



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Azidotimidina: toxicidad y mutagenicidad en líneas celulares y ratones viejos prenatalmente expuestos.

TRABAJO FIN DE GRADO

Autora:

Andrea Cereza Buil

Directores:

Irene Jiménez Salvador

Eduardo Ruiz Pesini

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Veterinaria

Grado en Biotecnología. Curso 2021-2022

Abreviaturas

ABC: Abacavir

AD: Enfermedad de Alzheimer

AIDS: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

ATP: Adenosin Trifosfato

AZT: Azidotimidina

CI: Complejo respiratorio mitocondrial I

CII: Complejo respiratorio mitocondrial II

CIII: Complejo respiratorio mitocondrial III

CIV: Complejo respiratorio mitocondrial IV

CV: Complejo mitocondrial V

CoQ: Coenzima Q

Cyt c: Citocromo C

ddl: Didanosina

DMSO: Dimetilsulfoxido

DMEM: *Dulbecco modified Eagles medium*

D-loop: Bucle de desplazamiento

d4T: Estavudina

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETC: Cadena de transporte electrónico

FADH₂: Flavin adenin dinucleótido

FBS: Suero fetal bovino

FDA: *Food and drug administration*

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana

IM: Espacio intermembrana

IMS: membrana interna mitocondrial

KSS: Síndrome de Kearns-Sayre

LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber.

LOPD: Enfermedad de Parkinson de ataque tardío

LS: Síndrome de Leigh

M: matriz mitocondrial.

MEF: Fibroblastos embrionarios de ratón.

MMS: Metil Metano Sulfonato

mtDNA: DNA mitocondrial

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina.

OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD: Enfermedad de Parkinson

POLG: DNA polimerasa gamma.

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rRNA: RNA ribosómicos

SNpc: Sustancia negra pars compacta

Tm: Temperatura de hibridación

tRNA: RNA de transferencia

3TC: Lamivudina

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 La mitocondria y el sistema de fosforilación oxidativa	2
2.2 DNA mitocondrial y alteraciones neurológicas	2
2.3 Toxicidad mitocondrial en la exposición a xenobióticos	4
2.3.1 Los análogos de nucleótidos inhibidores de la transcriptasa reversa como xenobióticos del sistema de fosforilación oxidativa	4
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
4. METODOLOGÍA	6
4.1 Líneas celulares	6
4.2 Muestras de tejido cerebral murino	6
4.3 Cultivo celular	7
4.3.1 Medios de cultivo	7
4.3.2 Congelación y descongelación de células	7
4.3.3 Mantenimiento de las líneas celulares	8
4.3.4 Recuento Celular	8
4.3.5 Tratamiento con AZT	8
4.3.6 Obtención de pellets celulares	9
4.4 Estudio de la función mitocondrial	9
4.4.1 Ensayo de Viabilidad y producción de ATP mitocondrial	9
4.4.2 Ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno	10
4.4.3 Ensayo de potencial de membrana mitocondrial	10
4.5 Biología Molecular	10
4.5.1 Extracción de DNA	10
4.5.2 Cuantificación del DNA	11
4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
4.5.4 Preparación y revelado del gel de electroforesis	13
4.5.5 Secuenciación del producto de PCR	13
4.6 Herramientas bioinformáticas	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1 Estudio de la toxicidad celular	14
5.2 Estudio de la mutagenicidad	17
5.2.1 Extracción de DNA	17
5.2.2 Amplificación por PCR del D-loop	17
5.2.3 Secuenciación	19
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23

1. RESUMEN

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) juega un papel fundamental en la función y diferenciación neuronal que tiene lugar en las primeras fases del desarrollo embrionario. Los xenobióticos de naturaleza diversa, como la azidotimidina (AZT), podrían causar una alteración de la función mitocondrial llegando a resultar en el desarrollo de enfermedades neurológicas como Parkinson o Alzheimer, siendo la edad y la exposición a xenobióticos algunos de los posibles factores de riesgo en estudio.

Diversos autores han estudiado el efecto de dicho fármaco en edades tempranas, sin embargo, el propósito de dicho trabajo es el estudio de las consecuencias de una exposición temprana en la vejez del individuo.

Para lograrlo, se establecieron varios objetivos, se realizó un tratamiento de 72 h con AZT 5 μ M y 50 μ M en dos líneas celulares, SH-SY5Y y MEF, donde se estudió la afectación de la función mitocondrial causada por la toxicidad del fármaco mediante pruebas bioquímicas analizadas por fluorescencia y luminiscencia. Además, se comprobó la existencia de mutaciones producidas en la región D-loop mediante amplificación por PCR, secuenciación por el método Sanger y comparación con la secuencia consenso. Después, la mutagenicidad fue estudiada en el mtDNA procedente de cerebro de ratones viejos C57BL/6J prenatalmente expuestos a AZT. No se registraron diferencias significativas en los parámetros analizados, salvo una disminución en la producción de ATP mitocondrial en MEF expuestos al fármaco. En la región D-loop del genoma mitocondrial no aparecían mutaciones causadas por la exposición al fármaco, tanto en las líneas celulares como en los animales de experimentación.

ABSTRACT

The oxidative phosphorylation system (OXPHOS) is essential for neuronal function and differentiation which occurs in prenatal period. Xenobiotics, such as azidothymidine (AZT), might alter mitochondrial function and lead to the development of neurological diseases. Some of them are Parkinson and Alzheimer which are increased with age and xenobiotics exposition.

Some authors have investigated in the effect of AZT in early life; however, the purpose of this project is to study what an early exposure to AZT will suppose in the future.

To aim this objective, we treated during 72 h two different cell lines (SH-SY5Y and MEF) with AZT (5 μ M and 50 μ M). The impairment of mitochondrial function caused by drug toxicity was analyzed through biochemical tests. Moreover, we studied the mutagenicity of the drug by PCR amplification of the D-loop, then sequenced using the Sanger Method and compared to a consensus sequence. We used both line cells and also brain samples from mouse C57BL/6J exposed to AZT in early life.

Overall, we did not find significative differences comparing to control, apart from the significance decrease in mitochondrial ATP production in MEF exposed to drug. In the D-loop region, we did not find mutations caused by toxicity, neither in the cell lines nor in the exposed mice.

2. INTRODUCCION

2.1 La mitocondria y el sistema de fosforilación oxidativa

La mitocondria es un orgánulo con doble membrana fundamental en las células eucariotas para la obtención de la energía en forma de adenosin trifosfato (ATP), esencial para el buen desarrollo celular. Esta función es llevada a cabo en la membrana interna de la mitocondria donde se localiza el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), constituido por la cadena de transporte de electrones (ETC), formada por los complejos I al IV (C I-IV), el coenzima Q (coQ) y el citocromo c (Cyt c), y la ATP sintasa o complejo V (CV) (Figura 1).

Los electrones son extraídos de los nutrientes ingeridos y, tras generar dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) y dinucleótido de flavina y adenina (FADH₂) reducidos, son recogidos en la ETC por el oxígeno inhalado. En el proceso de producción de ATP vía OXPHOS, se genera un potencial de membrana interna mitocondrial mediante el bombeo de protones a través de CI, CIII y CIV desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (IMS) que, posteriormente, impulsa el funcionamiento de la ATP sintasa.

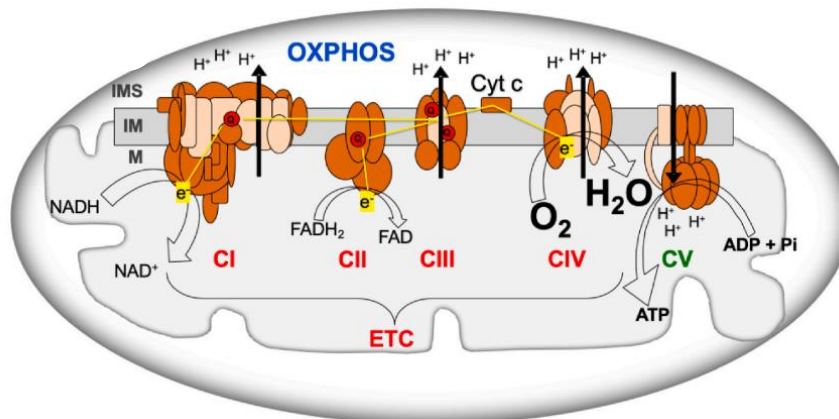


Figura 1. Modelo esquemático del sistema OXPHOS de la mitocondria. IMS: Espacio intermembrana, IM: membrana interna mitocondrial, M: matriz mitocondrial. Fuente: (1)

La liberación de electrones fuera de la cadena de transporte conduce a la formación de radicales libres que se suma a la gran disponibilidad de oxígeno por parte del orgánulo, lo que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en forma de anión superóxido y peróxido de hidrogeno, principalmente. No obstante, bajo determinadas condiciones, varias proteínas de la matriz mitocondrial y complejos enzimáticos son también capaces de producir ROS.

Otras funciones de este sistema incluyen la homeostasis del calcio intracelular, la regulación de la apoptosis, control de la dinámica mitocondrial o la diferenciación celular. (2)

2.2 DNA mitocondrial y alteraciones neurológicas

A nivel genético, la mitocondria no solo depende del DNA nuclear puesto que posee su propio DNA (DNA mitocondrial, mtDNA) (Figura 2), localizado en la matriz mitocondrial. Cada orgánulo tiene muchas copias idénticas del material genético de herencia materna. La estructura y organización genética está altamente conservada entre especies de mamíferos, se trata de una molécula de DNA de hebra doble, circular, superenrollada y cerrada de aproximadamente 16,6 kb en humanos.

Cada una de las hebras se conocen como H (pesada o *heavy*) y L (ligera o *light*) y están catalogadas en función del coeficiente de sedimentación. El mtDNA contiene información sobre 37 genes, 13 codifican proteínas que forman parte de los complejos enzimáticos de OXPHOS y los restantes, 2 RNAs ribosómicos (rRNAs) y 22 RNAs de transferencia (tRNAs).

Posee una región no codificante conocida como D-Loop (*Displacement loop* o bucle de desplazamiento). Se trata de un bucle con una estructura de triple hebra (cadena ligera, cadena pesada y 7S DNA). Se localiza entre el gen que codifica para el tRNA de la prolina y el de la fenilalanina. En él se sitúa el origen de replicación de la hebra H y es parte del control de la transcripción ya que contiene promotores y potenciadores. (3) Se considera una región hipervariable entre especies y dividida en regiones en función de su grado de diversidad. Sus características permiten asociarlo a enfermedades degenerativas, envejecimiento y evolución de las especies.

Además, se ha visto que el extremo 3' del D-loop posee puntos de ruptura comunes para deleciones, tanto en pacientes como en rupturas enzimáticas inducidas en modelos celulares y animales. (4)

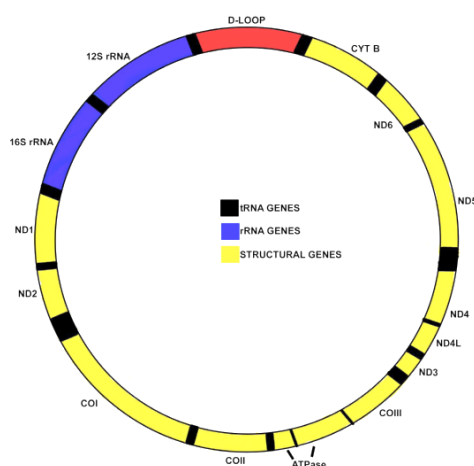


Figura 2. Composición del mtDNA. La figura muestra la estructura del DNA mitocondrial. Los genes estructurales se muestran en amarillo, los RNAs ribosómicos (rRNA) en azul y los RNAs de transferencia (tRNA) en negro. En rojo se muestra la región no codificante D-loop. Fuente: (5)

El mtDNA posee una alta tasa de mutación y es especialmente susceptible a sufrir daño por estrés oxidativo porque a nivel estructural no se encuentra empaquetado en histonas, como si ocurre en el DNA nuclear, ni tampoco tiene tantos mecanismos de reparación del material genético. Por tanto, mutaciones en el mtDNA pueden resultar en la disfunción del sistema OXPHOS que lleva a una inestabilidad en la generación de energía en forma de ATP que necesitan las células y conducirá a la aparición de patologías mitocondriales. Se verán más afectados aquellos sistemas que tengan una demanda energética mayor como puede ser el sistema nervioso. (6)

Algunas de las enfermedades relacionadas con la alteración de la función mitocondrial son: El síndrome de Kearns-Sayre (KSS), la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) o el síndrome de Leigh (LS).

Además, mutaciones en el mtDNA se encuentran relacionadas con enfermedades como la diabetes, Alzheimer (AD) y Parkinson (PD), incluso cáncer. (3)

El daño genético mitocondrial se acumula con la edad, lo que resulta fundamental en el proceso de envejecimiento, y especialmente en relación con la neurodegeneración producida en las enfermedades tales como Parkinson (PD). Concretamente, la variante más común de esta enfermedad se produce en la vejez del paciente y se conoce como Enfermedad de Parkinson de inicio o ataque tardío (LOPD). La prevalencia de esta enfermedad avanza con la edad 0,3 % de la población total, 1 % en personas mayores de 60 años y 3,5 % entre 85 y 89 años. (7)

La PD se da por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc). Estas células se encargan de la producción de dopamina, la cual regula el sistema de ganglios basales que participan en el control del movimiento. Cuando encontramos neurodegeneración a nivel de estas neuronas aparecen temblores, rigidez en reposo y lentitud. Además, se ha observado una acumulación generalizada de α -sinucleína, en forma de agregados en el citoplasma celular conocidos como cuerpos de Lewy. (8)

De hecho, el sistema OXPHOS no solo juega un papel fundamental en la función de las neuronas maduras, sino también en la neurogénesis que tiene lugar en los primeros días del desarrollo embrionario (desde la semana 5 a la semana 7 desde la fecundación, en humanos), concretamente en la diferenciación de la célula progenitora neural a neurona postmitótica. (9) Es entonces cuando la masa mitocondrial aumenta y estos orgánulos se distribuyen con el objetivo de dar lugar a los diferentes tipos neuronales mediante la diferenciación a neurona dopaminérgica. Además, son importantes en el crecimiento axonal, así como en el desarrollo y el mantenimiento de la plasticidad en las dendritas. (10)

2.3 Toxicidad mitocondrial en la exposición a xenobióticos

Algunos xenobióticos, no producto del metabolismo celular, pueden producir defectos en la función OXPHOS.

Continuamente nos encontramos expuestos a xenobióticos ambientales como pueden ser pesticidas o fungicidas. Es complicado determinar el alcance y momento de la exposición. Otros xenobióticos como los fármacos son continuamente estudiados, aunque también sea posible la exposición accidental a los mismos, y sí se conocen datos específicos al tratarse de compuestos terapéuticos.

2.3.1 Los análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa como xenobióticos del sistema de fosforilación oxidativa

Los análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NRTIs) son un tipo de fármacos antirretrovirales, utilizados en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que es el agente del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (AIDS).

Han sido desarrollados gran variedad de fármacos con este mismo mecanismo de acción como Abacavir (ABC), Estavudina (d4T), Lamivudina (3TC), Didanosina (ddI)... Pueden ser administrados de forma individual o combinando varios de ellos para potenciar el efecto terapéutico. (11)

El primer fármaco de este grupo aprobado por la *Food and drug administration* (FDA) fue la Azidotimidina (AZT), también conocido como Zidovudina y comercializado como Retrovir®. Inicialmente se utilizó como tratamiento anticancerígeno, pero se descartó por no conseguir los objetivos terapéuticos que perseguía.

Se ensayó contra el HIV y su aprobación en 1987 se vio impulsada por la inexistencia de tratamientos contra dicha enfermedad. Posteriormente, se comprobó los efectos adversos a largo plazo que podía provocar.

Se trata de un análogo de la timidina (Figura 3) cuya acción conduce a la supresión de la replicación del genoma viral. No obstante, también presenta afinidad por la DNA polimerasa gamma (POLG) responsable de la replicación del mtDNA humano. Entonces la toxicidad de este tipo de fármacos se encuentra relacionada con alteraciones en el sistema OXPHOS. (12)

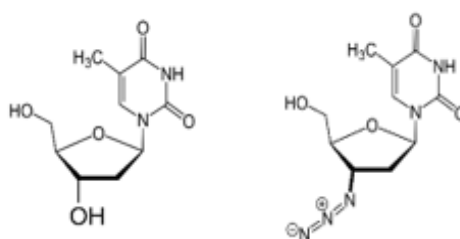


Figura 3. Estructura del AZT y su nucleósido análogo. A la izquierda se muestra el nucleósido timidina y a la derecha el AZT, donde se sustituye el grupo -OH del nucleósido por un grupo -N₃.

Este fármaco ha sido comúnmente prescrito a mujeres embarazadas para evitar la transmisión vertical del HIV. Se recomienda utilizarlo a lo largo de todo el embarazo y las primeras 6 semanas de vida del neonato.

A pesar de ser efectivo en la reducción de la carga viral, varios estudios reflejan los efectos secundarios del AZT como cardiomiopatía, hepatotoxicidad, neuropatías y daño mitocondrial. (11,13,14).

Dichos efectos secundarios pueden provocar también alteraciones en el material genético, concretamente dado que dicho fármaco tiene afinidad por POLG, resulta crucial en la replicación del mtDNA. Esta interacción puede desencadenar la aparición de mutaciones que pueden aparecer en edades tempranas cuando tiene lugar la exposición al AZT y acumularse con la edad siendo un factor importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Dado que la función OXPHOS es importante para la neurogénesis y que esta ocurre principalmente en las fases tempranas del desarrollo del sistema nervioso, la exposición prenatal a xenobióticos del sistema OXPHOS, que alteren la función mitocondrial, podrían ser un factor de riesgo en estudio en el desarrollo de enfermedades del sistema nervioso de aparición tardía.

Nuestra hipótesis propone que la exposición durante la etapa prenatal al AZT podría provocar toxicidad, tanto en la función mitocondrial, como en mutaciones en el mtDNA.

Para contrastar dicha hipótesis se establecen los siguientes objetivos:

- Estudio del efecto de la AZT a diferentes concentraciones en la función mitocondrial de dos líneas celulares (SH-SY5Y y MEF).
- Establecimiento de las condiciones óptimas de amplificación mediante PCR del D-loop del genoma mitocondrial en ratón.
- Determinación del efecto mutagénico de diferentes concentraciones de AZT en el mtDNA de cerebros de ratón y en las líneas celulares humanas y murinas.

4. METODOLOGIA

4.1 Líneas celulares

Para la realización de dicho trabajo Final de Grado se han utilizado muestras procedentes de diferentes líneas celulares:

- **SH-SY5Y** cuyo origen es un neuroblastoma humano. Se trata de un modelo celular popular para la investigación de LOPD puesto que se puede diferenciar a neuronas dopaminérgicas. (15)
- Fibroblastos embrionarios de ratón (**MEF**) inmortalizados procedentes de la cepa de ratón C57BL/6J.

En el caso de las células SH-SY5Y y MEF, se utilizó la línea celular para someterla al tratamiento con AZT.

4.2 Muestras de tejido cerebral murino

Se utilizaron muestras de tejido cerebral de ratón de la misma cepa que los fibroblastos. Dichos ratones son la descendencia de hembras a las que se les administró AZT entre los días E9 y E15 de gestación. Es durante este periodo cuando tiene lugar la diferenciación de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio en ratón (16). Se les expuso a dos concentraciones diferentes de fármaco, equivalentes a la utilizada en humano y el doble de la misma.

Además, las hembras gestantes fueron tratadas también con Uridina, puesto que se ha visto que en células SH-SY5Y el efecto de la disfunción del sistema OXPHOS sobre la diferenciación neuronal puede recuperarse con Uridina. (12)

Eran un total de 40 muestras, distribuidas en 5 grupos de 8 ratones cada uno: Vehículo, AZT 2,5 mg / día, AZT 5 mg / día, Uridina día y AZT 5 mg / día + Uridina 70 mg / día.

Transcurridos 20 meses, los ratones ya habían alcanzado la vejez en su especie (equivalente a 70-79 años en humanos), fueron sacrificados y se obtuvieron muestras del cerebro, de forma que durante este Trabajo Final de Grado solo se manipuló el DNA de los ratones previamente extraído del tejido cerebral en el grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Universidad de Zaragoza.

4.3 Cultivo celular

Todo el trabajo relativo al cultivo celular se llevó a cabo bajo condiciones estériles. Esto supone la manipulación de las muestras en campanas de flujo laminar vertical (Nu-437-400E, NUAIRE), así como el uso de material autoclavado y esterilizado con etanol 70 % antes de utilizarlo.

4.3.1 Medios de cultivo

Para el cultivo de las células se utilizó DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) para favorecer el crecimiento y la adhesión celular. Para el mantenimiento de la línea celular, la concentración de glucosa en el medio era 25 mM (4,5 g/L) y durante el tratamiento con AZT la concentración de glucosa era 5 mM (1 g/L) para asemejar las condiciones al estado fisiológico de la célula *in vivo*. Además, en ningún caso se utilizaron antibióticos puesto que, dado el origen endosimbiótico de las mitocondrias a partir de las bacterias, los antibióticos podrían interferir en la fidelidad de los resultados.

Para el tratamiento con AZT se preparó medio DMEM 5 mM de glucosa y 10 % FBS con dos concentraciones finales de AZT, 5 μ M y 50 μ M. Las concentraciones de fármaco utilizadas fueron elegidas y adaptadas en función de la dosis administrada a los pacientes actualmente. (12)

Todos los medios de cultivo se conservan en refrigeración y es necesario atemperarlos a 37 °C 15 min antes de su uso.

4.3.2 Congelación y descongelación de células

Para la congelación celular se utilizaron criotubos, en cada uno se introdujo 1 mL de la suspensión celular a la concentración celular deseada, en este caso 2.000.000 células. Además, se suplementó con FBS hasta un 20 % y un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) que actúa como crioprotector y evita la formación de cristales de hielo que dañan las membranas celulares. Inmediatamente se introdujeron los tubos en el Mr. Frosty. Dicho recipiente, contiene isopropanol que permite la disminución gradual de la temperatura de 1 °C/min durante las 24 h que se almacenan las muestras en el congelador a - 80 °C. Posteriormente, si se desea conservar las muestras durante un largo periodo de tiempo, se almacenan en un contenedor de nitrógeno líquido a - 196 °C.

Para la descongelación de células, se resuspendió con pipeta Pasteur el contenido del criotubo en 4 mL de medio DMEM 25 mM de glucosa contenidos en un tubo Falcon para que la descongelación de las células sea progresiva. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 1400 r.p.m. (Allegra X-22, Centrifuge Beckman Coulter) y el pellet se resuspendió en medio fresco y se inoculó en una placa para su cultivo. La centrifugación tras la descongelación es importante porque el sobrenadante contiene DMSO que resulta tóxico para las células vivas.

4.3.3 Mantenimiento de las líneas celulares

Como se trabajó con células adherentes, se llevó a cabo un proceso de tripsinización para proceder a su subcultivo cuando las células alcanzaban la confluencia máxima. Para ello se retiró el medio y se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS) (Ref: 10010-015, Gibco). Posteriormente, se incubaron con TryPLE (Ref: 12604-013, Gibco) durante unos minutos ya que contiene tripsina y ayudó a que las células se levantasen de la superficie de la placa, gracias a la rotura de las proteínas de adhesión de la membrana, y quedasen en suspensión. La acción del TryPLE se detuvo con la adición de medio DMEM 25 mM de glucosa y 10 % FBS y se recogieron las células en suspensión en un tubo Falcon.

Dicho recipiente, se centrifugó 5 min a 1400 r.p.m. y se desechó el sobrenadante ya que contiene TryPLE. El pellet se resuspendió en medio fresco y se inoculó en la placa nueva en la que previamente se había añadido el volumen adecuado de medio para el crecimiento celular.

El subcultivo se incubó a 37 °C con humedad al 90 % y un 5 % de CO₂ (Nuaire® DHD AutoFlow). Se fue observando el crecimiento celular a lo largo de los días y cuando se consideró necesario se cambió el medio o se doblaron para continuar con el mantenimiento de la línea celular.

Además, la suspensión celular obtenida tras la centrifugación del Falcon puede ser utilizada para la congelación de células o para su recuento.

4.3.4 Recuento celular

Para el recuento celular se utilizó el método del azul tripán. Se cogió una alícuota de suspensión celular y se mezcló con azul tripán en una proporción 1:1. Se homogenizó y se colocó en la cámara para, haciendo uso de un contador automático (Countless II, Life Technologies), obtener los datos de viabilidad y recuento celular. Se tomaron los datos de dos medidas y se hizo la media aritmética.

Se utilizó el método del azul tripán porque dicho colorante penetra en las células que tienen su membrana plasmática dañada y, por tanto, no son viables. Las células teñidas de azul serán células muertas y así es como serán distinguidas de las viables por el contador automático.

4.3.5 Tratamiento con AZT

Se realizó previamente una prueba de número de células sembradas en cada pocillo con el fin de valorar el crecimiento celular en dicha superficie en relación con el tratamiento farmacológico y se diseñó el experimento como se indica en la Tabla 1. Dado que el tratamiento con AZT se extendió a lo largo de 72 h, se consideró importante tener en cuenta el tamaño de cada tipo celular para no llegar a la confluencia máxima del cultivo. Se sembraron las células en medio DMEM 5 mM de Glucosa.

Tabla 1. Diseño del experimento de tratamiento con AZT para cada tipo celular.

	Objetivo	Número de células sembradas	Tipo de placa	Replicados por condición
SH-SY5Y	Pellets celulares	250.000 células/pocillo	6 pocillos	3
	Toxicidad mitocondrial	5.000 células/pocillo	96 pocillos	8
MEF	Pellets celulares	100.000 células/pocillo	6 pocillos	3
	Toxicidad mitocondrial	1.000 células/pocillo	96 pocillos	8

A las 24 h, se cambió el medio y se substituyó por el de tratamiento. Se establecieron tres condiciones: Control, AZT 5 μ M, AZT 50 μ M. Se debe tener en cuenta que en el control el cambio de medio se lleva a cabo con DMEM 5 mM Glucosa únicamente. Se efectuó un cambio de medio a las 48 h desde el inicio del tratamiento.

Trascurridas 72 h de cultivo con AZT, se pone fin al tratamiento y se continua con los siguientes ensayos en función de cuál sea el objetivo.

4.3.6 Obtención de pellets celulares

Tras el tratamiento se recogieron las células. Se eliminó el medio de cada pocillo y se tripsinizó como se indica en el apartado 4.2.3. El contenido de cada uno de los pocillos se centrifugó en un tubo Falcon 5 min a 1400 r.p.m. y el pellet obtenido se resuspendió en PBS para eliminar posibles restos de medio y se pasó a un Eppendorf. Posteriormente, cada uno de los Eppendorf se centrifugó durante 4 min a 5000 r.p.m. (Minispin Plus, Fisher Scientific) y se retiró todo el PBS sobrante. Los pellets celulares obtenidos se conservaron a - 80 °C.

4.4 Estudio de la función mitocondrial

4.4.1 Ensayo de viabilidad y cantidad de ATP mitocondrial

Para la medida de la viabilidad celular tras el tratamiento, en placas de 96 pocillos de fondo blanco, se utilizó el reactivo *CellTiter-Fluor reagent* (G6081, Promega). En este caso se mide la actividad proteasa de las células vivas lo que sirve como biomarcador. Se utiliza un sustrato fluorogénico péptido (Gly-Phe-AFC) que es capaz de permear en las células y, una vez sufre la actividad proteasa, generar una señal fluorescente proporcional al número de células vivas.

Se eliminó el medio de los pocillos y se añadieron 200 μ L del reactivo de viabilidad. Tras la incubación de las placas 30 min en estufa a 37 °C se midió la fluorescencia (Ex: 380 nm y Em: 520 nm) utilizando el lector de placas Novostar (BMG-Labtech) y se obtuvieron los datos. Posteriormente se lavaron los pocillos con PBS y se inició el ensayo de cantidad de ATP mitocondrial producido.

Para la evaluación de la cantidad de ATP producido se preparó medio DMEM *free* (sin glucosa ni piruvato) con Piruvato 1 mM y 2-Deoxiglucosa 5 mM en un volumen final de 10 mL. Resulta importante utilizar dicho medio para inhibir la producción de ATP por la vía glucolítica y obtener

resultados del producido en la mitocondria. Para ello inhibiremos la hexoquinasa (enzima participante en esta ruta) mediante el uso de 2-deoxiglucosa.

Se añadieron 100 µL en cada pocillo del medio de reacción, se incubó 2 h en estufa y se añadieron 100 µL *CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay* (G7571, Promega). Este reactivo provoca la lisis celular y la transformación de luciferina y oxiluciferina la cual es fluorescente en función de la cantidad de ATP existente. A mayor fluorescencia, mayor número de células vivas y mayor cantidad de ATP producido. Se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente y se midió de la misma forma que para el ensayo de viabilidad anterior.

4.4.2 Ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno

Tras el tratamiento, se eliminó el medio de cada pocillo de una placa de 96 pocillos negra y se añadieron 200 µL de MitoSOX® a una concentración final de 5 µM (M36008, Invitrogen). Se trata de un derivado del dihidroetidio que se dirige específicamente a las mitocondrias de las células vivas y es oxidado a superóxido conduciendo a la formación de 2-hidroxi-etidio que es retenido por las mitocondrias y tiene fluorescencia roja. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente y oscuridad, se lavaron los pocillos tres veces con PBS y se midió la fluorescencia en el lector de placas Novostar (BMG-Labtech) (Ex: 510 nm y Em: 580 nm).

Para normalizar los resultados frente al número de células vivas, se añadió Hoechst 33342 (Thermo Scientific) a una concentración final de 20 µM. Es un colorante fluorescente que se une al DNA de las células vivas. Se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente, se lavó con PBS y se volvieron a realizar las mediciones.

4.4.3 Ensayo de potencial de membrana mitocondrial

Se eliminó el medio de una placa de 96 pocillos y se añadieron 100 µL del reactivo previamente preparado que contiene MITO-ID, agua destilada y buffers pertenecientes al kit (MITO-ID®, ENZ-51018-K100, *Enzo lifescience toxicity kit*). Dicho protocolo se basa en la tinción en naranja de las mitocondrias y verde en del citosol si tenemos un alto potencial mitocondrial, si no es así, las mitocondrias no mostrarán fluorescencia naranja.

Se dejó incubar 30 min en oscuridad y se midió la fluorescencia en el lector de placas Novostar (BMG-Labtech) (Ex: 550nm y Em:580nm).

Posteriormente se hizo la medida con Hoechst 33342 del mismo modo que en el ensayo de producción de ROS (Apartado 4.3.2).

4.5 Biología molecular

4.5.1 Extracción de DNA

El material de partida para la extracción de DNA fueron pellets de cada una de las líneas celulares utilizadas durante el trabajo final de grado, SH-SY5Y y MEF inmortalizadas.

Se utilizó un Kit de extracción de DNA para lisados celulares (*Cell and Tissue DNA extraction Kit*, Biotools B&M) basado en una columna de afinidad y diferentes buffers. Finalmente se obtuvo el DNA celular resuspendido tras la elución de la columna con 40 µL de agua libre de DNAasas.

4.5.2 Cuantificación de DNA

Se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) para medir la cantidad de DNA obtenido tras el tratamiento a partir de un pequeño volumen de muestra. Dicho dispositivo se configuró para medir ácidos nucleicos, en concreto DNA, a 260 nm y se estableció un blanco a partir de agua pura puesto que es el disolvente que se utilizó para eluir la columna de extracción. Posteriormente se realizó la medición de cada una de las muestras y se obtuvo, además de la cantidad de DNA en ng/μL, los valores que indican la calidad del material genético extraído. Estos se corresponden al cociente entre absorbancias y deben estar entre unos niveles determinados para asegurar que las muestras no se encuentran contaminadas, ni por proteínas ni por compuestos orgánicos ($A_{260/230} = 1,8-2$ y $A_{260/280} = 1,8-2,2$).

4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA extraído se sometió a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región D-loop del genoma mitocondrial en la cual se estudió la presencia de mutaciones tras el tratamiento con AZT. Se tuvo en cuenta la presencia de tipos celulares diferentes a lo largo del desarrollo del Trabajo Final de Grado, lo cual condicionó la presencia de cebadores diferentes para la amplificación de la región deseada en las diferentes secuencias, tanto de humano como de ratón.

- SH-SY5Y

En SH-SY5Y, la región D-loop comprende los siguientes nucleótidos: 1 al 576 y 16024 al 16569. Los cebadores utilizados para la PCR fueron los que se encontraban puestos a punto en el laboratorio y se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación del D-Loop en SH-SY5Y. Tm: Temperatura de hibridación. En el nombre del cebador se detalla que es para mtDNA (mt) de humano (h), la cadena con la que hibrida, ligera (L) o pesada (H) y la posición del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador.

Cebador		Secuencia	Tm (°C)	Tamaño amplicón
hmtL15591	Directo	5' TTCGCCTACACAATTCTCCG- 3'	65,8	1643 bp
hmtH626	Reverso	5'-TTTATGGGGTGATGTGAGCC-3'	65,8	

- MEF

En el caso de MEF, se realizó la puesta a punto de la PCR para este tipo celular mediante el diseño de los oligonucleótidos (directo y reverso) para ambas hebras del DNA. Para ello se obtuvo del NCBI la secuencia en formato FASTA de genoma mitocondrial de ratón de la cepa C57BL/6J (NC_005089.1,(17)) y se diseñaron los cebadores (Tabla 3) teniendo en cuenta que el D-loop en ratón comprende del nucleótido 15423 al 16299. El diseño se tiene que llevar a cabo teniendo en cuenta que la longitud de los cebadores debe ser alrededor de 20 bases, la temperatura de fusión (Tm), a la cual hibridan los oligonucleótidos en los sitios complementarios, de cada uno no debe ser superior a 65 °C y que además la diferencia entre ambas no debe ser superior a 5 °C. Adicionalmente se hará el diseño teniendo en cuenta que en

el extremo 3' del oligonucleótido sea una C o una G para aumentar la robustez de la unión al DNA.

Tabla 3. Cebadores diseñados para la puesta a punto de la PCR del D-loop en ratón. En el nombre del cebador se detalla que es para mtDNA (mt) de ratón (ms), la cadena con la que hibrida: ligera (L) o pesada (H) y la posición del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador. Además, se detalla la temperatura de hibridación (Tm).

Cebador		Secuencia	Tm (°C)	Tamaño amplicón
msmtL15198	Directo	5'-AACACCCATTTATTATCATTGGCC-3'	62,9	1327 bp
msmtH202	Reverso	5'-TAAGCTATTTTAATGTGCTTGATACC-3'	61	
msmtL15198	Directo	5'-AACACCCATTTATTATCATTGGCC-3'	62,9	1334 bp
msmtH109	Reverso	5'-TTTACCTCTAATTAATTATAAGGCC-3'	58,5	

La PCR se preparó en tubos Eppendorf de 200 µL en un volumen total de 25 µL como se indica en la Tabla 4. Se utilizaron diferentes enzimas según el DNA a amplificar: Emerald (EmeraldAmp GT PCR Master Mix, Takara) para ratón y 2X Phusion Master Mix con buffer CG (Thermo Scientific) para las SH-SY5Y.

Tabla 4. Diseño de PCR

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
2X Phusion Master Mix EmeraldAmp GT PCR Master Mix	12,5 µL	1X
Cebador directo 25 µM	0,5 µL	5 µM
Cebador reverso 25 µM	0,5 µL	5 µM
Muestra DNA	Ajustar para cada muestra	100 ng / µL
H ₂ O	Completar hasta 25 µL.	

Además del análisis de las muestras deseadas, para cada PCR se preparó un blanco para detectar la presencia de contaminación de los reactivos en caso de que la hubiese y se añadió también una muestra Rho⁰ para comprobar que se amplificaba el genoma mitocondrial.

Las muestras preparadas se colocaron en el termociclador (T3 thermocycler Biometra) utilizando un programa con los ciclos de PCR indicados en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de PCR para secuenciación utilizado en el termociclador. La Temperatura de hibridación (Tm) varía según los cebadores empleados.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	45 s	1
Hibridación	66 o 64	30 s	1
Extensión	72	3 min	35
Extensión final	72	5 min	1
Enfriamiento	4	5 min	

4.5.4 Preparación y revelado del gel de electroforesis

Para comprobar la amplificación del fragmento de secuencia deseado por PCR, se realizó una electroforesis de los productos de PCR y su posterior análisis en el transiluminador.

Al trabajar con DNA se preparó un gel de agarosa al 1 % (p/v), para ello se preparó una disolución de 1 g de Agarosa en 100 mL de TBE 1X calentando en el microondas para conseguir que se disuelva correctamente. A dicha disolución se le añadieron 6,5 µL de Bromuro de etidio en campana, se colocó el peine que sirve de molde para los pocillos y se dejó solidificar.

Una vez gelificado, se colocó en la cubeta de electroforesis, se rellenó la misma con tampón TBE 1X y se cargaron 5 µL de cada muestra junto a 2 µL tampón de carga (0,21 % (p/v) azul de bromofenol, EDTA 0,2 M pH 8, 50 % (v/v) glicerol en agua pura) en cada pocillo. Se cargaron todas las muestras, el blanco y el marcador de pesos moleculares de 8 Kb (Roche). Posteriormente, se conectó la cubeta a la fuente de alimentación y se corrió el gel durante 5 min a 50 V para comprobar que la muestra había entrado en los pocillos y después se subió el voltaje a 100 V. Una vez, el gel había recorrido la distancia adecuada, se detuvo el paso de la corriente.

El resultado del gel de electroforesis se observó en el transiluminador (Gel Doc XR, Biorad).

4.5.5 Secuenciación del producto de PCR

El producto de amplificación se preparó para la secuenciación, para ello se utilizó el reactivo *ExoSAP-IT™ Express PCR product reagent* (Thermo Fisher Scientific) el cual elimina el exceso de cebadores y los nucleótidos no incorporados enzimáticamente para que no interfieran en la secuenciación. 10 µL de muestra de amplificado se añadieron a un tubo Eppendorf de 0,5 mL junto a 4 µL de reactivo y se limpió el producto de PCR con el programa del termociclador que se indica en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa utilizado en el termociclador para la limpieza de los productos de PCR a secuenciar.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Limpieza	37	4 min	1
Inactivación	80	1 min	1
Enfriamiento	4		

La secuenciación se realizó por el método Sanger de manera externa en el servicio de Secuenciación de la unidad de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Se enviaron las muestras junto a una hoja de petición y los cebadores utilizados (Tabla 7). Se recibió un archivo con la secuencia amplificada con cada uno de los oligonucleótidos.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación. En el nombre del cebador se detalla si es para mtDNA (mt) de ratón (ms) o humano (h), La cadena con la que hibrida, ligera(L) o pesada (H) y la posición del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador.

Cebador		Secuencia	Muestra
hmtL15591	Directo	5'-TTCGCCTACACAATTCTCCG-3'	DNA humano
hmtL16365	Directo	5'-GTCAAATCCCTTCTCGTCCC-3'	
hmtH626	Reverso	5'-TTTATGGGGTGATGTGAGCC-3'	
msmtL15198	Directo	5'-AACACCCATTTATTATCATTGGCC-3'	DNA de ratón
msmt L15422	Directo	5'- TGGTATTCTAATTAACTACTTCTTG-3'	
msmtH202	Reverso	5'-TAAGCTATTTTAATGTGCTTGATACC-3'	

4.6 Herramientas bioinformáticas

- Sequencher: Software que permite el ensamblaje y análisis de secuencias de DNA en formato ab.1. En cada uno de los proyectos permite comparar la secuencia consenso con cada una de las muestras previamente secuenciadas con el objetivo de estudiar las mutaciones generadas tras la exposición al fármaco. Además, permite hacer una limpieza de la secuencia mediante la función *"trim ends"* con el objetivo de optimizar la comparación utilizando únicamente la región del producto de secuenciación en el que la señal es nítida.
- GraphPad Prism 5: software utilizado para el análisis bioestadístico de los datos y su representación gráfica. Como se trabajó con un número pequeño de muestras, se usó el test de normalidad de Saphiro-Wilk. Los parámetros estadísticos se estudiaron con el test ANOVA y test Kruskal-Wallis, suponiendo diferencias significativas cuando el p-valor < 0,05.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Estudio de la toxicidad celular

Una vez realizados los tratamientos y realizado el estudio de la toxicidad celular del AZT a través de diferentes parámetros mitocondriales, se relativizaron los datos frente al número de células vivas. Para el análisis de resultados se realizó la media del control de todos los replicados y se referenció cada uno de los resultados a este para calcular el valor en porcentaje.

- Viabilidad Celular

El objetivo del estudio de la viabilidad celular fue obtener el porcentaje de células vivas presentes para cada condición. Tal y como se muestra en la figura 4 la viabilidad celular con respecto a el control no ha encontrado diferencias significativas en ninguna de las dos líneas celulares tratadas con el fármaco. En el caso de MEF se observa una tendencia a la disminución de la viabilidad en las condiciones de AZT 5 μ M y 50 μ M con respecto al control.

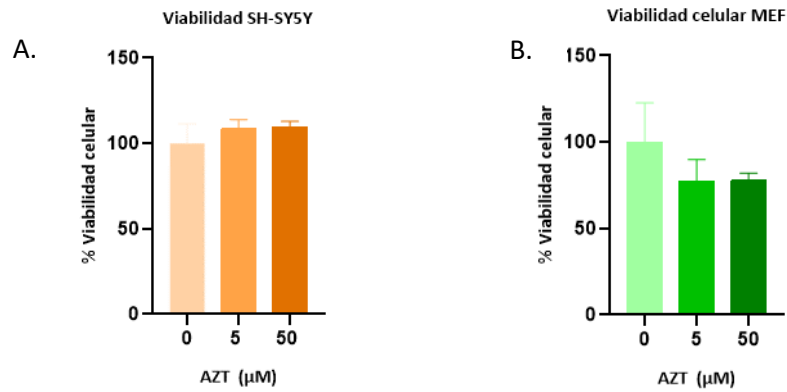


Figura 4. Efecto del AZT sobre la viabilidad celular sobre las 2 líneas celulares y concentraciones en estudio, SH-SY5Y (A) y MEF (B), Control (0 μM), 5 μM y 50 μM.

- Cantidad de ATP mitocondrial producido

La producción de ATP vía OXPHOS depende directamente del estado de la mitocondria, por tanto, al exponer las células al fármaco, en caso de que sea tóxico, la cantidad de ATP producido disminuiría conforme aumenta la concentración de AZT. Se debe tener en cuenta que la producción ATP se encuentra condicionada a que la célula se encuentre en condiciones óptimas para poder producirlo, por tanto, se relativizaron los resultados en función del número de células viables.

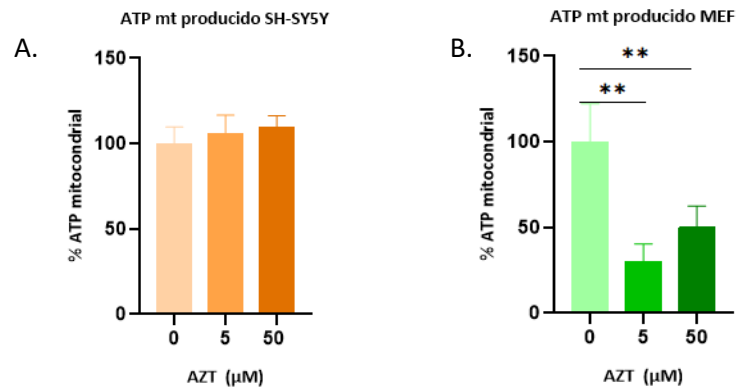


Figura 5. Efecto del ATP sobre la producción de ATP mitocondrial en las dos líneas celulares y concentraciones en estudio, SH-SY5Y (A) y MEF (B), Se representan tres condiciones para cada línea celular: control (0 μM), 5 μM y 50 μM.

La Figura 5 refleja que el efecto del AZT sobre la producción de ATP en los MEF (B) es negativo de forma que disminuye la producción de ATP con la presencia de AZT de forma significativa. En las SH-SY5Y (A) la diferencia no es significativa.

- Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

En el análisis de resultados basados en la producción de ROS se debe tener en cuenta que estas son producidas en la mitocondria y es fundamental mantener un equilibrio para lograr el buen funcionamiento del orgánulo evitando el estrés oxidativo que provoca una excesiva producción de ROS. El objetivo es estudiar si la exposición de las dos líneas celulares al AZT suponer una alteración que condujese a una situación de estrés oxidativo y, por tanto, producción de ROS. Como se observa en la figura 6 la exposición de las dos líneas celulares al tratamiento con AZT no ha resultado en diferencias significativas en la producción de ROS.

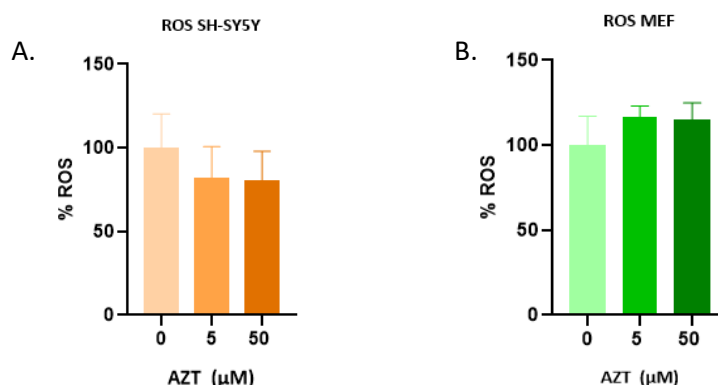


Figura 6. Efecto del ATP sobre la producción de ROS mitocondrial en las dos líneas celulares y concentraciones en estudio, SH-SY5Y (A) y MEF (B), Se representan tres condiciones para cada línea celular: control (0 μM), 5 μM y 50 μM.

- Potencial de membrana mitocondrial

Del mismo modo, un defecto en la ETC causado por la toxicidad del AZT daría lugar a la alteración del potencial de membrana mitocondrial, sin embargo, como se observa en la Figura 7 no hay alteración significativa en las pruebas realizadas en las SH-SY5Y.

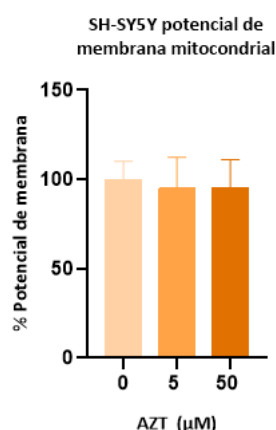


Figura 7. Efecto del ATP sobre el potencial de membrana mitocondrial en SH-SY5Y. Se representan tres condiciones para cada línea celular: control (0 μM), 5 μM y 50 μM.

Tras el análisis de datos correspondientes a los diferentes parámetros que podrían resultar afectados por la toxicidad del fármaco, no se observan diferencias significativas con respecto al

control en la mayoría de los casos. Es apreciable que, en el caso de MEF, la tendencia a la disminución de la viabilidad celular (Figura 4B) y aumento de la producción de ROS (Figura 6B) junto a una significativa menor producción de ATP mitocondrial (Figura 5B) podrían indicar una alteración de la función mitocondrial para este tipo celular.

Varios autores han encontrado alteraciones en los niveles y función de los diferentes complejos de la ETC durante tratamientos más prologados en el tiempo con el fármaco, tanto en cultivos celulares como en modelos animales y pacientes (18–20). Este hecho sugiere que la exposición al fármaco durante 72 h y concentraciones 5 μ M y 50 μ M no compromete significativamente la actividad mitocondrial de las células, pero no afirma la ausencia de alteración de la función OXPHOS por parte del AZT.

5.2 Estudio de la mutagenicidad

5.2.1 Extracción de DNA

Tras el cultivo celular y exposición al fármaco como se indica en el apartado 4.2.5 de materiales y métodos, se extrajo el DNA. Las concentraciones medias de los tres replicados obtenidos en ambas líneas celulares se detallan en la Tabla 8. Los parámetros de calidad $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ se encontraban dentro de los establecidos para considerarse óptima para su posterior uso. En ambos casos, en las muestras tratadas con AZT se observa una tendencia de disminución de la concentración de DNA conforme se aumenta la concentración de fármaco. Para poder confirmar la relación entre la exposición al AZT y la disminución de la cantidad de DNA, sería necesario realizar ensayos más concretos basados en la concentración de DNA nuclear y mitocondrial en referencia a la cantidad de células vivas presentes en la muestra.

En este momento se comenzó a utilizar las muestras de DNA procedentes de cerebro de ratón, la extracción y cuantificación del material genético ya se había realizado con anterioridad.

Tabla 8. Concentración media del DNA de SH-SY5Y y MEF extraído tras el tratamiento.

	Concentración media DNA SH-SY5Y (ng/ μ L)	Concentración media DNA MEF (ng/ μ L)
CONTROL (CT)	238,0	284,5
AZT 5 μ M	201,2	109,6
AZT 50 μ M	144,3	89,2

5.2.2 Amplificación mediante PCR de la región D-loop

- Puesta a punto de la amplificación D-loop en genoma mitocondrial murino

Con el objetivo de poner a punto la PCR del D-loop en el mtDNA de ratón, se llevó a cabo la amplificación por PCR del D-loop del DNA extraído de MEF sin exposición al fármaco (174,8 ng/ μ L, $A_{260/280}$ = 1,98 $A_{260/230}$ = 2,25).

Se probaron tres temperaturas de hibridación (T_m) en función de las T_m de los oligonucleótidos diseñados. Las temperaturas ensayadas fueron 58, 60 y 64 °C. Además, se debe tener en cuenta

que se diseñaron dos cebadores reversos con el objetivo de elegir la combinación con la que se obtuviese una mayor intensidad de banda en el gel de electroforesis.

A mayor temperatura de hibridación, mayor especificidad de reacción dado que las altas temperaturas dificultan la unión entre el cebador y la cadena molde y solo se unirán si existe una complementariedad total, lo que resulta complicado. Por otra parte, si la temperatura es muy baja, encontraremos poca especificidad y por tanto poca hibridación entre la hebra molde y el oligonucleótido y la PCR no podrá llevarse a cabo.

Es por ello que solo se preparó blanco a modo de control a 58 °C. Además, se utilizó una muestra de DNA de una línea celular de Rho⁰, la cual es carente de mtDNA, para comprobar que únicamente se secuenciará el genoma mitocondrial.

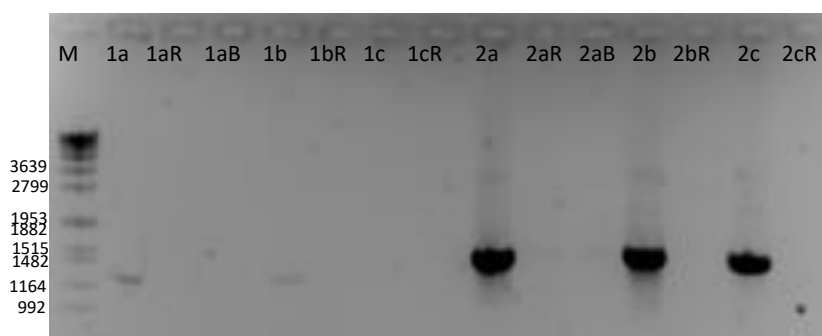


Figura 8. Gel de electroforesis de la puesta a punto de la PCR de la región D-loop en DNA de MEF. Las combinaciones de oligonucleótidos y temperaturas utilizadas se detallan en la figura siendo 1: L15198 + H109, 2: L15198 + H202, a: 58 °C, b: 60 °C y c: 64 °C. M: marcador de pesos moleculares (8 kb). B: Blanco y R: Rho⁰.

Como se observa en la Figura 8 solo resultó exitosa la amplificación con L15198 y H202. Se obtuvo amplificación a las tres temperaturas, por lo tanto, dado que a mayor temperatura, mayor especificidad en la hibridación, se eligió 64 °C como temperatura de hibridación para llevar a cabo la PCR del D-loop del DNA de los fibroblastos y muestras de cerebro de ratón expuestos al AZT.

- Líneas celulares, SH-SY5Y y MEF

Tras correr el gel de electroforesis con los productos de amplificación de la PCR de ambas líneas celulares, los resultados se muestran en las figuras 9 y 10. Se puede observar que en ambos casos no se observan bandas inespecíficas, se ha obtenido amplificado de todas las muestras y que dicha banda se sitúa entre las bandas de 1515 y 1882 kb del marcador de 8 kb siendo el tamaño del amplicón 1643 bp para SH-SY5Y y entre las bandas de 1482 y 1164 kb siendo el tamaño del amplicón 1327 bp para MEF.

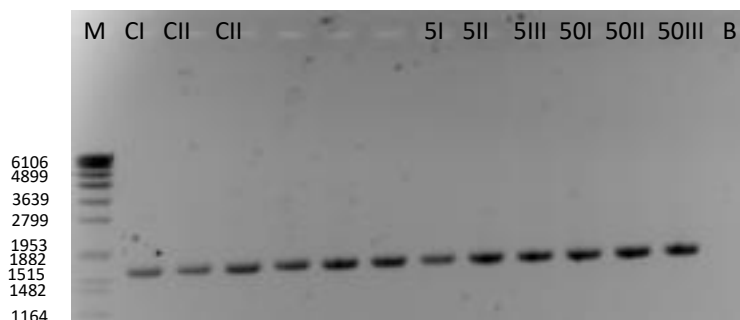


Figura 9. Gel de electroforesis tras la amplificación por PCR del D-loop de SH-SY5Y tras el tratamiento. Se muestran, de izquierda a derecha, el marcador de pesos moleculares de 8 kb (M), así como los controles (CI, CII, CII), AZT 5 μ M (5I, 5II, 5III), AZT 50 μ M (50I, 50II, 50III) y Blanco (B).

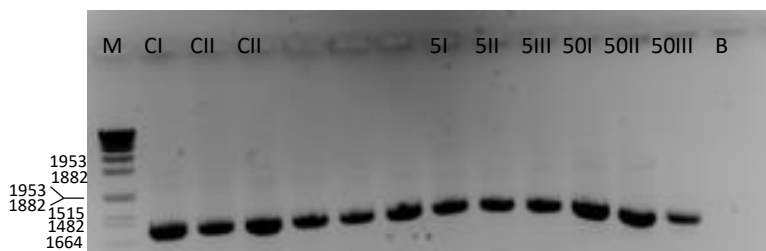


Figura 10. Gel de electroforesis tras la amplificación por PCR del D-loop de MEF tras el tratamiento. Se muestran, de izquierda a derecha, el marcador de pesos moleculares de 8 kb (M), así como los controles (CI, CII, CII), AZT 5 μ M (5I, 5II, 5III), AZT 50 μ M (50I, 50II, 50III) y Blanco (B).

- Muestras de cerebro de ratones expuestos al AZT

El producto de amplificación por PCR de las muestras de DNA de ratón se corrió en un gel de electroforesis y se comprobó que en todas las muestras se había obtenido amplificado y que este tiene el tamaño deseado tal y como se indica en la figura 11.

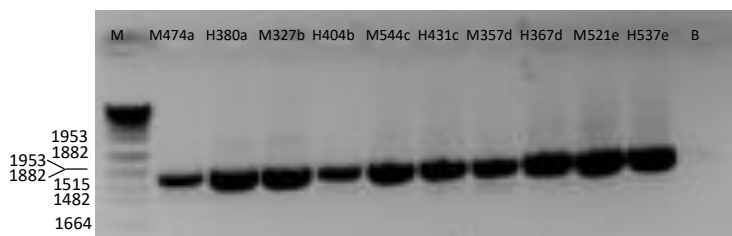


Figura 11. Gel de electroforesis de 10 de las 40 muestras de las que se amplificó por PCR el D-loop a partir de DNA extraído de cerebro de ratón. Se muestra, de izquierda a derecha, el marcador de pesos moleculares de 8 kb (M). El número identificativo de cada muestra comienza con M en el caso de que fuese un macho o por H si era una hembra y termina con a: Vehículo, b: AZT 2,5 μ M, c: AZT 5 μ M, d: Uridina, e: AZT+ Uridina.

5.2.3 Secuenciación

El objetivo de la secuenciación del producto de PCR era la comparación de esta misma con la secuencia consenso depositada en las bases de datos para cada uno de los genomas mitocondriales, humano y de ratón. Así al ensamblar las dos secuencias en Sequencher® aparecen irregularidades, que pueden ser posibles mutaciones, pero que deben ser contrastadas con la señal obtenida en el electroferograma puesto que pueden ser fallos de señal.

- SH-SY5Y

La secuencia consenso utilizada con la cual se compararon las secuencias de cada una de las muestras pertenecía al genoma mitocondrial humano (NC_012920.1,(17)), y no al de la línea celular SH-SY5Y. Tras el análisis, se encontraron dos cambios de base (Figura 13): m.263 A>G (21) y m.16523 T>C. Ambos se encontraron en todas las muestras, tratadas y no tratadas con AZT. Además, en torno a la posición 303 y hasta la 319 se encontró una región poli C (Figura 12) que presentó heteroplasmia de longitud. Esta última puede encontrarse relacionada con el medio de detección utilizado y las diferencias en la secuenciación entre muestras. (22)

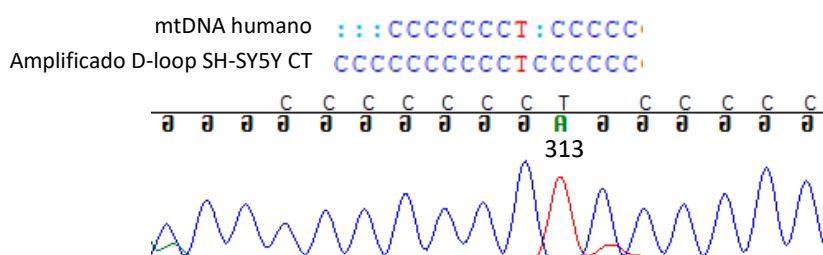


Figura 12. Resultado del análisis de secuencia de la muestra CTI de SH-SY5Y. Se muestra la región poliC comprendida entre los nucleótidos 303 y 319 con heteroplasmia de longitud en el D-loop secuenciado a partir de DNA de SH-SY5Y control (CT), sin exposición al AZT, comparada con la secuencia del mtDNA humano. Código de colores de las bases: Citosina (C): Azul y Timidina (T): rojo.

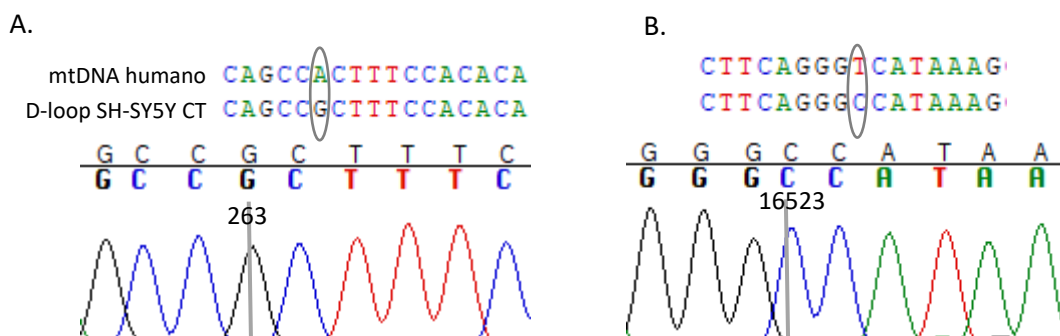


Figura 13. Resultado del análisis de secuencia de la muestra CT de SH-SY5Y. Se muestran dos fragmentos de la comparación entre la secuencia consenso (mtDNA humano) y el D-loop secuenciado de la muestra control (CT). Se detallan las mutaciones m.263 A>G (A) y m.16523 T>C (B). Código de colores de las bases: Citosina (C): Azul, Timina (T): rojo, Guanina (G): Negro, Adenina (A): verde.

- MEF

Para este tipo celular, al llevar a cabo el estudio de las mutaciones por comparación de secuencia se encontró una mutación común a todas las muestras por lo que no se relaciona con la toxicidad del AZT, sino como una mutación presente en la línea celular utilizada. Se trata de m.15951delG (Figura 14).

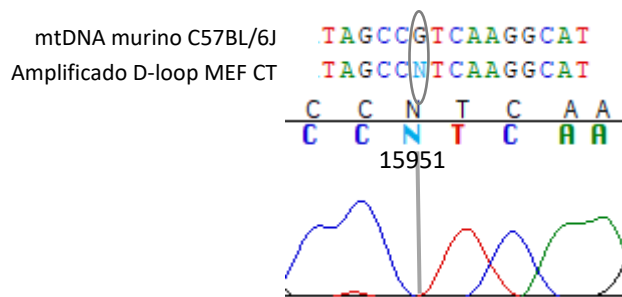


Figura 14. Resultado del análisis de secuencia de la muestra CT de MEF. Se muestra un fragmento de la comparación de secuencia entre la secuencia consenso (mtDNA murino C57BL/6J) y el D-loop secuenciado de la muestra CT. Se detalla m.15951delG.

- Muestras procedentes de cerebro de ratón

En el análisis de mutaciones tras la exposición prenatal al AZT de los ratones no se han encontrado alteraciones, al igual que no han encontrado otros autores mutaciones puntuales tras el estudio del efecto a largo plazo de diversos NRTIs sobre neuronas corticales de ratones, entre los que se encontraba el AZT. (23)

Dichos resultados que indican que el AZT es seguro a largo plazo se complementan con los estudios que se están realizando en el laboratorio para este mismo fármaco en los cuales tampoco se ve ningún efecto negativo.

En algunas de las muestras no se ha llegado a obtener una señal de secuenciación óptima que permita comparar toda la longitud del D-loop con la secuencia consenso. Queda pendiente como trabajo futuro el diseño de nuevos oligonucleótidos de secuenciación o volver a secuenciar los productos de PCR de dichas muestras.

6. CONCLUSIONES

- Se consiguió establecer las condiciones adecuadas y oligonucleótidos a utilizar para la amplificación del D-loop en DNA murino mediante la puesta a punto de la PCR en MEF.
- Se determinó que el tratamiento de las células con AZT durante 72 h a 5 μ M y 50 μ M, tras el análisis de la función mitocondrial, no provoca alteraciones significativas de la función mitocondrial en la mayoría de los casos. Esto da indicios de que una exposición prenatal al fármaco sería segura para el individuo en las concentraciones estudiadas.
- No se encontraron mutaciones en el D-loop relacionadas con la exposición al AZT a ninguna de las dos concentraciones ensayadas de las células (SH-SY5Y y MEF), ni de las muestras de cerebro de ratón. Sin embargo, y dada la longitud del genoma mitocondrial, sería interesante estudiar la mutagenicidad en el genoma mitocondrial entero para comprobar si alguna de las mutaciones que causa en la región codificante da lugar a un fallo que resulta en una patología. Además, sería interesante diseñar otros ensayos de tratamiento con el fármaco donde se estudiaran otro tipo de parámetros mitocondriales tales como el número de copias de mtDNA o aspectos epigenéticos.

Cabe destacar, que nos hemos centrado únicamente en el análisis de mutagenicidad en las células vivas adheridas al pocillo tras la exposición al AZT, pero se debería tener en cuenta que cuando se realizan cambios de medio durante el tratamiento, se descartan las células no viables que quedan en suspensión. Estas últimas podrían haber alcanzado un nivel tan alto de mutaciones que provocase fallos en el metabolismo celular que comprometiesen su viabilidad y sería importante analizarlas.

CONCLUSIONS

- It was possible to establish the suitable conditions and primers used in D-loop amplification of murine samples by PCR fine-tuning in MEF.
- AZT did not result toxic to cells exposed to 5 μ M and 50 μ M during 72 h. After the mitochondrial function analysis, there was not significative evidence of alterations.
- Mutations in D-loop region related to AZT exposition were not found at either concentration in cell lines (SH-SY5Y and MEF) and murine brain samples. Nevertheless, mtDNA has many other regions that would be interesting to study in order to know if there are any mutations that results in pathological states. Moreover, it would be interesting to deepen other mitochondrial aspects such as the number of mtDNA copies or epigenetics.

It is worth noting that we have only analyzed the mutagenicity caused in live cells attached to the well after AZT exposure. It should be taken into account that non-viable cells are discarded during medium changes along the treatment and they could have acquired mutaition.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bayona-Bafaluy MP, Garrido-Pérez N, Meade P, Iglesias E, Jiménez-Salvador I, Montoya J, et al. Down syndrome is an oxidative phosphorylation disorder. *Redox Biol.* **2021**;41.
2. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. Vol. 592, *FEBS Letters.* **2018.** p. 692–702.
3. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. **2019**;1:1–15.
4. Bacman SR, Williams SL, Moraes CT. Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **2009**;37(13):4218–26.
5. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol* [Internet]. **2014**;2(1):619–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.03.006>
6. Chinnery PF. Primary Mitochondrial Disorders Overview 1 . Clinical Characteristics of Mitochondrial Disorders. *GeneReviews®.* **2021**;1–16.
7. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* **2016**;139:318–24.
8. Lashuel HA. Do Lewy bodies contain alpha-synuclein fibrils? and Does it matter? A brief history and critical analysis of recent reports. *Neurobiol Dis* [Internet]. **2020**;141(March):104876. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104876>
9. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology.* **1993**;14(1):83–144.
10. Cheng A, Hou Y, Mattson MP. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro.* **2010**;2(5):243–56.
11. Wang H, Lemire BD, Cass CE, Weiner JH, Michalak M, Penn AMW, et al. Zidovudine and dideoxynucleosides deplete wild-type mitochondrial DNA levels and increase deleted mitochondrial DNA levels in cultured Kearns-Sayre syndrome fibroblasts. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* **1996**;1316(1):51–9.
12. Iglesias E, Bayona-bafaluy MP, Pesini A, Garrido-p N, Ruiz-pesini E. cells Xenobiotics on Dopaminergic Neuronal. **2019**;1–20.
13. Torres SM, Walker DM, McCash CL, Carter MM, Ming J, Cordova EM, et al. Mutational analysis of the mitochondrial tRNA genes and flanking regions in umbilical cord tissue from uninfected infants receiving AZT-based therapies for prophylaxis of HIV-1. *Environ Mol Mutagen.* **2009**;50(1):10–26.
14. Blanche S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret B, Firtion G. Early report Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. **1999**;354:1084–9.
15. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* [Internet]. **2017**;12(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>

16. Gaven F, Marin P, Claeysen S. Primary culture of mouse dopaminergic neurons. *J Vis Exp*. **2014**;(91):1–11.
17. @ www.ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
Revisado el día 20/06/2022
18. Petit C, Piétri-Rouxel F, Lesne A, Leste-Lasserre T, Mathez D, Naviaux RK, et al. Oxygen consumption by cultured human cells is impaired by a nucleoside analogue cocktail that inhibits mitochondrial DNA synthesis. *Mitochondrion*. **2005**;5(3):154–61.
19. Ziobrowski, Hannah N., Sonnevile, Kendrin R. Eddy, Kamryn T., Crosby, Ross D., Micali, Nadia, Horton, Nicholas J., Field AE. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *J Adolesc Heal*. **2019**;65(4):139–48.
20. Pereira LF, Oliveira MBM, Carnieri EGS. Mitochondrial sensitivity to AZT. *Cell Biochem Funct*. **1998**;16(3):173–81.
21. Bassi MA, Lopez MA, Confalone L, Gaudio RM, Lombardo L, Lauritano D. 干旱与氮素的关系Enhanced Reader.pdf. Vol. 388, *Nature*. **2020**. p. 539–47.
22. Howell N, Smejkal CB. Persistent heteroplasmy of a mutation in the human mtDNA control region: Hypermutation as an apparent consequence of simple-repeat expansion/contraction. *Am J Hum Genet*. **2000**;66(5):1589–98.
23. Zhang Y, Wang B, Liang Q, Qiao L, Xu B, Zhang H, et al. Mitochondrial DNA D-loop AG/TC transition mutation in cortical neurons of mice after long-term exposure to nucleoside analogues. *J Neurovirol*. **2015**;21(5):500–7.