



Universidad  
Zaragoza

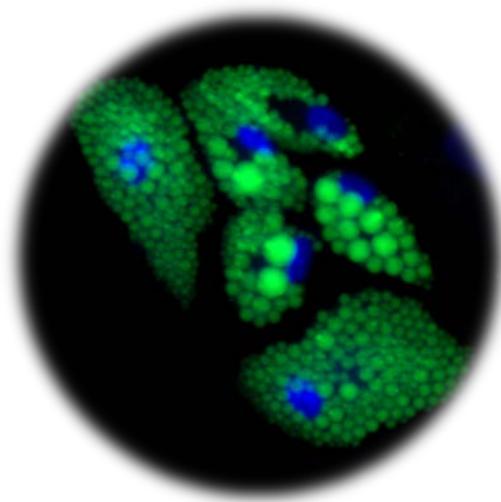


## Trabajo Fin de Grado

# Papel del sistema de fosforilación oxidativa en la diferenciación a adipocito

---

## Oxidative phosphorylation system's role in adipogenic differentiation



Autor

David Giraldos Jiménez

Directores

Eduardo Ruiz Pesini  
Laura Llobet Sesé

Facultad de Ciencias  
Grado en Biotecnología  
Curso 2015-2016



**Universidad  
Zaragoza**

**Facultad de Veterinaria  
Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular y Celular  
Miguel Servet, 177  
50013-Zaragoza**

## **A QUIEN PUEDA INTERESAR:**

Laura Llobet Sesé y Eduardo Ruiz Pesini, directores del trabajo fin de grado (TFG) realizado en nuestro Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria por D. David Giraldo Jiménez, consideramos que dicho estudiante cuenta con los conocimientos necesarios para defender el TFG titulado “Papel del sistema de fosforilación oxidativa en la diferenciación a adipocito”.

Zaragoza, 22 de Junio de 2016

Laura Llobet Sesé  
Becaria FIS

Eduardo Ruiz Pesini  
Investigador ARAID

# ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
I.	ABSTRACT .....	1
II.	INTRODUCCIÓN .....	2
1.	El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).....	2
2.	Diferenciación adipogénica .....	3
3.	OXPHOS y la diferenciación celular.....	4
4.	Modelo celular .....	4
5.	Efecto en la diferenciación de los xenobióticos que actúan sobre OXPHOS .....	5
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO.....	7
1.	Hipótesis inicial.....	7
2.	Objetivo .....	7
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
1.	Línea Celular.....	8
2.	Medios de cultivo y reactivos generales .....	8
3.	Instrumentación.....	9
4.	Cultivo y diferenciación .....	9
5.	Determinaciones bioquímicas .....	11
6.	Análisis estadísticos .....	13
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
1.	Efecto de los xenobióticos sobre OXPHOS.....	14
2.	Efecto de los xenobióticos sobre la viabilidad celular.....	15
3.	Diferenciación adipogénica del modelo celular .....	16
4.	Efectos sobre la diferenciación adipogénica de los inhibidores del sistema OXPHOS...	17
VI.	CONCLUSIONES .....	23
VI.	CONCLUSIONS.....	23
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	24
VIII.	ANEXO .....	i

## **I. RESUMEN**

La alta prevalencia en la sociedad actual de la obesidad y sus patologías asociadas genera un foco de interés sobre las investigaciones en torno al tejido adiposo. Este interés se ha visto incrementado con los recientes descubrimientos acerca de la influencia de determinados factores ambientales en la dinámica de dicho tejido, que pueden incluso desembocar en la aparición de fenotipos patológicos. El punto de mira recae, por tanto, en las células que constituyen el tejido implicado: los adipocitos. Estas células alcanzan su fenotipo a través de un conjunto de cambios morfológicos y de expresión génica que constituyen la diferenciación adipogénica. Dada la implicación en la diferenciación celular del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), una ruta metabólica energética de las mitocondrias, se ha decidido estudiar su papel en este mecanismo.

Para ello, se sometió a células hASC a las condiciones de diferenciación en ausencia y en presencia de un factor ambiental concreto: diferentes xenobioticos inhibidores del sistema OXPHOS. Los compuestos elegidos fueron rotenona (10 nM), antimicina A (10 nM) y oligomicina (16 nM), y cada uno se ensayó por separado. Los resultados obtenidos muestran que impedir el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS durante el proceso de diferenciación adipogénica repercute en ella, alterándola respecto al proceso natural.

## **I. ABSTRACT**

The high prevalence of obesity and related pathologies in current society has focused a point over researches about the adipose tissue. This interest has been increased due to the recent discoveries of environmental factors which can influence on adipose tissue dynamics, and may even result in pathological phenotypes. Therefore, the target spotlight the cells that form the implicated tissue: the adipocytes. These cells get their phenotype through several morphological and epigenetic changes which constitute the adipogenic differentiation process. Due to the implication in the cell differentiation process of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), an energetic metabolic mitochondria pathway, it has been chosen to study its role in this molecular mechanism.

So that, hASC cells were exposed to differentiation conditions in absence and presence of a specific environmental factor: different OXPHOS system xenobiotics inhibitors. The chosen compounds were rotenone (10 nM), antimycin A (10 nM) and oligomycin (16 nM), each one of them separately assayed. The obtained results show that disrupting OXPHOS well-made function, during the adipogenic differentiation process, has an effect on it, modifying natural process relation.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. El sistema de fosforilación oxidativa

Las mitocondrias son unos orgánulos intracelulares que debido a su origen procariótico (endosimbiosis de una  $\alpha$ -proteobacteria) constan de una doble membrana [1]. Esas dos membranas distintas y funcionales son: una membrana externa que rodea a una membrana interna, la cual al tener más superficie se repliega sobre sí misma formando las conocidas como crestas mitocondriales [2].

El espacio comprendido entre ambas se denomina espacio intermembrana, y el delimitado por la membrana interna se denomina matriz mitocondrial [1], [2]. Dicha matriz alberga un genoma circular, el DNA mitocondrial (mtDNA). Este genoma, de herencia exclusivamente materna [1], ha sido evolutivamente reducido por transferencia de genes al núcleo hasta contener únicamente 37 genes. Estos genes restantes codifican 22 RNAs de transferencia (tRNAs), 2 RNAs ribosómicos (rRNAs) y 13 cadenas polipeptídicas [2].

Estos orgánulos son conocidos principalmente por su papel en la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa o sistema OXPHOS, una ruta metabólica clave para el metabolismo productor de energía en las células de los organismos aeróbicos [2]. Esta ruta tan importante tiene lugar en un espacio concreto de la mitocondria, las crestas de la membrana mitocondrial interna (*Figura 1*) [2], donde se encuentran alojados los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (o cadena transportadora de electrones) y la ATP sintasa [3].

La cadena respiratoria mitocondrial se compone de una serie de transportadores electrónicos (*Figura 1*), proteínas integrales organizadas en complejos supramoleculares (CI-IV). Cada uno de ellos es capaz de catalizar secuencialmente la transferencia electrónica a través de una porción de la cadena [3].

La secuencia que siguen los electrones procedentes de la oxidación de los nutrientes de la dieta a través de dicha cadena es: NADH deshidrogenasa (CI), Coenzima Q, Ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa (CIII), Citocromo c, Citocromo oxidasa (CIV) y finalmente el oxígeno de la respiración actúa como aceptor reduciéndose a agua (*Figura 1*). La energía liberada durante el transporte de electrones permite el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando así un gradiente electroquímico. La energía contenida a su vez en este gradiente es utilizada para generar calor y energía en forma de ATP mediante el paso de protones de vuelta a la matriz a través del canal protónico de la ATP sintasa (también conocida como CV) [3].

Los cinco complejos que forman parte de OXPHOS están codificados mayoritariamente por el genoma nuclear (en el caso de CII, la enzima Succinato deshidrogenasa, únicamente por él), pero los 13 polipéptidos codificados por el mtDNA son subunidades de los cuatro complejos restantes (*Figura 1*) [1]–[3].

Por tanto, debido a su localización, a sus particularidades genéticas y a su implicación en la síntesis de la cadena respiratoria mitocondrial, el mtDNA resulta crucial para la correcta función de OXPHOS [2] y a la vez un condicionante para ciertas patologías. Esto último se debe a que determinadas alteraciones en el mtDNA hacen que el organismo sea propenso a sufrir los efectos de determinados xenobióticos [1], [4].

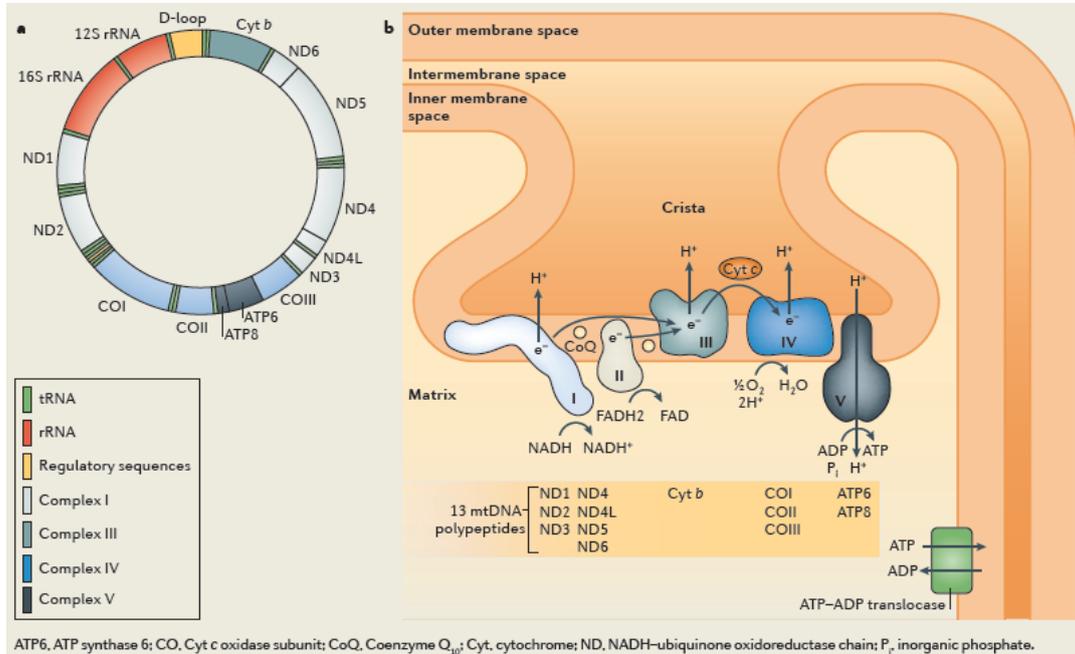


Figura 1. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y el genoma mitocondrial humano (mtDNA). Tomada de [2]. a) Genes codificados por el mtDNA y sus productos. b) Disposición de los complejos de la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial y la secuencia de transporte de los electrones. Tanto en a) como en b) se indican las subunidades de cada complejo codificadas por el mtDNA.

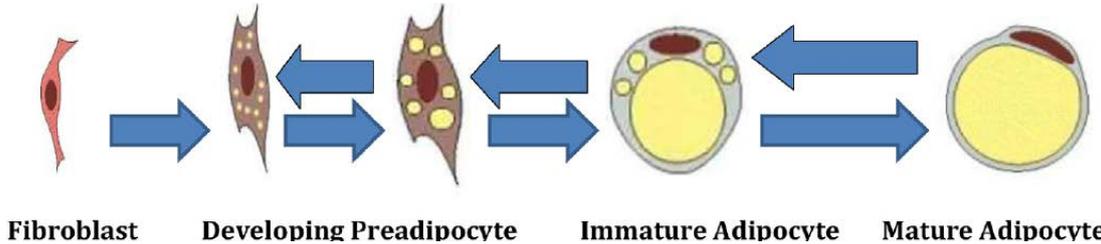
Para terminar en lo que respecta a la mitocondria, aunque se ha dicho que es la más conocida, la función de OXPHOS no se limita únicamente a la producción de energía a través de la síntesis de ATP. Este sistema también juega un papel importante en otros eventos celulares como la muerte celular programada [1], la contribución en respuestas frente a distintos estreses (como por ejemplo el oxidativo) [1], la intervención en la inmunidad innata [2], o la diferenciación celular [5].

## 2. Diferenciación adipogénica

La diferenciación adipogénica o adipogénesis es el proceso de desarrollo en el cual una célula mesenquimal indiferenciada termina diferenciándose en un adipocito. Este proceso consta de una serie de estadios definidos a lo largo de los cuales se suceden los cambios de expresión génica y de la morfología celular que determinan el fenotipo final (Figura 2) [6].

Entre esos cambios de expresión génica se requiere la activación de numerosos factores de transcripción, como el receptor  $\gamma$  activado por el proliferador peroxisomal (PPAR- $\gamma$ ) y la proteína de unión al CCAAT/enhancer (C/EBP) [6].

En cuanto a los cambios morfológicos que tienen lugar en las células (*Figura 2*), consisten principalmente en el paso de una forma de tipo fibroblasto a una casi esférica debido a la aparición gradual de gotas de grasa intracelulares. Esa grasa acumulada además al llegar a los últimos estadios termina desplazando el núcleo contra la membrana plasmática en el anillo del escaso citoplasma restante [6].



*Figura 2. Diferenciación adipogénica. Tomada de [6]. Conjunto de cambios morfológicos producidos a lo largo de la diferenciación. Las flechas indican la posible reversión entre estadios.*

Los adipocitos resultantes de la diferenciación son los principales constituyentes del tejido adiposo, un tejido clave en el control del metabolismo corporal. No solo regula el balance de energía (almacenamiento y movilización de triacilglicéridos), sino que también ejerce como un órgano endocrino (secreción de lípidos y factores proteicos como por ejemplo las adipocinas) [6].

En los últimos años el tejido adiposo ha despertado un alto interés por la alta prevalencia de la obesidad y patologías asociadas (tales como diabetes, hipertensión, etc.) en la sociedad actual [7], así como por los resultados de estudios recientes que indican que la exposición ante diversos factores ambientales externos pueden afectar a la capacidad de las células para llevar a cabo esta diferenciación [6].

### 3. OXPHOS y la diferenciación celular

La diferenciación celular se vincula con la función OXPHOS por evidencias tales como que la inducción de la diferenciación está acompañada por un incremento en el número de copias de mtDNA, en los niveles de polipéptidos codificados por el mtDNA, en la tasa de consumo de oxígeno y en el ATP intracelular [5].

Todas estas evidencias sugieren que en la diferenciación se desencadena un proceso de biogénesis mitocondrial y un aumento de su actividad metabólica. Esto conlleva una transición en la forma de producción de energía, desde la glicolisis inicial en las células sin diferenciar hasta la fosforilación oxidativa, que proporciona más energía. Por tanto, la propia función de OXPHOS es también importante para la dinámica de los tejidos [5].

### 4. Modelo celular

Las células madre derivadas de tejido adiposo humanas (hASC) son células madre somáticas que residen en una gran variedad de tejidos (no sólo en la médula ósea, sino también en tejido adiposo, tendones, músculo esquelético, placenta, fluido amniótico, sangre del cordón umbilical, etc.). Estas células pueden diferenciarse en distintas progenies de múltiples linajes, incluyendo osteoblastos, condrocitos, hepatocitos y adipocitos [8], [9].

Según los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), las hASC tienen que ser adherentes al plástico cuando se cultivan en condiciones estándar, deben expresar una serie de antígenos de superficie específicos, y deben poder diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y adipocitos *in vitro* [10].

Además de esa gran capacidad de diferenciación, este tipo de células secretan factores proangiogénicos, inmunomoduladores y anti-apoptóticos [11]–[13]. En cuanto a su utilización, aparte de en estudios de diferenciación como en este caso, también pueden ser empleadas en ingeniería de tejidos y en potenciales aplicaciones terapéuticas o clínicas [14].

## **5. Efecto en la diferenciación de los xenobióticos que actúan sobre OXPHOS**

Existe una gran cantidad de xenobióticos que interactúan con subunidades de los complejos del sistema OXPHOS y cuyos efectos sobre la dinámica celular siguen sin estar del todo esclarecidos. Por tanto, como ya se ha dicho antes, estas sustancias tóxicas con las que uno puede entrar en contacto en el ambiente pueden afectar a la capacidad proliferativa y al potencial de diferenciación de las células y, por tanto, a la dinámica tisular, pudiendo incluso llegar a causar la aparición de fenotipos patológicos.

Así por ejemplo, la teoría obesogénica sostiene que hay un conjunto de esos xenobióticos (como por ejemplo las organotinas, compuestos utilizados como biocidas [15]) que al provocar diferencias en la función OXPHOS promueven la diferenciación hacia la obesidad y otros síndromes metabólicos asociados [16].

Pero no todos los casos generan el mismo fenotipo. Como muestra de la situación contraria se encuentran algunos tratamientos terapéuticos, tales como antirretrovirales basados en análogos de nucleósidos, o antibióticos ribosomales. Los primeros inhiben la  $\gamma$ -polimerasa mitocondrial impidiendo la replicación del mtDNA y pueden causar lipoatrofia [17], mientras los segundos impiden la síntesis de las proteínas codificadas por el mtDNA y pueden disminuir la diferenciación adipogénica [4].

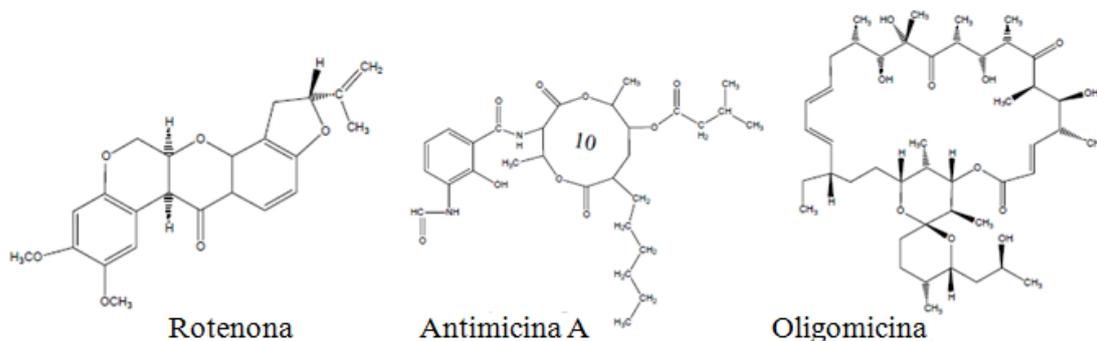
En general, estos compuestos suelen afectar a la mitocondria por su condición de origen bacteriano. Debido a ello la mitocondria todavía conserva algunos rasgos similares a los microorganismos patógenos, que son el verdadero objetivo de los tratamientos (ya sean terapéuticos o de otra índole). Un ejemplo de esto son antibióticos ribosomales tales como Cloranfenicol o Linezolid, que además de a los ribosomas procariotas también se unen a la subunidad mayor de los ribosomas mitocondriales impidiendo su función [18].

No hay que olvidar tampoco que además el mtDNA influye, ya que según el haplotipo un individuo puede estar más predispuesto o ser más susceptible a sufrir el efecto patológico, como es el caso mencionado antes de la lipoatrofia causada por los antirretrovirales [17].

Hechos como estos resaltan dos cosas. La primera, es la relativa “facilidad” con la que uno podría entrar en contacto con estas sustancias potencialmente tóxicas, ya sea porque debido a su uso generalizado terminan siendo contaminantes ambientales (como las organotinas) o porque podría ser necesario consumirlas (como los tratamientos terapéuticos). La segunda, es la importancia de conocer cómo afectan ciertos xenobióticos a la dinámica celular, si es que lo hacen, ya que de lo contrario seguirán suponiendo un riesgo para la salud.

Entre los distintos xenobióticos que son actualmente objeto de estudio se encuentran los siguientes (*Figura 3*):

- Rotenona: obtenido a partir de las raíces de especies vegetales como *Derris* y *Lonchocarpus*, este metabolito comúnmente utilizado como pesticida es un inhibidor del complejo I. Se une irreversiblemente bloqueando el paso de los electrones a la ubiquinona. Como resultado, aumentan los niveles celulares de ROS y disminuyen los de ATP [19], [20].
- Antimicina A: este antibiótico producido por *Streptomyces kitazawensis* se une al sitio Qi del complejo III bloqueando la transferencia de electrones entre el citocromo b y el c. La inhibición del complejo III conlleva la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, incrementándose la producción de ROS y disminuyendo los niveles celulares de ATP [20], [21].
- Oligomicina: este antibiótico perteneciente a la familia de los macrólidos, producido por varias cepas distintas de *Streptomyces*, es un inhibidor del complejo V. Ejerce su efecto uniéndose de forma directa en la subunidad  $F_0$  de la ATP sintasa, de manera que impide el flujo de protones a través del canal. Como consecuencia disminuyen los niveles celulares de ATP [20], [22].



*Figura 3. Estructura química de los tres xenobióticos seleccionados para el estudio en este trabajo. Adaptada de [20].*

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO**

#### **1. Hipótesis inicial**

En la naturaleza existen cientos de xenobióticos que al inhibir la actividad enzimática de los complejos respiratorios afectan a la funcionalidad del sistema de fosforilación oxidativa. Por otro lado se sabe que la función de dicho sistema está implicada en el proceso de diferenciación adipogénica. La hipótesis de este trabajo consiste en que determinados compuestos que inhiban la función mitocondrial podrían por tanto afectar también a la adipogénesis.

#### **2. Objetivo**

El objetivo general del presente trabajo es estudiar y comparar la diferenciación adipogénica de las hASC tanto en ausencia como en presencia de los xenobióticos seleccionados (rotenona, antimicina A y oligomicina) en busca de diferencias significativas debidas al efecto de dichos compuestos químicos.

Para ello se ha dividido en los siguientes objetivos específicos:

1. Comprobar que los xenobióticos escogidos, a las concentraciones elegidas realmente afectan al sistema OXPHOS
2. Aprender a cultivar y diferenciar hASC a adipocitos
3. Diferenciar las hASC en presencia de los xenobióticos seleccionados
4. Estudiar el efecto de los xenobióticos sobre la diferenciación adipogénica de las hASC

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Línea Celular

En el presente trabajo se utilizaron las células StemPRO® Human Adipose-Derived Stem Cells de Invitrogen (células madre derivadas de tejido adiposo humanas o hASC), aisladas de tejido adiposo humano recolectado durante procedimientos de liposucción y criopreservadas como cultivo primario. En el laboratorio se dispone de diferentes líneas hASC procedentes de distintos donantes. En este trabajo se han utilizado concretamente las hASC-2, caracterizadas genéticamente en [4].

Este tipo de células conserva la capacidad de diferenciarse a múltiples fenotipos de células maduras *in vitro* (como condrocitos, osteocitos, etc.), aunque el fenotipo que interesa conseguir en este caso es el de adipocito.

### 2. Medios de cultivo y reactivos generales

#### Medios de cultivo

Los distintos medios de cultivo utilizados a lo largo del trabajo fueron preparados en el propio laboratorio, con los siguientes componentes:

- Crecimiento y mantenimiento de las células madre:
  - o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), glucosa 25 mM, Glutamax (Gibco 61965), 90 %.
  - o Suero Fetal Bovino (Sigma-Aldrich) 10 %.
  - o Piruvato Sódico (Sigma-Aldrich) 1 mM.
- Diferenciación adipogénica:
  - o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), glucosa 25 mM, Glutamax (Gibco 61965), 89 %.
  - o Suero Fetal Bovino (Sigma-Aldrich) 10 %.
  - o Piruvato sódico (Sigma-Aldrich) 1 mM.
  - o Dexametasona (Sigma-Aldrich) 1  $\mu$ M.
  - o Indometacina (Sigma-Aldrich) 200  $\mu$ M.
  - o 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich) 500  $\mu$ M.
  - o Insulina (10  $\mu$ g/ml), (Sigma-Aldrich).
- Xenobióticos de estudio:
  - o Rotenona (Sigma-Aldrich) 10 nM.
  - o Antimicina A (Sigma-Aldrich) 10 nM.
  - o Oligomicina (Sigma-Aldrich) 16 nM.

#### Reactivos generales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico o apto para biología molecular y cultivo celular en su caso. La mayoría de ellos proceden de las casas comerciales Sigma-Aldrich y Thermo Fisher.

### 3. Instrumentación

- Contador de células automático Countess Automated Cell Counter® (Invitrogen™).
- Lector de microplacas NOVOstar, BMG Labtech.
- Fluid Cell Imaging Station (Life Technologies).
- Oxígrafo de alta resolución Oroboros® Oxygraph-2k.
- Campana de flujo laminar Holten LaminiAir HB 2448.
- Incubador de células Nuair® DHD AutoFlow.
- Centrífuga para tubos Falcon Beckman Coulter Allegra™ X – 22, rotor Sx4250.
- Centrífuga Eppendorf MiniSpin® plus.
- Microscopio invertido con cámara acoplada, modelo DMIL (Leica).
- Contenedor de congelación “Mr.Frosty™” (ThermoScientific).

### 4. Cultivo y diferenciación

#### Condiciones de cultivo celular

Los soportes utilizados para el cultivo de este tipo celular, el cual crece de forma adherente, fueron placas de cultivo de 100 mm de diámetro y multiplacas de 6 y 12 pocillos. Se trabajó en campana de flujo laminar para mantener la esterilidad.

Los cultivos se mantuvieron siempre en condiciones de normoxia (20 % O<sub>2</sub>, en un incubador de células, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>), siendo renovado el medio de cultivo cada 2 - 3 días, ya sea el de crecimiento o el de diferenciación.

#### Procedimientos de cultivo celular

Las hASC almacenadas en nitrógeno líquido, se descongelaron y se sembraron. Para la descongelación se tomó el vial de células del tanque de N<sub>2</sub> líquido y éstas se resuspendieron en medio de cultivo a 37 °C. La suspensión celular resultante se sembró en una placa de cultivo adecuada y a las 24 horas se renovó el medio. A partir de ese momento el medio de cultivo fue renovado de forma periódica cada 2 - 3 días hasta tener las células en confluencia (inhibición por contacto), momento en el cual se procedió a tripsinizarlas.

Para ello, se lavaron con Tampón Fosfato Salino (PBS) los restos de medio de cultivo para evitar la inhibición de la tripsina por el Suero Fetal Bovino (FBS) y se incubaron las placas con la solución de tripsina TrypLE Express (Thermo Fisher) (1,5 ml/placa) durante 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se comprobó que las células hubieran pasado a estar en suspensión observándolas con el microscopio invertido y se recogieron en un volumen de medio de cultivo 3 veces mayor al utilizado de tripsina. Tras recogerlas en tubos Falcon se centrifugaron para obtener el pellet celular. Una vez obtenido puede destinarse a varios propósitos, lo más frecuente es para sembrar nuevas placas o para congelarlo y almacenarlo.

En el primer caso, sembrar nuevas placas supone hacer una duplicación, es decir, las células tripsinizadas y centrifugadas se resuspenden en el medio de cultivo utilizado y luego son distribuidas esta vez en dos o más placas de cultivo distintas según la cantidad de células que haya (previo conteo en el contador de células automático). La finalidad de esto es

prolongar la línea de cultivo y aumentar la cantidad de células durante las primeras fases del experimento. Cada una de esas duplicaciones se considera como un nuevo pase.

En cambio, si el pellet se destinaba a la congelación celular, éste tenía que ser resuspendido en medio de congelación: DMEM suplementado con 20 % FBS y 10 % Dimetilsulfóxido (DMSO), un compuesto que actúa como crioprotector. Para su almacenamiento se utilizaron criotubos resistentes al N<sub>2</sub> líquido (los cuales antes de ser introducidos en el tanque de N<sub>2</sub> líquido se mantuvieron al menos 24 horas en el contenedor de congelación a – 80 °C), y la cantidad de células congeladas por vial fue de  $1 \cdot 10^6$  aproximadamente.

#### Establecimiento de un pool de células

Los primeros días de trabajo se dedicaron principalmente al cultivo de las hASC para poder establecer una pequeña colección de células de varios pases, con la que poder trabajar durante el desarrollo del proyecto y que sirviera de reservorio ante cualquier imprevisto que obligase a repetir o volver a empezar.

Las células utilizadas se encontraban inicialmente en el pase 5. Conforme las placas de cultivo se encontraban aproximadamente a un 80 % de confluencia se doblaban y hacían nuevos pases. Finalmente se congelaron 4 criotubos de hASC en nitrógeno líquido, correspondientes a pase 6 y pase 7.

#### Diferenciación adipogénica en presencia de xenobióticos

Para llevar a cabo los experimentos, se descongeló un criotubo correspondiente a pase 6 con el que se sembraron dos placas de cultivo de 100 mm. Los 10 días siguientes se dedicaron a conseguir una cantidad adecuada de células para poder empezar las diferenciaciones haciendo dos nuevos pases (de dos placas se pasó a tener 3, y de 3 se duplicaron a 6). Una vez alcanzada la confluencia en las seis placas (de pase 8), las células se tripsinizaron, centrifugaron y resuspendieron para poder sembrar las seis placas de pocillos sobre las que se realizaron posteriormente las diferenciaciones.

Por un lado se sembraron 3 placas de 6 pocillos, para una vez finalizada la diferenciación recoger por separado el sobrenadante y los pellets celulares, para testar leptina y triglicéridos (marcadores adipogénicos) respectivamente. Por otro lado, se sembraron 3 placas de 12 pocillos, para cuantificar gotas lipídicas intracelulares mediante un colorante lipofílico llamado Nile Red (marcador adipogénico) una vez terminada la diferenciación.

Una vez las células alcanzaron la mayor confluencia posible se procedió a sustituir el medio de crecimiento por el medio de diferenciación. Para cada xenobiótico se preparó una placa de seis pocillos y otra de 12 pocillos, con las siguientes distribuciones:

- En las placas de 6 pocillos, la primera fila se dejó como células control (medio de diferenciación) y la segunda fila se dejó en presencia del xenobiótico que correspondiera (medio de diferenciación + xenobiótico).
- En las placas de 12 pocillos, las dos primeras columnas se dejaron como células control (medio de diferenciación), mientras que la tercera y cuarta columna se dejaron en presencia del xenobiótico que correspondiera (medio de diferenciación + xenobiótico)

A partir de ese momento el medio de diferenciación (con o sin xenobiótico según los pocillos) se fue renovando cada 48 - 72 horas durante las tres semanas siguientes (tiempo que dura el protocolo de diferenciación establecido) hasta la finalización del experimento.

Al final del experimento se contaron las células presentes en cada uno de los pocillos, con el fin de comprobar que los distintos xenobióticos no afectaban a la viabilidad celular. Para realizar el conteo primero fue necesario recoger los sobrenadantes y tripsinizar las células. Se tomó una alícuota de 10 µl de las células en suspensión y se mezcló con una del mismo volumen de azul Tripan. Este colorante determina la viabilidad de los cultivos por exclusión de captación, ya que sólo penetra en aquellas células cuya membrana está dañada, tiñéndolas de azul.

La mezcla resultante se distribuyó entre las dos cámaras de Neubauer del portaobjetos del contador de células automático, y se procedió a contarlas en dicho instrumento. El conteo, además de para la viabilidad celular también se utiliza para referir los resultados de los marcadores de adipogénesis al número de células presentes.

Tras el conteo, el resto de células se centrifugaron. Tanto los pellets celulares obtenidos como los sobrenadantes anteriormente recogidos se almacenaron a - 80 °C para posteriormente medir sobre ellos parte de los marcadores de adipogénesis.

## **5. Determinaciones bioquímicas**

### Medida del consumo de oxígeno en presencia de xenobióticos

El consumo de oxígeno se midió con un oxígrafo de alta resolución que utiliza electrodos muy sensibles y minimiza la difusión de oxígeno. Se basa en el principio básico de la respirometría: una muestra celular en una cámara cerrada consume el oxígeno haciendo disminuir la concentración del mismo, de manera que si se representa el descenso frente al tiempo se obtiene la velocidad de consumo de oxígeno. El oxígrafo se encuentra acoplado a un software avanzado (DatLab4), el cual informa simultáneamente de las velocidades de consumo de oxígeno y la estabilidad de la señal del mismo, y es utilizado para la adquisición y análisis de datos.

Para esta técnica se utilizaron células hASC sin diferenciar de pase 7 en crecimiento exponencial. Se tripsinizaron, se centrifugaron y se contaron. El pellet celular se diluyó en 2 ml de medio DMEM sin FBS para evitar burbujas y se introdujeron en las dos cámaras de las que dispone el oxígrafo. Éstas se cerraron y se esperó a que se estabilizara el flujo de oxígeno, obteniéndose de esa forma el valor de respiración endógena.

Una vez llegados a ese punto se añadió en cada cámara un xenobiótico distinto: rotenona y antimicina A, ambas a una concentración de 10 nM. Se esperó de nuevo a que se estabilizara el flujo de oxígeno para obtener el valor de la respiración inhibida. Se realizó un único experimento para cada caso, ya que se trataba de una medida a nivel cualitativo. En cuanto a la oligomicina, esta medida no se realizó debido a la existencia de material bibliográfico del departamento aprovechable.

## Marcadores de adipogénesis

Los marcadores elegidos han sido: la leptina, una adipoquina producida y secretada por los adipocitos diferenciados; los triglicéridos, moléculas lipídicas generadas durante la adipogénesis; y las gotas lipídicas, estructuras formadas durante la adipogénesis para almacenar la grasa generada. En los tres casos la medición, ya sea colorimétrica o de fluorescencia, se realiza con el lector de microplacas.

- Leptina: El kit ELISA de leptina humana de Abcam es un ensayo *in vitro* para la medida cuantitativa de dicha adipoquina, ya sea en suero, plasma o en el propio sobrenadante de los cultivos celulares. Este ensayo utiliza un anticuerpo específico para la leptina humana inmovilizado en el soporte de una placa de 96 pocillos.

Tanto los estándares utilizados para la recta patrón (entre 1,64 y 400 pg/ml) como las muestras de sobrenadante se pipetea en los pocillos, y la leptina presente en cada caso queda fijada a ellos a través del anticuerpo localizado en el fondo de cada uno. Tras incubar overnight a 4 °C y lavar los pocillos se añade un segundo anticuerpo, en esta ocasión uno biotinilado anti-leptina humana, y se deja incubar una hora, a partir de aquí a temperatura ambiente.

Una vez se elimina el anticuerpo no unido, se pipetea una solución de estreptavidina conjugada a la enzima HRP (peroxidasa de rábano) y se incuba 45 minutos. Los pocillos se lavan de nuevo y finalmente se añade el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), de manera que durante los 30 minutos de incubación se desarrolla la reacción colorimétrica de forma proporcional a la cantidad de leptina unida.

La solución stop produce el cambio de color de azul a amarillo, llevándose a cabo posteriormente la medida de intensidad a 450 nm. Las muestras, procedentes de 3 experimentos independientes, se midieron por duplicado. Los resultados se expresan como pg/ml.

- Cuantificación de triglicéridos: El kit para la detección de Adipogénesis de Abcam es un ensayo *in vitro* para la medida cuantitativa de triglicéridos en muestras de tejido o de cultivos celulares (preadipocitos humanos). Este ensayo utiliza la acción sucesiva de varias enzimas. Primero, las muestras se resuspenden con la solución de extracción de lípidos para conseguir la liberación al medio de los triglicéridos a detectar. Luego, tanto los estándares (entre 40 y 200  $\mu$ M) como las muestras procesadas se pipetea en los pocillos correspondientes de la placa de 96 pocillos.

Tras una breve incubación de 10 minutos con la lipasa, enzima que metaboliza los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos, se añade la mezcla de reacción y se deja incubar durante media hora a 37 °C. Esta mezcla contiene entre otras cosas la enzima que oxida el glicerol anteriormente producido, y la sonda que gracias a ese proceso redox posibilita la detección al conferir una coloración rojiza proporcional a la cantidad inicial de triglicéridos. Finalmente la medida de intensidad colorimétrica se realiza por tanto a 570 nm. Las muestras, procedentes de 3 experimentos independientes, se midieron por duplicado. Los resultados se expresan como  $\mu$ M.

- Cuantificación de gotas lipídicas intracelulares: mediante el colorante hidrofílico Nile Red, que en un ambiente hidrofóbico pasa a ser fluorescente. Puede utilizarse para determinar la acumulación de triglicéridos en forma de gotas intracelulares como marcador de la diferenciación a adipocito.

Una vez finalizado el tiempo de la diferenciación (3 semanas), se vacían los pocillos de las placas de 12 pocillos y se lavan las células con 1 ml de PBS. Después, se añade a cada pocillo 1 ml de Nile Red diluido 1/100 con PBS. Tras una incubación de 15 minutos se procede a leer la placa en el fluorímetro, midiendo la fluorescencia a 485 nm de excitación y 572 nm de emisión. Se midieron 6 pocillos independientes para cada condición. Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia (RFU).

Además de cuantitativamente, las gotas lipídicas pudieron visualizarse en la estación de imagen Fluid. Para poder distinguir las células no diferenciadas, y que por tanto no mostrarían ninguna señal de fluorescencia, se realizó una tinción nuclear con el fluorocromo Hoechst.

## **6. Análisis estadísticos**

Para llevar a cabo todos los análisis estadísticos se ha utilizado el programa informático StatView 6.0. Para cada conjunto de datos se han calculado los valores medios y la desviación estándar. Mediante la prueba t de Student desapareada se han comparado y estudiado estadísticamente los distintos parámetros. Los *p*-valores menores a 0,05 se consideran estadísticamente significativos (\*). Las representaciones gráficas se han elaborado con el propio software del programa.

## V.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Efecto de los xenobióticos sobre OXPPOS

En primer lugar se determinó la concentración adecuada con la que trabajar para cada uno de los xenobióticos a estudiar. Debe tratarse de concentraciones muy bajas, con la intención de simular valores que puedan llegar a darse en sangre en los casos de exposición a estos contaminantes ambientales, pero que sean suficientes como para inhibir el sistema OXPPOS.

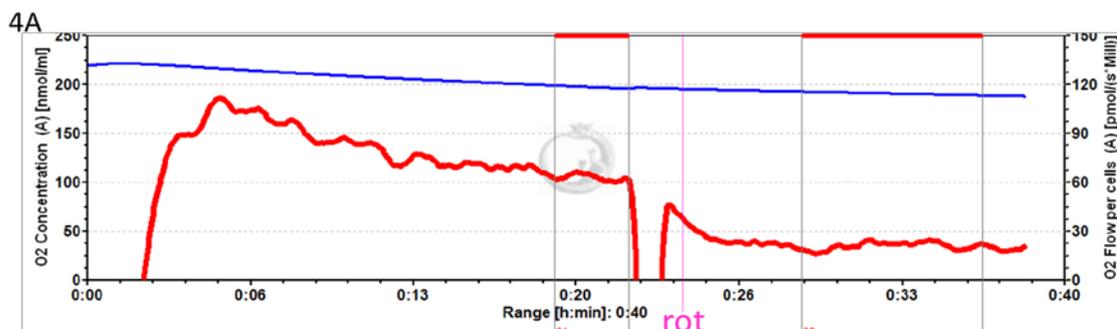
Para ello, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de varios de los estudios realizados durante la última década en los que emplearon alguno de los xenobióticos seleccionados en relación a la diferenciación adipogénica. Los datos recogidos se encuentran en la *Tabla 1*, la cual se puede consultar en el Anexo. En ella, además, se encuentran recopilados otros parámetros y condiciones de ensayo (tipo celular, tiempo de exposición al xenobiótico, efectos, etc.) que se comentarán a lo largo de la discusión.

Por tanto, los rangos utilizados por otros laboratorios sirvieron de base para llegar a la decisión final. En el caso de la rotenona y la antimicina A, la concentración elegida para ambos casos fue 10 nM. En cuanto a la oligomicina, dado que ya se había utilizado en el laboratorio del departamento con el mismo tipo celular [4], se optó por usar la misma concentración, 16 nM.

Una vez establecidas las concentraciones, se decidió comprobar su efecto inhibitorio sobre el sistema OXPPOS en nuestras células hASC no fuera a ser que se tratara de concentraciones demasiado bajas.

El experimento consistió en un análisis a nivel cualitativo del consumo de oxígeno por parte de las células, en el que se comparó la respiración endógena en ausencia de los compuestos, y la posterior respiración una vez añadidos los xenobióticos.

En el caso de la rotenona y la antimicina A, el cambio producido se puede observar en la *Figura 4*. En efecto, el consumo de oxígeno (línea roja) se redujo a menos de la mitad al adicionar cada una de las drogas, al verse afectada la cadena de transporte mitocondrial.



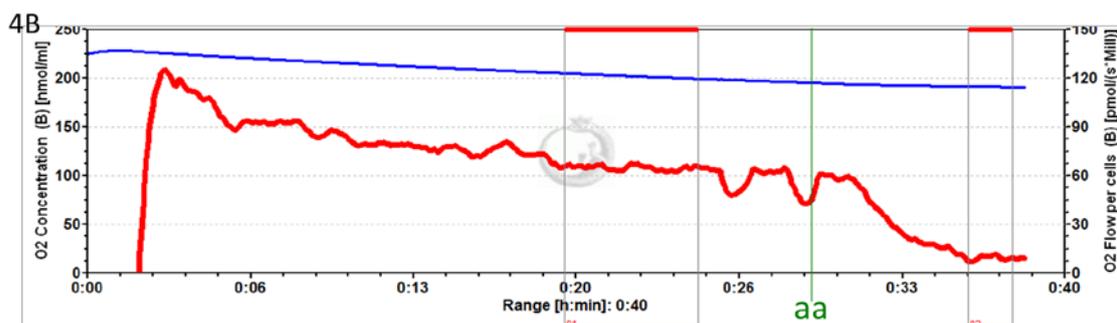


Figura 4. Evolución del oxígeno consumido por las células hASC. Línea azul: concentración de oxígeno en la cámara. Línea roja: consumo de oxígeno en la cámara. Primer segmento (01): respiración endógena. Segundo segmento (02): respiración inhibida, una vez estabilizada tras la inyección del xenobiótico (momento representado por una línea vertical). A) Rotenona (rosa). B) Antimicina A (verde).

Con respecto a la oligomicina, en los trabajos previos del departamento/laboratorio ya se había comprobado su efecto inhibitorio a la concentración de 16 nM en hASC [4], cuyos resultados pueden consultarse en la *Figura adicional 1*, en el Anexo.

## 2. Efecto de los xenobióticos sobre la viabilidad celular

Tras ver que las concentraciones de xenobióticos elegidas inhibían el sistema OXPHOS, se quiso comprobar que éstas no afectaban a la viabilidad celular de las hASC. Por ello, una vez finalizado el período de tres semanas de diferenciación, se procedió a contar las células presentes en cada una de las placas, para así también poder normalizar más adelante los resultados de los marcadores adipogénicos frente al número de células vivas.

La media de los contajes realizados se muestra en la *Figura 5*. Como puede apreciarse, la presencia de los xenobióticos no ha resultado tóxica para las células, ya que no han afectado, de forma significativa, a la viabilidad celular respecto a los controles sin droga.

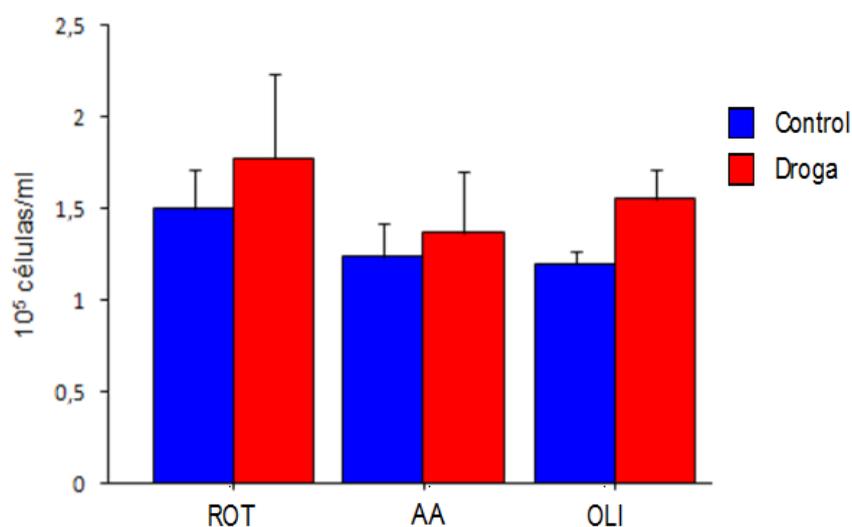
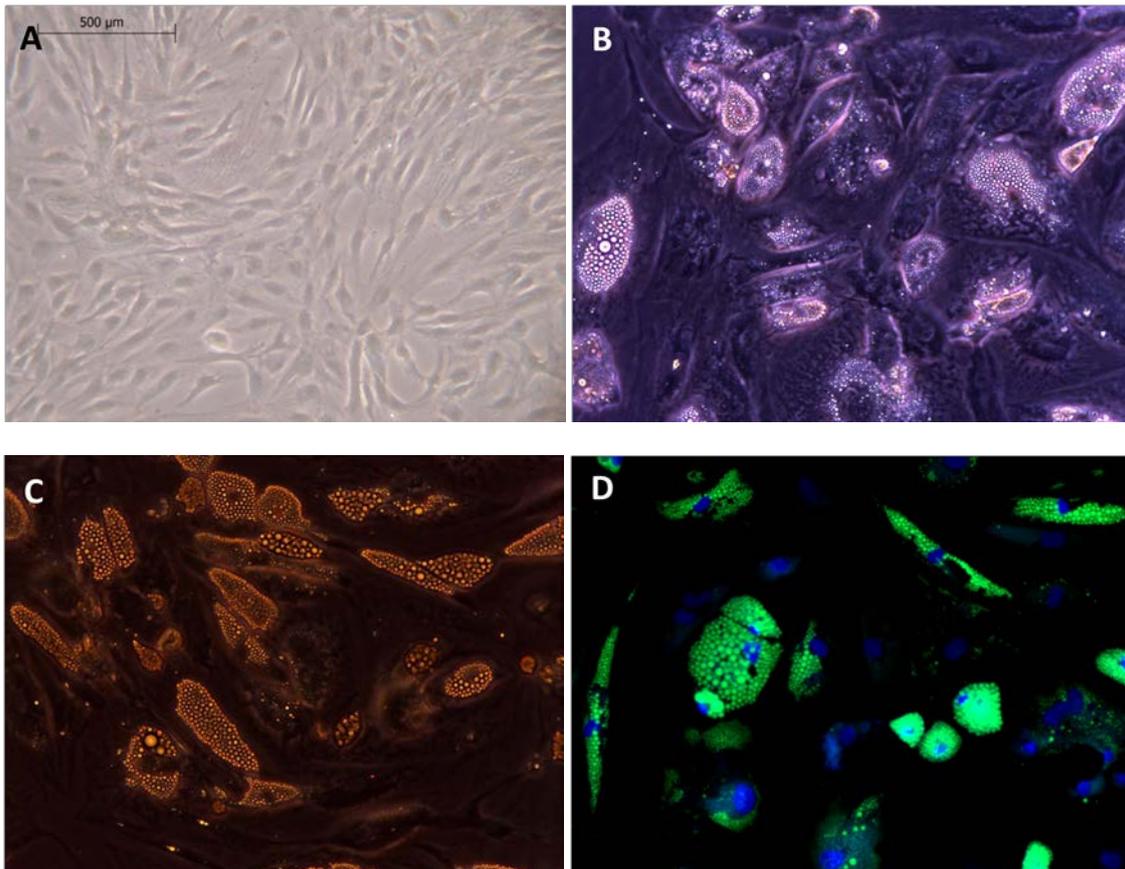


Figura 5. Número de células vivas.

### 3. Diferenciación adipogénica del modelo celular

A lo largo de las tres semanas de diferenciación *in vitro* se pudo observar mediante visualizaciones al microscopio invertido que ésta transcurría con éxito en las células control, debido a la aparición progresiva de gotas lipídicas en el citoplasma de las células.

La progresión de dicho fenómeno, el más apreciable a simple vista de la adipogénesis, queda reflejada en la *Figura 6*. En dicha figura se puede ver cómo, a la mitad del tiempo de tratamiento, ya han ido formándose pequeñas gotas en varias células (en algunos casos en cantidad considerable), mientras que al final del mismo aquellas células que han respondido al medio de diferenciación presentan mayor presencia de ellas y de mayor tamaño.



*Figura 6. hASC sin diferenciar y diferenciadas a adipocito durante 3 semanas. Imágenes de microscopio invertido a 20X. A) Sin diferenciar. B) tras 10 días de cultivo con el medio de diferenciación. C) tras 21 días. Imágenes de estación de imagen Fluid. D) tras 21 días, teñidas con Nile Red (gotas lipídicas en verde) y Hoechst (núcleos en azul)*

Respecto a la morfología, aunque en general han alcanzado un tamaño mayor al de las células sin diferenciar, no todas las células que presentan grasa acumulada han adoptado una forma más esférica. En esos casos contienen gotas lipídicas pero siguen manteniendo un aspecto que recuerda al fibroblasto, al ser alargadas y estrechas en vez de redondeadas.

Por lo tanto, algunos autores denominarían a estas células preadipocitos o adipocitos inmaduros, ya que se sabe que los adipocitos maduros son redondeados y contienen una sola gota lipídica grande rodeada de un fino anillo citoplasmático [6].

Considerando estos resultados, se puede afirmar que, al menos morfológicamente, se ha conseguido con éxito la diferenciación adipogénica de las células hASC utilizadas. Además, se midieron otros parámetros de diferenciación como la secreción de leptina y la cantidad de triglicéridos acumulados, cuyos resultados serán mostrados detalladamente en apartados posteriores. Con respecto a la tasa de diferenciación, no se calculó cuantitativamente pero se pudo ver que era menor a la alcanzada (36,8 +/- 8,3 %) en otros trabajos realizados en el departamento [4].

Los hechos que podrían haber influido en este aspecto son varios. Para poder cuadrar el largo período de cultivo necesario, el protocolo de diferenciación se empezó antes de que las células hubieran alcanzado el porcentaje óptimo de confluencia. Este porcentaje suele ser bastante alto, y aunque es el punto de partida entre los distintos protocolos existentes no siempre es el mismo (por ejemplo, debe ser en torno al 80 % según el StemPro® Adipogenesis differentiation kit de Invitrogen™, pero según el Poietics™ human ADSCs – adipogenesis protocol de Lonza debe ser mayor o igual al 90 %). Por otra parte, el medio de diferenciación utilizado fue preparado personalmente, con los componentes descritos en materiales y métodos, en vez de usar uno comercial. Por lo tanto, su eficacia y por ende el porcentaje de diferenciación obtenido puede ser menor respecto a los medios comerciales, los cuales están estandarizados y optimizados para ese fin.

#### **4. Efectos sobre la diferenciación adipogénica de los inhibidores del sistema OXPPOS**

Una vez constatada la diferenciación de las células control, llega el momento de compararla con las células tratadas con los xenobióticos, para ver si han experimentado una mayor, igual o menor diferenciación. La comparación se realiza en base a los tres marcadores adipogénicos elegidos.

##### Leptina

Esta proteína pertenece a la familia de las adipoquinas, hormonas secretadas por el tejido adiposo [6]. Esta característica le convierte en un marcador perfecto de este tipo de diferenciación, puesto que a mayor tasa de diferenciación mayores niveles de leptina habrá en consecuencia, y viceversa. Además, esta proteína es secretada por las células, lo cual facilita su análisis, ya que solo hace falta recoger el sobrenadante de los cultivos y realizar un ensayo ELISA mediante el kit descrito en materiales y métodos.

En cuanto a los resultados, no se detectaron diferencias significativas con respecto a las células control para ninguno de los tres xenobióticos utilizados. Sin embargo, el aspecto más a tener en cuenta de estos resultados es su poca fiabilidad. La razón es que a la hora de realizar la medición no se pudo respetar el protocolo debido a problemas técnicos de la instrumentación utilizada. Por tanto, los resultados no se muestran y el experimento debería ser repetido en un futuro.

En todo caso, aunque se hubieran conseguido resultados significativos o simplemente de una fiabilidad aceptable, únicamente se habría podido comparar con trabajos previos el resultado de la oligomicina [4]. Respecto a los otros dos xenobióticos no hay mediciones de esta hormona adipocítica en la bibliografía consultada.

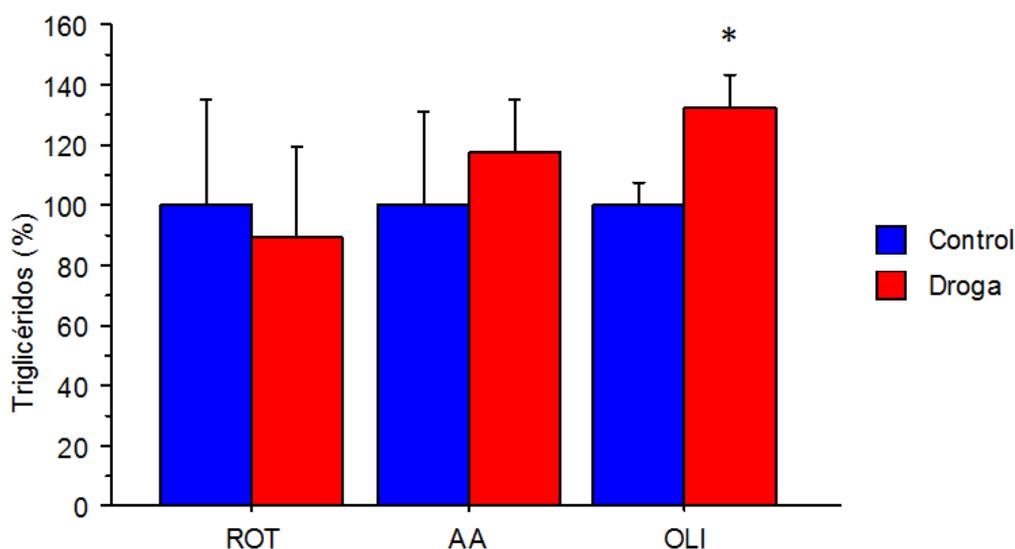
Los otros dos marcadores son los más característicos dado que corresponden a la función determinada para el fenotipo diferenciado: la reserva energética en forma de grasa [6]. Es por ello que son los parámetros principalmente determinados en otros estudios.

### Cantidad de triglicéridos

Se procedió a calcular de manera cuantitativa ( $\mu\text{M}$ ), gracias al kit enzimático de Adipogénesis de Abcam, la cantidad de triglicéridos almacenados por las células durante el proceso de diferenciación. Al contrario que con la leptina, aquí fue precisa la lisis celular para liberar el contenido.

Mientras que para la rotenona y la antimicina A no se producen variaciones significativas, las células diferenciadas en presencia de oligomicina 16 nM generaron una mayor cantidad de triglicéridos respecto a su control sin droga (*Figura 7*).

Esto concuerda con los resultados del trabajo realizado con la misma concentración en el departamento [4]. En dicho trabajo este mismo parámetro se veía aumentado significativamente, si bien los experimentos citados se realizaron con medio de crecimiento en vez de diferenciación, que es el empleado aquí.

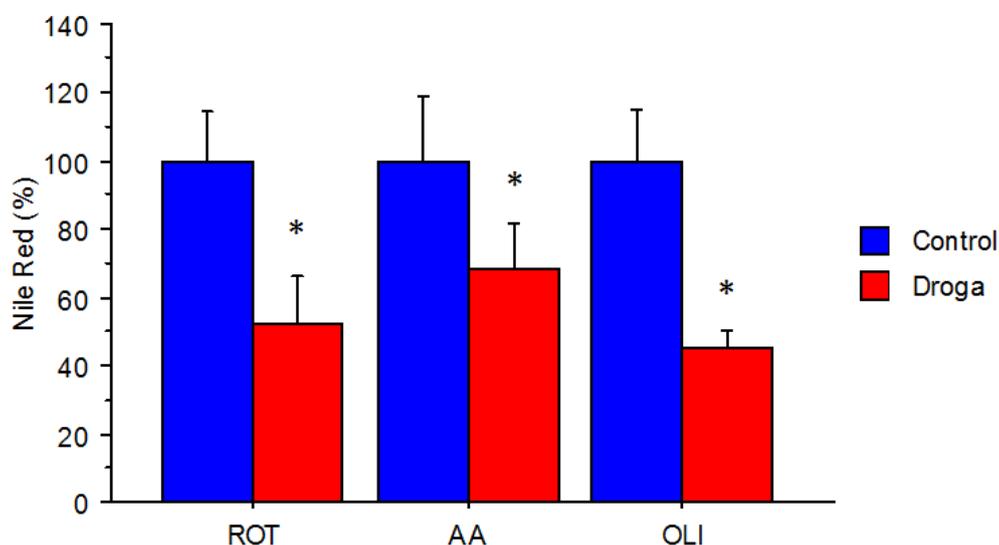


*Figura 7. Estudio de la diferenciación de las hASC en función de la cantidad de triglicéridos acumulados ( $\mu\text{M}$ ). Los resultados se han expresado como porcentajes, siendo el 100 % el valor del control. ROT: rotenona; control  $100 \pm 35,2$ ; droga  $89,3 \pm 30,1$ ;  $p=0,7093$ . AA: antimicina A, control  $100 \pm 30,9$ ; droga  $117,2 \pm 18,1$ ;  $p=0,4551$ . OLI: oligomicina, control  $100 \pm 7,6$ ; droga  $132,5 \pm 10,3$ ;  $*p=0,0118$ .*

### Nile Red

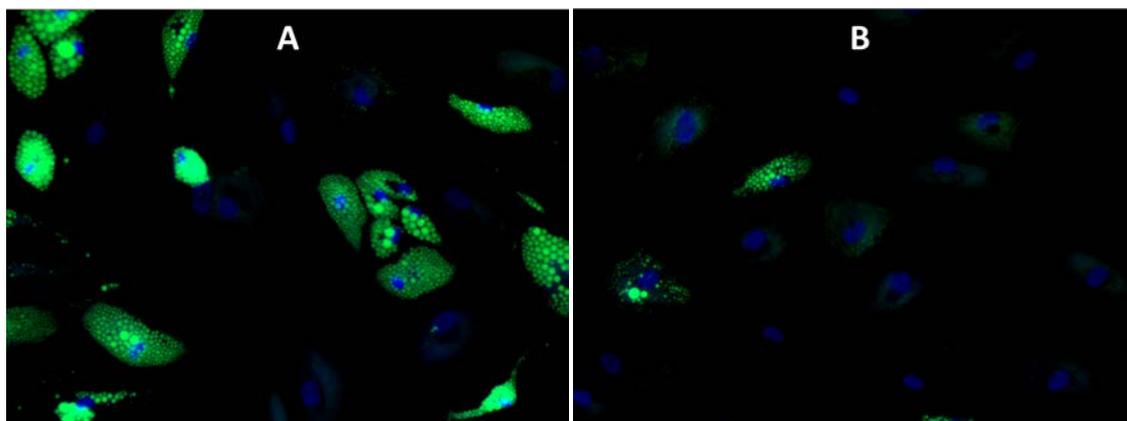
Consiste en una cuantificación de las gotas lipídicas presentes en las células, que captan el colorante lipofílico Nile Red, y cuya intensidad de fluorescencia puede medirse mediante un espectrofotómetro.

En contraste con los otros dos marcadores, los tres xenobióticos presentan cambios significativos. Más concretamente, su presencia en los cultivos a lo largo de todo el período de diferenciación ejerce un efecto inhibitorio, con un descenso considerable en la formación de las gotas lipídicas. Esa disminución se puede ver en la *Figura 8*.



*Figura 8. Estudio de la diferenciación de las hASC en función de la señal fluorescente del colorante Nile Red. Los resultados se han expresado como porcentajes, siendo el 100 % el valor del control. ROT: rotenona; control 100 ± 14,2; droga 52,7 ± 13,9; \*p=0,0002. AA: antimicina A, control 100 ± 19,1; droga 68,7 ± 12,8; \*p=0,0076. OLI: oligomicina, control 100 ± 15,3; droga 45,5 ± 4,8; \*p<0,0001.*

La tinción fluorescente, no sólo permite la cuantificación de las gotas, sino que además también ofrece la oportunidad de visualizarlas mediante un microscopio de fluorescencia. La *Figura 9* es un ejemplo de esto, en la que se puede comprobar, gracias a las capturas realizadas de las tinciones celulares en la estación de imagen Fluid, la menor diferenciación que se ha producido en los cultivos con el xenobiótico.



*Figura 9. Imagen de fluorescencia. En azul, los núcleos teñidos con Hoechst, para distinguir las células sin diferenciar. En verde las gotas lipídicas, debido a la tinción con Nile Red. A) Células (control) diferenciadas en ausencia de oligomicina B) Células diferenciadas en presencia de oligomicina.*

Tal y como se decía, en dicha figura se puede ver que entre las células diferenciadas en presencia del xenobiótico hay menor cantidad de ellas que presente fluorescencia verde, es decir, gotas lipídicas. Además, en esos casos las células son de menor tamaño y de menor intensidad debido a la menor cantidad de gotas y al menor tamaño de éstas.

Recapitulando, en base a este marcador, los tres inhibidores de OXPPOS inhibirían claramente la diferenciación. Sin embargo, eso supone una discrepancia con respecto a los marcadores anteriormente tratados que impide afirmar con rotundidad que ese sea el efecto producido por los xenobióticos.

#### Análisis en conjunto de los marcadores

Hasta ahora, se han ido analizando los resultados de cada marcador de manera individual, pero si se quiere llegar a resolver la hipótesis planteada, se precisa una visión más global. Evidentemente, lo ideal sería que para un xenobiótico en concreto, el efecto producido en sus tres marcadores fuera el mismo.

Sin embargo, entre los distintos resultados de este estudio el factor más repetido ha sido la falta de consistencia entre ellos, lo cual dificulta el análisis de los mismos y la determinación del efecto producido por los xenobióticos. Un aspecto que probablemente ha influido en parte en esa inconsistencia es el no tener más repeticiones de la realización de las técnicas. Esto habría aportado un mayor número de datos (mejora de la estadística) y una mayor experiencia a la hora de realizarlas (mejora de la calidad de los datos).

La discrepancia comentada se produce entre la cantidad de triglicéridos y la fluorescencia debida al Nile Red. Estos dos marcadores deberían en principio coincidir entre sí ya que están midiendo parámetros muy relacionados: la cantidad de grasa (triglicéridos) almacenada en el interior de las células diferenciadas y la cantidad de gotas lipídicas (que son los depósitos de grasa acumulada) presente en las células diferenciadas. Sin embargo, para los tres xenobióticos han sido diferentes entre ellos. En este aspecto en particular, no es la primera vez que se describen diferencias entre estos dos marcadores [23].

Los únicos resultados que han coincidido han sido la falta de diferencias en los niveles de leptina y triglicéridos de la rotenona y antimicina A. No obstante, hay que recordar que los resultados de la leptina suscitan desconfianza. Por tanto se van a dejar al margen a lo largo de este análisis. Además, estas inconsistencias no son algo único de este trabajo. Entre los distintos estudios utilizados como base y bibliografía, para un mismo xenobiótico se han descrito efectos opuestos.

Para ir dilucidando el efecto de cada xenobiótico y comparar con los antecedentes (las principales diferencias entre las condiciones de ensayo están recogidas en la *Tabla 1*, en el Anexo), lo mejor será ir por partes, empezando con la oligomicina. Con respecto a este xenobiótico, existía el precedente realizado en el propio departamento con las mismas células y el mismo tiempo de exposición (21 días) [4]. En aquel estudio, los tres mismos marcadores aquí empleados determinaron unánimemente un aumento de la diferenciación en presencia de la oligomicina. Aquí, en cambio, cada marcador supuso un resultado opuesto: la cantidad de triglicéridos aumentó, y la tinción de las gotas lipídicas disminuyó.

La diferencia en la realización entre un trabajo y otro es el medio sobre el que se añadió la oligomicina para el cultivo de las células. Mientras aquí fue medio de diferenciación, en el primero fue medio de crecimiento [4]. Esto explica el claro aumento obtenido en la diferenciación en ese caso, puesto que se está comparando con células sin diferenciar, mientras que aquí el control son células diferenciadas.

En otros datos publicados, concentraciones menores de oligomicina (8 nM), produjeron un aumento cuantitativo de los niveles de triglicéridos, pero las células (preadipocitos 3T3-L1 de ratón) no adquirían marcadores específicos de adipocitos [24]. Aunque en este caso hay más diferencias en cuanto a condiciones del ensayo (consultar *Tabla 1* en Anexo), en un principio podría parecer que estos resultados se corresponden más a los aquí obtenidos, ya que también se consigue un aumento de los triglicéridos. Sin embargo, a diferencia de lo aquí ocurrido, en aquel caso ese aumento estuvo apoyado por un aumento de la tinción de las gotas lipídicas [24].

En cuanto a la rotenona, la única variación significativa entre parámetros ha sido el descenso en la tinción de gotas lipídicas (Nile red). Esto ya había sido descrito para concentraciones menores (8 nM) sobre preadipocitos 3T3-F442A de ratón [25], y para mayores (100 nM) sobre el mismo tipo de células y en presencia de un medio de diferenciación similar [26]. En el caso que usaron una mayor concentración de rotenona, los resultados parecen concordar con los aquí obtenidos, pero al igual que la dosis el tiempo de exposición también fue distinto (7 días) [26].

En contraposición a estos dos últimos comentados, el mismo tipo celular empleado (hASCs) en presencia de concentraciones iguales (10 nM) experimentó un aumento de la diferenciación adipogénica [27]. En este caso, la diferencia podría deberse al empleo de medio de diferenciación para preadipocitos.

Con respecto a la antimicina A, al igual que con la rotenona, el único cambio significativo es el descenso en la tinción con Nile Red, lo que supondría una disminución de la diferenciación atendiendo a ese único marcador. Eso mismo ocurrió con preadipocitos de ratón (3T3-F442A) tratados con mayores cantidades de antimicina A (20 nM) [25], mientras que concentraciones similares a las aquí utilizadas (10 nM) provocaron un aumento de la adipogénesis o de alguno de sus marcadores en otros estudios [24], [27], [28].

En el primero de ellos, al igual que en el aumento de diferenciación causado por rotenona [27], fueron hASCs con medio de diferenciación de preadipocitos [27]. En los otros dos, las células fueron tratadas con un medio de diferenciación bastante diferente al utilizado en el resto de trabajos (ver *Tabla 1* en el Anexo), aunque solo se produjo el aumento cuantitativo de los niveles de triglicéridos [24], [28].

En definitiva, en ninguno de los tres xenobióticos estudiados se puede concretar un efecto específico en base a los resultados obtenidos en este trabajo, debido a la falta de consenso entre ellos. Aún así es evidente que afectan a la diferenciación. No hay más que ver el descenso producido en la cantidad de gotas lipídicas almacenadas en las células tratadas, hecho apoyado por las pruebas visuales que suponen las imágenes tomadas.

En cuanto a las diferencias en resultados respecto a la literatura, las comparaciones son difíciles porque en ningún caso coinciden todas las condiciones del ensayo (células, concentración del xenobiótico, medio utilizado, tiempo de exposición al xenobiótico, etc.). Como ya se ha dicho, esas diferencias están recogidas en la *Tabla 1* del Anexo. Lo que sí se ha podido observar es que determinadas elecciones en esas condiciones podrían influir en los resultados finales.

Por ejemplo, en los casos en los que se utiliza el medio de diferenciación de preadipocitos, un estadio más avanzado que el de las células aquí utilizadas (hASC), se obtiene un aumento de la diferenciación tras exponer las células a los xenobióticos. En otros casos como el antecedente del departamento [4], en el que se emplea medio de crecimiento, esa podría ser la causa del aumento en la diferenciación obtenido. Una explicación sería que como consecuencia de la presencia del xenobiótico (inhibidor de OXPHOS) en el medio de crecimiento, por el fallo de la cadena respiratoria y la menor tasa de respiración se produce hipoxia y un aumento de ROS. Estos hechos están contrastados que pueden promover la diferenciación [27]. Al tener como control células que no se han diferenciado en absoluto al estar también en medio de crecimiento, el resultado obtenido es que se consigue un aumento de la diferenciación. Por ese motivo, en el caso presente, y en los similares en los que han empleado medios de diferenciación muy parecidos [26], los resultados serían diferentes (respecto a ese tipo de circunstancias en concreto) ya que el control en estos casos sí que son células diferenciadas en perfectas condiciones.

Por último, no hay que olvidar en ningún momento de que estos son resultados *in vitro*, por lo que podría ser diferente a lo acontecido en el organismo *in vivo* cuando entre en contacto con estas sustancias.

## VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones alcanzadas en este trabajo han sido las siguientes:

Primera: se ha comprobado que los xenobióticos estudiados, a las concentraciones elegidas, inhiben el sistema OXPHOS.

Segunda: se ha conseguido la diferenciación adipogénica de las hASC.

Tercera: la presencia de los xenobióticos afecta a la diferenciación adipogénica, a raíz de las diferencias significativas entre los marcadores.

Cuarta: no se ha podido determinar con claridad cuál es el efecto concreto que producen los xenobióticos sobre la diferenciación adipogénica.

## VI. CONCLUSIONS

The achieved conclusions in this study have been the following:

First: it has been proved that the assayed xenobiotics, at the chosen concentrations, inhibit OXPHOS system.

Second: hASC adipogenic differentiation has been reached.

Third: seeing the significant differences between markers, the xenobiotics presence affects to the adipogenic differentiation.

Fourth: it has not been clearly possible to determine the precise effect of xenobiotics on the adipogenic differentiation.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Nunnari and A. Suomalainen, “Mitochondria: In sickness and in health,” *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1145–1159, 2012.
- [2] P. Mishra and D. C. Chan, “Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 10, pp. 634–46, 2014.
- [3] N. V. Dudkina, R. Kouřil, K. Peters, H.-P. Braun, and E. J. Boekema, “Structure and function of mitochondrial supercomplexes,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1797, no. 6–7, pp. 664–670, Jun. 2010.
- [4] L. Llobet, J. M. Toivonen, J. Montoya, E. Ruiz-Pesini, and E. Lopez-Gallardo, “Xenobiotics that affect oxidative phosphorylation alter differentiation of human adipose-derived stem cells at concentrations that are found in human blood,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 8, no. 11, pp. 1441–1455, Nov. 2015.
- [5] I. Martinez-Romero, S. Emperador, L. Llobet, J. Montoya, and E. Ruiz-Pesini, “Mitogenomics: Recognizing the Significance of Mitochondrial Genomic Variation for Personalized Medicine,” *Curr. Pharmacogenomics Pers. Med.*, vol. 9, no. 2, pp. 84–93, 2011.
- [6] A. T. Ali, W. E. Hochfeld, R. Myburgh, and M. S. Pepper, “Adipocyte and adipogenesis,” *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 92, no. 6–7, pp. 229–236, 2013.
- [7] A. De Pauw, S. Tejerina, M. Raes, J. Keijer, and T. Arnould, “Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 175, no. 3, pp. 927–39, 2009.
- [8] C.-T. Chen, Y.-R. V Shih, T. K. Kuo, O. K. Lee, and Y.-H. Wei, “Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.,” *Stem Cells*, vol. 26, no. 4, pp. 960–968, 2008.
- [9] E. Schipani and H. M. Kronenberg, “Adult mesenchymal stem cells,” in *StemBook*, 2008.
- [10] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.,” *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–7, 2006.
- [11] B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla, and A. Blancher, “Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells,” *Br. J. Haematol.*, vol. 129, no. 1, pp. 118–129, 2005.
- [12] J. Rehman, D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine, and K. L. March, “Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells,” *Circulation*, vol. 109, no. 10, pp. 1292–1298, 2004.
- [13] R. Yañez, M. L. Lamana, J. García-Castro, I. Colmenero, M. Ramírez, and J. a Bueren, “Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease.,” *Stem Cells*, vol. 24, no. 11, pp. 2582–2591, 2006.
- [14] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. A. Bunnell, “Adipose-derived stem cells for regenerative medicine,” *Circulation Research*, vol. 100, no. 9, pp. 1249–1260, 2007.

- [15] J. B. Graceli, G. C. Sena, P. F. I. Lopes, G. C. Zamprogno, M. B. da Costa, A. F. L. Godoi, D. M. dos Santos, M. R. R. de Marchi, and M. A. dos Santos Fernandez, "Organotin: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate," *Reprod. Toxicol.*, vol. 36, pp. 40–52, 2013.
- [16] F. Grün, *The Obesogen Tributyltin*, 1st ed., vol. 94. Elsevier Inc., 2014.
- [17] S. L. Hendrickson, L. A. Kingsley, E. Ruiz-Pesini, J. C. Poole, L. P. Jacobson, F. J. Palella, J. H. Bream, D. C. Wallace, and S. J. O'Brien, "Mitochondrial DNA haplogroups influence lipotrophy after highly active antiretroviral therapy," *J Acquir Immune Defic Syndr*, vol. 51, no. 2, pp. 111–116, 2009.
- [18] D. Pacheu-Grau, A. Gómez-Durán, M. J. López-Pérez, J. Montoya, and E. Ruiz-Pesini, "Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy," *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 33–39, Jan. 2010.
- [19] Y. T. Deng, H. C. Huang, and J. K. Lin, "Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling," *Mol. Carcinog.*, vol. 49, no. 2, pp. 141–151, 2010.
- [20] B. Miles, "Inhibitors & Uncouplers," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 52, pp. 1075–1085, 2003.
- [21] X. Ma, M. Jin, Y. Cai, H. Xia, K. Long, J. Liu, Q. Yu, and J. Yuan, "Mitochondrial Electron Transport Chain Complex III Is Required for Antimycin A to Inhibit Autophagy," *Chem. Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1474–1481, Nov. 2011.
- [22] S. Hong and P. L. Pedersen, "ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 4, pp. 590–641, Table of Contents, 2008.
- [23] E. J. O. Rourke, A. A. Soukas, C. E. Carr, and G. Ruvkun, "C. elegans Major Fats Are Stored in Vesicles Distinct from Lysosome-Related Organelles," *Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 430–435, 2010.
- [24] S. Vankoningsloo, M. Piens, C. Lecocq, A. Gilson, A. De Pauw, P. Renard, C. Demazy, A. Houbion, M. Raes, and T. Arnould, "Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose.," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 1133–1149, 2005.
- [25] A. Carrière, M. C. Carmona, Y. Fernandez, M. Rigoulet, R. H. Wenger, L. Pénicaud, and L. Casteilla, "Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: A mechanism for hypoxia-dependent effect," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 39, pp. 40462–40469, 2004.
- [26] Y. Zhang, G. Marsboom, P. T. Toth, and J. Rehman, "Mitochondrial Respiration Regulates Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, 2013.
- [27] J. H. Kim, S.-H. Kim, S. Y. Song, W.-S. Kim, S. U. Song, T. Yi, M.-S. Jeon, H.-M. Chung, Y. Xia, and J.-H. Sung, "Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation.," *Cell Biol. Int.*, vol. 38, no. 1, pp. 32–40, 2014.
- [28] S. Vankoningsloo, A. De Pauw, A. Houbion, S. Tejerina, C. Demazy, F. de Longueville, V. Bertholet, P. Renard, J. Remacle, P. Holvoet, M. Raes, and T. Arnould, "CREB activation induced by mitochondrial dysfunction triggers triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes.," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 7, pp. 1266–1282, 2006.