



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**

## Trabajo Fin de Grado

# **Caracterización del daño muscular y hepático causado por la exposición a un tóxico mitocondrial**

Characterization of muscle and  
liver damage caused by exposure  
to a mitochondrial toxin

Autor

**Andrés Jiménez Zúñiga**

Directora

**Ester López Gallardo**

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Curso 2018-2019 – Grado en Biotecnología

## Índice

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	7
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
<b>4.1. Preparación de muestras de hígado en el criostato</b> .....	8
<b>4.2. Tinciones</b> .....	8
4.2.1. Tinción Nile Red.....	8
4.2.2. Tinción Sudán III .....	8
4.2.3. Tinción Oil Red O .....	9
<b>4.3. Cuantificación de triglicéridos en tejido hepático y muscular</b> .....	9
4.3.1. Preparación de los reactivos .....	9
4.3.2. Preparación de las muestras de hígado .....	10
4.3.3. Preparación de las muestras de músculo.....	10
4.3.4. Preparación de curva estándar .....	10
4.3.5. Procedimiento del ensayo y detección .....	11
<b>5. RESULTADOS</b> .....	12
<b>5.1. Índice de grasa abdominal y contenido en peso de hígado y músculo.</b> .....	12
<b>5.2. Evaluación histológica de muestras de hígado</b> .....	13
5.2.1. Tinciones. ....	13
5.2.1.1. Tinción Nile Red. ....	14
5.2.1.2. Tinción Sudán III.....	14
5.2.1.3. Tinción Oil Red O. ....	14
5.2.2. Evaluación del contenido de gotas lipídicas.....	15
5.2.2.1. Evaluación del contenido de gotas lipídicas en ratones hembra gestantes.....	15
5.2.2.2. Evaluación del contenido de gotas lipídicas en crías de ratón. ....	16
<b>5.3. Cuantificación de triglicéridos</b> .....	16
5.3.1. Cuantificación de triglicéridos en muestras de hígado. ....	16
5.3.1.1. Cuantificación de triglicéridos en hígado de ratones hembra gestantes. ....	18
5.3.1.2. Cuantificación de triglicéridos en hígado de crías de ratón. ....	19
5.3.2. Cuantificación de triglicéridos en muestras de músculo. ....	19
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	21
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	23
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24

## 1. RESUMEN

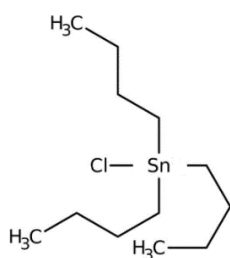
El Tributyltin Chloride (TBTC) se trata de un xenobiótico declarado como tóxico que ha sido detectado a altas concentraciones en el medio marino. Esto ha provocado su presencia en determinados alimentos y en el agua de consumo diario, llegando a encontrarse a concentraciones entre 50 y 400 nM en muestras de sangre humanas. Diferentes estudios han declarado que este compuesto provoca el desarrollo de obesidad y diferentes síndromes metabólicos en mamíferos, además de resultar en otro tipo de afecciones como anomalías a nivel de sistema endocrino, inmunotoxicidad o neurotoxicidad. En el presente trabajo analizamos el efecto provocado por el tóxico en ratones hembra gestantes y sus crías (únicamente hembras) tras la aplicación del TBTC a concentraciones entre 100 y 1000 nM por vía oral en los periodos de lactancia y gestación. Concretamente, se llevó a cabo un análisis de la grasa abdominal y el tejido hepático y muscular de las muestras recogidas. Los resultados muestran que la exposición directa a TBTC en ratones hembras gestantes ha provocado una acumulación lipídica en tejido hepático a concentraciones de 500 y 1000 nM del tóxico. Tras la exposición *in utero* al TBTC únicamente se ha observado un aumento del contenido en peso y de triglicéridos del tejido muscular, pudiendo desembocar en el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes.

## 1. ABSTRACT

Tributyltin Chloride (TBTC) is a xenobiotic declared as a toxic which has been detected at high concentrations in the aquatic environment. This has caused its presence in particular aliments and in the daily intake water, finding itself at concentrations between 50 and 400 nM in human blood samples. Several studies have proved that this compound motivates the development of obesity and different metabolic syndromes in mammals, besides turning out in other kinds of illnesses such as endocrine system anomalies, immunotoxicity or neurotoxicity. In this study we analyzed the toxic effects in female pregnant mice and their breeding (explicitly female descendants) after the TBTC exposure at concentrations between 100 and 1000 nM by oral way during the breastfeeding and gestation time. Specifically, an analysis of abdominal fat, liver and muscular tissue has been carried out. The results show that direct exposure to TBTC in female pregnant mice has caused fat accumulation in the liver tissue at concentrations of 500 and 1000 nM of the toxic. After *in utero* exposition to the TBTC it has only been observed an increase of the amount of muscle tissue and an accumulation of triglycerides in this tissue, that may lead to the development of insulin resistance and diabetes.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las organotinias son un grupo diverso de compuestos que presentan como fórmula general  $R_nSnX_4$ , donde R es un grupo alquilo o arilo y X es un anión ( $Cl^-$ ,  $OH^-$ ,  $S^{2-}$  o  $COO^-$ ). Están caracterizados por la presencia de, al menos, un enlace covalente Sn-C. Estos compuestos se clasifican como mono-, di-, tri- o tetraorganotinias en función del número de grupos alquilo o arilo unidos a su centro tetravalente (Sn). (Rocha *et al.*, 2012)



**Figura 1.** Estructura molecular del TBTC.

<https://www.fishersci.es/shop/products/metabolite-tbtc-dcm-100-g-ml/12910264>

Dentro de este grupo cabe destacar el Tributyltin chloride (TBTC). Este compuesto era utilizado como componente antiincrustante de las pinturas que recubrían las cubiertas de los barcos. Además, formaba parte de pesticidas, antifúngicos e incluso era utilizado en la fabricación de plásticos de polietileno (Grün *et al.*, 2006). Sin embargo, en la década de 1990 este compuesto fue reconocido como tóxico, pudiendo desencadenar una gran cantidad de efectos nocivos en el organismo a concentraciones relativamente bajas, siendo por ello declarado como “the most toxic chemical ever deliberately released into the seas” (“El compuesto químico más tóxico jamás vertido sobre el mar”, World Wildlife Fund). Debido a su baja solubilidad y a la larga persistencia de sus sedimentos, su presencia en el medio acuático ha dado lugar a una contaminación a nivel mundial, llegando a encontrarse concentraciones de 200 a 400 ng/L (1 a 10  $\mu\text{g/L}$  a nivel de sedimentos) en zonas cercanas a puertos. (Lyssimachou *et al.*, 2015)

La existencia de este contaminante en el medio marino (así como sus productos de degradación, DBT y MPT) ha desembocado en la presencia del mismo en alimentos como pescados o mariscos, o en el agua que consumimos diariamente. Se ha estimado que la ingesta diaria de TBT en Japón es de 2,2 a 6,9  $\mu\text{g}$  por persona. Por otra parte, la media de consumo mundial de TBT, debido únicamente a su presencia en mariscos, varía dependiendo de la zona entre 0,18 a 2,6  $\mu\text{g}$  por persona. (Tsuda *et al.*, 1995) Un estudio acerca de la concentración de organotinias (incluyendo TBT) en sangre humana informó de la presencia de estos compuestos a unas concentraciones entre 50 nM y 400 nM. (Whalen, Loganathan and Kannan, 1999)

Debido a la alarmante concentración de TBTC presente en muestras de seres humanos se han llevado a cabo gran cantidad de investigaciones acerca de los posibles efectos tóxicos que puede provocar en el organismo. Uno de los más reseñables es la alteración del metabolismo lipídico y la obesidad. El TBTC puede desencadenar una acumulación de ácidos grasos a nivel de hígado, dando lugar al desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA). Esta enfermedad puede cursar con una estosis simple, pero la acumulación de ácidos grasos en el parénquima hepático provoca una situación de estrés oxidativo, la formación de radicales libres de oxígeno y una cascada inflamatoria de citocinas que puede dar lugar al desarrollo de una fibrosis avanzada (mayor predisposición a cirrosis, fallo hepático y cáncer de hígado). (Martín Domínguez *et al.*, 2013)

A continuación, se muestra una tabla en la que se resumen diferentes daños relacionados con la exposición a este contaminante:

Tipo de estudio	Concentración/dosis del tóxico	Efecto observado
<i>In vitro</i> en diferentes tipos de ATP sintasas	≈ 200 nM	Inhibición ATP sintasa (provoca el desarrollo de obesidad y síndromes metabólicos)
<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> en mamíferos (ratones y humanos)	10-100 nM (administración en estudios <i>in vivo</i> en etapa pre-natal o post-natal temprana)	Alteración del metabolismo lipídico y obesidad
<i>In vivo</i> en moluscos gasterópodos	< 1 nM	Aumento de niveles de testosterona
<i>In vivo</i> en mamíferos (ratas)	Dosis oral de: - 18 mg/kg TBT - 29 mg/kg DBT - 180 mg/kg MBT	Atrofia del timo y supresión de la respuesta inmune dependiente de células T
<i>In vivo</i> en mamíferos (ratas)	Dosis de 12,5 mg/kg	Disminución de actividad motora espontánea
<i>In vitro</i> en células PC12 (línea celular de feocromocitoma de ratas)	300 nM	Inhibición del desarrollo neuronal

**Figura 2.** Tabla resumen de efectos tóxicos observados por la exposición a TBTC en diferentes estudios (von Ballmoos, Brunner and Dimroth, 2004; Lyssimachou et al., 2015; Grün et al., 2006; Kotake and Topics, 2012)

Estos efectos son provocados por el compuesto mediante distintos tipos de mecanismos de toxicidad, los cuales han sido caracterizados y se muestran descritos a continuación:

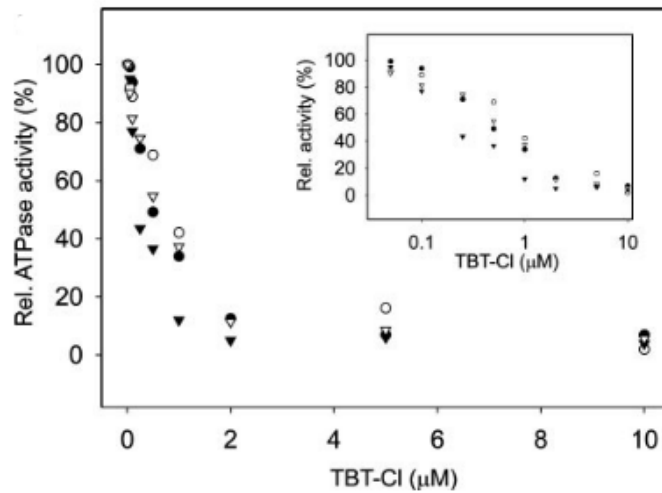
**1) Inhibición de la F-ATP sintasa:** Las F-ATP sintasas son enzimas rotatorias compuestas por dos motores (regiones  $F_0$  y  $F_1$ ) conectados por un eje común para intercambiar energía uno con otro. Tienen un papel fundamental en el metabolismo energético celular y son por ello un componente esencial de prácticamente todo tipo de célula viva. (Boyer, 1997)

Durante la síntesis de ATP, el motor  $F_0$  (transmembrana) convierte la energía de un gradiente electroquímico transmembranal de protones o iones  $Na^+$  en un esfuerzo de torsión. La rotación es transmitida por el eje al motor  $F_1$  desembocando en la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. (Capaldi and Aggeler, 2002)

En el año 1958 Aldridge describió por primera vez los efectos tóxicos de las organotinas en la fosforilación oxidativa mitocondrial (Aldridge, 1958). A partir de ello, se llevaron a cabo numerosas investigaciones que demostraron que la subunidad “a” de las F-ATP sintasas alberga el canal iónico que permite el acceso al sitio de enlace de la subunidad “ $c_{11}$ ” desde la superficie periplásmica. (Dimroth, von Ballmoos and Meier, 2006) Este canal es imprescindible para el funcionamiento del complejo, ya que enzimas mutantes que tienen este canal bloqueado son completamente inactivas. (Kaim and Dimroth, 1998)

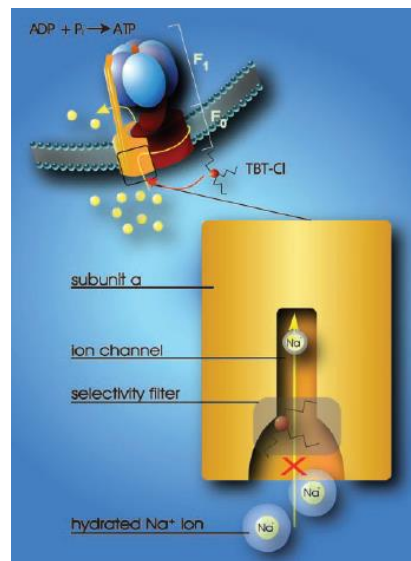
En 2004 Von Ballmoos estudió el efecto del TBTC y derivados sobre dos F-ATP sintasas, Na<sup>+</sup> F-ATP sintasa de *I. Tartaricus* y la H<sup>+</sup> F-ATP sintasa de *E. Coli*. Para ello se analizó la inhibición de esas enzimas en 4 condiciones:

- Na<sup>+</sup> F-ATP sintasa de *I. Tartaricus* purificada tratada con TBTC.
- Na<sup>+</sup> F-ATP sintasa de *I. Tartaricus* asociada a la membrana tratada con TBTC.
- H<sup>+</sup> F-ATP sintasa de *E. Coli* asociada a la membrana tratada con TBTC.
- H<sup>+</sup> F-ATP sintasa de *E. Coli* purificada tratada con DDBT-Cl (compuesto derivado del TBTC).



**Figura 3.** Inhibición de ATP sintasa por TBTC y DDBT-Cl. TBTC y ATP sintasa purificada de *I. Tartaricus* (▲). TBTC y ATP sintasa asociada a membrana de *I. Tartaricus* (●). TBTC y ATP sintasa asociada a membrana de *E. Coli* (○). DDBT-Cl y ATP sintasa purificada de *E. Coli* (△).  
**Recuadro.** Escala logarítmica. (von Ballmoos, Brunner and Dimroth, 2004)

Ambas enzimas dieron una respuesta similar al tratamiento con TBTC, arrojando valores de inhibición con una K<sub>i</sub> de alrededor de 200 nM (Fig. 3). Además, fue demostrado que el TBTC actúa sobre la región F<sub>0</sub> del complejo enzimático y, concretamente, compete con las partículas de Na<sup>+</sup> ya que los sitios de reconocimiento para los dos compuestos se superponen estructuralmente. Por ello, la presencia de TBTC impide el paso de los iones por el canal iónico de la subunidad “a” y, por el contrario, los iones Na<sup>+</sup> impiden la unión del TBTC al complejo. (von Ballmoos, Brunner and Dimroth, 2004)



**Figura 4.** Bloqueo del canal iónico de la subunidad a de ATP sintasa por TBTC. (von Ballmoos, Brunner and Dimroth, 2004)

Este bloqueo del canal iónico de la ATP sintasa ha sido relacionado con alteraciones a nivel de diferenciación adipogénica. En 2015 se reportó que la inhibición del sistema

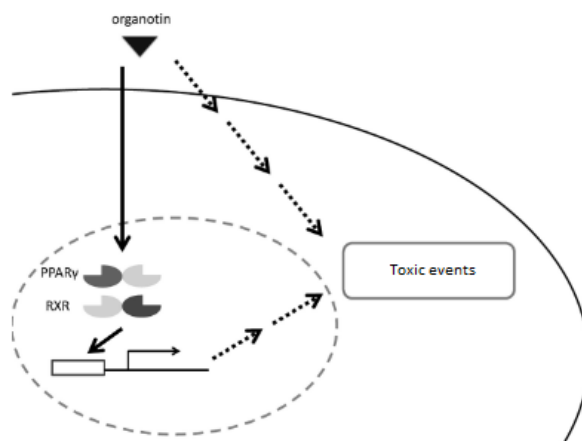
OXPHOS mitocondrial en células hASC (human adipose derived stem cell) puede promover o inhibir el proceso de adipogénesis *in vitro*. Por ello, contaminantes como el TBTC pueden dar lugar al desarrollo de obesidad o síndromes metabólicos. (Llobet *et al.*, 2015)

- 2) **Agonista de receptores nucleares:** los receptores nucleares son factores de transcripción ligando-dependientes que regulan la expresión de genes relacionados con distintas funciones fisiológicas (Kotake and Topics, 2012). RXR $\alpha$  (retinoid X receptor  $\alpha$ ) y PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) se tratan de dos ejemplos de este tipo de receptores.

PPAR $\gamma$  forma un heterodímero permisivo con el RXR $\alpha$  que, una vez activado, se une a elementos de respuesta PPAR específicos del DNA y modula la transcripción de sus genes diana, como la acil-CoA oxidasa. Por lo tanto, controla la vía de oxidación beta peroxisomal de los ácidos grasos, siendo considerado el principal regulador de la adipogénesis. Su activación promueve procesos implicados en la maduración de los adipocitos e induce la expresión de genes relacionados con el consumo, metabolismo y almacenamiento de ácidos grasos (Grün *et al.*, 2006).

El TBTC ha sido identificado como agonista de los receptores RXR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  a concentraciones entre 10 y 100 nM (Kanayama T1, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, 2005). Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición de TBTC o ligandos de RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  a líneas celulares de adipocitos no diferenciados, tanto de roedores (3T3-L1) como humanas, han dado lugar a la diferenciación y acumulación de triglicéridos, así como a un aumento de la expresión de marcadores adipogénicos. Otros estudios, realizados *in vivo* mediante la exposición de TBTC a ratones en etapa pre-natal o post-natal temprana, han mostrado un aumento en la cantidad de masa adipocítica y una

mayor acumulación de tejido adiposo a nivel de hígado. Así pues, estos resultados sugieren que el TBTC altera el metabolismo lipídico y provoca obesidad a través de la activación de estos receptores nucleares (Lyssimachou *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Concentraciones bajas de TBT provocan su unión con RXR $\alpha$  y PPARG, actuando como agonistas. (Kotake and Topics, 2012)

- 3) **Alteración de la homeostasis esteroidea:** Varios estudios han demostrado que la exposición a TBTC puede desembocar en una serie de anomalías a nivel de sistema endocrino. La acumulación de organotinas disminuye la actividad de la aromatasa (enzima responsable de un paso fundamental en la biosíntesis de los estrógenos) dando lugar a un aumento de los niveles de testosterona y, por ello, a un predominio de los rasgos masculinos. Este fenómeno, conocido como “imposex”, ha sido observado en

moluscos gasterópodos y es responsable de daños en el sistema reproductivo, resultando incluso en la esterilidad de los sujetos. (Lyssimachou *et al.*, 2015)

El TBTC ha mostrado capacidad de unión y activación del receptor retinoide X (RXR) de los moluscos. Por otra parte, el ligando del RXR humano, el ácido 9-cis retinoico (9-cis-RA), induce el fenómeno de “imposex” en gasterópodos. Por ello, se cree que la activación del RXR es el mecanismo de acción principal que induce este fenómeno. Sin embargo, este aumento de niveles de testosterona no se ha observado en mamíferos, o en caso de observarse ha sido en mucha menor medida. En su lugar, presentan una predominancia de efectos relacionados con el daño hepático, neuronal y la inmunotoxicidad. (Grün *et al.*, 2006)

**4) Inmunotoxicidad:** la exposición de TBT y DBT en ratas da lugar a una atrofia del timo y una supresión de la respuesta inmune células T-dependiente. La atrofia del timo es causada por una reducción en el número de linfoblastos de crecimiento rápido que da lugar a una disminución notable de linfocitos. El mecanismo mediante el cual tiene lugar este fenómeno es relativamente desconocido. Se ha observado que agonistas naturales y sintéticos de PPARG inducen la activación de las enzimas caspasa 3 y 9, provocan la disminución del potencial de membrana mitocondrial y promueven la destrucción del sustrato utilizado por las caspasas. Estos hechos sugieren que las organotinas (incluyendo el TBTC) inducen la apoptosis PPARG-dependiente de células del linfoma o linfocitos en el timo. (Atanasov *et al.*, 2005) Además, el DBT impide la supresión de la producción (mediada por glucocorticoides) de interleucina-6 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  en macrófagos humanos. (Gumy *et al.*, 2008)

**5) Neurotoxicidad:** La exposición en mamíferos a organotinas puede producir epilepsia, amnesia y defectos en la memoria, (Robert G. Feldman, MD; Roberta F. White, PhD; Ikechukwu I. Eriator, 1993) además de ser especialmente neurotóxica en el sistema nervioso central. (Miller, Park and Carolina, 1984). El mecanismo mediante el cual se producen estos efectos no está todavía definido. Se ha visto que la salida de glutamato en las neuronas es inducida mediante tratamiento con TBT. Una acumulación excesiva de glutamato puede dar lugar a una activación desmesurada de sus receptores, aumentando en gran medida los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular y produciendo finalmente la muerte neuronal. (Farina *et al.*, 2003)

Por otra parte, una investigación fue llevada a cabo para ver si el TBT activa AMPK (AMP-activated protein kinase) y si su activación contribuye a la muerte de células neuronales. Se observó que los niveles de ATP celular del sistema de cultivo utilizado disminuyeron después de 30 minutos de exposición a 500 nM TBT. La mayoría de las neuronas expresaron AMPK, y el TBT indujo la fosforilación de AMPK. La liberación de glutamato puede ser controlada por AMPK, por lo que la activación de AMPK por TBT puede causar la muerte neuronal a través de la liberación de glutamato. (Nakatsu *et al.*, 2008)



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El proyecto inicial del grupo de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza consistió en la evaluación del daño provocado a nivel cerebral por la exposición a TBTC de forma directa o *in utero* en un modelo animal de ratón hembra. Se procedió mediante la administración del xenobiótico por vía oral a ratones hembra gestantes a diferentes concentraciones (100 nM, 500 nM y 1000 nM) durante el periodo de gestación y de lactancia.

- Las crías (únicamente hembras) se sacrificaron a los tres meses de edad. Se recogieron diferentes tejidos para el análisis del efecto producido por la exposición *in utero* del TBTC.
- Las madres también se sacrificaron y sus tejidos se recogieron para el análisis del efecto directo del tóxico.
- Como control negativo se obtuvieron muestras de ratones hembra gestantes y de crías a las que no se les administró el tóxico.

La revisión bibliográfica del proyecto hizo interesante considerar el estudio del efecto del TBTC en otros tejidos. Por ello, el presente trabajo se centra en el análisis a nivel de tejido hepático, muscular y grasa abdominal de las muestras recogidas, tratando de caracterizar los efectos obesogénico y endocrino provocados por el TBTC. Para ello se llevaron a cabo diferentes procedimientos:

- 1) Evaluación del índice de grasa abdominal y contenido en peso de hígado y músculo en crías de ratón hembra.
- 2) Procesamiento de muestras hepáticas, realización de tinciones histoquímicas y evaluación del contenido de gotas lipídicas en muestras de hígado de ratones hembra gestantes y crías de ratón hembra.
- 3) Cuantificación de triglicéridos en muestras de hígado de ratones hembra gestantes y crías de ratón hembra.
- 4) Cuantificación de triglicéridos en muestras de músculo en crías de ratón hembra. Este tipo de análisis no ha sido realizado en experimentos previos, pero tenemos la hipótesis de que la exposición a TBTC puede provocar un acúmulo de lípidos en tejido muscular.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Preparación de muestras de hígado en el criostato**

A partir de las muestras de hígado originales se obtuvieron 4 secciones de cada una para posteriores tinciones, dos de 20  $\mu\text{m}$  y otras dos de 4  $\mu\text{m}$ . Previo a la toma de muestras se pesó cada uno de los hígados por separado. Para su obtención se siguieron los siguientes pasos:

- Cierta cantidad de las muestras se tomó y se recubrió en un molde con OCT como medio de inclusión (temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  para permitir la formación de un bloque sólido).
- Este bloque se situó sobre una base que permitió su colocación en el criostato. Además, cada muestra se marcó con su código de identificación.
- Cada bloque se desbastó hasta alcanzar la zona con tejido, en la cual se tomaron los 4 cortes y se adhirieron sobre portaobjetos.
- Los portaobjetos con las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2. Tinciones**

Con el objetivo de visualizar contrastadamente los lípidos de las muestras de hígado preparadas en el criostato se realizaron diferentes tipos de tinciones: Sudán III, Nile Red y Oil red O. A continuación, se muestran los protocolos utilizados para su realización.

#### **4.2.1. Tinción Nile Red**

La solución utilizada se preparó con 5 $\mu\text{L}$  de Nile Red junto con 1ml de PBS. Ciertas muestras utilizadas como control negativo se trataron únicamente con PBS. El procedimiento seguido para la tinción fue el siguiente:

- Las muestras de hígado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron manteniéndolas 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y finalmente otros 15 minutos a temperatura ambiente.
- Una vez descongeladas, las muestras se cubrieron con la solución de Nile Red durante 10 minutos protegidas de la luz. Para evitar que la solución escapase de la zona del portaobjetos con la muestra se bordeó con el PAP pen (ab 2601) de Abcam como barrera hidrofóbica.
- Pasado este tiempo se añadió una gota de Aquatex® | Merck Millipore y se colocó un cubreobjetos para su observación en microscopio de fluorescencia

#### **4.2.2. Tinción Sudán III**

La solución utilizada (solución Herxheimer) se preparó añadiendo 50 cc de etanol al 70% junto con 50 cc de acetona sobre 1 g de Sudán III. Esta solución se filtró previo a cada uso. El procedimiento seguido para la tinción fue el siguiente:

- Las muestras de hígado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron manteniéndolas 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y finalmente otros 15 minutos a temperatura ambiente.
- Una vez descongeladas se sumergieron en etanol al 70%.
- Posteriormente, se cubrieron las muestras con la solución de Herxheimer durante 25 minutos. Para evitar que la solución escapase de la zona del portaobjetos con la

muestra se bordeó con el PAP pen (ab 2601) de Abcam como barrera hidrofóbica. Para minimizar su evaporación, se mantuvieron en una cámara húmeda y eventualmente se añadió más solución sobre las muestras.

- Pasados los 25 minutos, se sumergieron en agua destilada y se trataron con etanol al 70% para eliminar posibles sedimentos del colorante.
- Finalmente, se tiñeron con hematoxilina durante 3 minutos y se lavaron con agua rica en cal y con agua destilada.
- Para el montaje se añadió una gota de Aquatex® | Merck Millipore y se colocó un cubreobjetos para su observación en microscopio.

#### **4.2.3. Tinción Oil Red O**

La solución Stock se preparó con 100 ml de isopropanol junto con 300 mg de Oil Red O. La solución de trabajo se adecuó previo a cada uso. Para ello, 40 ml de agua destilada se añadieron sobre 60 ml de la disolución Stock y tras 10 minutos de reposo se procedió a un filtrado. El procedimiento seguido para la tinción fue el siguiente:

- Las muestras de hígado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron manteniéndolas 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y finalmente otros 15 minutos a temperatura ambiente.
- Una vez descongeladas, las muestras se fijaron en una disolución tamponada de formaldehído al 10% durante 10 minutos.
- Tras esto, se sumergieron en isopropanol al 60% (diluido en agua miliQ) una vez y, posteriormente, durante 15 minutos en la solución de trabajo de Oil Red O.
- Pasados los 15 minutos, las muestras se trataron nuevamente con isopropanol al 60% y con agua destilada (un único paso), y se sumergieron 3 minutos en hematoxilina.
- Finalmente, las muestras fueron lavadas con 10 pasos por agua destilada.
- Para el montaje se añadió una gota de Aquatex® | Merck Millipore y se colocó un cubreobjetos para su observación en microscopio.

### **4.3. Cuantificación de triglicéridos en tejido hepático y muscular**

La cuantificación de triglicéridos totales en muestras de hígado y músculo se realizó mediante el ensayo colorimétrico del kit "Adipogenesis detection assay kit ab102513" de Abcam. Mediante este procedimiento los triglicéridos son solubilizados e hidrolizados a glicerol y ácidos grasos. Debido a la adición de una sonda de adipogénesis el glicerol es oxidado y la sonda genera un color medible a una longitud de onda de 570 nm.

#### **4.3.1. Preparación de los reactivos**

Cada uno de los reactivos utilizados se preparó y se almacenó siguiendo las siguientes indicaciones:

- Buffer del ensayo de adipogénesis: listo para usarse como es recibido. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Solución de extracción lipídica: listo para usarse como es recibido. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Estándar de triglicéridos (1mM): previo a su uso se calentó a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto y se homogeneizó en un vórtex 30 minutos (este proceso se realizó dos veces). Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Sonda de adipogénesis: previo a ser utilizado se calentó a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo en hielo durante su uso.
- Mix enzimático de adipogénesis: se reconstituyó con  $220\ \mu\text{L}$  del buffer de ensayo. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo en hielo durante su uso.
- Lipasa: se reconstituyó con  $220\ \mu\text{L}$  del buffer de ensayo. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo en hielo durante su uso.

#### **4.3.2. Preparación de las muestras de hígado**

Se tomó una cantidad de alrededor de 10 mg de cada muestra de hígado en un eppendorf. La cantidad de muestra tomada de cada una se anotó. El análisis de resultados se realizó considerando la cantidad de triglicéridos de cada muestra dividido entre los mg tomados inicialmente. Una vez tomadas las muestras se procedió de la siguiente forma:

- Las muestras se mantuvieron en hielo y se resuspendieron en  $100\ \mu\text{L}$  de la solución de extracción lipídica.
- El tejido se homogeneizó con 15 pasadas de un homogeneizador tipo Dounce para un posterior reposo de 30 minutos.
- Tras esto, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a  $16000\ \text{rpm}$  y el sobrenadante se transfirió a otro eppendorf.
- El sobrenadante se calentó a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
- Finalmente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización del análisis final.

#### **4.3.3. Preparación de las muestras de músculo**

En el caso del tejido muscular, debido a su menor contenido en triglicéridos, se tomaron 20 mg de cada muestra para realizar el ensayo. La cantidad de muestra tomada de cada una se anotó y el análisis se realizó en función de ello.

Una vez tomadas las muestras se procedió de igual forma que en el caso del tejido hepático, a excepción de que la homogenización se realizó mediante congelación con  $\text{N}_2$  líquido. Para ello, las muestras se colocaron sobre un mortero y sobre ellas se vertió  $\text{N}_2$  líquido. Una vez congeladas, se molieron. Este proceso se realizó dos veces por cada muestra. Tras esto, el tejido se resuspendió en un eppendorf con  $100\ \mu\text{L}$  de la solución de extracción lipídica.

#### **4.3.4. Preparación de curva estándar**

Primeramente, se preparó una disolución estándar de triglicéridos  $0,2\ \text{mM}$  diluyendo  $80\ \mu\text{L}$  de la disolución estándar de triglicéridos en  $320\ \mu\text{L}$  de buffer de ensayo. La curva

estándar se realizó por duplicado en cada ensayo. El contenido de los pocillos de las soluciones de la curva estándar queda reflejado en la siguiente tabla:

Estándar #	Volumen de estándar de triglicéridos 0,2 mM (μL)	Buffer de ensayo (μL)	Volumen final en el pocillo (μL)	Concentración final de triglicéridos en el pocillo (nmol/pocillo)
1	0	125	50	0
2	25	100	50	2
3	50	75	50	4
4	75	50	50	6
5	100	25	50	8
6	125	0	50	10

#### 4.3.5. Procedimiento del ensayo y detección

Las muestras a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente. Tras esto, 4 μL de lipasa se añadieron a cada eppendorf (100 μL). Al mismo tiempo, 50 μL de las soluciones de la curva estándar (por duplicado) se colocaron en los pocillos correspondientes de la placa de 96 y se añadieron 2 μL de lipasa en cada una de ellos. Pasados 10 minutos, las muestras en los eppendorf se centrifugaron 5 minutos a 16000 rpm.

- En el caso de las muestras de hígado, se tomaron 5 μL (por duplicado) de cada una de ellas y se vertieron en los pocillos correspondientes. Se añadieron 45 μL de buffer del ensayo a cada uno.
- En el caso de las muestras de músculo, se tomaron 30 μL (por duplicado) de cada una de ellas y se vertieron en los pocillos correspondientes. Se añadieron 20 μL de buffer del ensayo a cada uno.

Posteriormente, se añadieron 50 μL del mix de reacción (92% buffer de ensayo, 4% sonda de adipogénesis y 4% mix enzimático) a cada uno de los pocillos (tanto muestras como estándares para la curva).

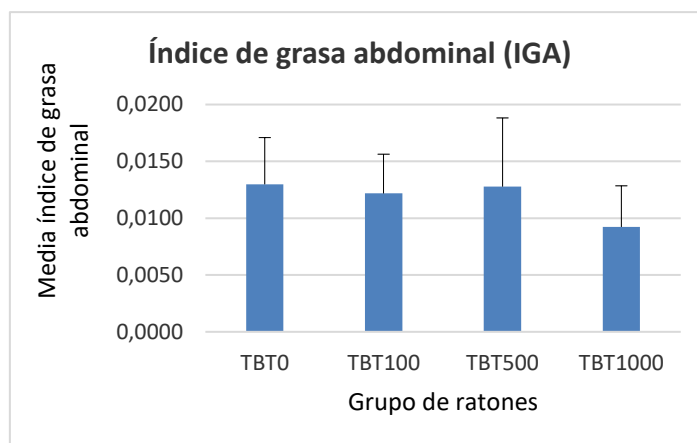
La placa de pocillos se incubó a 37 °C protegida de la luz durante 30 minutos y, finalmente, se procedió a la realización del ensayo colorimétrico en el lector Novostar de BMG-Labtech a una longitud de onda de 570 nm.

## 5. RESULTADOS

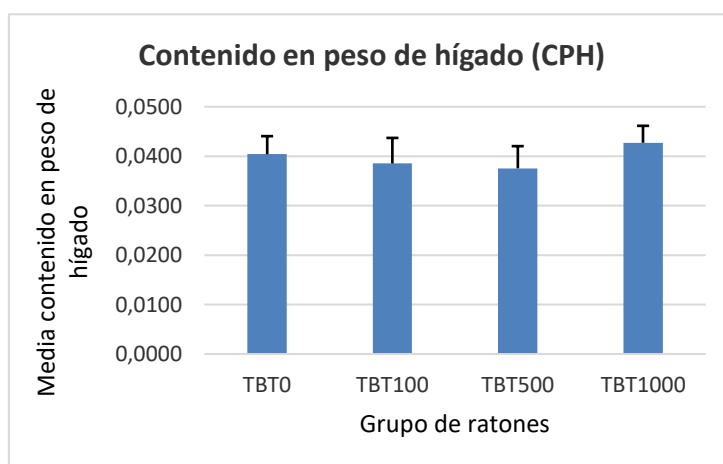
### 5.1. Índice de grasa abdominal y contenido en peso de hígado y músculo.

Se analizó el índice de grasa abdominal (IGA, contenido en grasa abdominal/peso total) y el contenido en peso de hígado (CPH, peso tejido hepático/peso total) de todas las muestras de crías de ratón. Por otra parte, se evaluó el contenido en peso en músculo (CPM, peso tejido muscular/peso total) en 5 muestras de cada grupo (según la concentración de TBTC) de crías de ratón. Los resultados fueron los siguientes:

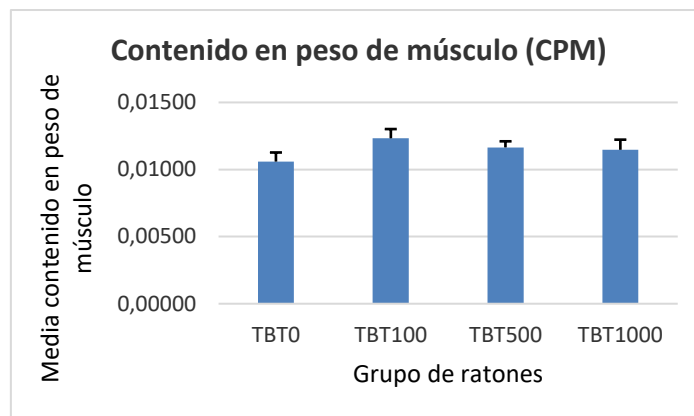
	Media IGA	Desviación estándar IGA	Media CPH	Desviación estándar CPH	Media CPM	Desviación estándar CPM
TBT0	0,0130	0,0041	0,0404	0,0036	0,01059	0,00068
TBT100	0,0122	0,0035	0,0385	0,0052	0,01233	0,00069
TBT500	0,0128	0,0060	0,0376	0,0045	0,01165	0,00045
TBT1000	0,0092	0,0036	0,0427	0,0034	0,01147	0,00076



**Figura 6.** Índice de grasa abdominal medio en crías de ratón por grupos. Eje y. Media de índice de grasa abdominal. Eje x. Grupos de ratones.



**Figura 7.** Contenido en peso de hígado en crías de ratón por grupos. Eje y. Media contenido en peso de hígado. Eje x. Grupos de ratones.



**Figura 8.** Contenido en peso de músculo en crías de ratón por grupos. Eje y. Media contenido en peso de músculo. Eje x. Grupos de ratones.

Se llevó a cabo un test-t desapareado en StatView 6.0 (SAS Institute Inc.) para el análisis estadístico, utilizando como variable nominal “grupo de ratones” y como variable numérica “índice de grasa abdominal”, “contenido en peso de hígado” o “contenido en peso de músculo”.  $p$ -Valores  $< 0,05$  fueron considerados significativos.

- La comparativa de índice de grasa abdominal muestra diferencias significativas entre los grupos TBT0 y TBT1000 ( $p$ -Valor=0,0418) y entre los grupos TBT100 y TBT1000 ( $p$ -Valor=0,0386).
- La única diferencia significativa existente en el contenido en peso de hígado se da entre los grupos TBT500 y TBT1000 ( $p$ -Valor=0,0345).
- El análisis del contenido en peso de músculo muestra diferencias significativas entre los grupos TBT0 y TBT100 ( $p$ -Valor=0,0039) y TBT0 y TBT500 ( $p$ -Valor=0,0201).

## 5.2. Evaluación histológica de muestras de hígado

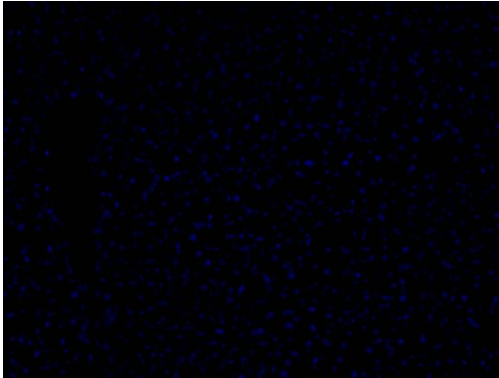
### 5.2.1. Tinciones.

Se prepararon un total de 66 muestras de hígado para ser teñidas y analizadas. Concretamente, 42 muestras de crías de ratón y 24 de ratones hembra gestantes, todas ellas pertenecientes a los 4 grupos en estudio (controles y concentraciones de tóxico de 100, 500 y 1000 nM). A partir de cada una de ellas se prepararon bloques con OCT apropiados para su corte en el criostato, mediante el cual se obtuvieron dos secciones de 20 $\mu$ m y dos de 4 $\mu$ m de cada una.

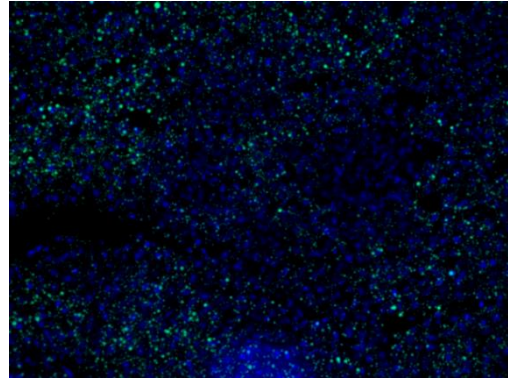
Una vez en posesión de estas muestras se procedió a la tinción de las mismas con el objetivo de visualizar gotas lipídicas en ellas de forma contrastada. Para las tinciones se utilizaron finalmente las secciones de 20  $\mu$ m, ya que se vio que permitían una mejor visualización de las muestras. Se llevaron a cabo 3 tipos de tinciones distintas: Nile Red, Sudán III y Oil Red O.

### 5.2.1.1. Tinción Nile Red.

En las muestras tratadas con el protocolo de tinción de Nile Red se observa fluorescencia verde debido a la presencia de gotas lipídicas. En el control negativo vemos únicamente los núcleos con fluorescencia azul. Sin embargo, la fluorescencia desaparece con el tiempo, por lo que estas muestras no permitían su revisualización. Por ello, se decidió probar otro tipo de tinciones.



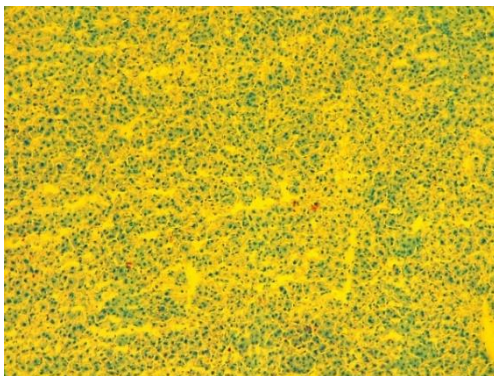
**Figura 9.** Control negativo tinción Nile red. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #174. Objetivo 20x.



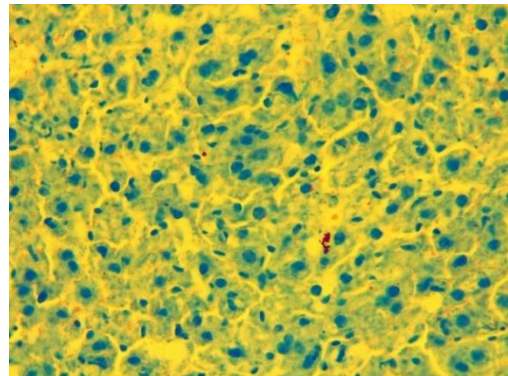
**Figura 10.** Tinción Nile red. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #174. Objetivo 20x.

### 5.2.1.2. Tinción Sudán III.

Las muestras tratadas con el protocolo de tinción de Sudán III permiten la observación de los núcleos (azules), pero no se aprecian las gotas lipídicas. Por lo tanto, no nos sirvió para su cuantificación.



**Figura 11.** Tinción Sudán III. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #139. Objetivo 10x.

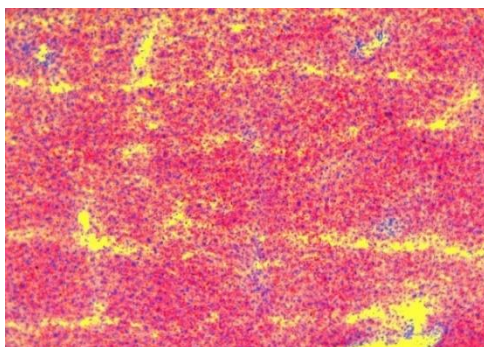


**Figura 12.** Tinción Sudán III. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #139. Objetivo 40x.

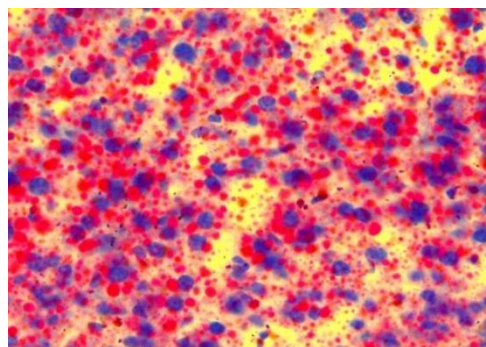
### 5.2.1.3. Tinción Oil Red O.

La tinción con el protocolo de Oil Red O permite la visualización de los núcleos (azul) y de las gotas lipídicas (rojo). Debido a su sencillez y eficiencia este protocolo se utilizó para tratar el resto de muestras y así llevar a cabo una evaluación del contenido en gotas lipídicas de las mismas.

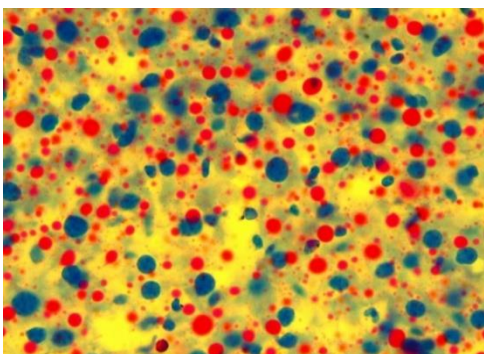




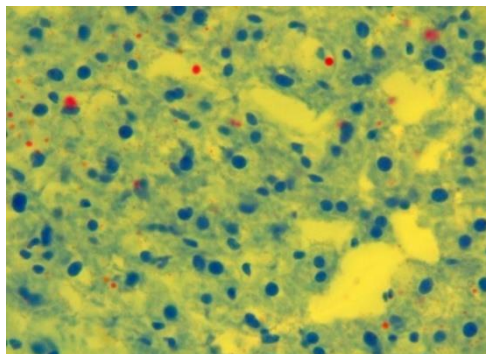
**Figura 13.** Tinción Oil Red O. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #123. Objetivo 10x.



**Figura 14.** Tinción Oil Red O. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #123. Objetivo 63x.



**Figura 15.** Tinción Oil Red O. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #22. Objetivo 63x.



**Figura 16.** Tinción Oil Red O. Corte 20  $\mu\text{m}$ , muestra de hígado #39. Objetivo 63x.

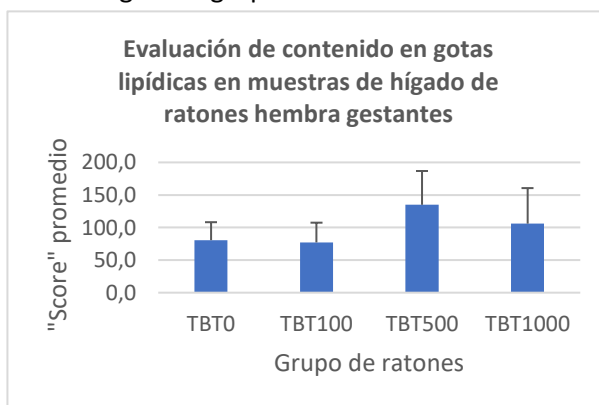
## 5.2.2. Evaluación del contenido de gotas lipídicas.

Con el fin de evaluar el contenido de gotas lipídicas se analizaron las muestras de hígado tratadas con el protocolo de tinción de Oil Red O. Se tomaron fotos de 3 regiones de cada muestra (seleccionadas aleatoriamente) y a cada una de ellas se le asignó una puntuación o "score" en función de la acumulación de tejido adiposo observado. Se tomaron en cuenta factores como cantidad, tamaño o color (colores más amarillentos implican mayor contenido en triglicéridos) de las gotas lipídicas.

### 5.2.2.1. Evaluación del contenido de gotas lipídicas en ratones hembra gestantes.

Se asignó un "score" promedio a cada muestra de ratones hembra gestantes (Anexo 1). Las medias y desviación estándar obtenidas según los grupos son:

	Media	Desviación estándar
TBT0	80,6	27,6
TBT100	77,2	30,3
TBT500	134,9	51,9
TBT1000	105,9	54,6



**Figura 17.** Contenido en gotas lipídicas en muestras de hígado de ratones hembra gestantes por grupos. Eje y. "Score" promedio asignado a la muestra. Eje x. Grupos de ratones.

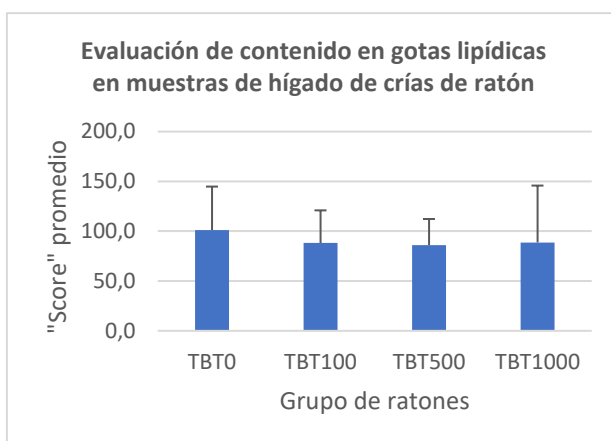
Se llevó a cabo un test-t desapareado en StatView 6.0 (SAS Institute Inc.) para el análisis estadístico, utilizando como variable nominal “grupo de ratones” y como variable numérica “score promedio”.  $p$ -Valores  $< 0,05$  fueron considerados significativos.

Se observan diferencias significativas entre los grupos TBT0 y TBT500 ( $p$ -Valor=0,0473) y TBT100 y TBT500 ( $p$ -Valor=0,0405).

### 5.2.2.2. Evaluación del contenido de gotas lipídicas en crías de ratón.

Se asignó un “score” promedio de contenido en gotas lipídicas de cada muestra de crías de ratón (Anexo 2). Las medias y desviación estándar obtenidas según los grupos son:

	Media	Desviación estándar
TBT0	101,1	43,7
TBT100	88,2	32,8
TBT500	86,1	26,1
TBT1000	88,7	57,1



**Figura 18.** Contenido de gotas lipídicas en muestras de hígado de crías de ratón por grupos. Eje y. “Score” promedio asignado a la muestra. Eje x. Grupos de ratones.

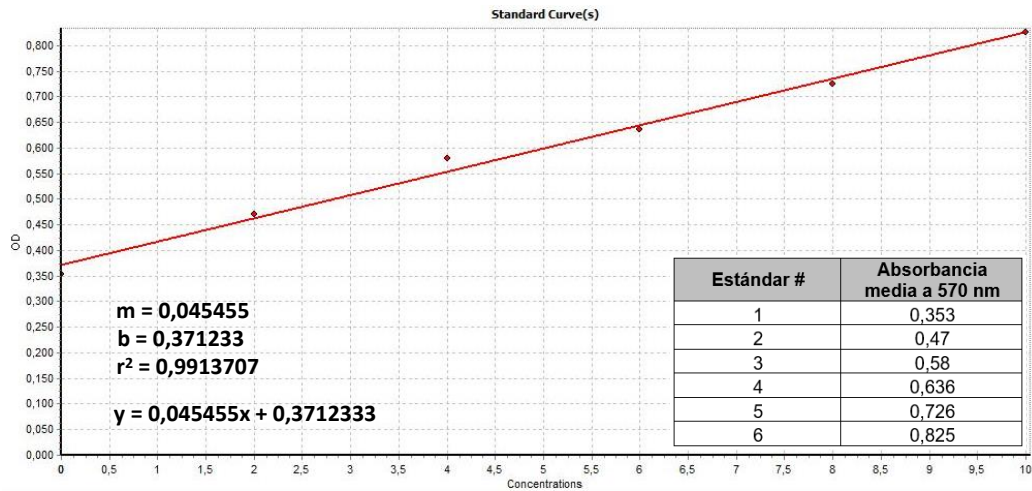
Se llevó a cabo un test-t desapareado en StatView 6.0 (SAS Institute Inc.) para el análisis estadístico, siguiendo el mismo criterio que en las muestras de ratones hembra gestantes. No se aprecia ninguna diferencia significativa entre los grupos.

## 5.3. Cuantificación de triglicéridos

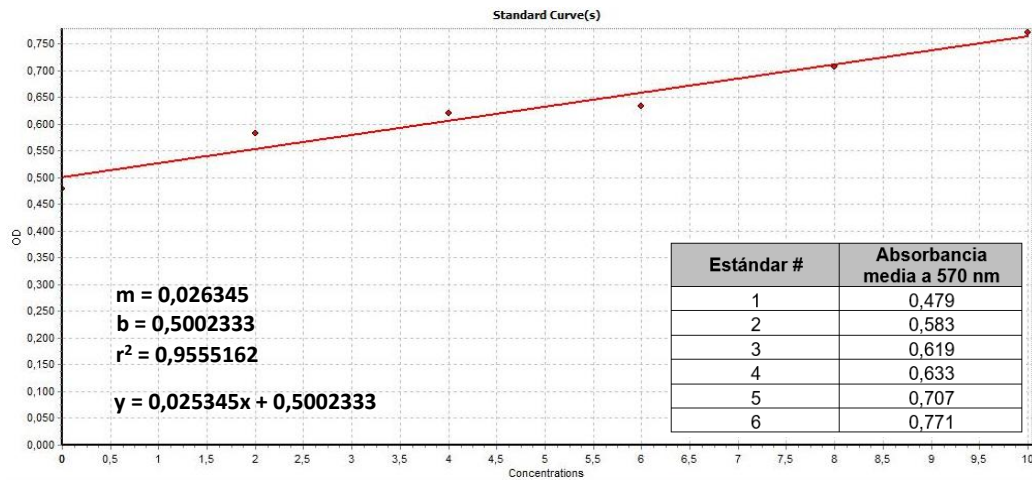
### 5.3.1. Cuantificación de triglicéridos en muestras de hígado.

La cuantificación de triglicéridos en hígado se realizó en tres placas de 96 pocillos. Por ello, estos resultados se interpolaron en 3 curvas estándar distintas, una por cada placa utilizada en el ensayo:

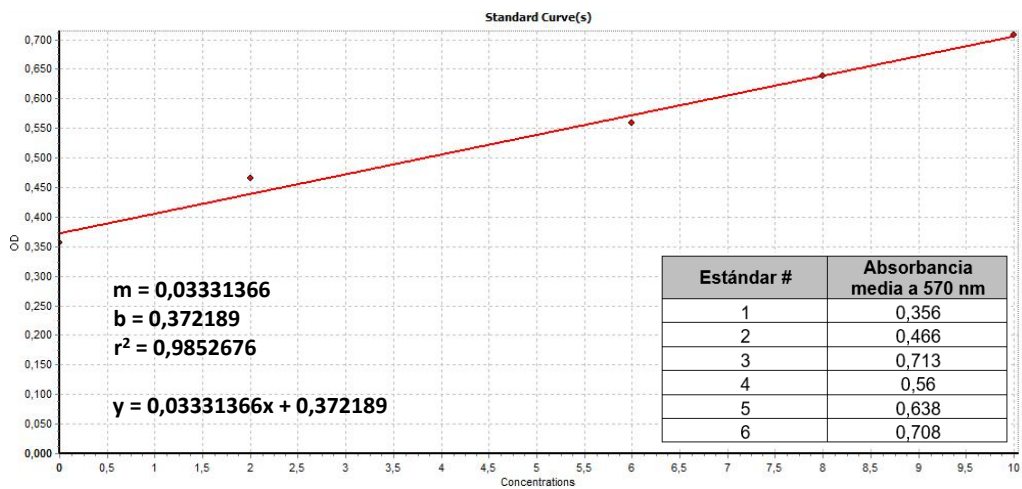
- La curva #1 se ajustaba a lo esperado.
- La curva #2 presentaba un valor de “m” demasiado bajo, afectando a la interpolación de los datos de la placa #2. Por ello, los datos de esta placa fueron interpolados utilizando la curva de la placa #1 (no es lo ideal debido a que varían las condiciones, la placa debería ser repetida para confirmar que los datos no son erróneos).
- La curva #3 presenta el estándar #3 con un valor muy desviado, por lo que se omitió.



**Figura 19.** Curva estándar #1 obtenida en el software MARS Data Analysis en el ensayo de cuantificación de triglicéridos en hígado y músculo. Eje y. Absorbancia. Eje x. nmol triglicéridos/pocillo.



**Figura 20.** Curva estándar #2, obtenida en el software MARS Data Analysis en el ensayo de cuantificación de triglicéridos en hígado. Eje y. Absorbancia. Eje x. nmol triglicéridos/pocillo.



**Figura 21.** Curva estándar #3, obtenida en el software MARS Data Analysis en el ensayo de cuantificación de triglicéridos en hígado con omisión del estándar #3. Eje y. Absorbancia. Eje x. nmol triglicéridos/pocillo.

### 5.3.1.1. Cuantificación de triglicéridos en hígado de ratones hembra gestantes.

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo colorimétrico en el lector Novostar de BMG-Labtech a una longitud de onda de 570 nm fueron los siguientes (absorbancia media de los duplicados):

Muestra (0nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
9	0,785
10	0,79
17	0,855
18	0,628
25	0,827
26	0,854
33	1,098
34	1,067

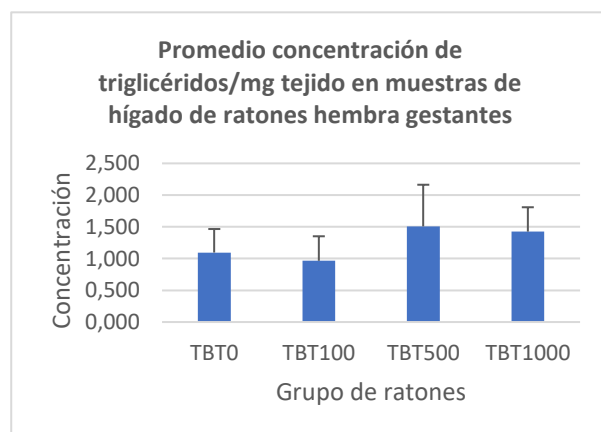
Muestra (100nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
11	1,087
12	1,028
19	0,596
20	0,677
27	0,994
28	0,607
35	0,734
36	0,887

Muestra (500nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
13	0,621
14	0,896
21	1,154
22	1,218
29	1,165
37	0,821
38	0,964

Muestra (1000nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
15	0,807
16	1,166
23	0,803
24	1,22
31	0,75
32	0,875
39	1,184
40	1,143

Los resultados de la interpolación de los datos de absorbancia de las muestras en las curvas estándar permitieron la obtención de los datos de concentración de triglicéridos en las muestras respecto a los miligramos de tejido tomados para hacer el ensayo (Anexo 3). Agrupando los resultados según la concentración de TBTC obtenemos los siguientes medias y desviaciones estándar:

	Media	Desviación estándar
TBT0	1,095	0,371
TBT100	0,965	0,387
TBT500	1,507	0,656
TBT1000	1,425	0,383



**Figura 22.** Promedio de concentración de triglicéridos/mg de tejido en muestras de hígado de ratones hembra gestantes por grupos. Eje y. Concentración de triglicéridos(nmol/pocillo) /mg de tejido. Eje x. Grupo de ratones

Se llevó a cabo un test-t desapareado en StatView 6.0 (SAS Institute Inc.) utilizando como variable nominal “grupo de ratones” y como variable numérica “concentración de triglicéridos/mg de tejido”. *p*-Valores < 0,05 fueron considerados significativos.

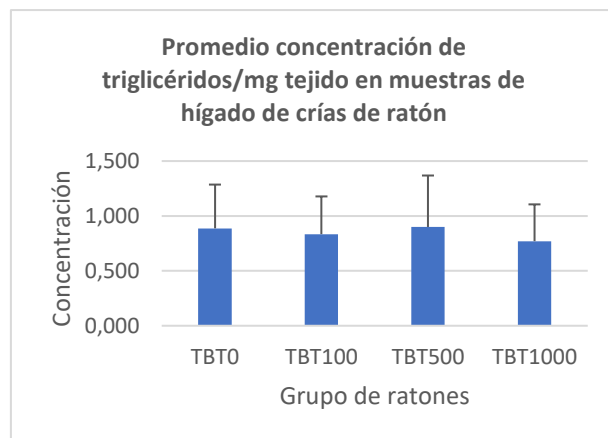
La única diferencia significativa se da entre TBT100 y TBT1000 (*p*-Valor=0,0324).

### 5.3.1.2. Cuantificación de triglicéridos en hígado de crías de ratón.

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo colorimétrico en el lector Novostar de BMG-Labtech a una longitud de onda de 570 nm (Anexo 4) fueron interpolados con las curvas estándar.

Los resultados de la interpolación de los datos de absorbancia de las muestras en las curvas estándar permitieron la obtención de los datos de concentración de triglicéridos en las muestras respecto a los miligramos de tejido tomados para hacer el ensayo (Anexo 5). Las medias y desviaciones estándar obtenidas agrupando según concentración de TBTC son las siguientes:

	Media	Desviación estándar
<b>TBT0</b>	0,887	0,399
<b>TBT100</b>	0,834	0,344
<b>TBT500</b>	0,900	0,469
<b>TBT1000</b>	0,771	0,335



**Figura 23.** Promedio de concentración de triglicéridos/mg de tejido en muestras de hígado de crías de ratón por grupos. **Eje y.** Concentración de triglicéridos/nmol/pocillo) /mg de tejido. **Eje x.** Grupo de ratones

Se llevó a cabo un test-t desapareado en StatView 6.0 (SAS Institute Inc.) siguiendo el mismo criterio que en el ensayo de hígado en ratones hembra gestantes. No se aprecia ninguna diferencia significativa entre los grupos.

### 5.3.2. Cuantificación de triglicéridos en muestras de músculo.

La cuantificación de triglicéridos en músculo (muestras de crías de ratón) se realizó en una única placa de 96 pocillos. Los resultados obtenidos al realizar el ensayo colorimétrico en el lector Novostar de BMG-Labtech a una longitud de onda de 570 nm fueron los siguientes (absorbancia media de los duplicados):

Muestra (0nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
98	1,237
99	1,349
158	1,172
186	0,981
187	1,117

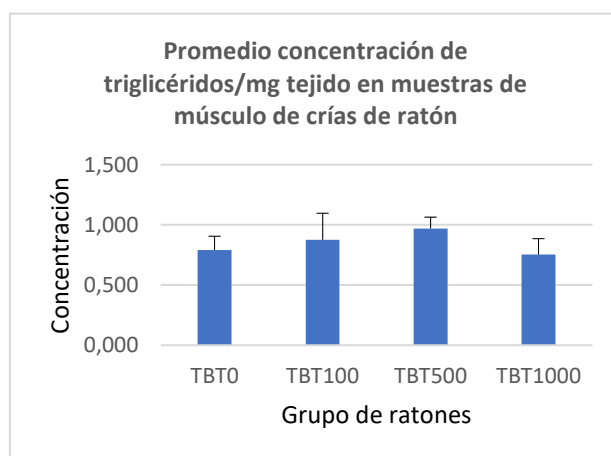
Muestra (100nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
106	0,978
161	1,3
162	1,001
163	1,332
164	1,257

Muestra (500nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
153	1,347
174	1,349
175	1,225
176	1,302
177	1,312

Muestra (1000nM TBTC)	Absorbancia media a 570 nm
60	1,263
122	1,229
123	0,988
124	1,133
169	0,971

En este ensayo se realizó en la misma placa que una cuantificación de triglicéridos de hígado, por ello ambos compartían curva estándar (curva estándar #1). Los resultados de la interpolación de los datos de absorbancia de las muestras en la curva estándar permitieron la obtención de los datos de concentración de triglicéridos en las muestras respecto a los miligramos de tejido tomados para hacer el ensayo (Anexo 6). Finalmente, se realizó la media de cada grupo de ratones (según la concentración de TBTC) y la desviación estándar:

	Media	Desviación estándar
TBT0	0,791	0,115
TBT100	0,876	0,221
TBT500	0,970	0,094
TBT1000	0,754	0,131



**Figura 24.** Promedio de concentración de triglicéridos/mg de tejido en muestras de músculo de crías de ratón por grupos Eje y. Concentración de triglicéridos(nmol/pocillo) /mg de tejido. Eje x. Grupo de ratones.

Se llevó a cabo un test-t desapareado en StatView 6.0 (SAS Institute Inc.) siguiendo el mismo criterio que en el ensayo de hígado.

Los resultados indican que las únicas diferencias significativas entre los grupos se presentan entre TBT0 y TBT500 ( $p$ -Valor=0,0271) y entre TBT1000 y TBT500 ( $p$ -Valor=0,0173).



## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos han sido analizados en función de la concentración de TBTC y del tipo de ratón del estudio (ratones hembra gestantes o sus crías). Así se podrá discernir si la exposición *in utero* a TBTC provoca efectos similares a una exposición directa o no, y si los resultados obtenidos se asocian con los observados en otros artículos bibliográficos.

El índice de grasa abdominal (Fig. 6) fue analizado en muestras de crías de ratón. No se observaron diferencias entre los grupos a excepción de los ratones tratados con concentraciones del tóxico de 1000 nM, en los que el contenido de grasa disminuye. Esto se contradice con lo observado en la bibliografía, en 2013 se llevó a cabo un estudio similar al realizado en el presente trabajo (Chamorro-García *et al.*, 2013) y sí que se observó un aumento del índice de grasa abdominal por exposición *in utero* del tóxico, así como el realizado por Bertuloso (Bertuloso *et al.*, 2015), a diferencia de que, en este caso, el tóxico no fue aplicado en el agua de bebida, sino que fue inyectado directamente en el estómago (implicando un mayor control de la dosis de TBTC en cada animal) y los experimentos se realizaron en rata.

Los análisis de contenido en peso de hígado en crías de ratón (Fig. 7) no muestran ninguna diferencia reseñable entre los grupos en relación a la concentración de TBTC, únicamente se observa una pequeña disminución del contenido a concentración 500 nM y un ligero aumento a 1000 nM. Por ello, vemos que no se aprecia el desarrollo de hepatomegalia por efecto del tóxico.

El contenido de gotas lipídicas (Fig. 18) y concentración de triglicéridos (Fig. 23) en hígado de crías de ratón no muestra diferencias significativas entre los grupos, con un “score” de media alrededor de 90 y con valores de desviación estándar muy elevados. Estos resultados sugieren que la exposición *in utero* al tóxico no produce acumulación lipídica en tejido hepático, sin embargo, se contradicen con los resultados obtenidos en otros artículos (Grün *et al.*, 2006; Chamorro-García *et al.*, 2013; Bertuloso *et al.*, 2015). Por otra parte, para este tipo de ensayo es necesario que los ratones ayunen previo al sacrificio, evitando así la presencia de gotas lipídicas en los controles. Debido a que estos modelos animales fueron utilizados inicialmente para el estudio del efecto del xenobiótico a nivel cerebral no se encontraban en ayunas, dificultando por ello la evaluación del contenido en grasa (tanto en madres como en crías).

En lo referente a los ratones hembra gestantes, el análisis del contenido de gotas lipídicas (Fig. 17) muestra un aumento significativo en el grupo de concentración 500 nM (con una “score” promedio de 135) respecto a los de concentraciones 0 y 100 nM. En cuanto al grupo de concentración 1000 nM presenta un valor medio mayor que los grupos de 0 y 100 nM (y menor que el de 500 nM), pero debido a su elevada desviación estándar no se ajusta al criterio establecido para considerarlo significativo. Respecto a la concentración de triglicéridos (Fig. 22), los grupos de concentración 500 y 1000 nM presentan mayor valor de media que los de 0 y 100 nM, pero solo se considera significativa la comparación entre los grupos de concentración 100 y 1000 nM. En definitiva, vemos que se observa una tendencia hacia un mayor contenido de triglicéridos en hígado en los grupos de concentración de TBTC de 500 y 1000 nM, lo cual coincide con lo observado en la bibliografía. Sin embargo, este aumento podría haber sido más evidente y significativo si se hubieran cumplido las condiciones de ayuno previo al sacrificio, y si se hubieran realizado más repeticiones y analizado más muestras de ratones.

Por otra parte, la concentración de triglicéridos en hígado en ratones hembra gestantes entre los grupos de concentraciones de TBTC de 0 y 100 nM no muestra variaciones. El estudio realizado por Von Ballmoos (von Ballmoos, Brunner and Dimroth, 2004) demostró que la inhibición de las ATP-sintasas por exposición a TBTC tenía una constante de inhibición  $K_i$  de alrededor de 200 nM de concentración de tóxico (Fig. 3). Es decir, que a valores menores de 200 nM la inhibición de las ATP-sintasas sería relativamente despreciable. Por otro lado, el estudio realizado en 2006 por Felix Grün (Grün *et al.*, 2006) defendía que el TBTC actúa como activador de los receptores nucleares RXR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  a concentraciones entre 10 y 100 nM del tóxico. Así, nuestros resultados coincidirían con los obtenidos por Llobet en 2015 (Llobet *et al.*, 2015), los cuales defendían que el mecanismo mediante el cual se da la adipogénesis y la acumulación lipídica es mediante la inhibición del sistema OXPHOS y no debido a la activación de receptores nucleares.

En cuanto a los ensayos realizados en tejido muscular, fueron analizadas únicamente 5 muestras de ratones de cada grupo. Para sacar una conclusión clara acerca de estos estudios deberíamos realizar un mayor número de replicados y de muestras analizadas.

El contenido en peso de músculo en crías de ratón (Fig. 8) muestra un aumento significativo entre controles y los grupos de concentración 100 y 500 nM. Por tanto, vemos que se ha producido un cambio en el contenido muscular del animal debido a la exposición al tóxico a concentraciones similares a la contaminación ambiental de TBTC.

La concentración de triglicéridos (Fig. 24) en músculo parece mostrar un aumento relacionado con la concentración del tóxico. Sin embargo, se observa una disminución de concentración en el grupo de 1000 nM y, además, el grupo de concentración 100 nM presenta una desviación estándar muy elevada (posiblemente debido al bajo número de muestras analizadas), dejando como única diferencia significativa la que se presenta entre los grupos 0 y 500 nM.

Tomando los resultados de los análisis en tejido muscular vemos que a concentraciones de 100 y 500 nM de tóxico se observa un aumento del contenido en peso del tejido y de la concentración de triglicéridos. Es posible que esta mayor cantidad de triglicéridos es la que provoque el aumento del peso del tejido muscular. Así, la exposición *in utero* podría ser causante del desencadenamiento de una acumulación de lípidos en tejidos que no deberían contenerlos, como es el músculo. Esto supondría un problema mucho más grave que una acumulación en hígado o en tejido adiposo, ya que un aumento de lípidos en músculo se ha asociado con el desarrollo de problemas endocrinos y metabólicos como diabetes y resistencia a la insulina (Abdul-Ghani *et al.*, 2001; Roden, 2005).



## 7. CONCLUSIONES

La exposición directa a TBTC en ratones hembra gestantes ha provocado una acumulación de lípidos en el tejido hepático a concentraciones de 500 y 1000 nM del tóxico, sin embargo, a concentraciones de 100 nM no se ha observado este efecto, manteniéndose los niveles de triglicéridos de los controles.

La exposición *in utero* a TBTC a concentraciones entre 100 y 1000 nM a ratones hembra no ha provocado un aumento de índice en grasa abdominal ni de concentración de triglicéridos en tejido hepático. Tampoco se ha observado el desarrollo de hepatomegalia. Sin embargo, se ha dado un aumento en la acumulación de triglicéridos y del contenido en peso en tejido muscular, que podría causar, según la bibliografía consultada, problemas como resistencia a la insulina y diabetes.

## 7. CONCLUSIONS

Direct exposure to TBTC in pregnant female mice has generated a lipid accumulation in the hepatic tissue at concentrations up to 500 and 1000 nM of the toxic, however, at concentrations of 100 nM this effect has not been perceived, maintaining the triglycerides levels of the controls.

*In utero* exposure to TBTC at concentrations between 100 and 1000 nM to female mice has not caused an increase of the abdominal lipid rate nor of the triglycerides in hepatic tissue. A development of hepatomegaly has not been observed neither. Nevertheless, an increase in the triglyceride accumulation and the muscular tissue contents has taken place which could motivate, according to the consulted sources, inconveniences such as insulin resistance and diabetes.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani, M. A. *et al.* (2001) 'Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action.', *Diabetes*, 50(1), pp. 219–226. doi: 10.1210/jc.2002-020570.
- Aldridge, W. N. (1958) 'The biochemistry of organotin compounds. Trialkyltins and oxidative phosphorylation', *Biochemical Journal*, 69(3), pp. 367–376. doi: 10.1042/bj0690367.
- Atanasov, A. G. *et al.* (2005) 'Organotins disrupt the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2-dependent local inactivation of glucocorticoids', *Environmental Health Perspectives*, 113(11), pp. 1600–1606. doi: 10.1289/ehp.8209.
- von Ballmoos, C., Brunner, J. y Dimroth, P. (2004) 'The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), pp. 11239–11244. doi: 10.1073/pnas.0402869101.
- Bertuloso, B. D. *et al.* (2015) 'Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas', *Toxicology Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 235(1), pp. 45–59. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.03.009.
- Boyer, P. D. (1997) 'the Atp Synthase—a Splendid Molecular Machine', *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), pp. 717–749. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
- Capaldi, R. A. y Aggeler, R. (2002) 'Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor.', *Trends in biochemical sciences*, 27(3), pp. 154–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893513>.
- Chamorro-García, R. *et al.* (2013) 'Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice', *Environmental Health Perspectives*, 121(3), pp. 359–366. doi: 10.1289/ehp.1205701.
- Dimroth, P., von Ballmoos, C. y Meier, T. (2006) 'Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases: Fourth in the Cycles Review Series', *EMBO Reports*, 7(3), pp. 276–282. doi: 10.1038/sj.embor.7400646.
- Farina, M. *et al.* (2003) 'Methylmercury Increases Glutamate Release from Brain Synaptosomes and Glutamate Uptake by Cortical Slices from Suckling Rat Pups : Modulatory Effect of Ebselen', 140, pp. 135–140. doi: 10.1093/toxsci/kfg058.
- Grün, F. *et al.* (2006) 'Endocrine-Disrupting Organotin Compounds Are Potent Inducers of Adipogenesis in Vertebrates', *Molecular Endocrinology*, 20(9), pp. 2141–2155. doi: 10.1210/me.2005-0367.
- Gumy, C. *et al.* (2008) 'Dibutyltin disrupts glucocorticoid receptor function and impairs glucocorticoid-induced suppression of cytokine production', *PLoS ONE*, 3(10). doi: 10.1371/journal.pone.0003545.
- Kaim, G. and Dimroth, P. (1998) 'A triple mutation in the a subunit of the escherichia coli/Propionigenium modestum F1F(o) ATPase hybrid causes a switch from Na<sup>+</sup> stimulation to Na<sup>+</sup> inhibition', *Biochemistry*, 37(13), pp. 4626–4634. doi: 10.1021/bi973022f.
- Kanayama T1, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, N. J. (2005) 'Organotin Compounds Promote Adipocyte Differentiation as Agonists of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma/Retinoid X Receptor Pathway', *Molecular Pharmacology*, 67(3), pp. 766–774. doi: 10.1124/mol.104.008409.family.

Kotake, Y. and Topics, C. (2012) 'Advances in Biology and Toxicology of Environmental Metals/Metalloids Molecular Mechanisms of Environmental Organotin Toxicity in Mammals', *Biol. Pharm. Bull.*, 35(11), pp. 1876–1880.

Llobet, L. *et al.* (2015) 'Xenobiotics that affect oxidative phosphorylation alter differentiation of human adipose-derived stem cells at concentrations that are found in human blood', *Disease Models & Mechanisms*, 8(11), pp. 1441–1455. doi: 10.1242/dmm.021774.

Lyssimachou, A. *et al.* (2015) 'The mammalian "obesogen" tributyltin targets hepatic triglyceride accumulation and the transcriptional regulation of lipid metabolism in the liver and brain of zebrafish', *PLoS ONE*, 10(12), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0143911.

Martín Domínguez, V. *et al.* (2013) 'Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica', *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 105(7), pp. 409–420. doi: 10.4321/S1130-01082013000700006.

Miller, B., Park, T. y Carolina, N. (1984) 'Biochemical, Functional and Morphological Indicators of Neurotoxicity: Effects of Acute Administration of Trimethyltin the Developing Rat1 to', pp. 744–751.

Nakatsu, Y. *et al.* (2008) 'Activation of AMP-activated protein kinase by tributyltin induces neuronal cell death', 230, pp. 358–363. doi: 10.1016/j.taap.2008.03.021.

Robert G. Feldman, MD; Roberta F. White, PhD; Ikechukwu I. Eriator, M. (1993) 'Trimethyltin Encephalopathy', pp. 2–6.

Rocha, M. V. J. *et al.* (2012) 'Construction and assessment of reaction models between F1F0-synthase and organotin compounds: Molecular docking and quantum calculations', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 31(10), pp. 1175–1181. doi: 10.1080/07391102.2012.726533.

Roden, M. (2005) 'Muscle triglycerides and mitochondrial function: Possible mechanisms for the development of type 2 diabetes', *International Journal of Obesity*, 29, pp. S111–S115. doi: 10.1038/sj.ijo.0803102.

Tsuda, T. *et al.* (1995) 'Daily intakes of tributyltin and triphenyltin compounds from meals.', *Journal of AOAC International*, 78(4), pp. 941–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7580332> (Accessed: 22 May 2019).

Whalen, M. M., Loganathan, B. G. y Kannan, K. (1999) 'Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro', *Environmental Research*, 81(2), pp. 108–116. doi: 10.1006/enrs.1999.3968.