

# **EFECTO DE XENOBIÓTICOS MITOCONDRIALES EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL:**

## **IMPLICACIÓN EN LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES Y NEURODEGENERATIVAS**

Effect of mitochondrial xenobiotics on neuronal  
differentiation: Implication in mitochondrial and  
neurodegenerative diseases

---

Trabajo Fin de Máster. Máster Biología Molecular y Celular

**Autora:** Lucía Berdejo Embid

**Directora:** Ester López Gallardo

**Codirectora:** Carmen Hernández Ainsa

## ABREVIATURAS

<b>Acetil-CoA</b>	Acetil Coenzima A
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATPasa</b>	ATP sintasa
<b>CoQ</b>	Coenzima Q
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>DHODH</b>	Dihidrorotato deshidrogenasa
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ETC</b>	Cadena transportadora de electrones
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>FAM</b>	6-Carbozifluoresceína
<b>FBSN</b>	Necrosis estriatal bilateral infantil familiar
<b>iPSCs</b>	Células madre pluripotentes inducidas
<b>JNK</b>	C-Jun N-terminal kinase
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MAP</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MILS</b>	Síndrome de Leigh de herencia materna
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NARP</b>	Neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NSC</b>	Células madre neurales
<b>OXPHOS</b>	Sistema de fosforilación oxidativa

<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAasa</b>	Ribonucleasa
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rRNA</b>	RNA ribosómico
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>TBT</b>	Tributilo de estaño
<b>TBTC</b>	Cloruro de tributil estaño
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TH</b>	Tirosina Hidroxilasa
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>VIC</b>	2-Cloro-7-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
1.1. ABSTRACT .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
2.1. SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL .....	2
2.2. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA .....	3
2.3. IMPORTANCIA DE OXPHOS EN CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO .....	4
2.3.1. Trascendencia en la diferenciación neuronal .....	5
2.3.2. Enfermedades neurodegenerativas .....	5
2.4. TÓXICO INHIBIDOR DEL SISTEMA OXPHOS: TBTC .....	7
2.4.1. Otros efectos del TBTC .....	10
2.4.2. Posible estrategia paliativa de los efectos neurotóxicos del TBTC .....	11
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y LÍNEAS CELULARES .....	13
4.2. APARATOS E INSTRUMENTOS .....	13
4.3. REACTIVOS GENERALES .....	14
4.3.1. Medios de cultivo y material estéril .....	14
4.3.2. Reactivos para PCR .....	14
4.3.3. Kits comerciales .....	15
4.3.4. Anticuerpos .....	15
4.4. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR .....	15
4.4.1. Cultivos celulares eucariotas .....	16
4.4.2. Mantenimiento cultivos celulares .....	16
4.4.3. Tripsinización .....	16
4.4.4. Recuento celular .....	16
4.4.5. Congelación y descongelación celular .....	17

4.5. DIFERENCIACIÓN NEURONAL .....	17
4.5.1. Inmunofluorescencia: Microscopía .....	17
4.6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	18
4.6.1. Extracción de RNA .....	18
4.6.2. Cuantificación de RNA .....	19
4.6.3. RT-qPCR .....	19
4.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL .....	20
4.7.1. Evaluación de la viabilidad celular .....	20
4.7.2. Medida de ATP y número de células .....	21
4.7.3. Medida de consumo de oxígeno .....	21
4.7.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	22
4.7.4.1. Fijación de células .....	22
4.7.4.2. Microscopio de transmisión .....	23
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	23
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
5.1. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA SH-SY57 .....	24
5.1.1. Diversas concentraciones de TBTC sobre la viabilidad celular .....	25
5.1.2. Análisis del consumo de oxígeno en presencia de TBTC .....	26
5.1.3. Medida de ATP y número de células .....	28
5.1.4. Análisis cualitativo mediante inmunofluorescencia .....	30
5.1.5. Análisis de marcadores neuronales mediante RT-qPCR .....	31
5.1.6. Microscopía electrónica de transmisión .....	32
5.2. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA NSC .....	35
5.2.1. Análisis del consumo de oxígeno en presencia de TBTC .....	36
5.2.2. Análisis cualitativo mediante inmunofluorescencia .....	38
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
7.1. CONCLUSIONS .....	46
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>4</b>

## 1. RESUMEN

En la actualidad, a pesar de muchos años de investigación, la mayoría de los mecanismos biológicos que dan lugar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas son todavía una incógnita. Se ha comprobado que son enfermedades muy ligadas al envejecimiento y, además, es posible que ciertos factores ambientales induzcan o provoquen estas patologías. Esto ocurre con el cloruro de tributilestaño, el cual se une a una subunidad del complejo V provocando su inhibición y a consecuencia, una disminución en la producción de ATP mitocondrial. Este tóxico ambiental se empleó como antiincrustante en la pintura que recubría los barcos y tiende a bioacumularse en especies tróficas superiores de la cadena alimentaria. De hecho, se han encontrado concentraciones de TBT y alguno de sus derivados en sangre humana, en un rango de 8-293 nM. Sin embargo, no se ha demostrado el efecto que pueden tener estos tóxicos en la diferenciación y funcionalidad neuronal.

Por tanto, en el siguiente trabajo se han llevado a cabo estudios para ver cómo afectan diferentes concentraciones de TBTC en el desarrollo neuronal usando dos líneas celulares. Los ensayos con células SH-SY5Y no tuvieron resultados muy esclarecedores sobre la posible influencia del tóxico en el desarrollo neuronal, por lo que se empleó células madre neurales que proporcionan un modelo más real. Pequeños indicios muestran que patologías mitocondriales inducidas por factores ambientales pueden ser posibles.

### 1.1. ABSTRACT

Currently, most of the biological mechanisms that lead to the development of neurodegenerative diseases are still unknown. It has been proven that they are diseases closely linked to aging and, in addition, it is possible that certain environmental factors induce or cause these pathologies. This occurs with tributyltin chloride, which is assembled to a subunit of complex V causing its inhibition and consequently, a decrease in the production of mitochondrial ATP. This environmental toxicant was used as an antifouling in the paint that coated ships and tends to bioaccumulate in higher trophic species of the food chain. In fact, concentrations of TBT and some of its derivatives have been found in human blood, in a range of 8-293 nM. However, the effect that these toxins may have on neuronal differentiation and functionality has not been displayed.

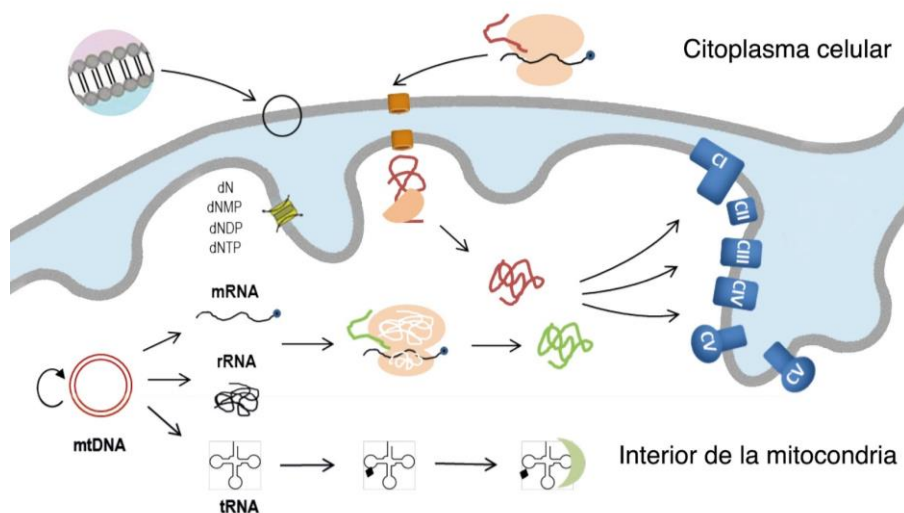
Therefore, in this work, studies have been carried out to see how different concentrations of TBTC affect neuronal development using two cell lines. The assays with SH-SY5Y cells did not have very illuminating results on the possible influence of the toxin on neuronal development, so neural stem cells were used that provide a more realistic model. Small clues show that mitochondrial pathologies induced by environmental factors may be possible.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL

La mitocondria es un orgánulo celular eucariota con un papel esencial en el funcionamiento de las células, principalmente en la producción de energía, debido al sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) que se encuentra en la membrana interna. Además, tiene otras funciones como la homeostasis del ion calcio, importación de proteínas, liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), regulación de la apoptosis...

Una particularidad de la mitocondria es que posee su propio genoma, el cual está constituido por múltiples moléculas de DNA circular de doble hebra (aproximadamente 16500 pares de bases) y contiene información sobre 37 genes, de los cuales, 13 codifican distintos polipéptidos que forman parte del sistema OXPHOS complementándose con péptidos codificados por el DNA nuclear, y los 24 restantes, codifican RNAs implicados en la maquinaria de síntesis proteica a nivel de orgánulo (22 tRNAs y 2 rRNAs). Por tanto, para el correcto funcionamiento de la mitocondria es necesaria la participación y coordinación de los dos genomas de la célula, DNA nuclear y mitocondrial [1],[2].

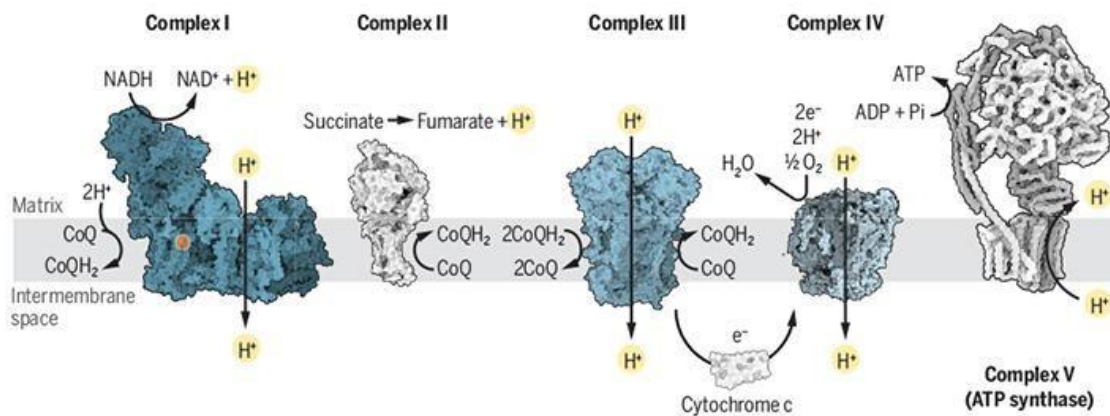


**Figura 1. Relación sinérgica entre el genoma nuclear y mitocondrial:** La cadena respiratoria humana está compuesta por varios complejos multi-enzimáticos formados por polipéptidos que han sido codificados por el DNA mitocondrial y nuclear, lo que se traduce en una coordinación de ambos.

## 2.2. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

En la célula los procesos se impulsan principalmente por la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP), nucleótido fundamental en la obtención de energía celular, por lo que es importante la provisión de esta molécula. La oxidación de NADH Y FADH<sub>2</sub> (transportadores de electrones reducidos) en la obtención de ATP se puede dar tanto en el citosol por acción de lactato deshidrogenasa (LDH) en la glucólisis como por la mitocondria mediante el sistema OXPHOS. Esta última obtiene un mayor rendimiento energético. Sin embargo, el uso de uno u otro depende del tipo de célula, sus necesidades energéticas y las condiciones en las que se encuentra [3].

El mayor rendimiento energético en OXPHOS se debe a sus dos componentes funcionales: la cadena transportadora de electrones (ETC), compuesta por los complejos I-IV, el citocromo c y la coenzima Q<sub>10</sub>; y la ATP sintasa (complejo V). Estos componentes se encuentran localizados en la membrana mitocondrial interna.



**Figura 2. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS):** Representación de la cadena transportadora de electrones (Complejos I-IV) y ATP sintasa (complejo V), incluyendo el flujo de electrones y protones a través.

El flujo de electrones a través de la ETC se complementa con el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana en los complejos I, III y IV, generándose un gradiente electroquímico que facilita el paso de protones a la matriz mitocondrial. La ATP sintasa usa este gradiente para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato.

Las enfermedades mitocondriales son aquellas causadas por defectos en el sistema OXPHOS, y por tanto, se caracterizan por una privación en el suministro de ATP, dando lugar a manifestaciones clínicas complejas y muy variadas. Una de las razones por lo que esto ocurre es debido al hecho de la relación sinérgica de los dos sistemas genéticos celulares, produciendo un gran abanico de posibilidades de mutaciones causales y patrones de herencia [2].



La tasa de mutación del mtDNA es mucho más elevada que la del DNA nuclear, ya que se generan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la ETC. Hay varias copias de mtDNA por mitocondria, y, además varias mitocondrias por célula, por lo que el alcance y complejidad de las enfermedades dependerá del porcentaje de mtDNA mutado. Entre estas mutaciones cabe destacar las deleciones. En individuos ancianos, las neuronas de la sustancia negra tienen los niveles de deleciones en el DNA mitocondrial aumentados. Esto también sucede en pacientes con ciertas enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson, donde estos niveles también están incrementados con respecto a pacientes sanos de la misma edad. Por tanto, se deduce que la edad es el factor de riesgo en las enfermedades neurodegenerativas de aparición tardía [3],[4].

### **2.3. IMPORTANCIA DE OXPHOS EN CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO**

Las neuronas son células que componen el sistema nervioso y su principal función es recibir, procesar y transmitir información por medio de señales químicas y eléctricas. Tienen una morfología bastante característica comprendida por la extensión de largos axones y dendritas ramificadas. Esto incluye el transporte de mitocondrias a través de los axones y la eliminación de orgánulos dañados. La disfunción mitocondrial afecta en mayor medida a las neuronas que a otros tipos celulares debido a la elevada demanda energética, la peculiaridad morfológica y una mayor tendencia a acumular daños.

Por la alta demanda energética, este tipo de células consumen una gran cantidad de ATP y al no disponer de almacenamiento de glucógeno dependen de un flujo ininterrumpido de glucosa. Por lo que tienen preferencia por la oxidación de este sustrato hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  mediante OXPHOS. En consecuencia, es de vital importancia el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial en las células neuronales.

Se han descrito una serie de factores que contribuyen a la vulnerabilidad preferencial de las neuronas dopaminérgicas, como el aumento del flujo de calcio y largos axones sin recubrimiento de mielina con elevadas demandas energéticas, que en conjunto aumentan el estrés oxidativo mitocondrial. Además, la presencia de dopamina (neurotransmisor) puede generar especies reactivas de oxígeno y formar aductos con proteínas implicadas en la homeostasis mitocondrial afectando a su función [5], [6].

### **2.3.1. Trascendencia en la diferenciación neuronal**

Durante el proceso de diferenciación neuronal, se incrementa el número de copias de mtDNA, el número de polipéptidos codificados por este, el consumo de oxígeno y el ATP intracelular. Se deduce de estas evidencias que en la diferenciación se produce una transición en la producción de energía, de la glicolisis al sistema OXPHOS. En consecuencia, disfunciones en OXPHOS pueden dar lugar a alteraciones en la diferenciación neuronal [7].

Por ejemplo, el sistema OXPHOS se encuentra involucrado en la producción de plasmalema, esencial en el desarrollo de las neuritas. La enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) se encarga de oxidar DHODH a orotato cediendo los electrones a la ubiquinona. Por lo tanto, si disminuye la actividad OXPHOS resultará en una disminución en la producción de orotato, que se encuentra implicado en la producción de fosfolípidos y pirimidinas, los cuales tienen relevancia en el establecimiento de la sinapsis [8],[9].

### **2.3.2 Enfermedades neurodegenerativas**

Actualmente, las enfermedades neurodegenerativas tienen una alta incidencia en personas de avanzada edad, por lo que, producen un gran impacto social. La pérdida de neuronas hipotalámicas y la apoptosis se encuentran involucradas en la progresión de estas enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Los principales factores reguladores en la muerte de las neuronas son el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la muerte celular inducida por apoptosis.

Se ha ido incrementado el estudio de la intervención de la mitocondria en el envejecimiento y fisiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas. En varias se han observado alteraciones mitocondriales. Aunque la neurodegeneración puede deberse tanto a mutaciones en el DNA mitocondrial como en el nuclear, repercutiendo en la fosforilación oxidativa, proteínas mitocondriales y en genes nucleares con implicación mitocondrial [10], [11].

Mutaciones primarias en mtDNA		
Enfermedad	Gen mutado	Afección
Síndrome de Leigh	BCS 1L	Complejo III
	MTATP 6	Complejo V
Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)	MTND6 (18 variantes alélicas)	Complejo I
Mutaciones en genes nucleares que afectan OXPHOS		
Síndrome de Leigh (COX)	Surf 1	Complejo IV
Síndrome de Leigh (COX)	SDHA	Complejo II
Síndrome de Leigh	NDUFS8, NDUFS7, NDUFV1, NDUFS4, MTND5, MTND6, NDUFS3, MTDND2	Complejo I
Mutaciones genes nucleares afectando proteínas mitocondriales		
Ataxia de Friedreich	FRDA1	Frataxina
Paraplejía espástica familiar	SPG 7	Paraplegina
Enfermedad de Wilson	ATP 7B	ATPasa transportadora de Cu
Síndrome de Mohr-Tranebjaerg	TIMM 8A	Translocasa de membrana interna mitocondrial
Mutaciones gen nuclear con involucro mitocondrial		
Alzheimer	PS 1 y PS 2	Presenilina 1 y 2
		Péptido amiloide-beta
Huntington	HD	Huntingina
Parkinson	SNCA	Alfa-sinucleína
	PARK 2 (parkina)	Ligasa de ubiquitina
	UBC	Ubiquitina
	DJ1	Sensor REDOX
	PINK 1	Cinasa Ser/ thr mitocondrial
	LRRK2	Cinasa GTPasa
	HTRA2	Proteasa apoptótica
Parálisis supranuclear progresiva	PSNP 1	Proteína tau
Esclerosis lateral amiotrófica	SOD1	Superóxido dismutasa

**Tabla 1. Enfermedades neurodegenerativas con alteraciones mitocondriales:** Se exponen diferentes enfermedades neurodegenerativas que pueden ser producidas por mutaciones en el DNA mitocondrial directamente, o en el DNA nuclear afectando a OXPHOS o proteínas mitocondriales. Aparece el gen mutado que produce cada determinada enfermedad y el complejo de la cadena respiratoria al que afecta.

Como se puede observar en la tabla 1, en el síndrome de Leigh uno de los genes mutados es el MT-ATP6, el cual codifica el polipéptido p.MT-ATP6, componente esencial del complejo V, que actúa como canal de iones de hidrógeno acoplado el transporte de iones con la catálisis rotatoria de ATP.

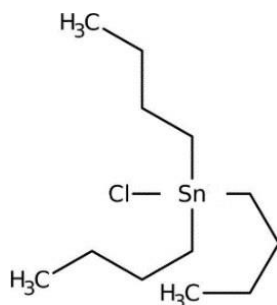
Las mutaciones puntuales en este determinado gen causan algunos trastornos mitocondriales: FBSN (necrosis estriatal bilateral familiar), MILS (síndrome de Leigh de herencia materna) y NARP (neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria). El deterioro bioenergético y el daño oxidativo a consecuencia de la disfunción de la ETC son dos hipótesis características de la patogénesis de las encefalopatías mitocondriales humanas. Pero existen detalles mecanicistas de estos trastornos que siguen sin estar claros, por lo que los enfoques terapéuticos siguen siendo en la actualidad muy limitados.

Existe la hipótesis de que tóxicos ambientales podrían simular los efectos de las mutaciones de este gen, al inhibir el complejo V por unión a dicho polipéptido. De hecho, en el grupo de investigación Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Universidad de Zaragoza, se comprobó que los niveles de consumo de oxígeno y producción de ATP eran semejantes en híbridos con mutaciones en MT-ATP6 y en aquellos expuestos a TBTC, pero no se conoce el efecto que puede tener dicho tóxico en la diferenciación y funcionalidad neuronal, lo que será objeto de estudio en el siguiente Trabajo Fin de Máster [12], [13].

#### 2.4. TÓXICO INHIBIDOR DEL SISTEMA OXPHOS: TBTC

Las organotinas son compuestos químicos cuya fórmula general es  $R_nSnX_4$ , donde R es un grupo alquilo y X un anión ( $Cl^-$ ,  $COO^-$ ,  $OH^-$ ). Estos se caracterizan por la presencia de, como mínimo, un enlace covalente C-Sn. Dependiendo del número de enlaces alquilo o arilo unidos a su centro tetravalente de estaño, se pueden clasificar como mono-, di-, tri- o tetraorganotinas. Entre sus propiedades físicas se pueden destacar que son líquidos incoloros o con un leve color amarillento, y son poco solubles en agua. La liberación al medio ambiente de estos compuestos se produce principalmente en el medio marino. Mientras que en los diferentes procesos de fabricación, transporte y almacenamiento el riesgo de emisión es menor.

Dentro de las organotinas se puede encontrar el cloruro de tributilestaño (TBTC), el cual se ha usado como catalizador, biocida y estabilizador térmico de polímeros de cloruro de polivinilo durante mucho tiempo. Principalmente, fue utilizado como componente antiincrustante de la pintura que recubría los barcos [14],[15].



**Figura 3. Estructura molecular del cloruro de tributilestaño (TBTC)**

Se consideró como tóxico en 1990 ya que puede desencadenar efectos nocivos en los organismos a bajas concentraciones. Por tanto, se trata como un compuesto químico orgánico disruptor endocrino por sus propiedades peligrosas para la salud y el medio ambiente, por lo que su uso comercial debe eliminarse por completo. Su tasa de degradación ambiental es bastante lenta, por lo que los compuestos de TBTC tienden a bioacumularse en especies tróficas superiores de la cadena alimentaria.

Las concentraciones de TBT en sangre humana se encuentran entre 8 y 293 nM, sin embargo, estos se eliminan con facilidad rápidamente de la sangre. Por lo que, la sangre no es el compartimento biológico ideal para evaluar la carga de TBTC y sus derivados en humanos. El nivel de ingesta diaria tolerable que se ha impuesto para humanos es de 0,25 microgramos/kg de peso corporal, basándose en estudios de inmunotoxicidad.

En este caso, el interés por este compuesto se debe a que es una buena herramienta en la investigación de la función cerebral. Los efectos neuropatológicos producidos por la intoxicación por este xenobiótico pueden proporcionar una visión general del mecanismo de acción de dicho compuesto y adaptaciones a los procesos inducidos por la toxina [14],[16].

Las organotinas son sumamente lipofílicas y atraviesan sin dificultad la barrera hematoencefálica (BHE) para ingresar en el cerebro. Este posee un alto potencial oxidativo, sin embargo, una capacidad limitada para combatir al estrés oxidativo. Normalmente, existe un equilibrio estable entre prooxidantes y antioxidantes para asegurar una óptima eficiencia. Pero cuando la tasa de generación de ROS excede la capacidad de actuación de los antioxidantes, se produce estrés oxidativo. Este acontecimiento puede producir efectos negativos en proteínas, lípidos y DNA. Sin embargo, la respuesta de algunas regiones del cerebro al estrés oxidativo no es homogénea y puede aparecer resiliencia selectiva. Numerosas neuropatologías han sido relacionadas con el estrés oxidativo. La exposición en mamíferos a cloruro de tributilestaño puede dar lugar a epilepsia y amnesia, por lo que es especialmente neurotóxico en el sistema nervioso central. Todavía no se conoce el mecanismo mediante el que se producen estos efectos [17].

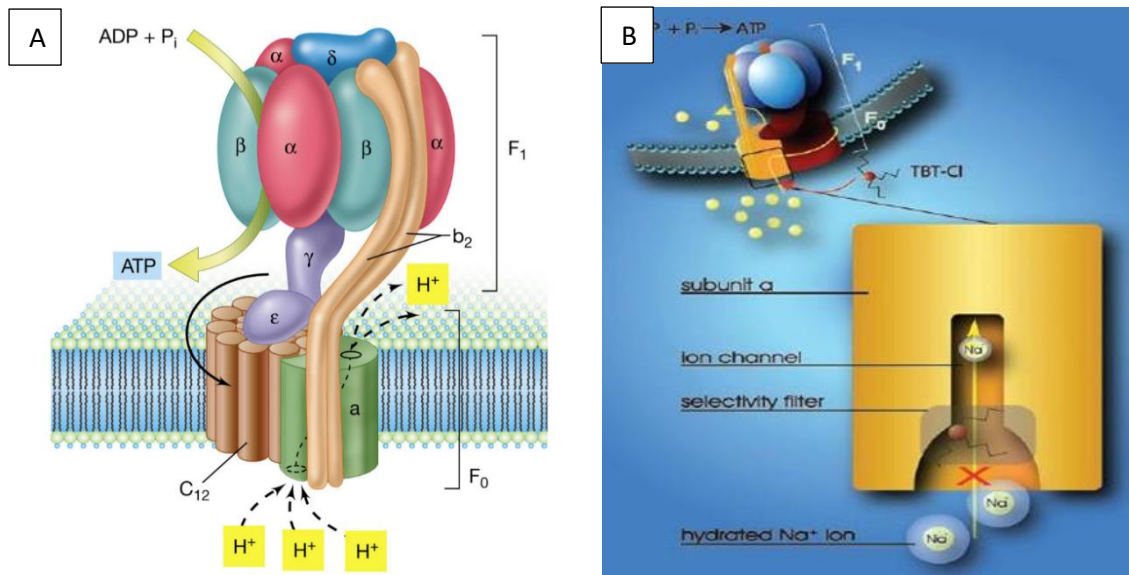
Gracias a diferentes estudios se han comprobado algunos factores que se ven afectados en las neuronas tras la exposición al tóxico:

- Se produce la salida de glutamato, cuya acumulación excesiva puede desencadenar una activación desmedida de sus receptores, aumentando los niveles de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El calcio tiene un papel esencial en la transmisión del impulso nervioso al desencadenar la liberación de neurotransmisores y modular numerosas reacciones celulares. Por lo que es necesario en el mantenimiento fisiológico de una célula, modulando las propiedades de la barrera hematoencefálica e induciendo la muerte neuronal mediante excitotoxicidad a través del receptor NMDA.

En resumen, un incremento en los niveles de Ca extracelular puede afectar a la excitabilidad de las neuronas, sin embargo, el aumento de los niveles intracelulares conduce a la muerte celular neuronal excitotóxica y a la generación de oxidantes a través de las vías mitocondriales. Y la disminución de los niveles de calcio intracelular puede obstaculizar varias vías de señalización [18].

- Induce la activación de calpaínas. Algunas investigaciones han demostrado que la inhibición de la activación de la calpaína previene la fragmentación inducida por la exposición a TBTC de las proteínas citoesqueléticas neuronales y muerte neuronal. Esto significa que la activación de la calpaína es clave en la neurodegeneración periférica inducida por TBT [18].
- Induce daño neuronal oxidativo al inhibir la actividad de la glutatión-S-transferasa [19].
- Degeneración de axones [22].
- Exposiciones cortas a altas concentraciones de TBT ( $\approx 500\text{nM}$ ) causan la expresión de AMPK y posterior fosforilación por parte del compuesto de estaño. La liberación de glutamato puede controlarse mediante AMPK, por lo que la activación de AMPK por la exposición al tóxico produce la muerte neuronal.
- Inhibe la biosíntesis de dopamina en las células neuronales mediante la reducción de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), provocando estrés oxidativo y daño celular. En algunos estudios se ha propuesto como mecanismo la posibilidad de que la producción de dopamina se vea afectada cuando el xenobiótico se asocia con L-DOPA, exacerbando los síntomas de la enfermedad de Parkinson [19], [20],[21].
- Como se ha comentado con brevedad anteriormente, el TBTC tiene la capacidad de inhibir la ATP sintasa (CV), lo que se traduce en una disminución en los niveles de ATP neuronal, desencadenando la autofagia y activación de la caspasa 3/7 seguida de fragmentación del material genético.

Este último mecanismo de toxicidad provocado por el TBTC está bien caracterizado. Como se puede ver en la figura 4, la ATP sintasa está compuesta por dos regiones ( $F_0$  y  $F_1$ ), las cuales se encuentran conectadas. Tienen un papel primordial en el metabolismo energético y por ello son esenciales en prácticamente todas las células. La región  $F_0$  se encarga de transformar la energía de un gradiente electroquímico transmembranal de iones en un esfuerzo de torsión. La rotación se transmite a través del eje de unión a la región  $F_1$ , donde se produce la síntesis del ATP, a partir de fosfato y ADP. Uno de los efectos tóxicos de las organotinas es el daño producido en la fosforilación oxidativa mitocondrial. La subunidad de F-ATP sintasa contiene un canal iónico que permite el acceso al sitio de enlace de la subunidad  $C_{11}$  desde la superficie periplásmica. Este canal es imprescindible en el funcionamiento del complejo enzimático, ya que enzimas mutantes que tienen dicho canal bloqueado quedando totalmente inactivadas.



**Figura 4. Inhibición de la ATP sintasa (Complejo V) por parte del TBTC:** A) Estructura de la ATP sintasa formada e interconectada por dos regiones ( $F_0$  y  $F_1$ ). B) Mecanismo de inhibición del canal iónico por competición del TBTC con cationes  $Na^+$ .

Se comprobó en distintas investigaciones que el TBTC influye en la región  $F_1$  compitiendo con los cationes de  $Na^+$ , debido a la superposición estructural de los sitios de reconocimiento de ambos. El bloqueo del canal iónico se relaciona con alteraciones a nivel de diferenciación adipogénica, lo que significa que la exposición al tóxico puede dar lugar al desarrollo de síndromes metabólicos [23],[24],[25].

#### 2.4.1. Otros efectos del TBTC

Aparte de la inhibición de ATP sintasa, este xenobiótico produce otros efectos perjudiciales caracterizados por distintos mecanismos de toxicidad. Los más destacables se describen a continuación:

- Inmunotoxicidad

En estudios con ratas expuestas a TBT y DBT se ha visto como consecuencia una atrofia del timo y supresión de la respuesta inmune de los linfocitos T. La atrofia se produce por una disminución en el número de linfoblastos de crecimiento rápido, pero el mecanismo de acción de las organotinas en este caso es desconocido. Existe la hipótesis de que estos compuestos inducen la apoptosis PPAR $\gamma$ -dependiente de linfocitos en el timo, al activar las enzimas caspasa 3 y 9, provocando la caída del potencial de membrana mitocondrial promoviendo la destrucción del sustrato de estas enzimas [26].

- Variación de la homeostasis esteroidea

Se ha comprobado que una alta exposición a TBTC puede dar lugar a una disminución en la actividad de la enzima aromatasa, la cual forma parte de la biosíntesis de los estrógenos, produciendo un incremento en los niveles de testosterona. Este efecto se ha observado en moluscos gasterópodos, sin embargo, en mamíferos predominan más efectos dañinos neuronales, hepáticos y de inmunotoxicidad [28].

- Agonista de receptores nucleares

El TBTC ha sido definido como agonista de los receptores nucleares RXR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , los cuales forman un heterodímero permisivo para modular la transcripción de sus genes diana como la acil-CoA oxidasa, para un rango de concentraciones 10-100 nM. Estos receptores controlan la vía de oxidación beta peroxisomal de los ácidos grasos, regulando así la adipogénesis.

Estudios in vitro en roedores y humanos han evidenciado acumulación de triglicéridos y un aumento de la expresión de marcadores adipogénicos. Estos resultados sugieren que el TBTC altera el metabolismo lipídico y provoca obesidad al activar estos receptores nucleares [27].

#### **2.4.2. Posible estrategia paliativa de los efectos neurotóxicos producidos por TBTC**

La supresión de la apoptosis neuronal puede proporcionar una estrategia para paliar las secuelas neurodegenerativas y tratar este tipo de enfermedades.

En varias investigaciones se ha comprobado que la paeoniflorina (PF), un monoterpeno glicósido que actúa como fármaco obtenido del extracto de plantas, tiene efectos antiapoptosis, además de antiinflamatorios y antioxidantes. De hecho, PF tiene un importante potencial neuroprotector. En los estudios se contempló la posibilidad de que PF puede preservar neuronas hipotalámicas de la citotoxicidad producida por TBTC, la reducción de MMP y la apoptosis, mediante la inhibición de la vía de señalización MKK4-JNK, disminuyendo los niveles de caspasa 3 y modulando la relación Bcl-2/Bax. Algunos de estos estudios han concluido que el PF es capaz de proteger neuronal del hipocampo y corticales de la neurotoxicidad.

Por tanto, la vía de señalización de JNK es una diana molecular para el tratamiento de la apoptosis inducida por neurodegeneración. La activación de JNK se lleva a cabo mediante la excitación secuencial de MAP y MAPK quinasas específicas [29],[30].



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Uno de los proyectos iniciales del grupo de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza consistió en el estudio de los síndromes de necrosis estriatal causados por la mutación de MT-ATP6, ya que encontraron que los cíbridos expuestos al tóxico TBTC presentaban niveles similares de consumo de oxígeno y producción de ATP que cíbridos que poseían esa mutación, por lo tanto, la exposición de cultivos celulares con este tóxico podría ser un buen modelo para este tipo de enfermedades mitocondriales, ya que no existe un modelo neuronal de la mutación hasta el momento.

En este trabajo se parte de la posibilidad de que un tóxico ambiental sea capaz de influir en el desarrollo neuronal durante la gestación debido a la exposición in útero y a consecuencia, se produzcan efectos negativos en neuronas dopaminérgicas, provocando una enfermedad mitocondrial temprana o incluso con el tiempo algún tipo de enfermedad neurodegenerativa.

Por tanto, el fin de este trabajo es comprobar el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de TBTC sobre la diferenciación neuronal dopaminérgica en SH-SY5Y y NSC. Se establecen a continuación los objetivos específicos secuenciales:

1. Establecer las concentraciones de TBTC viables para llevar a cabo la diferenciación neuronal.
2. Seguimiento de la diferenciación neuronal dopaminérgica durante 7 días a diferentes concentraciones de tóxico en ambas líneas celulares y su correspondiente caracterización con marcadores específicos neuronales.
3. Estudio de la mínima concentración de TBTC significativa a partir de la cual se empiezan a observar efectos en OXPHOS, por inhibición de la ATP sintasa, mediante ensayo de consumo de oxígeno en células diferenciadas y no diferenciadas.
4. Comparación de la producción de ATP y expresión génica relativa dependiendo de la concentración de tóxico.
5. Estudio de las posibles variaciones morfológicas y dinámica mitocondrial debida a la exposición de TBTC.
6. Comparación de los efectos producidos por el tóxico en ambas líneas celulares.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y LÍNEAS CELULARES

En el presente Trabajo de Final de Máster se ha trabajado con las siguientes líneas células eucariotas por su capacidad de diferenciación a neuronas dopaminérgicas.

- Células madre neurales humanas (NSC), obtenidas en nuestro laboratorio por diferenciación a partir de iPSC control (Induced pluripotent stem cells).
- Línea celular aneuploide SH-SY5Y, aislada de neuroblastoma, adquiridas en ATCC (CRL-2266™).

### 4.2. APARATOS E INSTRUMENTOS

<b>Función</b>	<b>Aparato</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>	<b>Observaciones</b>
Microscopía	Invertido	DMIL	Leica	Cámara ICC50 HD
Balanza	Analítica	ML204	Mettler Modelo	Precisión 0,001g
Almacenamiento	Ultracongelador	CFC Free	Sanyo	Muestras biológicas (-80°C)
	Frigoríficos y Congeladores	Varios	Whirpool, Bosch..	Reactivos y disoluciones (4°C y -20°C)
Manejo volumen	Micropipetas	Nichipet EX	Nichiryo	2, 20, 200 y 1000µl
	Micropipetal Multicanal	Finnpipette	TermoFisher Scientific	50 y 300µl
	Pipeteador automático	PipetBoy	Integra (Biosciences)	1-50ml
Recuento Celular	Contador	Countess Automated Cell Counter	ThermoFisher Scientific	Azul Tripán
Cultivo celular	Incubador	DHD Autoflow	Nuaire	Con isopropanol y rampa de Tª de 1°C/min.
	Campana de flujo laminar	LabGard ES UN-437 Class II, type A2 Biosafety	Nuaire	
Congelación de células	Criocontenedor	Mr. Frosty™	ThermoFisher Scientific	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , atmósferahúmeda
Atemperado	Baño termostaticado	Precistern	Selecta	

Centrífuga	Microcentrífuga	MiniSpin® plus	Eppendorf	
	Centrífuga	Allegra X-22	Beckman Coulter	
PCR	Real-time PCR	StepOne™ System	ThermoFisher Scientific	96 pocillos
Espectrofotómetros	Lector de placas	NOVOstar	BMG LabTech	Absorbancia, fluorescencia y luminiscencia
	Nano-drop	ND-1000	ThermoFisher Scientific	Ácidos nucleicos
Inmunofluorescencia	Microscopio confocal	EVOS Fluid Cell Imaging	ThermoFisher Scientific	

**Tabla 2. Instrumentos y aparatos empleados en la realización del presente trabajo:** Se especifica el aparato, marca, modelo y observaciones.

### 4.3. REACTIVOS GENERALES

Los reactivos químicos empleados son aptos para cultivo celular y biología molecular. Proceden principalmente de las casas comerciales ThermoFisher Scientific, Merck, Sigma-Aldrich, BioRad, Roche y Panreac®.

#### 4.3.1. Medios de cultivo y material estéril

Los medios de cultivo celular y el suero fetal bovino (FBS) provienen de Gibco™, Invitrogen.

El material estéril de plástico utilizado que incluye placas de 6,12,96 pocillos y de 100 mm, tubos Falcon, criotubos, pipetas, etc. proceden de TTP, Suiza.

#### 4.3.2. Reactivos para PCR

Los reactivos empleados para la PCR cuantitativa (qPCR) procedían de TaqMan® Multiplex PCR Master Mix de la casa comercial Applied-Biosystems. Las sondas y oligonucleótidos utilizados se sintetizaron por ThermoFisher Scientific y se purificaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

### 4.3.3. Kits comerciales

<b>Función</b>	<b>Nombre</b>	<b>Casa comercial</b>
Extracción de DNA	<i>NucleoSpin® RNA</i>	Macharey- Nagel
Real-time PCR	<i>TaqMan Gene Expression/Genotyping Master Mix</i>	Applied- Biosystems
Determinación viabilidad celular	LIVE/DEAD® Cell Vitality Assay Kit	Promega
Determinación niveles de ATP	CellTiter-Glo® Luminiscent Cell Viability Assay	Promega

**Tabla 3. Listado de Kits comerciales usados:** Especificando función y casa comercial.

### 4.3.4. Anticuerpos

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
$\beta$ -III-tubulina	Conejo polyclonal	1/1000	Abcam
Anti-Tirosina Hidroxilasa	Conejo polyclonal	1/1000	Sigma-Aldrich

<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
Alexa Fluor 488	Cabra polyclonal	1/1000	ThermoFisher Scientific
Alexa Fluor 594	Cabra polyclonal	1/1000	ThermoFisher Scientific

**Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia:** La dilución que se incluye es la óptima para la realización de este ensayo.

## 4.4. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

### 4.4.1. Cultivos celulares eucariotas

Para el crecimiento de la línea celular de neuroblastoma se utilizó *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco™), con un contenido en glucosa de 4,5 g/l, piruvato de sodio 1 mM y L-glutamina 584 mg/l, suplementado con suero fetal bovino (Invitrogen) al 10%, aportando proteínas y factores de crecimiento.

Las células madre neurales crecieron en un medio compuesto por KnockOut™ DMEM/F12, GlutaMAX™-I Supplement 2 mM, bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml y StemPro Neural Supplement® al 2%. Para poder sembrar esta línea celular se añadió CELLstart™ a las placas de cultivo, permitiendo así una correcta adhesión y expansión de las células.

El CELLstart™ es un sustrato definido que contiene componentes de origen humano (xeno-free). Este se diluye en D-PBS con calcio y magnesio a 1:100 y posteriormente se incuba la placa cubierta durante 1 hora a 37°C y 5% de dióxido de carbono. Tras acabar la incubación se debe eliminar la solución de CELLstart de la placa antes de su uso.

Hay que destacar que no se añadieron antibióticos para reproducir las condiciones fisiológicas y evitar efectos derivados por inhibición a nivel mitocondrial.

#### **4.4.2. Mantenimiento de los cultivos celulares**

Con el fin de garantizar la esterilidad de los cultivos celulares, las manipulaciones se realizaron en campanas de flujo laminar vertical en ausencia de antibióticos.

Ambas líneas celulares se cultivaron en placas de 6 y 96 pocillos y de 100 mm en su correspondiente medio, el cual se renueva cada 2-3 días. El cultivo se lleva a cabo en un incubador termostatzado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.4.3. Tripsinización**

Para la disociación de las células SH se emplea tripsina *TrypLE™ Express* de Gibco™, Invitrogen. Una vez que las células alcanzan una confluencia del 80% se retira el medio de cultivo sobrante y se lava con PBS sin calcio y magnesio, para descartar proteínas del suero remanentes que pueda inhibir el efecto de la tripsina. Una vez añadida la tripsina, se incuba la placa aproximadamente 2-3 minutos a 37°C. Tras comprobar que las células se han despegado y se encuentran en suspensión, se neutraliza la tripsina con la adición de medio (volumen 2 veces superior al utilizado de tripsina). Posteriormente, se centrifugan las células a 1200 rpm durante 4 minutos y se elimina el sobrenadante. Finalmente, se resuspende el pellet obtenido en el medio de cultivo preparado con anterioridad.

En el caso de las NSC, se utiliza D-PBS sin calcio y magnesio para lavar la placa y posteriormente StemPro® Accutase® para eliminar la adhesión de las células. El resto de los pasos son similares.

#### **4.4.4. Recuento celular**

Para el recuento celular se usa un contador automático, el cual detecta densidades entre 10<sup>4</sup>–10<sup>7</sup> células/ml. En el análisis de viabilidad se emplea Azul Tripán, un colorante con capacidad de penetrar en las células que tienen la membrana plasmática dañada, por lo que quedan teñidas de azul las células no viables y las viables sin colorear. Se recoge una alícuota de 20 µl de la suspensión celular y un volumen análogo del colorante y se homogeneizan, se depositan en una cámara desechable por duplicado y ya se puede proceder al recuento automático.

#### 4.4.5. Congelación y descongelación celular

En la descongelación de los cultivos celulares se parte de uno o varios criotubos (procedentes del congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  o tanque de nitrógeno líquido). Se introduce el vial al baño con agua para prevenir la formación de cristales al descongelar. Se prepara un tubo Falcon de 15 ml con aproximadamente 10 ml de medio de cultivo previamente atemperado y se traspasa el contenido del criotubo descongelado rápidamente, evitando el contacto de las células con el DMSO durante mucho tiempo. La suspensión celular se centrifuga a 1000 rpm durante 4 minutos, se aspira y elimina el sobrenadante y finalmente se resuspenden las células en medio completo previamente preparado. La viabilidad de las células descongeladas debe estar en torno al 80%.

En el proceso de congelación de los cultivos, se tripsinizan las células y se pipetea suavemente para hacer de la monocapa de la superficie de la placa una suspensión celular. La tripsina o acutasa se neutraliza con el medio celular. Se centrifugan las células a 1200 rpm durante 4 minutos y el pellet resultante se resuspende dando lugar a una densidad aproximada de 1-2 millones de células/ml. El medio de congelación estará compuesto por un 20% de DMSO y 80% de medio. Se guardan en criotubos resistentes al nitrógeno líquido y se introducen en el Mr. Frosty en el  $-80^{\circ}\text{C}$ . Este sistema consiste en un recipiente de policarbonato que contiene alcohol isoamílico, el cual permite que la temperatura vaya descendiendo gradualmente  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ .

#### 4.5. DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Para el proceso de diferenciación neuronal las células se sembraron en placas de 100 mm, placas de 6 y 96 pocillos a diferentes densidades dependiendo del ensayo a realizar. Hay que destacar que en el caso de las células SH la densidad al terminar la diferenciación es mucho mayor, puesto que las células siguen creciendo durante los 2-3 primeros días del desarrollo neuronal. Esto no sucede en las NSC, una vez se encuentran en medio de diferenciación dejan de crecer y comienzan a diferenciarse.

- El medio de diferenciación de las NSC contiene Neurobasal A preparado con baja glucosa (se añade a la botella original glucosa 1 g/L y piruvato 110 mg/L), B27 serum-free supplement 2%, GlutaMax 2mM, CultureOne 100X y ácido ascórbico 200mM.
- El medio de diferenciación de las células SH-SY5Y contiene Neurobasal A preparado (también se adiciona glucosa y piruvato en la misma concentración), B27 2%, CultureOne 100X, GlutaMax 2mM,  $\text{N}_2$  y 10  $\mu\text{M}$  ácido retinoico.

El objetivo del presente Trabajo de Final de Máster es estudiar el efecto que tienen diferentes concentraciones de TBTC en los 7 días que dura la diferenciación neuronal. Por lo que para ambas líneas celulares se prepararon sus correspondientes medios de diferenciación con concentraciones finales 0,10,20,50,75 y 100 nM de tóxico a partir de TBTC alicuotado a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

#### 4.5.1. Inmunofluorescencia: Microscopía

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, cada uno de ellos en una condición de concentración de tóxico diferente, a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo en el caso de las iNSCs y  $1 \times 10^5$  células/pocillo en las SH, debido a que estas siguen creciendo en los 3 primeros días de diferenciación.

Al acabar la semana de diferenciación, las células se lavan con PBS y se fijan con PFA 4% durante 15 minutos. Se realizan dos lavados con PBS. Se permeabiliza durante otros 15 minutos con Triton-X-100 y se bloquea posteriormente con BSA 5% durante 30 minutos, permitiendo así la entrada de los anticuerpos al interior de las células. Posteriormente, se lleva a cabo la tinción con los anticuerpos primarios ( $\beta$ -III-tubulina y Anti-Tirosina Hidroxilasa, 1:1000) durante una hora. Después se realizan dos lavados con Triton al 0,1% y los pocillos se incuban con los anticuerpos secundarios (AlexaFluor 488 y 594, 1:1000) durante dos horas en oscuridad. Se vuelve a lavar con Triton 0,1% y los pocillos se dejan en PBS con 1  $\mu$ l de DAPI, el cual permite el marcaje de los núcleos.

### 4.6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 4.6.1. Extracción de RNA

- *Kit NucleoSpin® RNA*

Tras lavar con PBS y despegar las células SH S5Y5 de la superficie de las placas, el RNA total se extrajo usando y siguiendo los pasos del Kit NucleoSpin® RNA. El cual es recomendado para el aislamiento de RNA de células y tejidos libres de bacterias y levaduras, obteniendo de esta manera un RNA que puede usarse en aplicaciones posteriores sin necesidad de purificación previa.

En primer lugar, las células se lisan con una solución que contiene grandes cantidades de iones caotrópicos mediante incubación, para inactivar las RNAsas y que se creen unas condiciones favorables para la adsorción de RNA en la membrana de sílice. El DNA también se adsorbe a la membrana de sílice, por lo que el kit incluye una solución de rDNAsa que se aplica directamente sobre esta. El resto de las etapas de lavado son necesarias para la eliminación de sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares, con su correspondiente centrifugación posterior para que los reactivos pasen a través de las columnas. En el último paso, el ARN se eluye en H<sub>2</sub>O en ausencia de RNAsas (60 o 40  $\mu$ l dependiendo del tamaño de la muestra). Este protocolo se puede realizar a temperatura ambiente.

Finalmente, una vez extraído, se debe almacenar a -80°C para evitar su fácil degradación.

- *Kit Cells-to-CT™ 1-Step TaqMan™ Kit (A 25603)*

Con este kit se realiza una extracción impura de RNA. El primer paso del protocolo a seguir es aspirar el medio de cultivo y lavar con 50 µl de buffer de lisis con DNAsa a temperatura ambiente, se pipetea varias veces para homogeneizar la mezcla. Se incuba la placa durante 5 minutos. Posteriormente se añaden 5µl de solución Stop, se vuelve a pipetear e incubar durante 2 minutos. Una vez realizados los pasos descritos, se puede guardar en hielo 2 horas si se va a realizar seguidamente la PCR o se congela el RNA a -20 °C.

#### **4.6.2. Cuantificación de RNA**

El análisis cuantitativo de la concentración de RNA se midió con el espectrofotómetro ND-1000 de Nanodrop y su correspondiente programa informático. La lectura espectrofotométrica se realiza a partir de un volumen de muestra muy reducido (1-2 µl). La pureza del RNA se mide indicando las relaciones de absorbancia (260/230, 280/230), valores aproximados a 2 se consideran puros para el RNA. Se miden las relaciones de absorbancia 260/230, 280/230 para indicar la pureza del RNA.

En primer lugar, se fija el valor de un blanco utilizando el disolvente en el que están disueltas las muestras de RNA (H<sub>2</sub>O en ausencia de RNAsas), al medir las muestras se obtiene directamente el valor de concentración (ng/ µl) de los ácidos nucleicos de interés. Finalmente, se realizan dos lavados con agua destilada y se miden para comprobar que no queda ningún resto de ácido nucleico en el equipo.

#### **4.6.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) posibilita la amplificación de regiones determinadas del DNA usando cebadores específicos con capacidad de hibridación en los extremos de la región de interés. En este ensayo se estudió la expresión de RNA de la tubulina (TUBB3) y de la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2), ya que proporcionan información sobre el desarrollo de la diferenciación neuronal.

La RT-qPCR proporciona un método sencillo para cuantificar una secuencia o un determinado gen que se encuentra en una muestra, controlando en todo momento el proceso de la reacción y guardando los datos que se recopilan durante el progreso. Para cuantificar la expresión génica mediante esta técnica en primer lugar se tiene que producir la retrotranscripción de RNA a cDNA. Cuanto mayor sea el número de copias del ácido nucleico de interés al inicio antes se observará un aumento en la fluorescencia.

Para la determinación del número de copias de mtDNA se usó la técnica de sondas de TaqMan®, que realiza una cuantificación relativa de un gen mitocondrial que se encuentra en una región conservada, y se le une una sonda fluorescente FAM, frente a un gen nuclear, usándose para normalizar y al que se le une una sonda fluorescente VIC.



Previamente, se realizaron diluciones de las muestras de RNA ya cuantificadas para que todas tuvieran una concentración uniforme (7,5 ng/μl). En cada pocillo de una placa de 96 se añadieron 2 μl de la dilución preparada de la muestra y 18 μl del Mix de reacción, llevándolo a cabo por duplicado.

El volumen final de la reacción son 20 μl por pocillo y se añaden los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (μl / pocillo)
TaqMan® RT-PCR Mix	10X	10
TaqMan RT Enzyme Mix	40X	0,5
Sonda FAM	20X	1
Sonda VIC control	20X	1
H <sub>2</sub> O estéril	-	5,5

**Tabla 5. Mezcla de reactivos para RT-qPCR**

La RT-qPCR tuvo lugar en el termociclador StepOne™ System de Applied Biosystems. Las condiciones del programa utilizado se resumen en la siguiente tabla:

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Retrotranscripción	48	15 minutos	1 ciclo
Desnaturalización inicial	95	10 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95	15 segundos	40 ciclos
Elongación	60	1 minuto	
Estabilización	50	30 segundos	1 ciclo

**Tabla 6. Especificaciones del programa térmico en el estudio de expresión génica mediante RT-qPCR**

Los resultados obtenidos se analizan en el programa StepOne Software v2.3, donde se pueden observar las gráficas de amplificación, la tendencia lineal de la curva patrón y la comparación entre duplicados. Ofrece la posibilidad de calcular el número de copias del gen mitocondrial de interés en las muestras de estudio, interpolando los valores obtenidos de Ct en la recta patrón.

## 4.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

### 4.7.1. Evaluación de la viabilidad celular

Se sembraron en una placa de 96 pocillos células a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pocillo. Tras la incubación con el medio de diferenciación a diferentes concentraciones de tóxico. Para evaluar la viabilidad celular se empleó LIVE/DEAD® Cell Vitality Assay Kit (L34951). En primer lugar, se prepara una disolución stock 1mM de C<sub>12</sub>-resazurina disolviéndola en DMSO.

A continuación, se prepara una disolución 1  $\mu\text{M}$  de tinción verde SYTOX y PBS 1X. Se añaden las disoluciones preparadas a las células y se incuban durante 15 minutos a 37<sup>o</sup> y 5% de CO<sub>2</sub>.

Finalmente, se analizan las células teñidas excitando a 488 nm y midiendo la emisión de fluorescencia a 530 y 575 nm.

#### 4.7.2. Medida de ATP y número de células

Para cuantificar las células activas metabólicamente y el ATP mitocondrial se sembró una placa de 96 pocillos de fondo blanco (casa comercial NUNC) con una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pocillo, siendo el volumen final de cada pocillo de 200  $\mu\text{l}$ .

Tras la semana de diferenciación de la línea celular SH-SY5Y con distintas concentraciones de TBTC (0, 10, 20, 50, 75 y 100 nM), se prepararon los reactivos necesarios para realizar el ensayo de cuantificación.

En primer lugar, para determinar el número de células metabólicamente activas, se prepara el reactivo CellTiter-Fluor y se añaden 100 microlitros de este por pocillo y se incuba la placa durante 30 minutos. Tras esto se analizan las células excitando a una longitud de onda de 400 nm y midiendo la emisión a 520 nm, en el programa NOVOstar.

Para la determinación de la síntesis de ATP mitocondrial, se empleó DMEM *free* enriquecido con piruvato 1mM y 2-desoxiglucosa 5mM. Este último compuesto se usa para inhibir la producción de ATP glucolítico. El estudio se realizó con el kit CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminiscent Cell Viability Assay (Promega, G7571).

El protocolo que se siguió en este caso fue realizar previamente dos lavados con PBS y después añadir 100  $\mu\text{l}$  del medio preparado en cada pocillo. La placa se incubó posteriormente durante 2 horas a una temperatura de 37<sup>o</sup>C y 5% CO<sub>2</sub>. Al terminar la incubación se añaden 100  $\mu\text{l}$  de reactivo Cell-Titer-Glo Reagent (mezcla del Buffer y Substrate) y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se mide la luminiscencia emitida con el lector de placas NOVOstar de BMG-Labtech.

Posteriormente, los pocillos se lavan dos veces con PBS. Para medir ATP mitocondrial se prepara un medio compuesto por 10 ml de DMEM *free*, piruvato 1mM y 2-desoxiglucosa 5mM. Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de este medio en cada pocillo y se incuban durante 2 horas en la estufa. Al acabar la incubación se añaden otros 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de ATP por pocillo y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se mide en el NOVOstar. Se obtiene una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente en cada uno de los pocillos.

### 4.7.3. Medida del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se mide con un oxígrafo de alta resolución (Oroboros) que se encuentra asociado al software DatLab para obtener y analizar los datos.

Para esta técnica se sembraron 3 placas de 100 con ambos tipos celulares sin diferenciar y otras 3 tras la semana de diferenciación. Las células que se emplean no deben sobrepasar una confluencia del 80%.

Se tripsinizan las placas y se resuspende el pellet obtenido hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se añaden 2 ml de muestra en cada una de las dos cámaras de medida. Una vez que se estabiliza el flujo en la gráfica se obtiene el valor de respiración endógena. Tras la estabilización se introducen diferentes tóxicos, o diferentes concentraciones del mismo, para observar las posibles variaciones en la respiración/consumo de oxígeno de las células. La cuantificación se realiza tras la estabilización de cada una de las señales. En último lugar, se determina la respiración que no depende de la cadena respiratoria, inhibiendo el complejo IV con cianuro.

Es aconsejable alternar las cámaras en los diferentes ensayos que se realicen para evitar errores que surjan de la variación de alguna de ellas.

### 4.7.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se sembró una placa especial para microscopía electrónica dividida en 8 compartimientos con una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pocillo con 4 condiciones diferentes para estudiar las posibles variaciones en la morfología de las mitocondrias.

- Células SH-SY5Y sin diferenciar en ausencia de tóxico
- Células SH-SY5Y sin diferenciar en presencia de tóxico
- Células SH-SY5Y diferenciadas sin tóxico
- Células SH-SY5Y diferenciadas con tóxico

La concentración de tóxico empleada para poder observar diferencias se determinó mediante los ensayos de consumo de oxígeno. Las células en las dos primeras condiciones se sembraron 48 horas antes de fijar las células, ya que al no estar diferenciadas la tasa de crecimiento es muy alta y nos interesa una densidad específica para que las imágenes que se obtengan se vean con claridad. Mientras que en las dos últimas condiciones se sembraron con una semana de antelación para completar la diferenciación neuronal.

#### 4.7.4.1. Fijación de células para TEM

Para emplear esta técnica y observar correctamente las células deben estar fijadas con anterioridad. En primer lugar, se les retira el medio y se realizan 3 lavados de 2 minutos con PBS a temperatura ambiente. Se añade tras este paso glutaraldehído 2,5% en 0,1M PB (Phosphate Buffer) hasta cubrir 300  $\mu$ l cada pocillo.

El PB 0,2M está compuesto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M (4X) y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2M (1X). Las placas se guardan a  $37^\circ\text{C}$  en un horno durante 5 minutos. Después se retira el glutaraldehído y se vuelve a añadir de nuevo al 2,5%. Las cámaras se guardan a  $4^\circ\text{C}$  durante 1-2 horas. Al acabar se retira el glutaraldehído y las células se lavan 4 veces con PB 0.1M durante 5 minutos. Posteriormente se añade 0,1M de PB con 0,05% de azida sódica y las cámaras se guardan en un frasco lleno de esta última disolución, sin burbujas.

#### 4.7.4.2. Microscopio de transmisión

Las muestras se procesaron y visualizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos de la Universidad de Zaragoza. Para la visualización se empleó un microscopio de transmisión JEOL 1010 a 80KV y para capturar las imágenes una cámara Gatan Bioscan.

### 4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

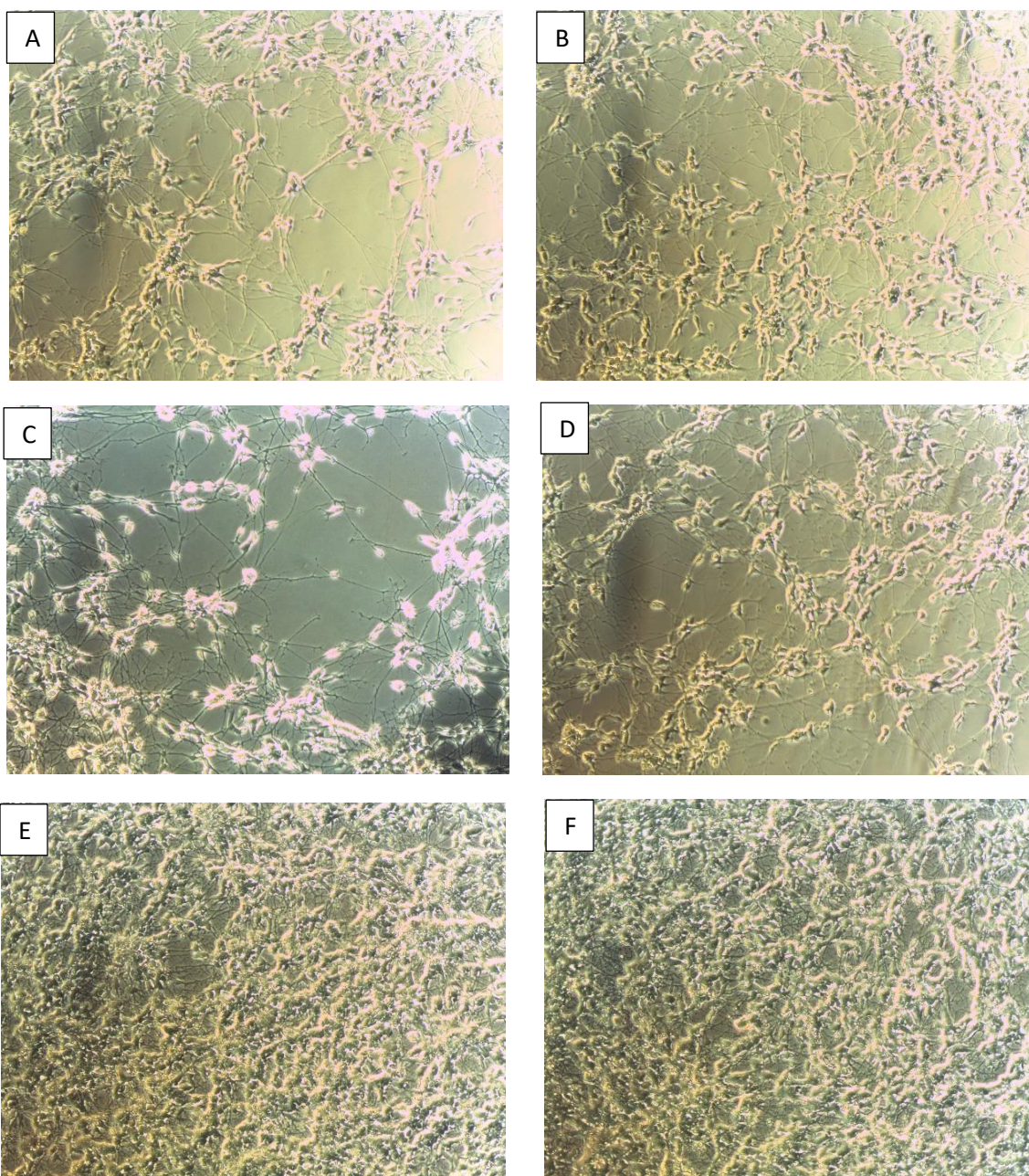
Los resultados obtenidos en este trabajo se muestran como media  $\pm$  SD del número de muestras realizadas en cada ensayo. Estos valores se analizaron estadísticamente y representaron gráficamente con el software GraphPad Prism 5. En variables de únicamente 2 grupos se aplica el test t no paramétrico Mann-Whitney y cuando existen un mayor número de variables se realiza test ANOVA. Estos test se hacen para comprobar si los valores correspondientes a distintas condiciones dan lugar a diferencias significativas o no. Se considera que tienen significancia estadística cuando p-valor  $< 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA DE LA LÍNEA SH-SY5Y

Se induce la diferenciación a neurona de las células de neuroblastoma en 6 condiciones diferentes, en presencia del tóxico TBTC a concentraciones de 0,10,20,50,75 y 100 nM, durante 7 días.

En las siguientes imágenes se puede observar el efecto de las diferentes concentraciones de tóxico sobre el desarrollo neuronal. Las fotografías fueron tomadas el quinto día de diferenciación.



**Figura 5. Imágenes de células SH-SY5y diferenciadas a distintas concentraciones de TBTC: A) 0 nM; B) 10 nM; C) 20 nM; D) 50 nM; E) 75 nM; F) 100 nM**

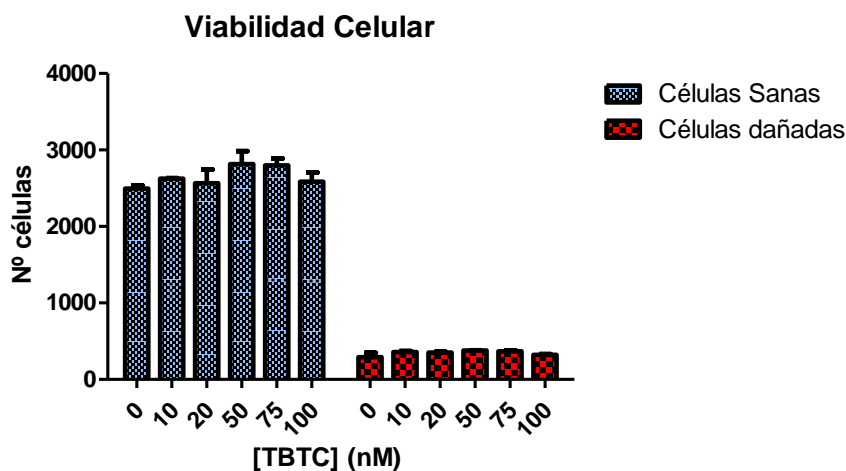
Debido al proceso de diferenciación a neurona, hay una disminución de la tasa de crecimiento de las células y una variación morfológica, produciéndose proyecciones desde el soma denominadas neuritas [31],[34]. Las neuritas, que engloban tanto las dendritas como los axones se pueden observar fácilmente al microscopio. Como se puede ver en las anteriores imágenes conforme aumenta la concentración de tóxico se inhibe el desarrollo neuronal, por lo que las células siguen creciendo y la diferenciación disminuye. Por tanto, en las dos últimas imágenes obtenidas se observan neuritas de menor tamaño y un mayor número de células.

### 5.1.1. Efecto de diferentes concentraciones de TBTC sobre la viabilidad celular

Para estudiar el efecto que tiene la exposición de TBTC en la diferenciación neuronal, es interesante comprobar que las concentraciones de xenobiótico que se emplean no influyan negativamente en la viabilidad de las células. Por lo que se realizó el ensayo de viabilidad en las células tratadas con concentraciones de TBTC de 0,10,20,50,75 y 100 nM durante los 7 días de diferenciación.

Este kit empleado para el estudio de viabilidad proporciona un ensayo de fluorescencia simple que muestra dos colores distinguiendo las células metabólicamente activas de las dañadas y muertas. Se basa en la reducción de la C<sub>12</sub>- resazurina a C<sub>12</sub>- resorufina fluorescente de color rojo en células metabólicamente activas. Por otro lado, el colorante SYTOX Green tiñe las células con membranas plasmáticas comprometidas (suelen ser células apoptóticas y necróticas tardías). En resumen, las células sanas emiten mayoritariamente fluorescencia roja, las células muertas fluorescencia verde y las células dañadas emiten una fluorescencia roja y verde bastante reducida.

Se analizó la viabilidad en una placa de 96 pocillos con las 6 condiciones de concentración por duplicado. En la figura 7 se puede observar la media de células sanas por pocillo a la izquierda de la gráfica y su correspondiente desviación dependiendo de la concentración empleada en la diferenciación neuronal.



**Figura 6. Viabilidad Celular de células SH-SY5Y:** Se representan el número de células metabólicamente activas (izquierda) y las apoptóticas (derecha) frente a las diferentes concentraciones de TBTC que se han empleado durante el estudio.

A la derecha, sin embargo, se muestra el número de células muertas por pocillo dependiendo de la concentración de tóxico empleada.

En general, tras los 7 días de diferenciación hay aproximadamente una densidad de  $3 \times 10^3$  células/pocillo y alrededor del 90% son células metabólicamente activas, por lo que se deduce que ninguna de las concentraciones de TBTC empleadas afecta negativamente en la viabilidad celular.

### 5.1.2. Análisis del consumo celular de oxígeno en presencia de TBTC

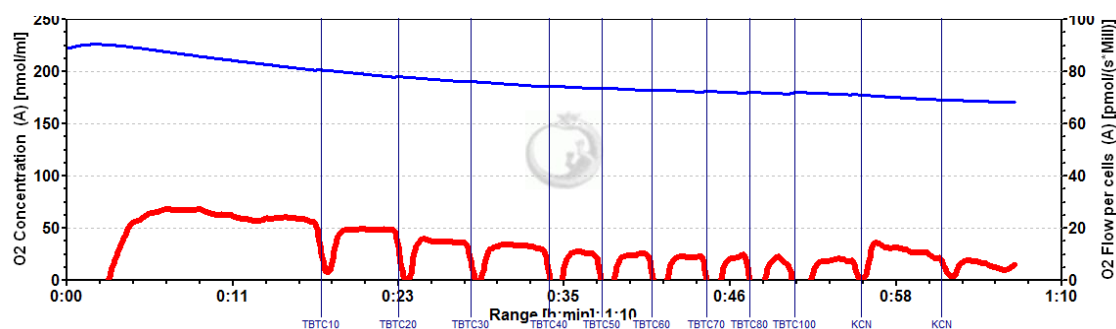
Con el fin de comprobar el efecto que produce la exposición de TBTC sobre el sistema de fosforilación oxidativa, se realizó una respirometría en células sin diferenciar y diferenciadas en ausencia del tóxico durante una semana. Se utilizó la línea celular SH-SY5Y de origen tumoral. Estas células muestran actividad glucolítica aumentada y fosforilación oxidativa disminuida hasta en ausencia de oxígeno (efecto Warburg). Este efecto da lugar a una mayor resistencia frente a xenobióticos que afectan a la función mitocondrial [32].

Ambas condiciones se consiguieron con sus respectivos medios:

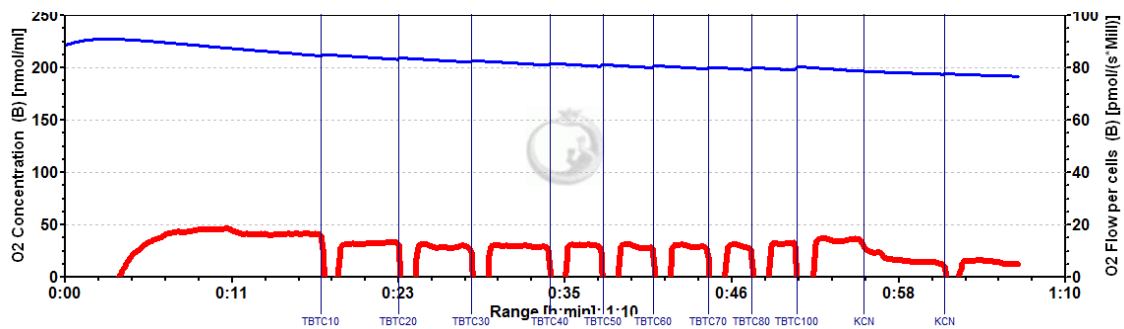
- **Sin diferenciar:** incubadas en medio DMEM con glucosa 4,5 g/l, piruvato 1mM y FBS al 10% durante 7 días.
- **Diferenciadas:** incubadas en medio Neurobasal A con B27 2%, CultureOne, GlutamaX, N<sub>2</sub> y ácido retinoico durante 7 días.

En este ensayo el primer valor que se obtuvo fue el de la respiración endógena (en ausencia de tóxico) una vez estabilizado el flujo. La adición secuencial de concentraciones crecientes de TBTC produce una disminución del consumo de oxígeno de las células estudiadas. Se añadieron 2  $\mu$ l de concentración 10 nM cada vez hasta llegar a una concentración en las cámaras de 100 nM.

#### Cámara A) Diferenciadas

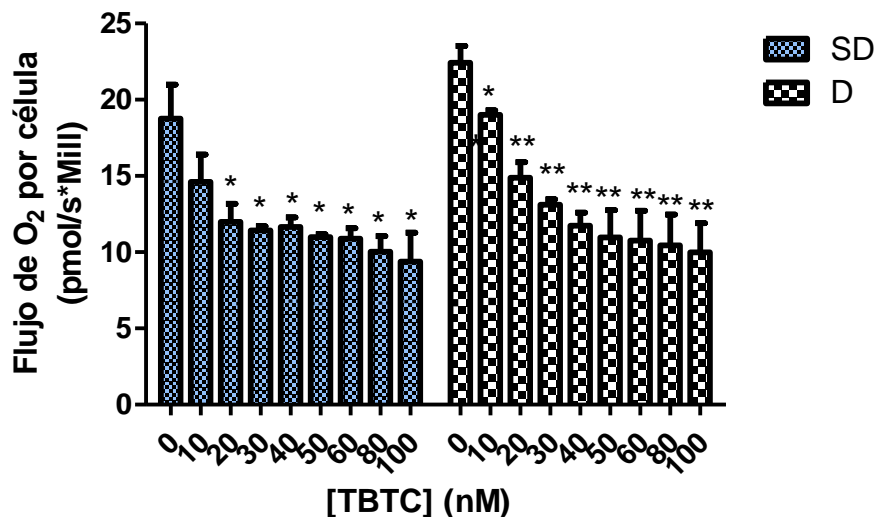


## Cámara B) Sin diferenciar



**Figura 7. Consumo de oxígeno de células SH-SY5Y:** Gráficas del consumo de oxígeno en células diferenciadas (Cámara A) y sin diferenciar (Cámara B) empleando un oxígrafo de alta resolución Orobos® Oxygraph-2K. Línea roja: flujo de oxígeno en la cámara. Línea azul: concentración de oxígeno.

En la diferenciación celular se produce una transición de la producción de energía de la glicolisis a OXPHOS, que en neuronas está asociada a un incremento de la respiración celular basal [33].

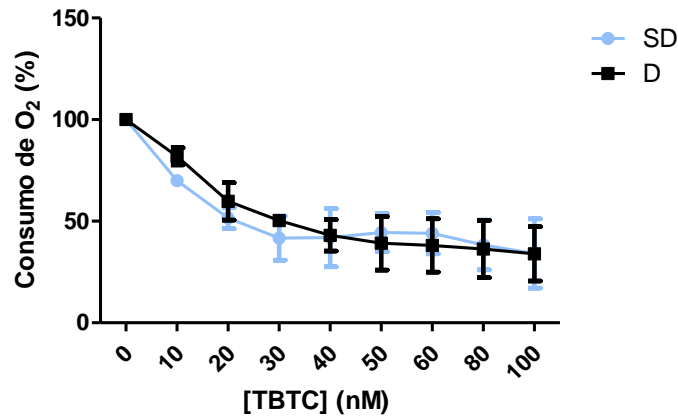


**Figura 8. Análisis del consumo de oxígeno de SH-SY5Y dependiendo de [TBTC]:** Histograma del consumo de oxígeno de células diferenciadas y sin diferenciar sometidas a diferentes concentraciones del tóxico. Las diferencias significativas se expresan considerando como criterio de significancia: p-valor <0,05(\*), <0,01 (\*\*), <0,001 (\*\*\*).

Los valores del flujo de oxígeno son ligeramente superiores para las células que se han diferenciado, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Se realiza un estudio estadístico en ambos estados celulares para conocer la concentración de TBTC mínimamente significativa comparada con el valor de la respiración endógena (primer valor del flujo de oxígeno estabilizando en ausencia de tóxico). En el caso de las células sin diferenciar se trata de una [TBTC]= 20nM y en las células diferenciadas [TBTC]=10 nM. Estos valores son de interés puesto que nos dan información sobre la concentración mínima de xenobiótico a la que se pueden empezar a observar cambios en la mitocondria (morfología, función, expresión, etc.).





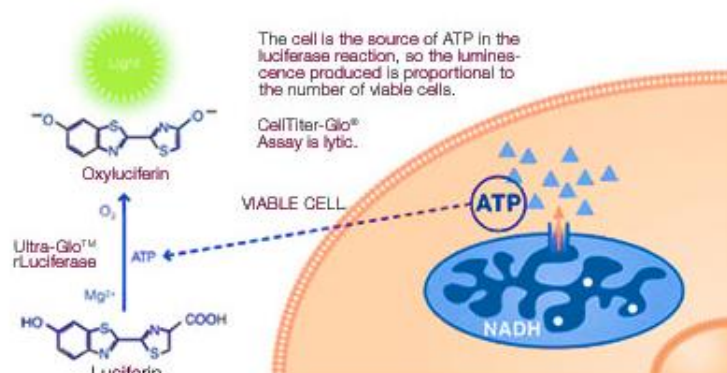
**Figura 9. Disminución porcentual del consumo de oxígeno:** Representación respecto de la respiración endógena (ausencia de TBTC). SD: Células sin diferenciar. D: Células diferenciadas.

La reducción porcentual del consumo de O<sub>2</sub> es dosis-dependiente, puesto que disminuye conforme aumenta la concentración de TBTC en las cámaras donde se encuentran las células. Este hecho concuerda con lo comentado anteriormente de que el TBTC actúa como inhibidor del sistema OXPHOS.

La regresión lineal de las células sin diferenciar se expresa como  $y = -0,4877 + 72,91x$  y en el caso de las diferenciadas  $y = -0,5958 + 79,45x$ . Comparándolas estadísticamente se obtiene una diferencia no significativa, por lo que aparentemente la concentración de tóxico es independiente de la diferenciación neuronal.

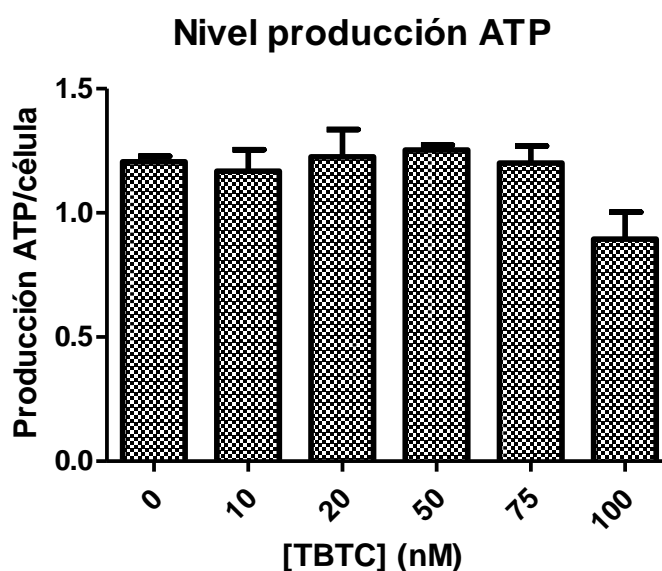
### 5.1.3. Medida de ATP y N° de células

En el caso de la cuantificación de síntesis de ATP mitocondrial, se empleó el kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, que se basa en la acción de una enzima luciferasa termoestable que cataliza la reacción que se puede observar en la Figura 8.



**Figura 10. Método de ensayo CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay:** El ATP procedente de células metabólicamente activas ayuda en la reacción de conversión de luciferina a oxiluciferina, transformando la energía química en lumínica, generando una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP.

Los resultados que se muestran en la Figura 9 se han calculado a partir de la señal luminiscente emitida por la cantidad de ATP propia de cada una de las muestras, normalizándola a partir del promedio de células metabólicamente activas presentes en cada pocillo, obteniéndose así la tasa de síntesis de ATP mitocondrial por célula. De esta manera se han obtenido los promedios porcentuales relativos para cada una de las 6 condiciones de cultivo en presencia de TBTC.



**Figura 11. Nivel de producción de ATP mitocondrial por célula relativos dependiendo de [TBTC].** Se representa en cada barra la desviación estándar derivada del promedio de los valores replicados obtenidos.

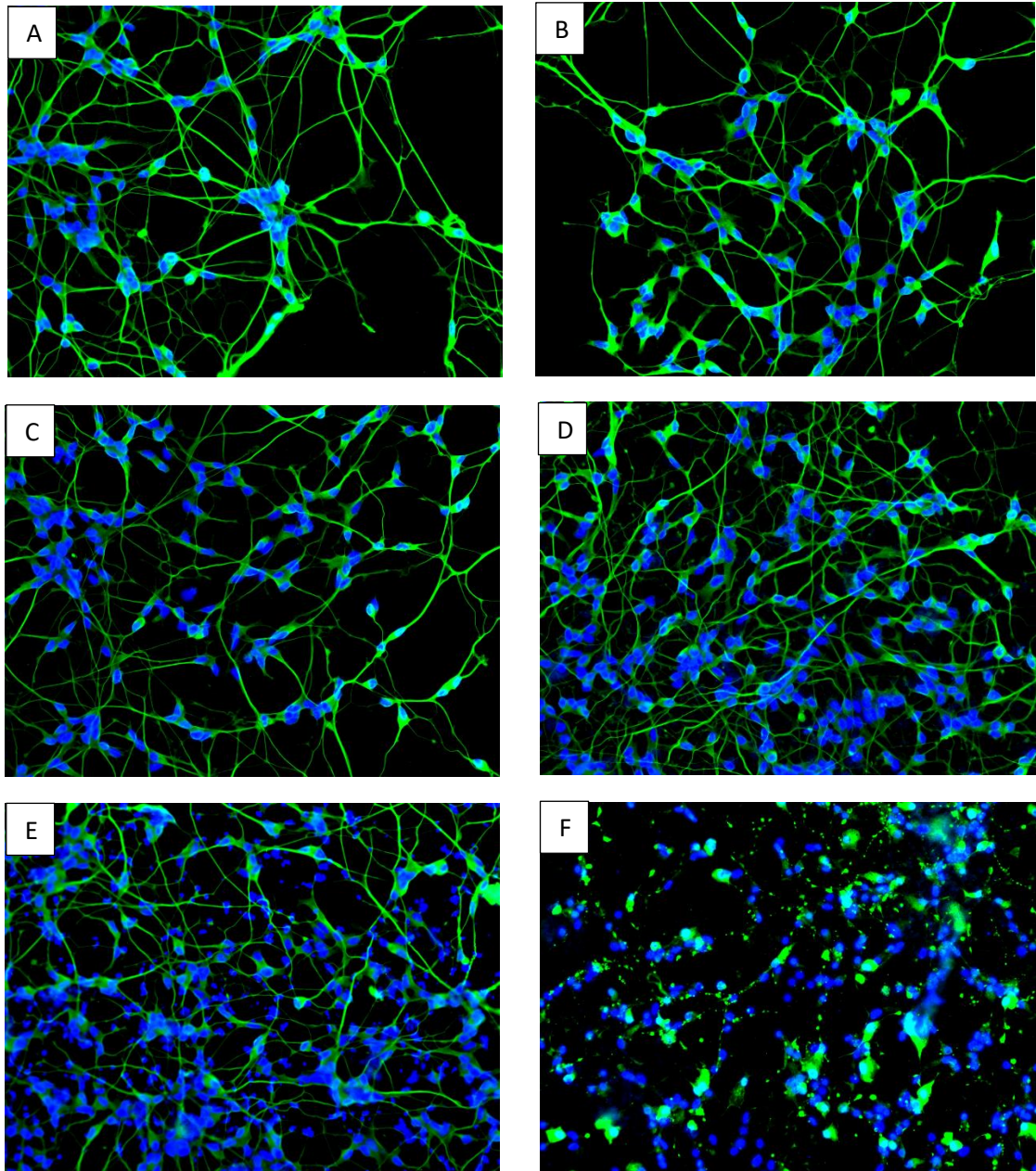
Teóricamente, tal y como se ha comentado anteriormente, el nivel de producción de ATP mitocondrial debería disminuir conforme aumenta la concentración de tóxico. Los valores obtenidos son similares a todas las concentraciones administradas. En la gráfica se observa únicamente esta reducción a una concentración de 100 nM, por lo que se realizó el test estadístico Mann-Whitney. Comparando con el nivel de producción de ATP de las neuronas en ausencia de TBTC se obtuvo que ambos valores no son significativamente diferentes.

El tributilestaño (TBT) es un compuesto que inhibe la ATP sintasa. De hecho, tal y como se ha visto en los ensayos de consumo de oxígeno, disminuye la respiración. Por lo tanto, teóricamente se debería observar una disminución en la síntesis de ATP mitocondrial conforme aumenta la concentración de tóxico en el medio de cultivo celular.

Sin embargo, en la gráfica anterior se puede ver que a las concentraciones empleadas de TBTC, el nivel de producción de ATP es muy similar en todas ellas, a excepción de a 100 nM que se aprecia una pequeña disminución. Hay que tener en cuenta que el dato de ATP el obtenido en 2 horas de incubación, por tanto, se debe contemplar la posibilidad de que la inhibición en la síntesis de ATP se observe en incubaciones de tiempo mayores de 2 horas.

#### 5.1.4. Análisis cualitativo de la línea SH-SY5Y mediante inmunofluorescencia

Para la caracterización de las neuronas tras la diferenciación se realizó una inmunofluorescencia. El marcador neuronal utilizado fue la  $\beta$ -III-tubulina, la cual forma parte de los microtúbulos para dirigir y mantener los axones. En todas las imágenes se puede observar que sí hay expresión de ésta (verde), lo que indica que se ha producido la diferenciación. En azul se pueden identificar los núcleos, que han sido marcados con DAPI puesto que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina.

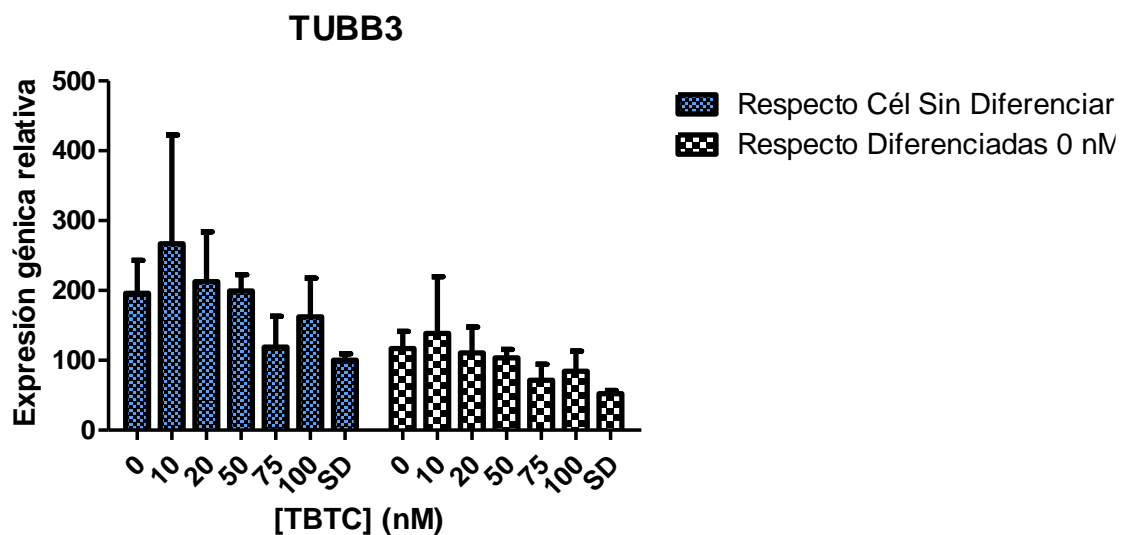


**Figura 12. Imágenes inmunofluorescencia de células SH-SY5Y diferenciadas a distintas concentraciones de TBTC: A) 0 nM; B) 10 nM; C) 20 nM; D) 50 nM; E) 75 nM; F) 100 nM**

En las imágenes se puede observar que no hay gran variación en la diferenciación para bajas concentraciones de tóxico. Sin embargo, a partir de una concentración de TBTC de 50 nM hay un mayor número de núcleos, lo que quiere decir que se inhibe en mayor medida la diferenciación y las células tumorales siguen creciendo. A concentraciones de tóxico de 75 y 100 nM, tras los 7 días de diferenciación, se empiezan a observar núcleos apoptóticos y una disminución en la expresión de tubulina. En la última fotografía ya no se ve ninguna ramificación de tubulina.

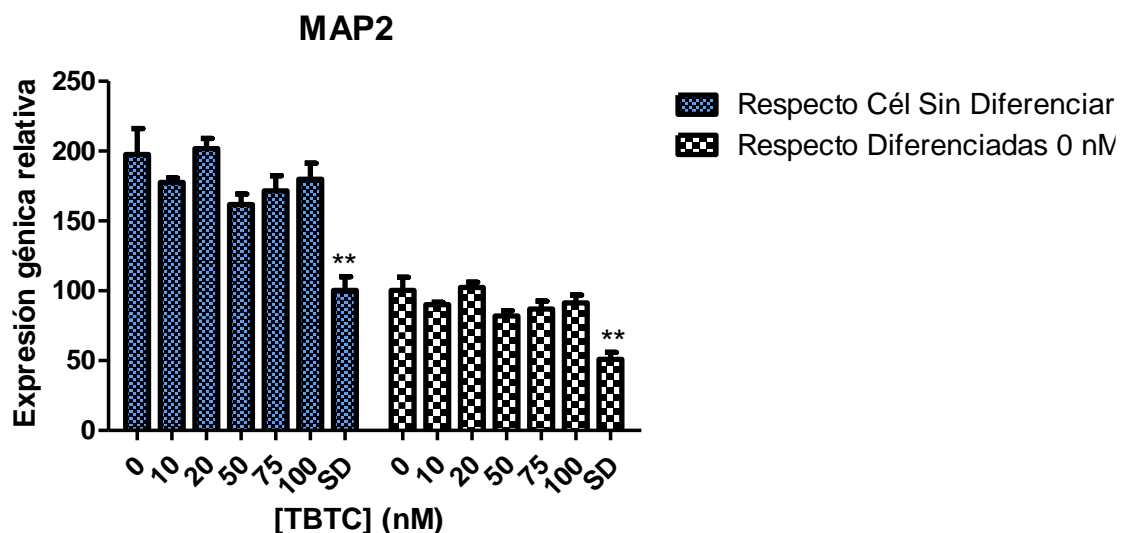
### 5.1.5. Análisis de TUBB3 y MAP2 mediante RT-qPCR

Mediante RT-qPCR se estudiaron las diferencias a nivel de expresión de mRNA de los marcadores TUBB3 y MAP2. Se analizan los datos obtenidos con respecto a las células sin diferenciar y frente a las diferenciadas en ausencia de tóxico. En todas las células diferenciadas se observa un aumento de  $\beta$ -III-tubulina respecto a las células sin diferenciar como podemos ver en la Figura 10 (barras color azul). También se aprecia una tendencia de disminución en la expresión al aumentar la concentración de tóxico, aunque no llega a ser significativa en ninguna de las concentraciones empleadas posiblemente por lo elevadas que son las desviaciones standard.



**Figura 13. Análisis de expresión del gen TUBB3 mediante RT-qPCR:** Los resultados fueron normalizados respecto al gen de referencia 18S. Se muestra en la gráfica la expresión del gen dependiendo de la [TBTC], en azul relativa a las células sin diferenciar y en blanco relativa a las células diferenciadas en ausencia de tóxico. Los valores obtenidos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de las réplicas.  $p$ -valor  $<0,05$  (\*),  $<0,01$  (\*\*),  $<0,001$  (\*\*\*)

Estudiando la expresión génica relativa del marcador MAP2 también se observan valores similares en las células diferenciadas en ausencia y presencia de diferentes dosis de TBTC. Sin embargo, en este caso sí que se observa una diferencia estadísticamente significativa en comparación con las células sin diferenciar.



**Figura 14. Análisis de expresión del gen MAP2 mediante RT-qPCR:** Los valores obtenidos se normalizaron frente al gen de referencia 18S. En la grafica se puede observar la expresión génica relativa dependiendo de la [TBTC]. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de las réplicas. p-valor <0,05(\*), <0,01 (\*\*), <0,001 (\*\*\*)).

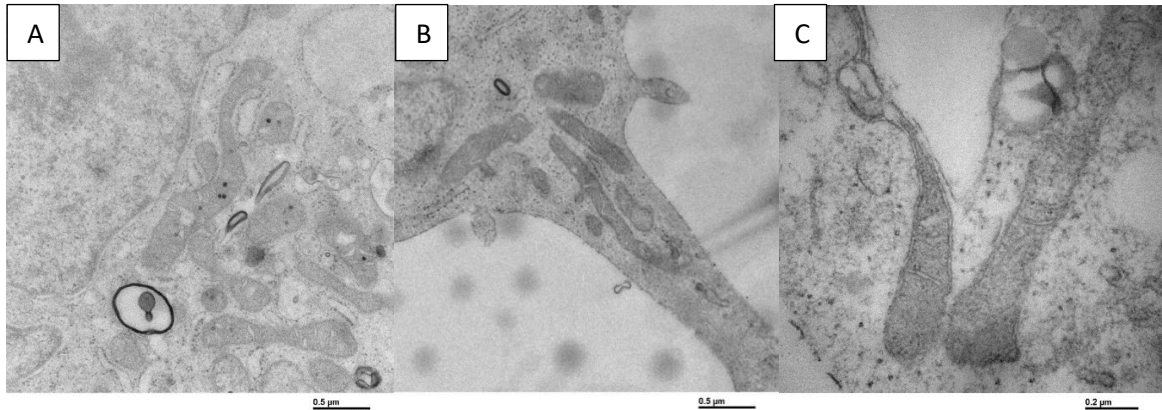
#### 5.1.6. Microscopía electrónica de transmisión

Aunque los valores de concentración de tóxico que dan una mínima diferencia significativa son 10 y 20 nM, para las células neuronales diferenciadas y sin diferenciar respectivamente, para microscopía electrónica se cultivaron las células con una concentración de TBTC de 50 nM. Se empleó esta condición de cultivo celular para poder observar más claramente si se producen diferencias en la morfología de las mitocondrias por la presencia del xenobiótico.

Las mitocondrias miden alrededor de 0,5-1  $\mu$ m de diámetro y pueden llegar hasta 7  $\mu$ m de largo. Son orgánulos muy versátiles y es difícil describir su forma, puesto que tienen la capacidad de modificarse, fraccionarse y aglutinarse, variando desde morfologías muy alargadas a elipsoides de poco tamaño. Se suelen observar formando una red muy dinámica.

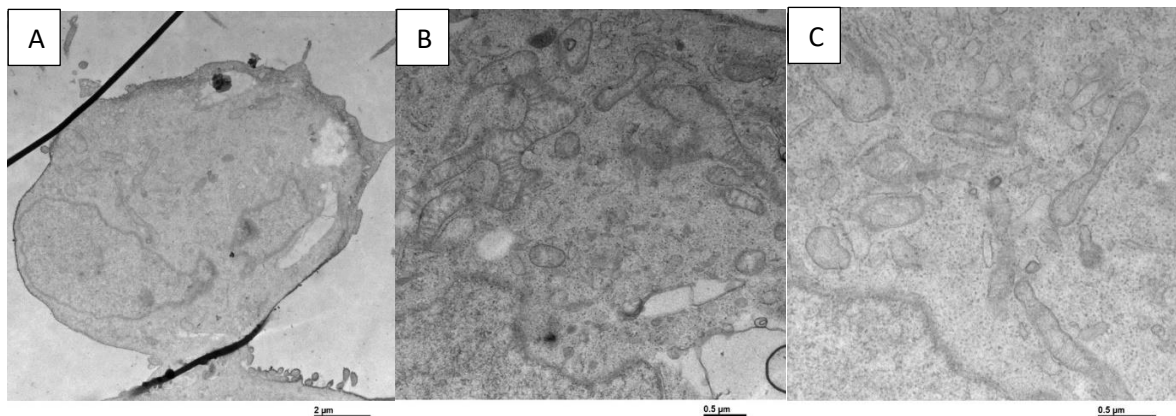
Las imágenes de TEM en las diferentes condiciones de cultivo celular se muestran a continuación:

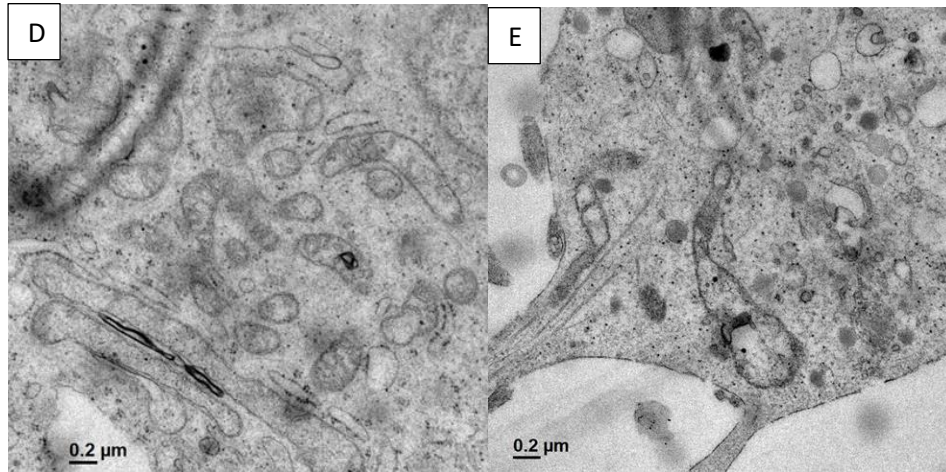
➤ Células SH-SY5Y diferenciadas en ausencia de TBTC



**Figura 15. Interior celular de las neuronas en ausencia de TBTC:** A) Agrupación de varias mitocondrias, las cuales están sufriendo fisión mitocondrial; B) Transporte axonal. Las neuronas requieren el transporte de mitocondrias hacia los terminales sinápticos, estas regiones tan especializadas tienen necesidades energéticas altas.; C) Mitocondrias alargadas y muy estrechas debido al proceso de diferenciación, se pueden observar las crestas mitocondriales, es decir, los repliegues de la membrana interna.

➤ Células SH-SY5Y diferenciadas en presencia de TBTC 50 nM



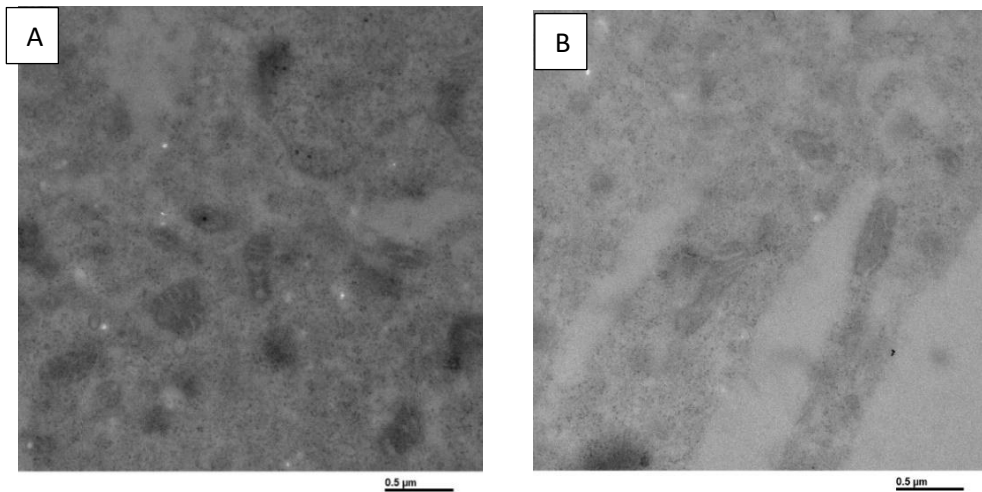


**Figura 16. Imágenes del interior celular de las neuronas en presencia de [TBTC]= 50 nM:** A) Célula completa; B) Mitocondrias agrupadas en una región de la célula.; C) Mitocondrias muy redondeadas con pocas crestas mitocondriales. D) Mitocondrias con ultraestructura muy alterada y con crestas desestructuradas. E) Se observan vacuolas autofágicas. Este proceso se produce de forma aumentada en las neuronas expuestas al tóxico ya que las mitocondrias están dañadas y la célula las destruye. Todas las imágenes fueron tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión

Durante el desarrollo neuronal aparecen cambios en la morfología mitocondrial. Más concretamente, en el proceso de neurogénesis se produce un cambio de estructuras tubulares y globulares mixtas a delgadas y alargadas, que siguen alargándose hasta llegar finalmente a una estructura más ancha y compleja producida por el alargamiento. Estas variaciones morfológicas en la diferenciación neuronal significan la maduración de las mitocondrias y manifiestan el paso metabólico de la glucólisis a OXPHOS, lo que lleva un aumento bioenergético [35].

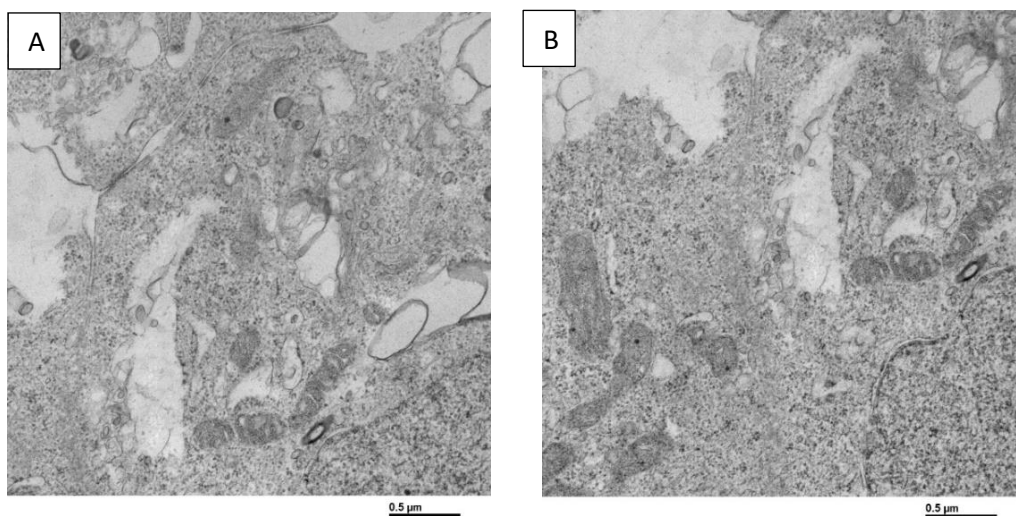
En la primera condición comentada, las células diferenciadas en ausencia de tóxico, se observa el alargamiento de las mitocondrias y la redirección de estas hacia las neuritas, puesto que aumenta la necesidad energética al diferenciarse. Sin embargo, cuando se realiza la diferenciación en presencia de tóxico, en este caso 50 nM, las mitocondrias se muestran menos alargadas, con una morfología más globular. El TBTC, como se ha explicado con anterioridad, inhibe la ATP sintasa, lo que se traduce en el impedimento del proceso diferenciación, porque no se puede producir la transición a OXPHOS (mayor rendimiento energético). Por lo que parece obvio que las mitocondrias se muestren menos estrechas, ya que en general, se está inhibiendo el desarrollo neuronal.

- Células SH-SY5Y sin diferenciar en ausencia de tóxico



**Figura 17. Interior de células SH-SY5Y sin diferenciar en ausencia de TBTC:** A) B) Mitocondrias de poco tamaño y globulares distribuidas homogéneamente en el interior de las células aisladas de neuroblastoma.

- Células SH-SY5Y sin diferenciar en presencia de TBTC 50 nM.



**Figura 18. Interior de células SH-SY5Y sin diferenciar en presencia de [TBTC]=50 nM:** A) B) Mitocondrias de poco tamaño y globulares distribuidas conjuntamente en diferentes zonas del interior de las células aisladas de neuroblastoma. En ambas imágenes pueden distinguirse las crestas mitocondriales.

La línea celular empleada en este ensayo proviene de neuroblastoma. Cabe destacar que en gran cantidad de células cancerosas muestran alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Estas en comparación con células sanas presentan un aumento en la captura de glucosa y ciertas anomalías en la glucólisis. El piruvato obtenido en el proceso de glucólisis se convierte en lactato por medio de la LDH, se secreta y no se oxida en la mitocondria. La hipótesis de Warburg propone



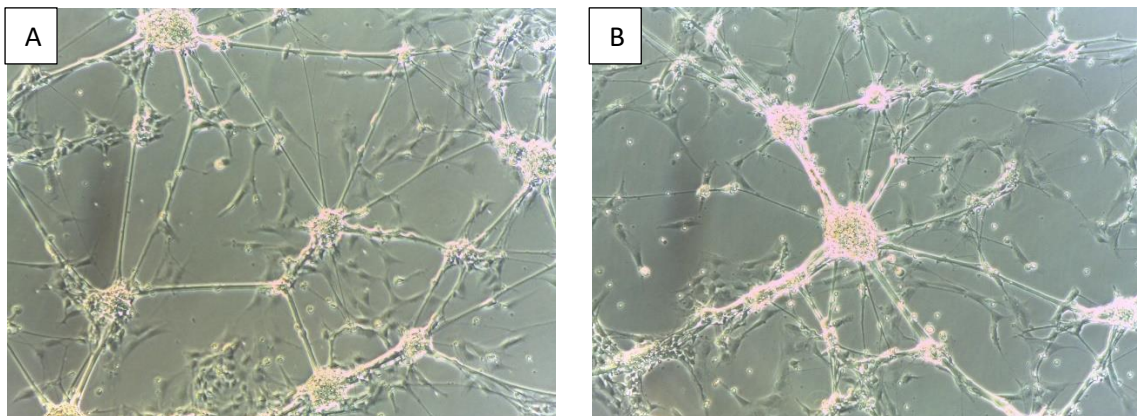
que este cambio metabólico se produce por defectos mitocondriales que incapacitan la capacidad de oxidar la glucosa a dióxido de carbono.

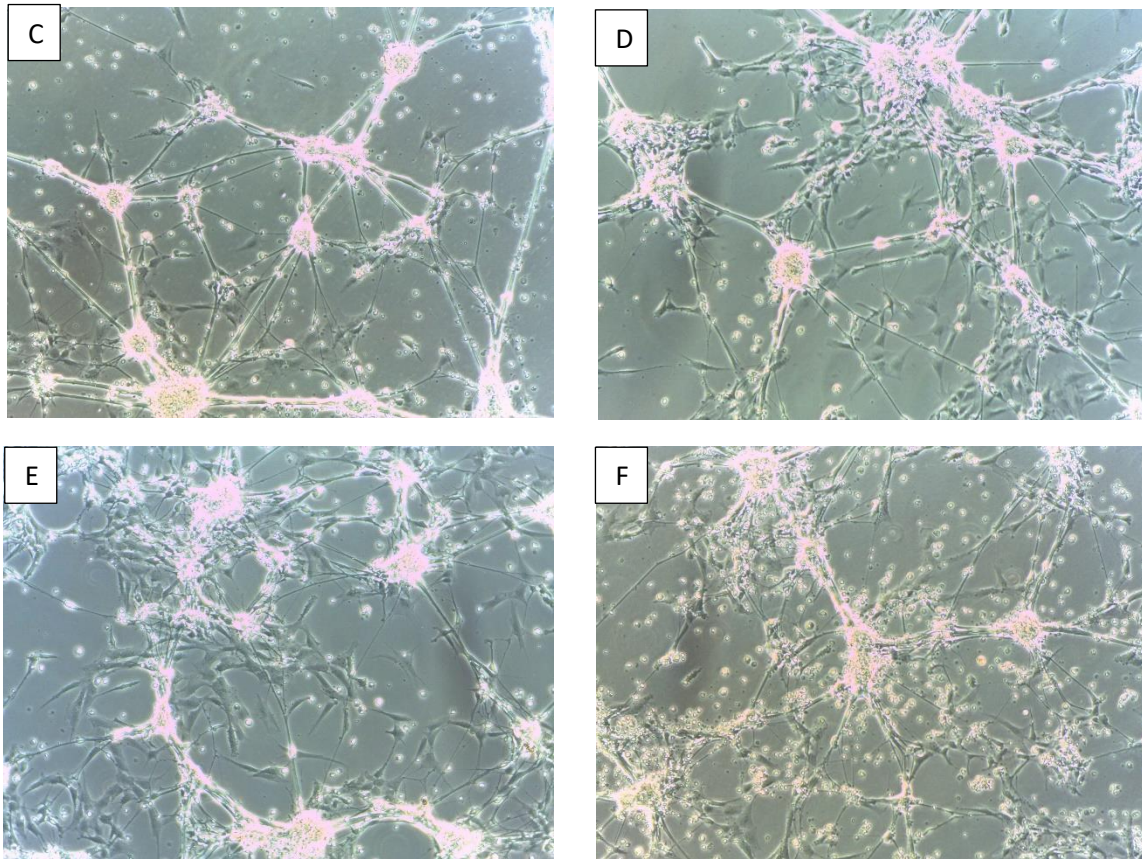
Por tanto, al usarse en mayor medida la glucólisis para la obtención de energía, los efectos del TBTC no afectan tanto a nivel mitocondrial, y no se ven grandes diferencias frente a las células SH-SY5Y sin diferenciar en ausencia de tóxico. En las imágenes de ambas condiciones se pueden observar acumulación en algunas zonas de mitocondrias con formas globulares y con mayor diámetro.

## 5.2. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA DE NSC

Debido a que la línea celular SH-SY5Y aislada de neuroblastoma sufre una variación en el número cromosómico del cariotipo (aneuploidía) se realizaron distintos ensayos en células madre neurales, para observar los efectos que produce el TBTC durante el desarrollo neuronal en un modelo que se acerca más a la realidad.

Se indujo también la diferenciación a neurona de las NSC en las mismas 6 condiciones nombradas anteriormente, en presencia del tóxico TBTC a concentraciones de 0,10,20,50,75 y 100 nM, durante 7 días. En este caso, al igual que en las células SH, las fotografías se realizaron en el quinto día de diferenciación. El efecto de las diferentes condiciones se puede observar en las siguientes imágenes:





**Figura 19. Imágenes de células NSC diferenciadas a distintas concentraciones de TBTC:** A) 0 nM; B) 10 nM; C) 20 nM; D) 50 nM; E) 75 nM; F) 100 nM

En estas imágenes se muestran neuritas de mayor tamaño y con uniones más fuertes, dando lugar a un aspecto más similar a una red neuronal. Además de observarse que hay un mayor número de células sin diferenciar, como en el caso anterior, debido a la inhibición del desarrollo neuronal por parte del tóxico, también podemos encontrar un mayor número de células muertas, conforme aumenta la concentración de TBTC.

Se debe destacar que las células madre neurales son mucho más sensibles con respecto al cultivo celular y se despegan con mayor facilidad de la superficie de la placa. Conforme aumenta la diferenciación esta sensibilidad crece debido a que la adhesión se complica por el desarrollo de las neuritas.

### 5.2.1. Análisis del consumo celular de oxígeno de NSC en presencia de TBTC

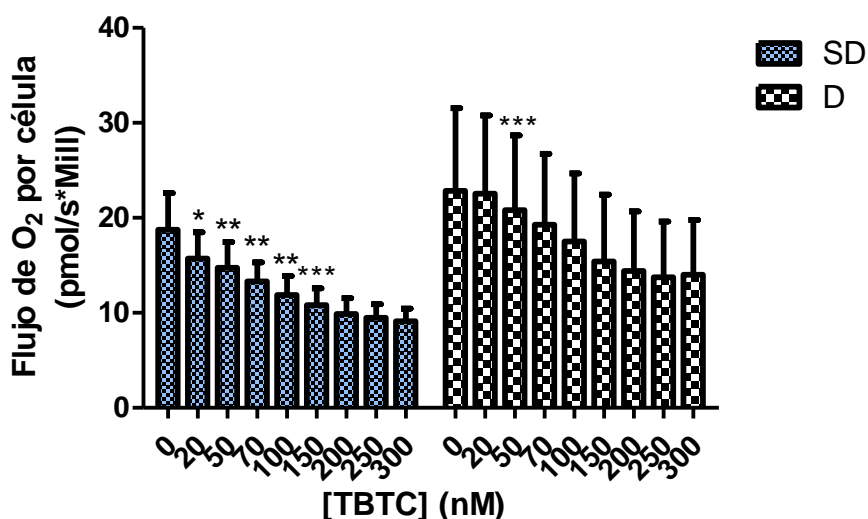
Se realizó un ensayo de respirometría en NSC sin diferenciar y diferenciadas en ausencia del tóxico durante una semana. Como en el caso de las células aisladas de neuroblastoma, se sembraron células madre neurales en placas de 100 mm y tras el recuento celular se resuspende el pellet hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml.

Las condiciones de los medios de cultivo para NSC se resumen a continuación:

- **Sin diferenciar:** medio compuesto por KnockOut™ DMEM/F12, GlutaMAX™-I Supplement 2 mM, bFGF 20 ng/ml, EGF 20 ng/ml y StemPro Neural Supplement® al 2%
- **Diferenciadas:** el medio contiene Neurobasal A preparado (se añade a la botella original glucosa 90 g/l y piruvato 50 mg/ml), B27 serum-free supplement 2%, GlutaMax 2mM, CultureOne 100X y ácido ascórbico 200mM.

El primer valor obtenido en la respirometría es el de respiración endógena (en ausencia de tóxico) una vez estabilizado el flujo.

La adición secuencial de concentraciones crecientes de TBTC produce una disminución del consumo de oxígeno. Se van añadiendo consecutivamente 2 microlitros de concentración 10 nM hasta llegar a una concentración en ambas cámaras de [TBTC]= 300 nM.



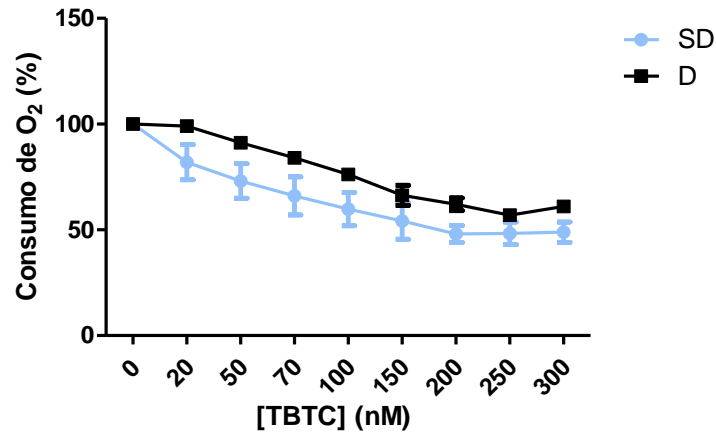
**Figura 20. Análisis del consumo de oxígeno de NSC dependiendo de [TBTC]:** Histograma del consumo de oxígeno de células diferenciadas y sin diferenciar sometidas a diferentes concentraciones del tóxico. Las diferencias significativas se expresan considerando como criterio de significancia: p-valor <0,05(\*), <0,01 (\*\*), <0,001 (\*\*\*).

Se concluye por los resultados expuestos en el histograma que los valores de flujo de oxígeno son mayores en NSC diferenciadas. Se compararon ambos estadísticamente mediante un test no paramétrico y se obtuvo que si hay diferencia significativa entre ambas (p-valor<0,05).

Dentro de cada una de las condiciones, se observa una disminución gradual del flujo conforme aumenta la concentración de tóxico.

Se llevó a cabo otro estudio estadístico para conocer la concentración de TBTC mínimamente significativa comparada con el valor de la respiración endógena (considerándola 100%), y se hallaron diferencias significativas a partir de una [TBTC]= 50 nM en el caso de NSC son diferenciadas (p<0,05). En cambio, para las NSC diferenciadas la concentración que da una

diferencia mínima significativa respecto la respiración endógena es de [TBTC] En ambos casos conforme nos aproximamos a concentraciones entre 150-200 nm se aprecia una estabilidad del flujo, ya no disminuye más la respiración.

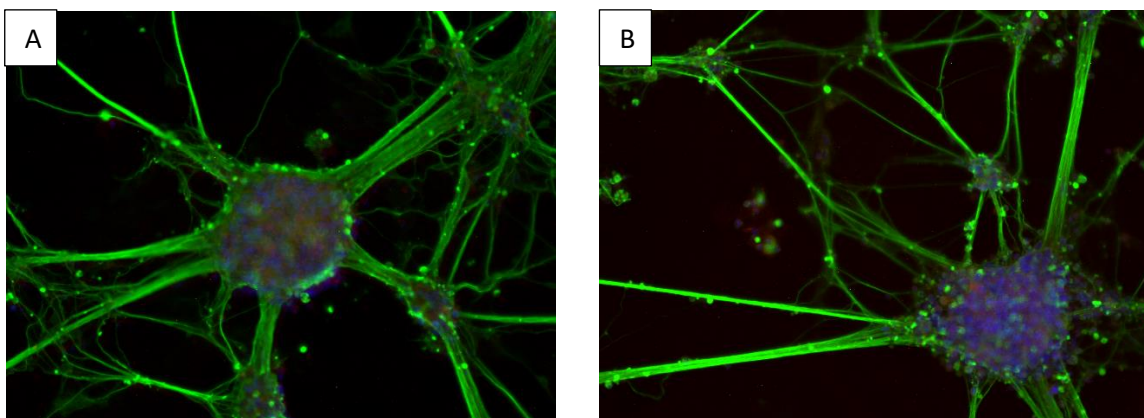


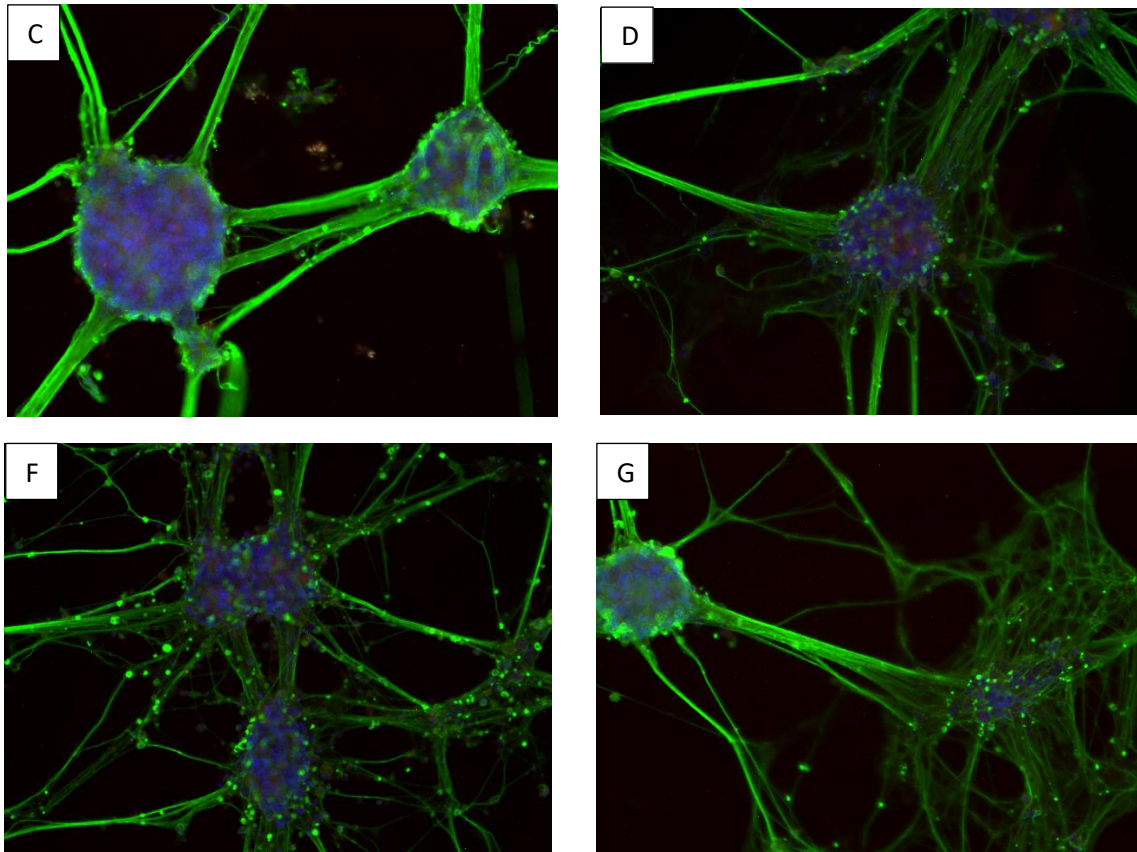
**Figura 21. Disminución porcentual del consumo de oxígeno:** Representación respecto de la respiración endógena (ausencia de TBTC). SD: Células sin diferenciar. D: Células diferenciadas.

De nuevo, se observa una reducción porcentual del consumo de O<sub>2</sub> conforme se va añadiendo una concentración creciente de tóxico en las cámaras.

### 5.2.2. Análisis cualitativo de NSC mediante inmunofluorescencia

Para la caracterización de la diferenciación de las NSC se emplearon  $\beta$ -III-tubulina y la tirosina hidroxilasa como marcadores neuronales y dopaminérgicos. La TH es la enzima encargada de catalizar la conversión a un precursor de la dopamina (neurotransmisor). Este marcador se puede observar en las siguientes imágenes en color rojo junto al azul de los núcleos, y la tubulina, como en el caso anterior, se observa en verde.





**Figura 22. Imágenes de inmunofluorescencia en NSC a distintas concentraciones de TBTC: A) 0 nM; B) 10 nM; C) 20 nM; D) 50 nM; E) 75 nM; F) 100 nM**

En la diferenciación de NSC se pueden observar acúmulo de núcleos y uniones más gruesas entre las neuritas. En este caso al aumentar la concentración de TBTC no se ve claramente un aumento en el número de núcleos sin diferenciar, sin embargo, se aprecia una mayor ramificación de las neuritas, lo que se traduce en una degeneración de los axones y la aparición de acúmulos citoplasmáticos en estas.

## 6. DISCUSIÓN

El impacto social de las enfermedades neurodegenerativas es principalmente elevado en países industrializados, donde la tasa de natalidad es menor y la esperanza de vida mayor comparada con países en vías de desarrollo. Pese a que en la actualidad se desconocen los mecanismos biológicos y ambientales que dan origen a estas patologías, las estadísticas señalan que estas enfermedades están ligadas al proceso de envejecimiento [36].

El mtDNA se puede dañar por diferentes causas ambientales, es decir, existe la teoría de que algunos tipos de xenobióticos pueden tener la capacidad de inducir enfermedades. Trastornos extraños de OXPHOS se producen debido a mutaciones genéticas, y a pesar de los avances actuales en los métodos de secuenciación, se siguen sin detectar algunas mutaciones causales.

Por lo que se ha planteado inicialmente que diferentes causas, como tóxicos ambientales, pueden inducir efectos bioquímicos similares a mutaciones patológicas si estos interactúan de cierta manera con enzimas de interés. Asimismo, estos estímulos ambientales pueden ocasionar variaciones en la expresividad o gravedad de las mutaciones. Un ejemplo de lo anteriormente comentado, son los pacientes que albergan la transición m.1555A> G en el gen *MT-RNR1* para el RNA ribosómico 12S (rRNA). Al estar expuestos a compuestos amino glucosídicos padecen pérdida auditiva no sindrómica.

En algunos estudios se lanza la hipótesis de que ciertos compuestos de organoestaño, como el empleado en este trabajo, pueden afectar y ocupar sitios del canal iónico del complejo V. Esto se traduce en la posibilidad de que el TBTC pueda influir en la expresión de la mutación m.8993T> G [12].

En el presente estudio se quiere investigar acerca de la posible influencia del tóxico durante el desarrollo neuronal. Es información sumamente importante en el caso de la gestación, para conocer si existe la posibilidad de desarrollar enfermedades mitocondriales o neurodegenerativas a la larga, si durante el embarazo en el proceso de diferenciación neuronal la madre está expuesta o tiene una concentración alta de tóxico en sangre. Además, se puede emplear la interacción célula-tóxico como modelo de este tipo de enfermedades y probar en dicho modelo posibles terapias.

En primer lugar, se realizaron distintos ensayos con la línea celular SH-SY5Y, células aisladas de neuroblastoma humano, las cuales se pegan con facilidad a la placa y perduran varios días en suspensión. Se escogió este modelo celular por su capacidad para diferenciarse a neurona dopaminérgica [34].

Para poder estudiar la disfunción mitocondrial se usó el tóxico TBTC, y las concentraciones elegidas para esta línea celular fueron 0,10,20,50,75 y 100 nM, ya que están dentro del rango de concentraciones encontradas en sangre de humanos. Mediante el ensayo de viabilidad celular se concluyó que estos valores de concentración no matan a las células. Sin embargo, en una ocasión se sembraron pocillos con [TBTC]=150 nM y todas las células se despegaron de la superficie de la placa tras dos días en esta condición, por lo que no se puede usar porque afecta negativamente a la viabilidad.

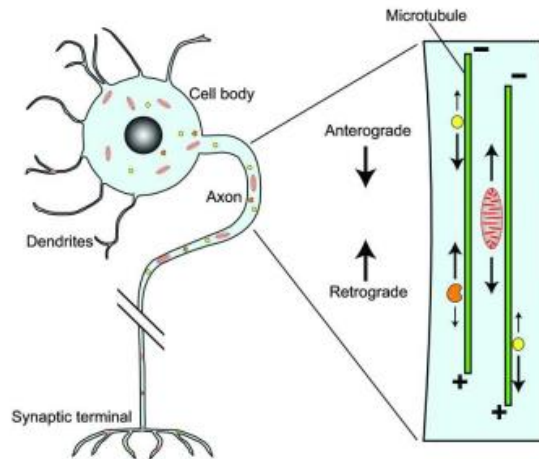
Por otro lado, la neurogénesis y el sistema OXPHOS están relacionados. OXPHOS es elemental en el metabolismo energético, el cual regula el proceso de neurogénesis, por lo que cualquier alteración producida va a incluir a ambos. Por esta razón, se realizó la respirometría con células diferenciadas y sin diferenciar en presencia de concentraciones crecientes de tóxico. En las células de neuroblastoma se observó una respiración endógena baja (en torno a 20 pmol/s\*Mill). Se compararon estadísticamente los resultados de células diferenciadas y sin diferenciar, y no se obtuvo ninguna diferencia significativa, lo que se traduce en que la reducción del consumo de oxígeno progresivamente conforme aumenta la concentración de tóxico no depende de la diferenciación neuronal, en esta línea celular.

Con el estudio se ha demostrado que el TBTC afecta a bajas concentraciones al sistema OXPHOS. Es importante destacar este hecho ya que otros autores, como se ha comentado anteriormente en la introducción, dicen que este tóxico afecta a otros niveles celulares y que su toxicidad es debida a sus respectivas inhibiciones. Por lo que hay que remarcar que esas inhibiciones en otros niveles celulares se producen a concentraciones más elevadas que las obtenidas en el ensayo de respiración. Se concluye, por tanto, que el TBTC actúa a concentraciones sanguíneas a nivel mitocondrial y, por lo tanto, las consecuencias funcionales que provoque se deberán a esta inhibición específica.

Al medir la producción de ATP, la cual debería disminuir conforme aumenta la concentración de TBTC, se observaron valores similares para todas las concentraciones a excepción de 100 nM, pero no se considera como una diferencia significativa. Hay que remarcar que la medida de ATP es la cantidad de energía obtenida por la mitocondria en 2 horas, quizás el tiempo no es suficiente para ver el efecto esperado.

Lo mismo ocurre con el ensayo de RT-qPCR. Se analizó la expresión génica relativa de TUBB3 y MAP2. TUBB3 codifica una proteína perteneciente a las tubulinas beta. Este tipo de proteínas se ensamblan para formar microtúbulos y se expresan principalmente en neuronas formando parte del mantenimiento de los axones. MAP2 es un gen que codifica una proteína asociada a microtúbulo 2, específica de neuronas, y encargada de estabilizar los microtúbulos en las dendritas de las neuronas posmitóticas. En las imágenes de microscopía invertida e inmunofluorescencia se ve con claridad que las células se han diferenciado, aunque no se observan diferencias muy evidentes en las primeras concentraciones, partir de 75 y 100 nM si que produce un aumento en el número de células cancerosas debido a la inhibición que produce el TBTC sobre la diferenciación. Por lo que en RT-qPCR se debería observar una disminución progresiva en la expresión de tubulina conforme aumenta la concentración de tóxico. Como se ha remarcado en el apartado de resultados, la tendencia disminuida en la expresión de  $\beta$ -III-tubulina no llega a ser significativa por la alta desviación standard.

Para comprobar si la exposición al xenobiótico afectaba en la morfología de las mitocondrias de neuronas se empleó microscopía electrónica de transmisión. Porciones de una red mitocondrial pueden ser desplazadas de unas regiones de la célula a otras, ya que disponen de una sorprendente movilidad y se ubican en zonas donde hay una mayor demanda de energía o calcio. La dinámica mitocondrial es realmente importante en neuronas, puesto que las mitocondrias se trasladan desde el soma hasta las dendritas y axones, mediante movimientos discontinuos. Los desplazamientos a larga distancia se llevan a cabo mediante microtúbulos, sin embargo, los filamentos de actina están involucrados en los de corta distancia [31],[37].

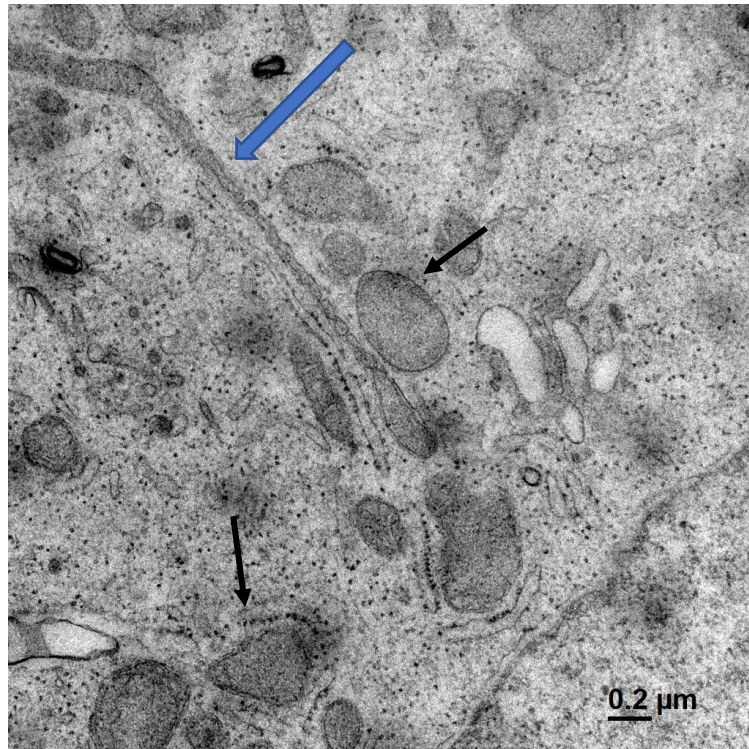


**Figura 23. Estructura neuronal y transporte axonal:** Para que la neurona funcione correctamente necesita el transporte de componentes citoplasmáticos a través del axón, incluyendo a las mitocondrias, vesículas y orgánulos endocíticos.

Además, hay que destacar la capacidad de las mitocondrias para dividirse o fusionarse con facilidad. Las funciones de estas dos dinámicas se basan en compartir productos sintetizados en distintas regiones, mitigar defectos locales y compartir mtDNA. Hay indicios de que la fusión mitocondrial aumenta cuando las células sufren altos niveles medios de estrés. En cambio, la fisión de las mitocondrias tiene lugar cuando los niveles de estrés están cerca de la muerte celular. En condiciones celulares normales, los procesos de fusión y fisión están en equilibrio [41].

En las cuatro condiciones de cultivo celular elegidas para TEM se observan redes mitocondriales, pequeños conjuntos de mitocondrias distribuidas en diferentes regiones de la célula. En el medio de diferenciación sin tóxico se ve claramente el alargamiento de las mitocondrias y el transporte axonal de estas debido al desarrollo neuronal. En presencia de tóxico hay también mitocondrias un poco alargadas y más anchas, incluso parece observarse en alguna de ellas el proceso de fisión mitocondrial, por lo que el TBTC sí que influiría en la morfología y función de estas. También se observan mitocondrias globulares sin apenas crestas mitocondriales, lo que manifiesta un defecto mitocondrial debido al tóxico empleado.





**Figura 2. Alteraciones mitocondriales por la exposición a TBTC:** Como señala la flecha azul el TBTC produce daños ultraestructurales en la mitocondria generando procesos de fusión-fisión anómalos. Además, se observan multitud de mitocondrias globulares y con pocas crestas mitocondriales como se señala en la figura con flechas negras.

Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente, en las células no diferenciadas en ausencia y presencia de tóxico no se observan grandes diferencias, las mitocondrias son de pequeño tamaño y forma elipsoidal. Por lo que se puede deducir de este hecho que el tóxico afecta en menor medida cuando las células de neuroblastoma no se han diferenciado.

Una vez realizados estos ensayos, se empezó a trabajar con NSC para estudiar la influencia del tóxico en un modelo más adaptado a la realidad, debido a que la línea celular SH-SY5Y es aneuploide. La aneuploidía hace referencia a la variación en el número de cromosomas de un cariotipo concreto.

Las NSC son células pertenecientes al sistema nervioso que tienen la capacidad de autorregenerarse y multipotentes, dando lugar a células diferenciadas produciendo linajes de neuronas y células gliales, incluyendo astrocitos y oligodendrocitos. Algunas NSC progenitoras residen en regiones restringidas del cerebro y siguen diferenciándose a neurona toda la vida [38].

En este caso también se estudió el consumo de  $O_2$  para comprobar el efecto del TBTC en NSC diferenciadas y no diferenciadas. Al igual en las células SH-SY5Y, se observa mayor flujo de  $O_2$  en células diferenciadas a neurona, y una disminución gradual de este conforme aumentamos la concentración de tóxico.

Como no se realizó estudio de viabilidad celular, en las cámaras se añadió progresivamente TBTC hasta alcanzar una concentración de 300  $\mu\text{M}$ . Se estudió mediante el test t no paramétrico los valores de flujo de  $\text{O}_2$  de ambas condiciones y sí existe diferencia significativa entre ambas, por lo que la reducción del consumo de  $\text{O}_2$  depende de la diferenciación neuronal.

Mediante inmunofluorescencia se obtuvo información cualitativa acerca del desarrollo neuronal, comprobando así que las NSC se diferenciaban.

Tanto en la respirometría como en la inmunofluorescencia de las NSC se observan diferencias más claras del efecto del TBTC conforme aumenta su concentración. Esto nos da pequeños indicios de que se debería seguir la investigación con esta línea celular que proporciona un modelo más real, y quizás se observarían diferencias más claras en la producción de ATP y expresión génica relativa de ciertos marcadores específicos de diferenciación neuronal. Cualitativamente, comparando las imágenes de inmunofluorescencia de ambas líneas diferenciadas se puede destacar el tamaño, número y ramificación de las neuritas. En el caso de las NSC el tamaño, grosor y ramificación de las neuritas es mayor y el número de núcleos es menor, debido que una vez se cultivan con el medio de diferenciación dejan de crecer totalmente. También es interesante el hecho de que estos se encuentran formando agrupaciones, formando una red neuronal. Esto no ocurre en las SH-SY5Y, las cuales siguen creciendo hasta aproximadamente el tercer día de diferenciación. Las neuritas son mucho más estrechas y uniformes. Además, hay que prestar especial atención a los acúmulos citoplasmáticos que aparecen en los axones conforme se van degenerando cuando las neuronas se exponen a concentraciones más altas de tóxico.

Sería de gran interés estudiar estos acúmulos citoplasmáticos para conocer la relevancia e influencia del TBTC en ciertas enfermedades. Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson (EP) aparecen depósitos intracitoplasmáticos ricos en  $\alpha$ -sinucleína en varios tejidos, los llamados cuerpos de Lewy. Son agregados atípicos de proteínas que se han formado por un incorrecto plegamiento y autoensamblaje de la cadena polipeptídica [5],[6],[40].

El hecho de que el TBTC tenga menor influencia en las SH-SY5Y se puede deber al efecto Warburg [32]. En general, las células cancerosas muestran alteraciones en el metabolismo de la glucosa, implicando un aumento en la captación de glucosa y anomalías en la glucólisis.

Un mayor consumo de glucosa genera metabolitos glucolíticos e incrementa la cantidad de ATP producido por glucólisis. Este cambio en el metabolismo se origina en células cancerosas por defectos mitocondriales que inhiben la capacidad de oxidar de manera efectiva la glucosa a  $\text{CO}_2$  [39].

Aunque la concentración de glucosa del medio de cultivo no es muy alta, es posible que se observara una mayor influencia del tóxico si el cultivo fuera en medio libre de glucosa suplementado con galactosa, para forzar la dependencia de la línea celular del sistema OXPHOS para abastecerse energéticamente.

## 7. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos y la discusión e interpretación de ellos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Trabajando con ambas líneas celulares, SH-SY5Y y NSC, se consiguió una correcta diferenciación neuronal. Se determinó un rango de concentraciones de exposición al TBTC (0-100 nM) que no afectan negativamente a la viabilidad celular durante el proceso de diferenciación.
- Cualitativamente, se observan variaciones en las células diferenciadas conforme aumenta la concentración de tóxico. En SH-SY5Y se observa un aumento en núcleos apoptóticos y disminución de la expresión de tubulina. Sin embargo, en NSC se aprecia una degeneración gradual de las neuritas y la presencia de acúmulos citoplasmáticos.
- Cuantitativamente, no se han observado diferencias significativas en la producción de ATP ni en la expresión génica de marcadores neuronales ante la exposición de diferentes concentraciones de tóxico. En el primer caso, puede ser debido a que no sean suficientes 2 horas de incubación para observar el efecto esperado. Respecto a la expresión génica, la desviación estándar de los resultados es elevada, pero si se observa una tendencia a una menor diferenciación antes la presencia de TBTC a pesar de no ser significativa.
- Al añadir gradualmente TBTC en respirometría disminuye el consumo de oxígeno, lo que se traduce en un decrecimiento en la respiración mitocondrial, de manera dosis-dependiente. En la línea celular SH-SY5Y la disminución del consumo de oxígeno no presenta variaciones significativas entre células diferenciadas y no diferenciadas, en el caso de las NSC ocurre lo contrario.
- Diferenciar la línea celular de neuroblastoma con ausencia y presencia de tóxico (50 nM) si produce alteraciones en la morfología y dinámica mitocondrial. Estas alteraciones destacan menos en presencia de tóxico al producir la inhibición del desarrollo neuronal. En cambio, las SH-SY5Y sin diferenciar tienen morfologías y agrupaciones similares tanto en presencia como ausencia de TBTC.
- La exposición de tóxico afecta en mayor medida a las células NSC diferenciadas que a las SH-SY5Y, por lo que la línea de investigación debería continuar realizando diferentes ensayos con estas.

## 7.1. CONCLUSIONS

Considering the results obtained and the discussion and interpretation of them, the following conclusions have been reached:

- Working with both cell lines, SH-SY5Y and NSC, a correct dopaminergic neuronal differentiation was achieved. A range of TBTC exposure concentrations (0-100 nM) that did not negatively affect cell viability during the differentiation process was determined.
- Qualitatively, variations are observed in differentiated cells as the concentration of toxin increases. In SH-SY5Y there is an increase in apoptotic nuclei and a decrease in the expression of tubulin. However, in NSC there is a gradual degeneration of neurites and cytoplasmic accumulations.
- Quantitatively, no significant differences have been observed in ATP production or in the gene expression of neuronal markers when exposed to different concentrations of toxin. In the first case, it may be because 2 hours of incubation are not enough to observe the expected effect. Regarding gene expression, the standard deviation of the results is high, but there is a tendency towards less differentiation before the presence of TBTC despite not being significant.
- Gradually adding TBTC in respirometry, oxygen consumption decreases, which means that a decrease in mitochondrial respiration, in a dose-dependent manner. In the SH-SY5Y cell line, the decrease in oxygen consumption does not show significant variations between differentiated and undifferentiated cells; in the case of NSC, the opposite occurs.
- Differentiate the neuroblastoma cell line with the absence and presence of toxin (50 nM) produces alterations in mitochondrial morphology and dynamics. These alterations stand out less in the presence of toxin as they inhibit neuronal development. However, undifferentiated SH-SY5Y have similar morphologies and groupings both in the presence and absence of TBTC.
- Toxic exposure affects differentiated NSC cells to a greater extent than SH-SY5Y, so the line of research should continue to carry out different assays with these.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Montoya et al., "Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 652, pp. 47–67, 2009, doi: 10.1007/978-90-481-2813-6\_5.
- [2] J. Montoya, "Biogénesis y Patología Mitocondrial," *Biogénesis y Patol. Mitocondrial*, no. 60, pp. 7–28, 2005.
- [3] W. J. H. Koopman, F. Distelmaier, J. A. M. Smeitink, and P. H. G. M. Willems, "OXPHOS mutations and neurodegeneration," *EMBO J.*, vol. 32, no. 1, pp. 9–29, 2013, doi: 10.1038/emboj.2012.300.
- [4] E. Biology and P. St., "Danuta Koczyk BEHAVIOUR AND."
- [5] H. Kawamata and G. Manfredi, "Proteinopathies and OXPHOS dysfunction in neurodegenerative diseases," *J. Cell Biol.*, vol. 216, no. 12, pp. 3917–3929, 2017, doi: 10.1083/jcb.201709172.
- [6] T. Briston and A. R. Hicks, "Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: Mechanisms and prospects for therapeutic intervention," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 46, no. 4, pp. 829–842, 2018, doi: 10.1042/BST20180025.
- [7] C. E. Hernández Flórez, G. A. Contreras García, and M. A. Beltrán Avendaño, "Desarrollo neuroembriológico: el camino desde la proliferación hasta la perfección," *Univ. Médica*, vol. 59, no. 3, pp. 1–10, 2018, doi: 10.11144/javeriana.umed59-3.dneu.
- [8] G. Son and J. Han, "Roles of mitochondria in neuronal development," *BMB Rep.*, vol. 51, no. 11, pp. 549–556, 2018, doi: 10.5483/BMBRep.2018.51.11.226
- [9] A. A. Khutorenko, V. V. Roudko, B. V. Chernyak, A. B. Vartapetian, P. M. Chumakov, and A. G. Evstafieva, "Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 29, pp. 12828–12833, 2010, doi: 10.1073/pnas.0910885107.
- [10] A. M. Celotto et al., "Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 3, pp. 810–820, 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4162-05.2006.
- [11] M. Rodríguez-Violante, A. Cervantes-Arriaga, S. Vargas-Cañas, and T. Corona, "Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas," *Arch. Neurociencias*, vol. 15, no. 1, pp. 39–46, 2010.
- [12] E. López-Gallardo, L. Llobet, S. Emperador, J. Montoya, and E. Ruiz-Pesini, "Effects of tributyltin chloride on cybrids with or without an ATP synthase pathologic mutation," *Environ. Health Perspect.*, vol. 124, no. 9, pp. 1399–1405, 2016, doi: 10.1289/EHP182.

- [13] M. D'Aurelio, C. Vives-Bauza, M. M. Davidson, and G. Manfredi, "Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 2, pp. 374–386, 2009, doi: 10.1093/hmg/ddp503.
- [14] I. F. da Silva, L. C. Freitas-Lima, J. B. Graceli, and L. C. de M. Rodrigues, "Organotins in neuronal damage, brain function, and behavior: A short review," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 8, no. JAN, pp. 6–11, 2018, doi: 10.3389/fendo.2017.00366.
- [15] E. Iglesias et al., "Prenatal exposure to oxidative phosphorylation xenobiotics and late-onset Parkinson disease," *Ageing Res. Rev.*, vol. 45, no. February, pp. 24–32, 2018, doi: 10.1016/j.arr.2018.04.006.
- [16] G. M. Cooke, H. Tryphonas, O. Pulido, D. Caldwell, G. S. Bondy, and D. Forsyth, "Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 42, no. 2, pp. 211–220, 2004, doi: 10.1016/j.fct.2003.09.003.
- [17] S. Yamada, Y. Kotake, Y. Demizu, M. Kurihara, Y. Sekino, and Y. Kanda, "NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells," *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1038/srep05952.
- [18] S. Fross, C. Mansel, M. McCormick, and B. P. S. Vohra, "Tributyltin alters calcium levels, mitochondrial dynamics, and activates calpains within dorsal root ganglion neurons," *Toxicol. Sci.*, vol. 180, no. 2, pp. 342–355, 2021, doi: 10.1093/toxsci/kfaa193.
- [19] S. Mitra, R. Gera, W. A. Siddiqui, and S. Khandelwal, "Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood-brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: An in vivo and in vitro study," *Toxicology*, vol. 310, pp. 39–52, 2013, doi: 10.1016/j.tox.2013.05.011.
- [20] M. K. Yu et al., "Effects of tributyltin acetate on dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 30, no. 7, pp. 858–865, 2007, doi: 10.1007/bf02978837.
- [21] U. Davaasambuu et al., "Ameliorative effects of ombuoside on dopamine biosynthesis in PC12 cells," *Nat. Prod. Sci.*, vol. 24, no. 2, pp. 99–102, 2018, doi: 10.20307/nps.2018.24.2.99.
- [22] J. X. Lu et al., "Axonal mRNA localization and local translation in neurodegenerative disease," *Neural Regen. Res.*, vol. 16, no. 10, pp. 1950–1957, 2021, doi: 10.4103/1673-5374.308074.
- [23] C. Von Ballmoos, J. Brunner, and P. Dimroth, "The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 31, pp. 11239–11244, 2004, doi: 10.1073/pnas.0402869101.
- [24] Boyer, P. D. "the Atp Synthase—a Splendid Molecular Machine", *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), pp. 717–749. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717.

- [25] Capaldi, R. A. y Aggeler, R., "Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor.", *Trends in biochemical sciences*, 27(3), pp. 154–60, doi: 10.1016 / s0968-0004 (01) 02051-5-
- [26] Whalen, M. M., Loganathan, B. G. y Kannan, K., "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.
- [27] Kanayama T1, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, N. J., "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.
- [28] F. Grün et al., "Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates," *Mol. Endocrinol.*, vol. 20, no. 9, pp. 2141–2155, 2006, doi: 10.1210/me.2005-0367.
- [29] C. Cong et al., "Paeoniflorin inhibits tributyltin chloride-induced apoptosis in hypothalamic neurons via inhibition of MKK4-JNK signaling pathway," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 237, no. February, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1016/j.jep.2019.03.030.
- [30] I. G. Onyango, J. P. Bennett, and G. B. Stokin, "Regulation of neuronal bioenergetics as a therapeutic strategy in neurodegenerative diseases," *Neural Regen. Res.*, vol. 16, no. 8, pp. 1467–1482, 2021, doi: 10.4103/1673-5374.303007.
- [31] W. M. Saxton and P. J. Hollenbeck, "The axonal transport of mitochondria," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 9, pp. 2095–2104, 2012, doi: 10.1242/jcs.053850.
- [32] R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, and A. Devin, "The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1807, no. 6, pp. 568–576, 2011, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010.
- [33] E. Gnaiger, "Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function," *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunct.*, no. January 2008, pp. 325–352, 2008, doi: 10.1002/9780470372531.ch12.
- [34] H. Xicoy, B. Wieringa, and G. J. M. Martens, "The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review," *Mol. Neurodegener.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1186/s13024-017-0149-0.
- [35] J. Kuzmicic et al., "Mitochondrial dynamics: A potential new therapeutic target for heart failure," *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 64, no. 10, pp. 916–923, 2011, doi: 10.1016/j.recesp.2011.05.018.
- [36] M. Rodríguez-Violante, A. Cervantes-Arriaga, S. Vargas-Cañas, and T. Corona, "Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas," *Arch. Neurociencias*, vol. 15, no. 1, pp. 39–46, 2010.

- [37] J. Kuzmicic et al., "Mitochondrial dynamics: A potential new therapeutic target for heart failure," *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 64, no. 10, pp. 916–923, 2011, doi: 10.1016/j.recesp.2011.05.018.
- [38] D. A. Grow et al., "Differentiation and Characterization of Dopaminergic Neurons From Baboon Induced Pluripotent Stem Cells," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 5, no. 9, pp. 1133–1144, 2016, doi: 10.5966/sctm.2015-0073.
- [39] L. D. Marroquin, J. Hynes, J. A. Dykens, J. D. Jamieson, and Y. Will, "Circumventing the crabtree effect: Replacing media glucose with galactose increases susceptibility of hepG2 cells to mitochondrial toxicants," *Toxicol. Sci.*, vol. 97, no. 2, pp. 539–547, 2007, doi: 10.1093/toxsci/kfm052.
- [40] J. M. Taymans and V. Baekelandt, "Phosphatases of  $\alpha$ -synuclein, LRRK2, and tau: Important players in the phosphorylation-dependent pathology of Parkinsonism," *Front. Genet.*, vol. 5, no. NOV, pp. 1–12, 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00382.
- [41] J. Kuzmicic et al., "Mitochondrial dynamics: A potential new therapeutic target for heart failure," *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 64, no. 10, pp. 916–923, 2011, doi: 10.1016/j.recesp.2011.05.018.