

Irene Jiménez Salvador

La exposición prenatal a la terapia
antirretroviral contra el HIV como
factor de riesgo en el desarrollo de
la Enfermedad de Parkinson:
Mitocondria y diferenciación
neuronal

Director/es

Ruiz Pesini, Eduardo
Iglesias Huerta, Eldris Alejandra

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

LA EXPOSICIÓN PRENATAL A LA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL CONTRA EL HIV COMO
FACTOR DE RIESGO EN EL DESARROLLO DE LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON: MITOCONDRIA Y
DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Autor

Irene Jiménez Salvador

Director/es

Ruiz Pesini, Eduardo
Iglesias Huerta, Eldris Alejandra

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2025



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**La exposición prenatal a la terapia
antirretroviral contra el HIV como factor
de riesgo en el desarrollo de la
Enfermedad de Parkinson:
Mitocondria y diferenciación neuronal**

Autora

Irene Jiménez Salvador

Directores

Eldris Alejandra Iglesias Huerta
Eduardo Ruiz Pesini

Facultad de Veterinaria
2024



**Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular**
Universidad Zaragoza

Dña. ELDRIS ALEJANDRA IGLESIAS HUERTA, Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad San Jorge,

y

D. EDUARDO RUIZ PESINI, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que **Dña. Irene Jiménez Salvador** ha realizado la Tesis Doctoral que lleva por título “La exposición prenatal a la terapia antirretroviral contra el HIV como factor de riesgo en el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson: Mitocondria y diferenciación neuronal” en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección y tutela, y que ésta se ajusta al plan de investigación y reúne, a su juicio, las condiciones para optar al grado de doctor.

Zaragoza, diciembre de 2024

Fdo.: Eldris Alejandra Iglesias Huerta

Fdo.: Eduardo Ruiz Pesini



Este trabajo ha sido realizado con un contrato de personal investigador predoctoral en formación para el periodo 2019-2023 del Gobierno de Aragón, así como con un contrato de investigadora de la Universidad de Zaragoza asociado a un proyecto de investigación financiado por Chiesi España S.A.U. Este trabajo ha sido financiado por las subvenciones del Instituto de Salud Carlos III (PI17/00166, PI21/00229) y del Gobierno de Aragón (Grupos Consolidados B33, LMP135_18, LMP22_21).

Durante la realización de esta tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos científicos:

Jiménez-Salvador I, Meade P, Iglesias E, Bayona-Bafaluy P, Ruiz-Pesini E. Developmental origins of Parkinson disease: Improving the rodent models. *Ageing Res Rev.* 2023;86.

Bayona-Bafaluy MP, Garrido-Pérez N, Meade P, Iglesias E, Jiménez-Salvador I, Montoya J, Martínez-Cué C, Ruiz-Pesini E. Down syndrome is an oxidative phosphorylation disorder. *Redox Biol.* 2021;41.

Pesini A, Iglesias E, Bayona-Bafaluy MP, Garrido-Pérez N, Meade P, Gaudó P, Jiménez-Salvador I, Andrés-Benito P, Montoya J, Ferrer I, Pesini P, Ruiz-Pesini E. Brain pyrimidine nucleotide synthesis and Alzheimer disease. *Aging.* 2019;11(19):8433–62.

Iglesias E, Bayona-Bafaluy MP, Pesini A, Garrido-Pérez N, Meade P, Gaudó P, Jiménez-Salvador I, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Uridine prevents negative effects of OXPHOS xenobiotics on dopaminergic neuronal differentiation. *Cells.* 2019;8(11).

A mi núcleo

AGRADECIMIENTOS

Desde mi llegada al laboratorio, he tenido el placer de compartir mi experiencia con muchas personas que han puesto todo de su lado para ayudarme en esta andadura que es el doctorado. Gracias a ellos he crecido tanto personal como profesionalmente.

En primer lugar, quería agradecer a mis directores, Eldris y Eduardo, su esfuerzo por trasmitirme sabiduría, ganas, pasión y curiosidad por la ciencia y la investigación. A Julio, por acogerme y permitirme formar parte de este gran grupo.

A mis compañeras de laboratorio, Alba, Ana, Carmen, Ester, Mouna y Sonia. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por vuestros consejos, por compartir vuestro conocimiento y por vuestra ayuda. Ha sido un placer recorrer parte de mi camino junto a vosotras, entre sufrimientos y alegrías, pero siempre intentando ver el lado positivo y arrancando sonrisas. No todo el mundo tiene la suerte de encontrar compañeras así, que terminan convirtiéndose en amigas. Sois geniales y valéis millones. A David y los compis de ciencias, Javier, Nuria, Patricia, Paula y Pilar, gracias por estar dispuestos a ayudar y siempre sumar con vuestra mejor actitud. A Cris, Isabel, Javi, Luis y Tania, sin vuestra compañía los momentos de desconexión en el laboratorio no hubieran sido lo mismo. Por nuestras charletas sin fin. Ojalá poder seguir compartiendo momentos con todos vosotros, aunque ya no sea tan a menudo. A las nuevas incorporaciones, a Santi y al resto de compañeros de departamento, gracias por transmitir buen rollo y tender la mano siempre que es necesario.

Y gracias a mi familia por todo lo que han tenido que aguantar, días buenos y no tan buenos, penas y alegrías, quebraderos de cabeza, pero sobre todo gracias por recordarme que todo esfuerzo tiene su recompensa. A mis amigas por ser mi segunda familia, un refugio donde siempre acudir. A Diego, el más sufridor de esta tesis, por su paciencia, por su confianza incondicional en mí y en mi trabajo, por ser mi fiel seguidor, y por compartir conmigo estos años y los que vendrán.

Muchísimas gracias a todos

Irene

ABREVIATURAS

AIDS: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

ART: terapia antirretroviral combinada

ASCL1: factor de transcripción bHLH 1 de la familia achaete-scute

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: adenosín trifosfato

ATV: atazanavir

AZT: azidotimidina o zidovudina

bACT: β -actina

bFGF: factor de crecimiento de los fibroblastos-básico

BSA: albúmina sérica bovina

cDNA: DNA complementario

CHR: cromosoma

CI: complejo I o NADH:ubiquinona oxidoreductasa

CII: complejo II o succinato:ubiquinona oxidoreductasa

CIII: complejo III o ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa

CIV: complejo IV o citocromo c oxidasa

CS: citrato sintasa

CV: complejo V o ATP sintasa

DAT: transportador de dopamina

DCX: doblecortina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOHaD: hipótesis de los Orígenes en el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad

DPBS: *Dulbecco's PBS*

DTNB: ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EN1: factor de transcripción *engrailed homeobox 1*

EN2: factor de transcripción *engrailed homeobox 2*

ETC: cadena de transporte de electrones

FADH₂: dinucleótido de flavina y adenina reducido

FBS: suero fetal bovino

FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

GAP43: proteína 43 asociada al crecimiento

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

H: cadena pesada del DNA mitocondrial

HIV: virus de inmunodeficiencia humana

hNSC: célula madre neural humana

hiPSC: célula madre pluripotente inducida humana

IBM: membrana límite interna

IMM: membrana mitocondrial interna

IMS: espacio intermembrana

INI: inhibidor de integrasa

INSTI: inhibidor de la transferencia de la cadena de la integrasa

iPSC: célula madre pluripotente inducida

KCN: cianuro de potasio

L: cadena ligera del DNA mitocondrial

LMX1B: factor de transcripción *homeobox LIM 1β*

LRRK2: *leucine rich repeat kinase 2*

MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2

MMP: potencial de membrana mitocondrial

MPPP: 1-metil-4-fenil-4-propionoxi-piperidina

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridinio

mRNA: RNA mensajero

MT-ATP6: subunidad 6 de la ATP sintasa

MT-ATP8: subunidad 8 de la ATP sintasa

MT-CO1/COX1: subunidad 1 del complejo IV

MT-CO2: subunidad 2 del complejo IV

MT-CO3: subunidad 3 del complejo IV

MT-CYB: citocromo b o subunidad 3 del complejo III

MT-ND1: subunidad 1 del complejo I

MT-ND2: subunidad 2 del complejo I

MT-ND3: subunidad 3 del complejo I

MT-ND4: subunidad 4 del complejo I

MT-ND4L: subunidad 4L del complejo I

MT-ND5: subunidad 5 del complejo I

MT-ND6: subunidad 6 del complejo I

MT-RNR1: rRNA 12S mitocondrial

mtDNA: DNA mitocondrial

MTERF: factor de terminación de la transcripción mitocondrial

mtSSB: proteínas mitocondriales de unión a DNA monocatenario

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

NCAM: molécula de adhesión celular neural

NCR: región no codificante

nDNA: genoma nuclear

NDUFA9: subunidad A9 del complejo I

NDUFB8: subunidad B8 del complejo I

NES: nestina

NEUROG2: neurogenina 2

NPTX2: pentraxina neuronal 2

NPTXR: receptor neuronal de pentraxina

Nr4a2: receptor nuclear subfamilia 4 grupo A miembro 2

NRTI: nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa

NSC: célula madre neural

NSE: enolasa específica neuronal

OMM: membrana mitocondrial externa

OXPHOS: fosforilación oxidativa

PAX5: factor de transcripción *paired box 5*

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD: Enfermedad de Parkinson

PEBP1: proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1

PI: inhibidor de proteasa

PINK1: *PTEN-induced kinase 1*

POLG: DNA polimerasa gamma

POLRMT: RNA polimerasa mitocondrial

PRKN: parkina

PSA: ácido polisiálico

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RAL: raltegravir

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especies reactivas de oxígeno

rRNA: RNA ribosómico

SDHA: subunidad A del complejo II

SDS: dodecil sulfato de sodio

SN: *substantia nigra*

SNCA: α -sinucleína

SNCG: γ -sinucleína

STR: *short tandem repeat*

SV2A: glucoproteína de vesícula sináptica

SYN1: sinapsina 1

SYP: sinaptofisina

TEFM: factor de elongación de la transcripción mitocondrial

TFAM: factor de transcripción mitocondrial A

TFB2M: factor de transcripción mitocondrial B2

TH: tirosina hidroxilasa

tRNA: RNA de transferencia

TUBB3: β III-tubulina

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson idiopática, considerado el segundo trastorno neurodegenerativo más común, se trata de una enfermedad multifactorial asociada a la edad. La neuropatología incluye la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, produciendo un déficit de dopamina que causa los síntomas motores de la enfermedad. La hipótesis de los Orígenes en el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad sugiere que la exposición a determinados factores ambientales durante etapas tempranas del desarrollo actúa como factor de riesgo para padecer enfermedades en la vejez. En base a ello, la exposición a tóxicos mitocondriales durante la neurogénesis dopaminérgica podría predisponer al desarrollo de la enfermedad de Parkinson, dada la importancia de la mitocondria en el establecimiento de circuitos neuronales. La toxicidad mitocondrial se ha establecido como uno de los efectos secundarios derivados de los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa, empleados en la terapia antirretroviral combinada administrada a pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana. Dicha terapia se recomienda pautar durante el embarazo para evitar la transmisión vertical del virus, de modo que los fetos están expuestos durante el desarrollo cerebral.

Con el objetivo de evaluar los efectos de esta clase de fármacos sobre la neurogénesis, se administró el antirretroviral azidotimidina durante la diferenciación neuronal a dos modelos celulares. Asimismo, para determinar posibles consecuencias de la exposición prenatal en la vejez, se administraron dosis farmacológicas a ratones hembra gestantes durante el periodo de neurogénesis dopaminérgica, estudiando sus efectos en la descendencia envejecida.

El tratamiento con la azidotimidina durante la diferenciación a neurona madura conduce a alteraciones en la homeóstasis mitocondrial, tanto en la línea celular SH-SY5Y como en las células madre neurales, produciendo un deterioro en el funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa. Como consecuencia de la disfunción mitocondrial, las neuronas obtenidas tras la diferenciación en presencia del fármaco muestran defectos morfológicos junto con una reducción de múltiples marcadores neuronales, incluidos varios de neurona dopaminérgica. Los ratones envejecidos expuestos prenatalmente a azidotimidina muestran una reducción de la actividad del complejo IV del sistema de fosforilación oxidativa en el tejido cerebral, así como una caída en los niveles del neurotransmisor dopamina que podría ser la causa del deterioro de la fuerza muscular observado en las pruebas conductuales.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. La enfermedad de Parkinson.....	3
I.1.1. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson	3
I.1.2. Aspectos clínicos de la enfermedad de Parkinson.....	3
I.1.3. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.....	5
I.2. La mitocondria.....	9
I.2.1. El DNA mitocondrial.....	10
I.2.2. Replicación, transcripción y traducción mitocondrial.....	12
I.2.3. El sistema de fosforilación oxidativa.....	14
I.3. La disfunción mitocondrial en la enfermedad de Parkinson	15
I.4. Xenobióticos OXPPOS y la enfermedad de Parkinson	18
I.5. La enfermedad de Parkinson, la neurogénesis y el sistema de fosforilación oxidativa	19
I.5.1. Orígenes en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.....	19
I.5.2. OXPPOS y neurogénesis del desarrollo	20
I.5.3. Xenobióticos OXPPOS y neurotoxicidad del desarrollo.....	21
I.6. La terapia antirretroviral	22
I.6.1. Contribución de la terapia antirretroviral a los trastornos neurodegenerativos.....	23
I.6.2. Tratamiento antirretroviral perinatal	24
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
II.1. Hipótesis	29
II.2. Objetivos.....	30
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
III.1. Caracterización de los modelos celulares.....	35
III.1.1. Caracterización genética.....	35
III.1.2. Diferenciación a neurona madura	36
III.2. Efecto de la azidotimidina sobre la diferenciación neuronal en el modelo de neuroblastoma humano SH-SY5Y	40
III.2.1. Parámetros funcionales de la mitocondria.....	40
III.2.2. Estudio de la diferenciación neuronal	41

III.3.	Efecto de la azidotimidina sobre la diferenciación neuronal en el modelo de células madre neurales.....	43
III.3.1.	Parámetros bioquímicos y funcionales de la mitocondria.....	44
III.3.2.	Estudio de la morfología neuronal.....	51
III.3.3.	Marcadores de diferenciación neuronal.....	54
III.4.	Efecto de la exposición prenatal a azidotimidina en ratones envejecidos.....	59
	Efecto del envejecimiento sobre el comportamiento funcional del ratón C57BL/6J .	60
III.4.1.	Pruebas conductuales.....	62
III.4.2.	Parámetros bioquímicos de la mitocondria.....	64
III.4.3.	Estudio de factores genéticos como posible nexo entre la exposición prenatal y sus efectos en la vejez	67
III.4.4.	Estudio de la vía dopaminérgica	68
IV.	CONCLUSIONES.....	77
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
V.1.	Líneas celulares y material biológico.....	81
V.2.	Cultivos celulares.....	81
V.2.1.	Materiales y equipos de cultivo celular	81
V.2.2.	Mantenimiento de cultivos celulares	81
V.2.3.	Congelación y descongelación de células	82
V.2.4.	Recuento celular	83
V.2.5.	Análisis de contaminación con <i>Mycoplasma spp.</i>	83
V.2.6.	Purificación de la línea de células madre neurales por el método de separación celular magnética	83
V.2.7.	Diferenciación a neurona madura	84
	Diferenciación a neurona de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y	84
	Diferenciación a neurona de células madre neurales.....	84
V.2.7.1.	Tratamientos con drogas	85
V.2.8.	Estudio de la diferenciación neural mediante el sistema Incucyte	85
V.2.9.	Inmunofluorescencia de cultivos celulares.....	85
V.3.	Modelo animal.....	86
V.3.1.	Pruebas conductuales.....	87
V.3.1.1.	Prueba de campo abierto.....	87
V.3.1.2.	Prueba de rejilla invertida	88
V.3.1.3.	Prueba de suspensión de alambre	88

V.3.1.4.	Prueba de pesas	88
V.3.1.5.	Evaluación de la hiposmia	88
V.4.	Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos	89
V.4.1.	Aislamiento de DNA total a partir de muestras biológicas o cultivos celulares	89
V.4.2.	Aislamiento de RNA total a partir de muestras biológicas o cultivos celulares	89
V.4.3.	Retrotranscripción de RNA total.....	89
V.4.4.	Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría.....	90
V.4.5.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	90
V.4.5.1.	Amplificación del mtDNA completo (PCR larga)	90
V.4.5.2.	Amplificación de la región control del mtDNA para su secuenciación	91
V.4.6.	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	92
V.4.7.	Secuenciación de la región control del mtDNA	93
V.4.8.	Determinación de la metilación global del DNA	93
V.4.9.	Determinación del número de copias de mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real a partir de DNA.....	94
V.4.10.	Determinación de los niveles de expresión de transcritos de mRNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real	96
V.4.11.	Preparación de muestras de RNA para análisis por RNA-seq	98
V.5.	Extracción, manipulación y análisis de proteínas.....	98
V.5.1.	Extracción de proteínas	98
V.5.1.1.	Extracción de proteínas a partir de muestras biológicas o cultivos celulares para Western blot	98
V.5.1.2.	Extracción de proteínas a partir de muestras biológicas o cultivos celulares para determinación de actividad enzimática y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).....	99
V.5.2.	Determinación de la cantidad de proteína total mediante el método de Bradford	99
V.5.3.	Método para el análisis de proteínas por Western blot	100
V.5.3.1.	Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	100
V.5.3.2.	Transferencia a membranas fluoruro de polivinilideno (PVDF) desde geles desnaturizantes de poliacrilamida	100
V.5.3.3.	Inmunodetección de proteínas en membranas PVDF	100
V.5.4.	Ensayos de actividad enzimática	101

V.5.4.1.	Determinación de la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria.....	101
V.5.4.2.	Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa.....	102
V.5.5.	Ensayos ELISA.....	103
V.5.5.1.	Determinación de los niveles de transportador de dopamina	103
V.5.5.2.	Determinación de los niveles del neurotransmisor dopamina	103
V.6.	Estudios funcionales del sistema OXPHOS	104
V.6.1.	Consumo de oxígeno en células intactas	104
V.6.2.	Determinación de niveles de ATP mitocondrial.....	104
V.7.	Análisis histológico de tejido cerebral de ratón	105
V.7.1.	Preparación del tejido cerebral	105
V.7.2.	Inmunohistoquímica de la tirosina hidroxilasa	105
V.8.	Análisis estadístico.....	105
VI.	BIBLIOGRAFÍA	111
	ANEXOS.....	139
	Anexo 1. Resultados obtenidos de otras clases de fármacos administrados en la terapia antirretroviral combinados con NRTI	139
	Anexo 2. Niveles de mRNA de las subunidades mitocondriales de los complejos del sistema OXPHOS analizados por RNA-seq en el modelo de células madre neurales	142
	Anexo 3. Niveles de mRNA de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo implicadas en la replicación, la transcripción y la traducción mitocondrial, y el procesamiento y la degradación de RNA y proteínas de la mitocondria analizados por RNA-seq en el modelo de células madre neurales	144
	Anexo 4. Pie de figura III. 19.....	147

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La enfermedad de Parkinson

I.1.1. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (PD) idiopática, el segundo trastorno neurodegenerativo más común, afecta al sistema nervioso central de manera crónica y progresiva, siendo la forma más frecuente de parkinsonismo. Se considera una enfermedad esporádica multifactorial asociada a la edad, aunque en el 5-10 % de los casos la PD se debe a alteraciones genéticas concretas que, en ocasiones, se asocian a una manifestación más temprana de la enfermedad (1–3).

Las estimaciones de incidencia anual de la PD varían desde menos de 10 a más de 20 casos nuevos por 100 000 individuos. Respecto a la prevalencia global, se estima entre 100 y 300 enfermos por cada 100 000. La PD afecta principalmente a las personas en los últimos años de su vida. En consecuencia, se trata de una enfermedad rara antes de los 50 años, pero la incidencia aumenta notablemente de 5 a 10 veces desde la sexta a la novena década de vida, alcanzando un pico entre los 70-79 años. Asimismo, la prevalencia se incrementa hasta más del 3 % en los grupos de mayor edad. Estas diferencias pueden deberse a factores ambientales o genéticos, reflejando la variedad demográfica de las poblaciones estudiadas, o a los métodos de estudio (3–5). Actualmente, cada año se diagnostican unos 10 000 casos nuevos de esta enfermedad en España, y se estima que 150 000 personas están afectadas por PD. En torno al 70 % de las personas diagnosticadas de PD en nuestro país tienen más de 65 años (6,7).

En la actualidad, el aumento de la esperanza de vida y, consecuentemente, el progresivo envejecimiento de la población traen consigo un incremento de las enfermedades neurodegenerativas. Además, los avances en el diagnóstico y las terapias han conducido a una mayor supervivencia. Como resultado, la PD se está convirtiendo en una enfermedad de proporciones epidémicas. En España, la mayoría de los expertos consideran que la prevalencia de la PD aumentará para 2030, de acuerdo con las estimaciones publicadas en 2005, que predecían que el número de individuos con PD se duplicaría para 2030 (8). Dicha enfermedad supone una carga tanto social como económica para la sociedad. Se estima que el gasto anual de un paciente de PD en España alcanza los 17 000 euros (9). El coste de la PD en Europa se acerca a los 11 billones de euros anuales (6).

I.1.2. Aspectos clínicos de la enfermedad de Parkinson

La PD se caracteriza por la bradicinesia, definida como la lentitud en los movimientos voluntarios con una reducción progresiva de la velocidad de estos, y otros síntomas motores como la rigidez muscular, el temblor en reposo o la inestabilidad postural. En la mayoría de

Introducción

los casos, el inicio de los síntomas motores suele ser unilateral, pudiendo mantenerse dicha asimetría durante el progreso de la enfermedad (2,5,10).

Además de las características motoras cardinales, existen multitud de síntomas no motores que cursan a lo largo de la enfermedad en la mayoría de los pacientes de PD. Estos incluyen trastornos neuropsiquiátricos, como demencia, depresión, ansiedad, apatía o alucinosis; afecciones del sistema autónomo, como hipotensión ortostática, hiperhidrosis o disfunción urogenital; disfunción del sueño, como trastornos del sueño REM, somnolencia diurna o alteraciones del ritmo circadiano; síntomas gastrointestinales, como disfgia, sialorrea o estreñimiento; síntomas sensoriales, principalmente disfunción olfatoria; y dolor. En muchos casos, los signos motores suelen ir precedidos de la aparición de alguno de los síntomas no motores. Las afecciones no motoras suelen ser más frecuentes con el avance de la enfermedad, siendo determinantes en la calidad de vida y la progresión de la discapacidad (2,5,10) (Figura I.1).

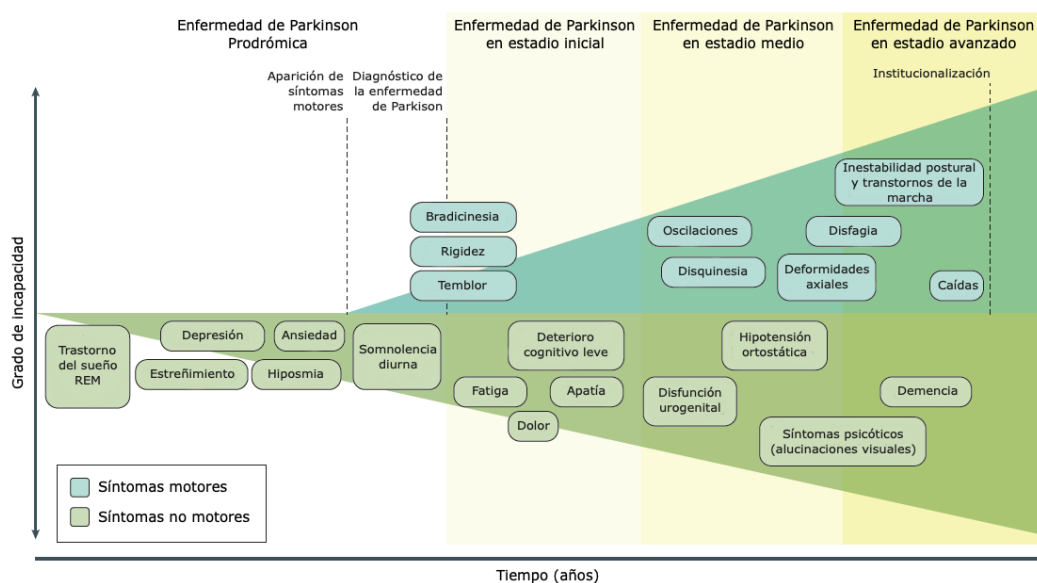


Figura I.1. Síntomas clínicos asociados a la progresión de la enfermedad de Parkinson. El diagnóstico de la enfermedad de Parkinson se produce con la aparición de síntomas motores (Enfermedad de Parkinson en estadio inicial), normalmente a finales de la cincuentena, pero puede ir precedido de una fase prodrómica de años o incluso décadas, que se caracteriza por síntomas no motores específicos (Enfermedad de Parkinson prodrómica). Los síntomas no motores se hacen cada vez más prevalentes y evidentes, pero pueden estar presentes en un grado variable a lo largo de todas las fases de la enfermedad. La discapacidad progresiva de la enfermedad de Parkinson se debe a la combinación de estos problemas no motores con el aumento de la gravedad de los rasgos motores cardinales, el desarrollo de complicaciones motoras inducidas por la L-DOPA (Enfermedad de Parkinson en estadio medio) y la evolución de discapacidades motoras que responden mal al tratamiento con L-DOPA, como la inestabilidad postural, los problemas de la marcha y la disfgia (Enfermedad de Parkinson en estadio avanzado). Adaptada de (5)

A pesar de la importancia del diagnóstico para el pronóstico, el tratamiento y la investigación, este sigue siendo en gran medida clínico, ya que se determina principalmente por la presencia de bradicinesia, característica más significativa en enfermos de PD, junto con la rigidez o el temblor. El diagnóstico en la PD supone un gran reto puesto que las características clínicas pueden solaparse con manifestaciones de otras enfermedades neurodegenerativas. Como resultado, las tasas de error del diagnóstico suelen ser elevadas a principios de la enfermedad (2,5,11).

Actualmente, la terapia se centra en la sustitución farmacológica de dopamina con L-DOPA (levodopa), cuyo defecto provoca las características motoras fundamentales de la enfermedad, además de tratamientos sintomáticos para paliar el resto de los síntomas tanto motores como no motores. Con el trascurso de la enfermedad, el uso crónico de la mayoría de los medicamentos empleados para el tratamiento del PD genera una pérdida paulatina de eficacia y la aparición de efectos secundarios indeseables (2,5,10,12).

I.1.3. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La neuropatología de la PD incluye la pérdida de neuronas dopaminérgicas en áreas específicas de la *substantia nigra* (SN), causa principal de los síntomas motores de la enfermedad, así como la acumulación de inclusiones intracelulares conocidas como cuerpos de Lewy. A pesar de ser rasgos característicos en la mayoría de los enfermos de Parkinson, ninguno de los dos eventos es exclusivo de dicha enfermedad. La muerte de neuronas dopaminérgicas también se encuentra en otras condiciones neurodegenerativas parkinsonianas, aunque el patrón de pérdida de tales neuronas en la SN es diferente. Igualmente, la presencia de cuerpos de Lewy también ocurre en otras enfermedades neurológicas como la demencia por cuerpos de Lewy o la enfermedad de Alzheimer, pero la distribución y la progresión de dichos depósitos difiere entre ellas. No obstante, ambas patologías se consideran específicas de la PD idiopática, siendo claves para su diagnóstico definitivo (1,2,5).

Inicialmente, la pérdida de neuronas dopaminérgicas, concretamente de la SN pars compacta, produce un déficit de dopamina que se resuelve por mecanismos compensatorios. En el momento del diagnóstico de la PD, normalmente como consecuencia de la manifestación de los síntomas motores de la enfermedad, la mayoría de los enfermos ha alcanzado al menos el 50 % de muerte neuronal dopaminérgica (2,13,14). La degeneración de las neuronas dopaminérgicas se produce de un modo heterogéneo, ya que algunas áreas están considerablemente afectadas en etapas tempranas, mientras que otras se encuentran funcionales hasta fases tardías de la enfermedad (Figura I.2a-d). En este contexto, la SN se consideraría la región más afectada en la PD, pero también se puede observar neurodegeneración, e incluso muerte, en otras regiones dopaminérgicas del cerebro (área tegmental ventral), los sistemas noradrenérgico (*locus coeruleus*), serotoninérgico (núcleos

Introducción

del rafe) o colinérgico (núcleo pedunculopontino, núcleo motor dorsal del vago, núcleo basal de Meynert) así como en el córtex, el bulbo olfatorio o el sistema nervioso entérico (5,15).

La patología de Lewy se considera un marcador histopatológico clave en la PD. Los cuerpos de Lewy están compuestos en su mayoría por α -sinucleína, aunque se han descrito más de 90 moléculas en su composición, destacando también la presencia de ubiquitina. En determinados procesos patogenéticos, la proteína α -sinucleína presenta cierta tendencia a formar oligómeros o fibrillas creando estos depósitos citoplasmáticos insolubles (Figura 1.2 e-g). En base a la localización de dichas inclusiones, se establecieron seis estadios de la PD que correlacionan la sintomatología con la distribución de los cuerpos de Lewy (Figura 1.2 h) (16), pero solo alrededor de la mitad de los pacientes diagnosticados clínicamente con PD tienen un patrón de cuerpos de Lewy de acuerdo con este modelo (2,14,15). La patología de Lewy se encuentra en varias regiones como el núcleo motor dorsal, el bulbo olfatorio, el rafe, el *locus coeruleus* o el hipotálamo, entre otras (1,5,14,16).

Durante la progresión de la PD, varias regiones del sistema nervioso se encuentran afectadas, ya sea por la presencia de cuerpos de Lewy o por la pérdida de neuronas. La aparición de cuerpos de Lewy en las neuronas no implica que estas finalmente vayan a acabar muriendo. De hecho, existen regiones con dichas inclusiones en las cuales no se produce pérdida neuronal y viceversa, regiones sin cuerpos de Lewy que sufren una importante muerte celular. Hasta el momento, no se puede asegurar que ambos eventos formen parte de un mismo proceso de degeneración, dado que la muerte neuronal sigue un patrón diferente a la patología de Lewy en la PD, aunque tampoco se deben considerar excluyentes entre sí (14,15).

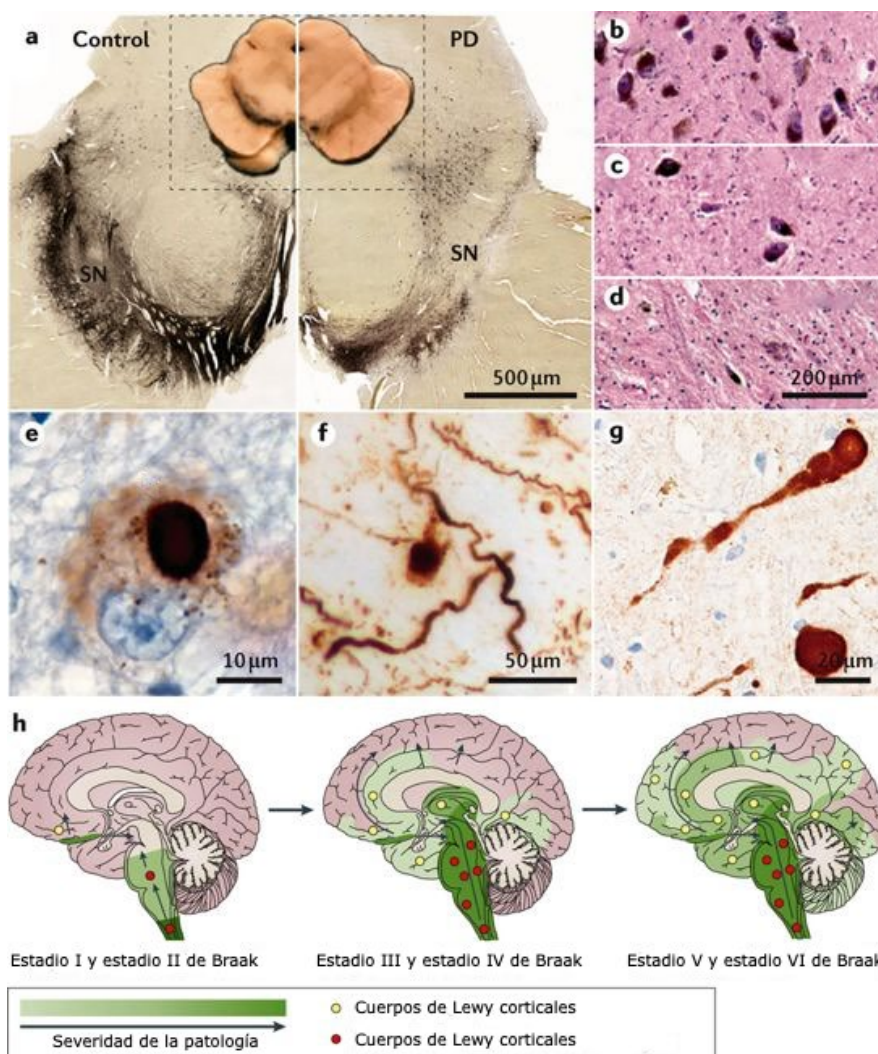


Figura 1.2. Principales neuropatologías diagnósticas de la enfermedad de Parkinson. a) La enfermedad de Parkinson (PD) se define por la despigmentación de la *substantia nigra* (SN) (panel derecho) en comparación con el control (panel izquierdo). Se muestran secciones macroscópicas (recuadro) y transversales del mesencéfalo con tinción inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante de la síntesis de dopamina. La pérdida selectiva de las partes ventrolaterales de la SN con la preservación de las regiones más mediales y dorsales es evidente en la sección histológica. b-d) Tinción de hematoxilina y eosina de la región ventrolateral de la SN que muestra una distribución normal de neuronas pigmentadas en un control sano (b) y una pérdida de células pigmentadas diagnósticamente significativa moderada (c) o severa (d) en la PD. e-g) La tinción inmunohistoquímica de la α -sinucleína muestra los cuerpos de Lewy redondos e intracitoplasmáticos (e), depósitos más difusos y granulares de α -sinucleína (e y f), estructuras extracelulares de α -sinucleína similares a puntos (f) y esferoides de α -sinucleína en los axones (g). h) La progresión teórica de la agregación de α -sinucleína en la PD sin patología de Alzheimer. Las inclusiones de α -sinucleína se producen en las neuronas colinérgicas y monoaminérgicas del tronco cerebral inferior en los casos asintomáticos (estadios I y II de Braak), infiltran neuronas similares en el mesencéfalo y el cerebro anterior basal en los casos con síntomas motores de PD (estadios III y IV de Braak) y, más adelante, se encuentran en las regiones cerebrales límbicas y neocorticales con la progresión de la enfermedad (estadios V y VI de Braak). Adaptada de (5)

Introducción

Existen diferentes hipótesis acerca de los procesos celulares que contribuyen a la neurodegeneración en la PD. El estudio de las formas hereditarias, con mutaciones genéticas implicadas en funciones celulares concretas, han ayudado a profundizar en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad. Tanto la disfunción mitocondrial como el estrés oxidativo parecen ser participantes clave en la patogénesis de la enfermedad. Asimismo, desajustes en el sistema ubiquitina-proteasoma o el sistema de autofagia lisosomal conducirían a fallos en la homeostasis intracelular. Como consecuencia, se genera un entorno inadecuado que conllevaría un mal funcionamiento celular y promovería una mayor acumulación de α -sinucleína. Parece que todos estos procesos crearían un círculo vicioso donde el efecto de cada evento exacerbaría el deterioro del resto, en algunos casos, suponiendo la muerte neuronal (2,5,13,17,18).

El hecho de que algunos conjuntos concretos de neuronas sean más susceptibles que otros a sufrir muerte neuronal, o presenten una mayor alteración en su funcionalidad, sigue siendo una gran incógnita en la PD. Para dar una posible explicación a la vulnerabilidad selectiva presente en la enfermedad, se han estudiado diferentes hipótesis basadas en características fenotípicas compartidas, centrándose en las neuronas dopaminérgicas de la SN, dado que se trata de la región con mayor pérdida neuronal. En primer lugar, los trastornos neurodegenerativos tienden a afectar neuronas con una gran arborización axonal poco o nada mielinizadas. Estas neuronas morfológicamente complejas, debido a las largas proyecciones axonales y la gran cantidad de terminales sinápticos, se relacionarían con una elevada demanda de energía necesaria para el transporte axonal. De hecho, parece que la pérdida de terminales axónicos en neuronas dopaminérgicas precede a la pérdida del soma neuronal. Además, una elevada arborización podría implicar mayor expresión de α -sinucleína, ya que parece estar implicada en el transporte vesicular y la liberación de neurotransmisores. En segundo lugar, estas neuronas se caracterizan por ser marcapasos autónomos, es decir, muestran potenciales de acción amplios dependientes de canales de calcio de tipo L o Ca_v1 , principalmente $Ca_v1.3$, en ausencia de entrada sináptica excitadora. Su actividad lenta y continua va acompañada de grandes oscilaciones en la concentración intracelular del Ca^{2+} . Estas oscilaciones de calcio en la neurona, además de mantener el potencial de membrana durante el marcapasos autónomo, promueven la entrada de calcio en la mitocondria para estimular la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y mantener las necesidades bioenergéticas. Este estímulo continuo conduce a la hiperpolarización mitocondrial y al aumento de estrés oxidativo. Un factor determinante en la homeostasis del calcio en este tipo de neuronas marcapasos sería la concentración de proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} (2,5,14,15,19–25). En resumen, teniendo en cuenta el elevado aporte energético mitocondrial necesario para la supervivencia neuronal, las mitocondrias en las neuronas parecen trabajar al límite de su capacidad. Por tanto, el deterioro mitocondrial tendría graves implicaciones en este tipo celular. En base a las teorías planteadas, la función mitocondrial se podría considerar eje central en la patología de la PD.

I.2. La mitocondria

La mitocondria, orgánulo presente en la mayoría de las células eucariotas, se conoce ampliamente como la central energética de la célula, ya que su principal función es la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) mediante el sistema OXPHOS. Aunque la visión moderna de la mitocondria define este orgánulo como un centro polifacético con diversas funciones conforme a las necesidades de la célula, actuando como un orgánulo de señalización.

El origen de la mitocondria surge de la endosimbiosis de una α -proteobacteria por una célula eucariota ancestral (26), teoría ampliamente aceptada. De hecho, dicho origen queda plasmado en la doble membrana que delimita el orgánulo.

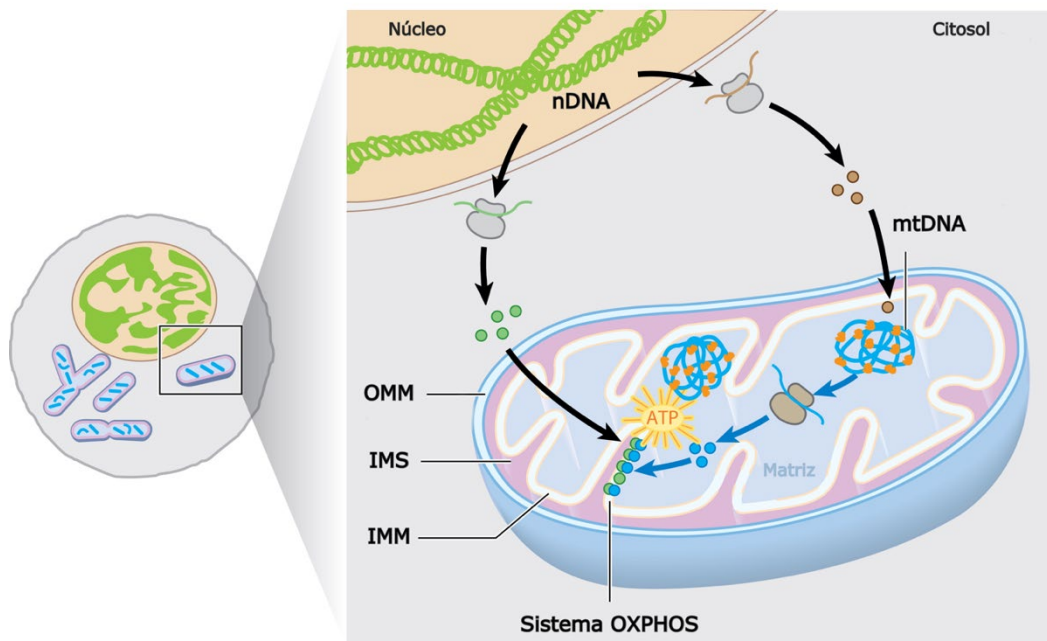


Figura I.3. Estructura de la mitocondria. Las mitocondrias se encuentran constituidas por la membrana mitocondrial externa (OMM), la membrana mitocondrial interna (IMM), el espacio intermembrana (IMS) y la matriz. La IMM tiene invaginaciones hacia la matriz mitocondrial, denominadas crestas, donde se localiza el sistema OXPHOS que se encarga de la síntesis de ATP. Está constituido por proteínas con un doble origen genético, aquellas codificadas en el DNA nuclear (nDNA), que se sintetizan en el citoplasma y viajan hasta las mitocondrias (círculos verdes); y aquellas codificadas por el DNA mitocondrial (mtDNA), que se traducen en la matriz mitocondrial (círculos azules). Adaptada de (27)

La mitocondria está compuesta por la membrana mitocondrial externa (OMM), el espacio intermembrana (IMS), la membrana mitocondrial interna (IMM) y la matriz (Figura I.3). La OMM, que separa el interior mitocondrial del citoplasma, tiene una estructura lisa y permeable que permite el paso de metabolitos y proteínas a través de porinas y translocasas

de la OMM, respectivamente. Además, se comporta como una plataforma en la que convergen las vías de señalización celular y presenta sitios de contacto con otros compartimentos subcelulares, como la membrana plasmática, el retículo endoplasmático, peroxisomas, lisosomas y endosomas, e incluso con otras mitocondrias. La IMM, que define el lumen de la mitocondria (matriz), se caracteriza por ser una barrera casi hermética donde las moléculas y las proteínas deben cruzar canales específicos o translocasas de la IMM para atravesarla. Esto favorecerá la generación de un potencial electroquímico de membrana. En la estructura de la IMM se pueden distinguir dos subcompartimentos, la membrana límite interna (IBM), que se dispone de forma paralela y próxima a la OMM, y las crestas mitocondriales, que se definen como invaginaciones de la IMM separadas del IMS por uniones tubulares estrechas. En estas crestas se localiza el sistema OXPHOS compuesto por los complejos ensamblados de la cadena de transporte de electrones (ETC) y la ATP sintasa, de manera que la formación de las crestas consigue aumentar la eficiencia de la respiración mitocondrial, y limitar la creación del potencial de membrana mitocondrial (MMP) y la difusión de proteínas importantes para el sistema OXPHOS. La matriz mitocondrial alberga el genoma mitocondrial (mtDNA), convirtiendo a la mitocondria en el único orgánulo celular con material genético propio en los animales. En ella se encuentran una gran variedad de proteínas implicadas en la replicación y la transcripción del mtDNA, la biosíntesis de proteínas y otras múltiples reacciones enzimáticas llevadas a cabo en la mitocondria, como el ciclo de Krebs o la β -oxidación de ácidos grasos, entre otros (28–31).

Las mitocondrias se caracterizan por ser orgánulos dinámicos que pueden cambiar el tamaño, la conectividad o la ultraestructura según los requerimientos de la célula mediante los procesos de fusión y fisión y la remodelación de las crestas. Dicha dinámica se debe al papel determinante de la mitocondria en variedad de contextos celulares incluyendo la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la diferenciación de células madre, la homeostasis del calcio, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), etc. En consecuencia, la cantidad de mitocondrias, su morfología y la distribución de la red mitocondrial cambia rápidamente dependiendo del tipo celular, e incluso dentro de cada célula individual, para responder a sus necesidades (30,32–34).

I.2.1. El DNA mitocondrial

Una de las particularidades de la mitocondria es poseer su propio genoma, el mtDNA, localizado en la matriz mitocondrial. Se trata de un ácido desoxirribonucleico (DNA) circular, cerrado, superenrollado, formado por dos hebras denominadas cadena pesada (H) y cadena ligera (L).

Cada molécula de mtDNA está constituida por 16 569 pares de bases en humanos, divididas en 37 genes que incluyen 11 RNAs mensajeros (mRNA), que codifican para 13 polipéptidos incluidos en cuatro de los cinco complejos del sistema OXPHOS; 2 RNAs ribosómicos (rRNA) (12S, 16S), que forman parte de los ribosomas mitocondriales; y 22 RNAs

de transferencia (tRNA), que participan en la traducción del mRNA sintetizado. Además, contiene una región no codificante (NCR) que incluye secuencias de regulación importantes en la replicación y la transcripción. De los trece polipéptidos, siete pertenecen al complejo I (CI) (p.MT-ND 1-6 y p.MT-ND4L); uno pertenece al complejo III (CIII) (p.MT-CYB); tres pertenecen al complejo IV (CIV) (p.MT-CO1-3); y dos pertenecen al complejo V (CV) o ATP sintasa (p.MT-ATP6 y p.MT-ATP8) (35). El sistema OXPHOS consta de aproximadamente 90 proteínas, por tanto, el resto de los polipéptidos componentes del sistema se encuentran codificados en el DNA nuclear (nDNA). En consecuencia, debe producirse una expresión coordinada entre ambos genomas para la constitución de dicho sistema (Figura I.4).

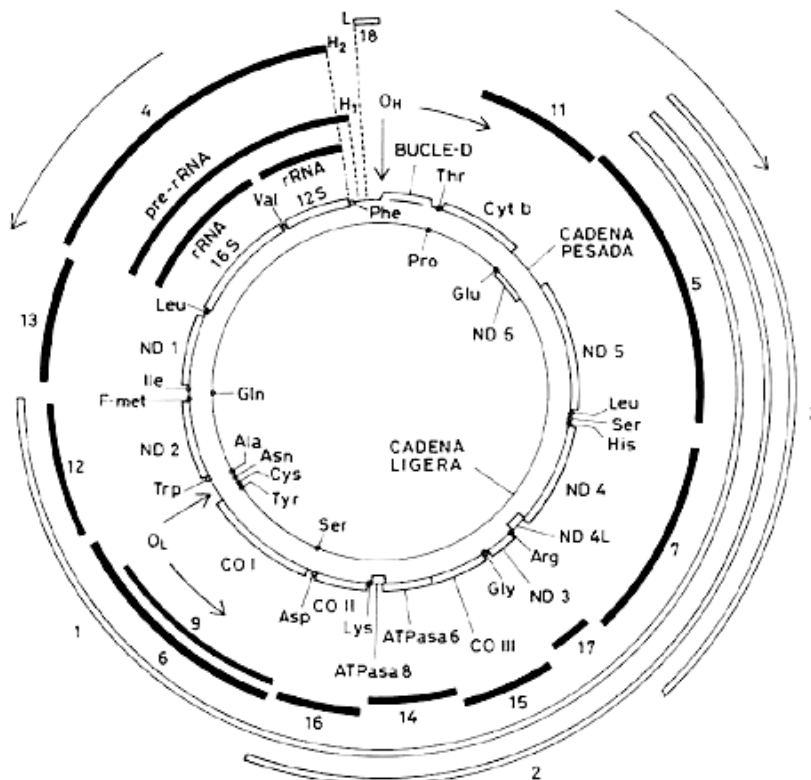


Figura I.4. Mapa genético del mtDNA con sus transcritos maduros. Las dos circunferencias interiores representan el mtDNA, con la cadena ligera y la cadena pesada. En ellas se indican los genes correspondientes para rRNA (12S, 16S), tRNA mostrados con la abreviatura del aminoácido pertinente, y mRNA mostrados con la proteína codificada en ellos (ND: subunidades de la NADH deshidrogenasa; Cyt b: citocromo b; CO: subunidades de la citocromo c oxidasa). H₁, H₂ y L indican los lugares de iniciación de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente. O_H y O_L simbolizan el origen de la replicación de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Las semicircunferencias exteriores se corresponden con los transcritos maduros de la cadena pesada (barras negras; 4-17) sintetizados a partir de H₂, de la cadena ligera (barras abiertas; 1-3, 18) sintetizados a partir de L, y el policistrón pre-rRNA sintetizado bajo el origen de transcripción H₁ que al procesarse da lugar al 12S rRNA y 16S rRNA. Las flechas exteriores indican el sentido de la transcripción de la cadena pesada (antihorario) y de la cadena ligera (horario), mientras que las flechas que están al lado de O_H y O_L señalan el sentido de síntesis de la cadena pesada (horario) y de la cadena ligera (antihorario); se representa el bucle de desplazamiento (Bucle-D o D-loop), incluido en la NCR. (36)

El mtDNA presenta una serie de características propias, diferentes a las del nDNA. Se considera una molécula compacta, ya que no presenta intrones ni regiones intergénicas no codificantes, a excepción de la NCR. A diferencia de la diploidía habitual del genoma nuclear, en una célula individual se encuentra una cantidad variable de mitocondrias que, a su vez, contienen múltiples copias del genoma mitocondrial, lo que se conoce como poliplasmia. Dependiendo del tipo celular se puede encontrar un rango de copias de mtDNA diferente, en función de los requerimientos del tejido. El mtDNA se transmite a la descendencia exclusivamente mediante herencia materna, debido a la destrucción de las mitocondrias del espermatozoide tras la fecundación. Por último, el mtDNA presenta una tasa de mutación más elevada en comparación al nDNA. Tradicionalmente, se ha creído que se debía a su localización en la matriz mitocondrial, entorno donde se producen ROS constantemente. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que la mitocondria cuenta con varios mecanismos de reparación efectivos, por lo que se postula que el mecanismo de replicación sea el causante de dichas mutaciones, a pesar de tener una polimerasa con las menores tasas de error y capaz de reparar los daños derivados de la oxidación (27,37,38).

1.2.2. Replicación, transcripción y traducción mitocondrial

La mitocondria se compone de aproximadamente 1200 proteínas diferentes, de las cuales muchas de ellas se necesitan para el mantenimiento y la expresión del mtDNA. De hecho, el mtDNA se encuentra formando estructuras conocidas como nucleoides en asociación con proteínas implicadas en la replicación y la transcripción mitocondrial. Cabe destacar el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) como principal proteína para compactar el mtDNA. En los nucleoides también se encuentran proteínas como la DNA polimerasa γ (POLG o POL γ), las proteínas mitocondriales de unión a DNA monocatenario (mtSSB), la helicasa TWINKLE, o la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), entre otras. Al conjunto de estas cuatro proteínas se le conoce como replisoma, la maquinaria básica e indispensable para la replicación del mtDNA (27,39). La POLG, única polimerasa mitocondrial presente en humanos, se compone de una subunidad catalítica α junto con dos subunidades accesorias β . Se encarga de sintetizar nuevas hebras de mtDNA, además de participar en los mecanismos de reparación. Posee actividad exonucleasa 3'-5' que permite la corrección eficiente de la hebra de DNA naciente, por ello posee una frecuencia de error tan baja (27).

De acuerdo con el modelo de desplazamiento de hebra, la replicación del mtDNA se produce de forma unidireccional, continua, asimétrica y asincrónica. La replicación comienza con la helicasa TWINKLE que desenrolla la doble hebra dejando accesible la cadena molde. Entonces, POLRMT sintetiza un fragmento de RNA que sirve como cebador para que POLG comience la replicación. La transición de ácido ribonucleico (RNA) a DNA tiene lugar en el origen de replicación de la cadena pesada (O_H). Simultáneamente, las proteínas mtSSB se unen a la cadena pesada parental desplazada para mantener su integridad y prevenir la renaturalización. La elongación de la hebra naciente de DNA se lleva a cabo por la POLG hasta

alcanzar el origen de replicación de la cadena ligera (O_L), después de recorrer dos tercios de la molécula. En este punto, se desplaza una secuencia de la hebra H parental capaz de establecer una estructura lazo-tallo que sirve como región de reconocimiento de POLRMT para sintetizar un cebador corto de RNA. Finalmente, POLG elonga ambas hebras de forma unidireccional, en sentido contrario, hasta completar la replicación de las cadenas (Figura I.5) (36,40–42).

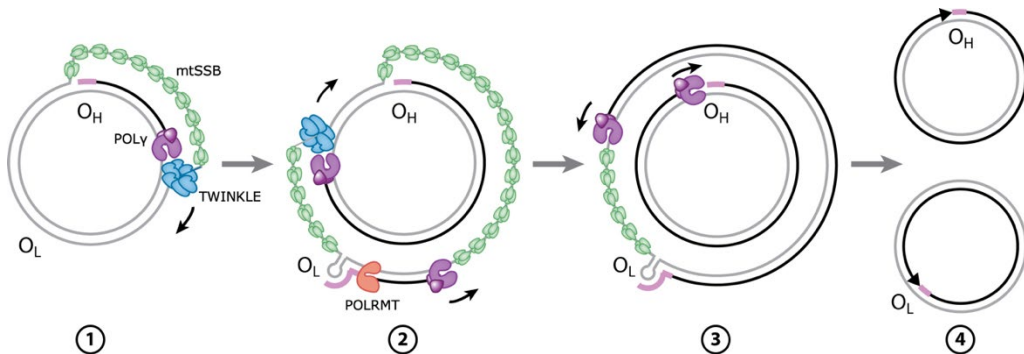


Figura I.5. Modelo de desplazamiento de hebra de la replicación mitocondrial. ① Después del inicio de la replicación por parte del replisoma en el origen de la cadena pesada (O_H), este procede unidireccionalmente para producir la cadena H naciente. La cadena H parental desplazada se estabiliza mediante la unión de las mtSSB (verde). ② Cuando la maquinaria de replicación de la cadena H pasa por el origen de la cadena ligera (O_L), se forma una estructura en lazo-tallo. La POLRMT (naranja), dirigida por el mtDNA, sintetiza cebadores cortos en el lazo-tallo que se utilizan para iniciar la síntesis de la cadena L de DNA. ③ Cabe destacar que TWINKLE (azul) sólo es necesario para la cadena H, ya que el molde para la síntesis de la cadena L es DNA monocatenario cubierto con mtSSB. ④ Una vez completada la síntesis de la cadena de mtDNA, la replicación finaliza en O_H u O_L , dependiendo de dónde se haya iniciado la síntesis de DNA. Adaptada de (27)

Existen en la actualidad otros modelos para explicar la replicación del mtDNA. En el modelo de RITOLS se produce una incorporación de fragmentos de RNA a lo largo de la cadena desplazada (RITOLS) que posteriormente se convierte a DNA. La replicación se inicia de manera unidireccional en un origen de replicación localizado en la NCR. En cambio, en el modelo de hebra acoplada la replicación de ambas cadenas se produce de forma simultánea, bidireccionalmente. Cabe destacar que el modelo de desplazamiento de hebra se considera el más aceptado hasta la actualidad (43,44).

La transcripción del mtDNA se inicia a partir de diferentes promotores, generando moléculas policistrónicas largas que se procesarán por cortes endonucleolíticos precisos delante y detrás de los tRNAs. Estos actúan como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento al adquirir la configuración en hoja de trébol en las cadenas nacientes de RNA, dando lugar a los rRNAs, tRNAs y mRNAs maduros, en base al modelo de puntuación por tRNAs (45). En este proceso principalmente interviene POLRMT, encargada de la síntesis de RNA, junto con dos factores de transcripción (TFAM, TFB2M), un factor de elongación (TEFM) y un factor de terminación (MTERF) (27,36,42,46).

Las mitocondrias disponen de un mecanismo propio para la traducción. Los mRNA obtenidos tras la transcripción del mtDNA se traducen a proteínas en los ribosomas mitocondriales. En humanos, estos mitorribosomas están formados por dos subunidades (28S, 39S) constituidas por rRNAs mitocondriales y proteínas codificadas en el nDNA (47). En cuanto al código genético, la mitocondria posee un código propio diferente al universal, con un menor número de tRNAs (35,36).

1.2.3. El sistema de fosforilación oxidativa

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), localizado en las crestas de la IMM, se encarga de llevar a cabo dos procesos metabólicos acoplados, la respiración celular y la síntesis de ATP. Dicho sistema se compone del CI (NADH:ubiquinona oxidorreductasa), el CII (succinato:ubiquinona oxidorreductasa), el CIII (ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa), el CIV (citocromo c oxidasa), el CV o ATP sintasa, y dos transportadores móviles de electrones (coenzima Q o ubiquinona, y citocromo c) (Figura 1.6).

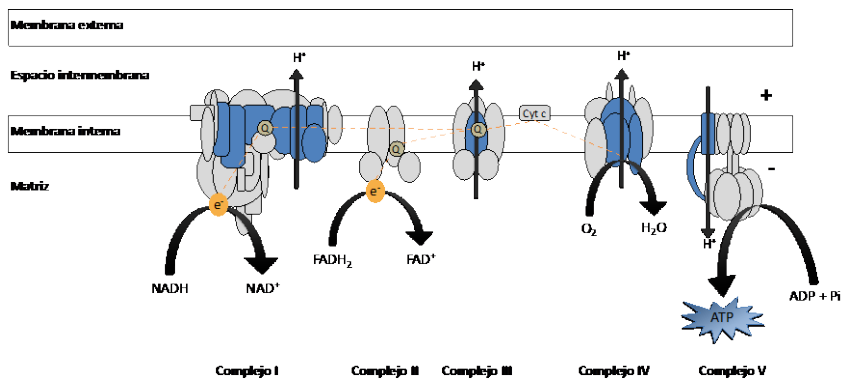


Figura 1.6. Representación esquemática del sistema OXPHOS. En la figura se observan los complejos de la cadena de transporte de electrones (Complejo I-V) (las subunidades de los complejos codificadas por el genoma nuclear se indican en gris; las subunidades codificadas por el genoma mitocondrial se indican en azul), la coenzima Q (círculos marrones) y el citocromo c. Las flechas negras perpendiculares señalan la dirección de salida de los protones al espacio intermembranoso y la dirección de entrada por el canal protónico de la ATP sintasa. La línea discontinua naranja marca el paso de electrones a través de los complejos. En la parte inferior se indica el nombre del complejo.

En la respiración celular, los electrones cedidos por los equivalentes de reducción (NADH, FADH₂), que se producen en el metabolismo catabólico, entran en la cadena de transporte de electrones a través del CI y CII, respectivamente. Estos electrones se transfieren mediante sucesivas reacciones de oxidación-reducción a la coenzima Q, al CIII, al citocromo c y al CIV para cederlos al oxígeno molecular que se reduce a agua, aunque una fracción de los electrones reacciona tempranamente con el oxígeno produciendo ROS. Estos complejos proteínicos acoplan la oxidación de los equivalentes de reducción al bombeo de

protones desde la matriz a través de la IMM hacia el interior de la cresta, generando un gradiente electroquímico utilizado por la ATP sintasa para sintetizar ATP (28,48,49).

Según el modelo de plasticidad, último modelo reconocido, los complejos OXPHOS están presentes tanto en forma de complejos individuales como de supercomplejos de composición y estequiometría diferentes, en función de los tipos celulares y las necesidades energéticas (49,50).

Aunque la producción de ATP se considera la función principal, el sistema OXPHOS está implicado en gran cantidad de procesos metabólicos esenciales para la función celular como rutas de biosíntesis (nucleótidos, lípidos, ácido fólico, grupo hemo, entre otros), regulación de los niveles de metabolitos como aminoácidos o cofactores, metabolismo del hierro, homeostasis del calcio, apoptosis, diferenciación celular, etc. (28).

1.3. La disfunción mitocondrial en la enfermedad de Parkinson

Las primeras evidencias acerca de la implicación de la mitocondria en la patogénesis de la PD surgieron en la década de 1980 en California, cuando se observó que el abuso de una nueva droga, conocida como 1-metil-4-fenil-4-propionoxi-piperidina (MPPP), desencadenaba signos típicos de parkinsonismo de inicio agudo (51). El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un subproducto de la síntesis de dicha droga, atraviesa la barrera hematoencefálica al inyectarse vía intravenosa. En el cerebro, la astrogliá convierte el MPTP en un metabolito tóxico denominado 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) mediante la monoamino oxidasa B. Seguidamente, este ion es captado de forma específica por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT) y, finalmente, se acumula en las mitocondrias. Dentro de las mitocondrias el MPP⁺ inhibe el CI de la ETC causando la muerte de las neuronas dopaminérgicas (52).

Años más tarde, al examinar cerebros post-mortem de pacientes con PD se determinaron actividades reducidas en complejos del sistema OXPHOS a partir de homogenado de SN, confirmando así que la disfunción mitocondrial puede contribuir a la patogénesis de la PD (53,54). Desde entonces, se han descrito niveles disminuidos de CI tanto en cantidad de proteína como en actividad en varias regiones del cerebro de enfermos de PD, principalmente en la SN. Algunos pacientes también presentaban esta disminución de CI en otros tejidos como fibroblastos, plaquetas, músculo esquelético o linfoblastos. En cambio, la deficiencia de otros complejos de la ETC, principalmente CIV, se ha descrito de forma esporádica en algunos casos de PD. Posteriormente, múltiples estudios han descrito niveles de ATP reducidos, daño oxidativo debido a la excesiva producción de ROS, o mayor cantidad de deleciones somáticas en el mtDNA asociado a déficit de CIV (52,55–59).

Hasta ahora, mutaciones en numerosos genes han sido identificadas por causar formas monogénicas de PD. Aunque un bajo porcentaje de los casos de PD están asociados a

Introducción

alteraciones genéticas concretas, el estudio de estos genes ha ayudado a avanzar en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad. De hecho, varios de estos están claramente asociados a la función y la integridad mitocondrial, lo que apoya la teoría de la disfunción mitocondrial como evento clave en el desarrollo de la PD. Entre los genes más estudiados se encuentran aquellos que codifican para α -sinucleína (*SNCA*), parkina (*PRKN*), *PTEN-induced kinase 1* (*PINK1*), *leucine rich repeat kinase 2* (*LRRK2*) o *DJ-1*, cuyas mutaciones tienen como consecuencia alteraciones mitocondriales, ya sea de forma directa o indirecta (Figura 1.7).

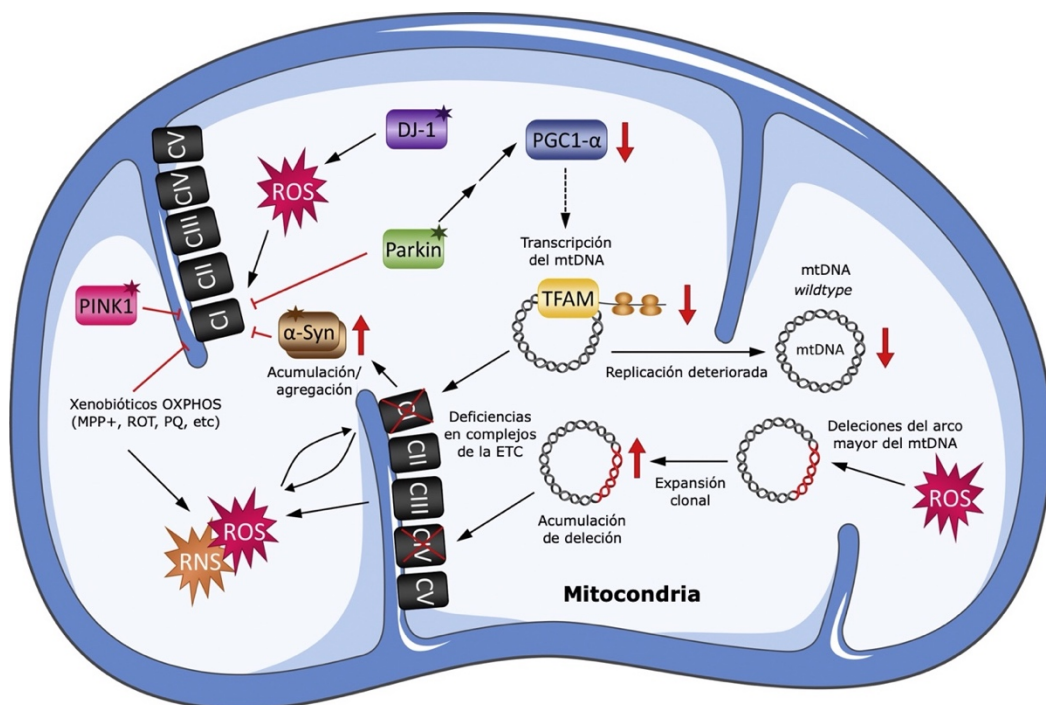


Figura 1.7. Disfunción de la cadena respiratoria y alteraciones del mtDNA en la enfermedad de Parkinson (PD). La disfunción de la cadena respiratoria que involucra principalmente al CI y al CIV se identifica a menudo en la PD idiopática. Como consecuencia del deterioro de sistema OXPHOS, los niveles celulares de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) aumentan. Xenobióticos OXPHOS, como el MPTP, la rotenona (ROT) o el paraquat (PQ), pueden reflejar fenotipos clínicos de la PD idiopática mediante la inhibición del CI o a través de la generación de ROS y RNS. El estrés oxidativo y los errores de replicación que se producen durante la PD son la causa de la deleción en el arco mayor del genoma mitocondrial (mtDNA). La expansión clonal de las moléculas de mtDNA delecionadas da lugar a un déficit del CIV. En la PD el nivel de moléculas de mtDNA de tipo salvaje (mtDNA *wildtype*) disminuye debido a un deterioro de la transcripción y la replicación mitocondrial. En cuanto a las proteínas asociadas a la PD, las mutaciones en DJ-1 aumentan el estrés oxidativo mitocondrial, que actúa sobre el CI. Del mismo modo, las formas mutantes de PINK1, parkina y α -sinucleína interfieren con la función del CI. La interacción entre la disfunción mitocondrial y la α -sinucleína es bidireccional, es decir, el deterioro de la ETC también puede inducir la acumulación y la agregación de α -sinucleína. Además, la proteína parkina puede modular la transcripción del mtDNA. Adaptada de (52)

Varias mutaciones puntuales *missense*, así como la duplicación o la triplicación del gen *SNCA*, o *PARK1/4*, que codifica para la proteína presináptica α -sinucleína, están asociadas a PD con herencia autosómica dominante, de hecho, fue el primer gen identificado por causar parkinsonismo. Además, parece que variantes polimórficas de *SNCA* incrementan el riesgo de PD esporádico. En condiciones patológicas, la α -sinucleína se podría acumular en la mitocondria interactuando con la membrana mitocondrial e interfiriendo en su funcionamiento mediante la inhibición de la ETC, la fragmentación mitocondrial, el aumento de estrés oxidativo, el daño del mtDNA y el desequilibrio de la homeostasis del calcio (57,60).

La forma más común de PD familiar con herencia autosómica dominante está causada por mutaciones en el gen *LRRK2*, o *PARK8*. La proteína LRRK2 se trata de una gran proteína multifuncional que parece intervenir en la regulación tanto de la dinámica como del control de calidad mitocondrial. Mutaciones en este gen producen disminución del MMP, reducción en los niveles de ATP y alteraciones del mtDNA, así como elongación mitocondrial (57,60,61).

Mutaciones en el gen *PRKN*, o *PARK2*, codificante de la proteína parkina, causan la forma más frecuente de parkinsonismo autosómico recesivo de inicio temprano, con más de 100 mutaciones descritas. La parkina es una ubiquitina-ligasa E3 implicada en la regulación de procesos de dinámica mitocondrial y control de calidad mediante mitofagia, entre otras funciones. Parece que dicha proteína trabaja junto con la proteína PINK1, una serina-treonina quinasa determinante en la localización mitocondrial de la parkina. Asimismo, mutaciones recesivas en el gen *PINK1*, o *PARK6*, codificante para la proteína PINK1, se asocian a la segunda forma más frecuente de PD de inicio temprano con herencia autosómica recesiva. Alteraciones genéticas en alguno de los dos genes provocan deterioro del sistema OXPHOS con déficit en niveles de ATP, elevada producción de ROS, alteraciones en la morfología mitocondrial y acumulación de mitocondrias dañadas (55,57,60–63). Además, la proteína parkina se encuentra implicada en la biogénesis mitocondrial ya que regula la actividad del represor transcripcional de un importante regulador, *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α* (PGC-1 α). De hecho, varios estudios han descrito una disminución de PGC-1 α en pacientes de PD (61–63).

Mutaciones en el gen *DJ-1*, o *PARK7*, conducen a casos raros de parkinsonismo de inicio temprano con herencia autosómica recesiva. DJ-1 parece ser una proteína multifunción con propiedades antioxidantes, además de actuar como sensor de estrés oxidativo, aunque su funcionamiento concreto no está claro. La pérdida de DJ-1 produce aumento de ROS, reducción del MMP y alteraciones en la morfología mitocondrial (57,60,61).

Por último, mutaciones en el gen *POLG1*, codificante para la subunidad catalítica de la POLG, se han asociado a múltiples trastornos con componente mitocondrial que incluirían parkinsonismo en su espectro clínico. Estos pacientes han mostrado tener defectos o deleciones en el mtDNA asociados a alteraciones en la función mitocondrial. También parece que variantes polimórficas raras supondrían un factor de riesgo para la PD (57,60–62).

En resumen, aunque la PD se trata de una enfermedad multietiológica, una disfunción mitocondrial causada por alteración en alguna vía como el sistema OXPHOS, la mitofagia, la dinámica o la biogénesis, puede ser un evento patogénico en muchos casos de PD.

I.4. Xenobióticos OXPHOS y la enfermedad de Parkinson

El factor ambiental en el desarrollo de la PD parece tener un papel considerablemente importante. La posibilidad de que neurotoxinas ambientales estuvieran implicadas en la patogenia de la enfermedad surgió en los años 80 cuando se descubrió que el MPP⁺ actuaba como desencadenante de parkinsonismo. Desde entonces se ha estudiado como la exposición a xenobióticos OXPHOS, concretamente tóxicos ambientales que producen inhibición mitocondrial, puede afectar al desarrollo de la PD (Figura I.7) (56,64). Se han considerado diversos riesgos ambientales, como vivir en una zona rural, la exposición ocupacional, el consumo de agua corriente, la dieta, etc., que aumentan la posibilidad de estar expuestos a toxinas como herbicidas, insecticidas o metales (65,66). Existen múltiples estudios que asocian dichos tóxicos con un elevado riesgo de padecer la PD en la población expuesta (67–70).

La rotenona pertenece a la familia de los rotenoides, compuestos citotóxicos naturales extraídos de plantas tropicales que inhiben el CI de la ETC. Durante años se ha empleado como plaguicida, ya que se consideraba inocuo para humanos dado su carácter natural, aunque actualmente se encuentra prohibido en muchos países. Al inhibir el CI, la rotenona produce una disminución de los niveles de ATP y un aumento de ROS (65,71). La exposición a rotenona parece aumentar el riesgo de desarrollar PD (67,68). De hecho, tanto la rotenona como el MPTP han sido tóxicos ampliamente utilizados para modelar la PD en animales reproduciendo características anatomopatológicas de la enfermedad (72). Entre los inhibidores del CIII se pueden encontrar pesticidas persistentes en el medioambiente como la atrazina o la dieldrina, ya prohibidos en numerosos países por su toxicidad. Ambos se han asociado a un mayor riesgo de sufrir parkinsonismo, además de encontrar correlación entre la acumulación de dieldrina y la PD durante el estudio de cerebros de pacientes (56,64,65,69,71). Otros plaguicidas pueden influir en la actividad mitocondrial por otras vías, como el paraquat, que se trata de un herbicida empleado en muchos lugares del mundo. Parece que actúa como un compuesto cíclico redox que conduce a una producción excesiva de ROS aumentando el estrés oxidativo y alterando la homeostasis mitocondrial. Estudios epidemiológicos vinculan la exposición a paraquat con el desarrollo de PD (56,65,67,68,71).

El estudio de la exposición a tóxicos ambientales conlleva ciertas limitaciones dado que resulta complicado conocer con certeza tanto el tiempo como la concentración de exposición. Pero no solo los tóxicos ambientales deben ser considerados, existen otros xenobióticos como los fármacos. En este caso, un individuo puede conocer los parámetros de exposición a dichos fármacos que podrían tener implicaciones en el desarrollo de

enfermedades. Algunos de estos compuestos pueden afectar secundariamente a las actividades de complejos respiratorios, la traducción o la replicación mitocondrial.

Las combinaciones de factores ambientales y genéticos tanto nucleares como mitocondriales tienen efectos aditivos pudiendo aumentar el riesgo de sufrir PD. Los polimorfismos poblacionales en los genes del mtDNA, que afectan a las interacciones con diferentes xenobióticos, también podrían comportarse como factores de susceptibilidad para desarrollar PD sólo en presencia de ese xenobiótico en particular (56).

I.5. La enfermedad de Parkinson, la neurogénesis y el sistema de fosforilación oxidativa

I.5.1. Orígenes en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson

Debido a la plasticidad del desarrollo, un organismo puede adaptar su estructura o sus funciones en respuesta al ambiente durante un periodo de tiempo determinado, mediante cambios epigenéticos, alteraciones en la diferenciación de tejidos o cambios en mecanismos homeostáticos. Sin embargo, algunas de estas respuestas pueden tener efectos perjudiciales sobre el desarrollo sin proporcionar ninguna adaptación beneficiosa para el ambiente futuro (73). La hipótesis de los Orígenes en el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD) propone que factores ambientales a los que está expuesto un individuo durante el desarrollo prenatal, neonatal y la infancia actúan como factores de riesgo para padecer determinadas enfermedades en la edad adulta y la vejez.

Dicha teoría se puede aplicar al origen de las enfermedades neurodegenerativas estudiando el desarrollo cerebral y el impacto del ambiente durante este proceso (74,75). Alteraciones durante estos periodos de desarrollo pueden afectar negativamente al establecimiento de los circuitos neuronales básicos, debilitando la estructura fundamental del cerebro. La exposición a un tóxico durante la proliferación, la migración o la diferenciación de las células cerebrales puede provocar hipoplasia (reducción de la población neuronal), ectopia (deslocalización neuronal) o displasia (configuración anormal de las ramas dendríticas), respectivamente (76). Dichas modificaciones pueden ser responsables de deficiencias permanentes.

La PD podría ser una de las enfermedades relacionadas con la DOHaD. En humanos, las neuronas dopaminérgicas de la SN, principal región afectada en la PD y causante de los síntomas motores de la enfermedad, se generan en las semanas 5-7 después de la fertilización (76). Curiosamente, el desarrollo del sistema nervioso entérico y olfativo también se produce durante este periodo e, igualmente, se encuentran afectados en la PD (77,78). La implicación de la DOHaD en la PD supondría que factores tempranos podrían reducir de forma aguda el número de neuronas. En consecuencia, el desgaste neuronal asociado a la edad avanzada llevaría el número de neuronas a niveles inferiores a los

necesarios para mantener una función adecuada (74,79). Alternativamente, un factor prenatal causante de algún tipo de modificación celular permanente podría sensibilizar a las neuronas ante posibles exposiciones dañinas o eventos traumáticos futuros o interferir con el programa de desarrollo y, así, acelerar la pérdida de neuronas a lo largo de la vida (80–89). De hecho, ratones deficientes en múltiples genes asociados al desarrollo de la PD mostraron desregulación en la neurogénesis embrionaria de neuronas dopaminérgicas (90).

1.5.2. OXPHOS y neurogénesis del desarrollo

El desarrollo del cerebro, órgano extremadamente complejo y estructurado en mamíferos, se basa en el establecimiento de los circuitos neuronales, que determinarán la cognición y el comportamiento del individuo. La formación del tejido neuronal depende de las células madre neurales (NSC) que tienen la capacidad de dividirse dando copias idénticas de sí mismas o diferenciarse a neuronas mediante el proceso de neurogénesis, que se produce principalmente en las primeras etapas de la vida. Durante este periodo, el sistema nervioso muestra neuroplasticidad, de forma que puede sufrir cambios adaptativos dependiendo del entorno en la estructura o la función de las células, como variaciones en el crecimiento de axones y dendritas, la formación de sinapsis o la neurogénesis (91,92).

Entre las diferentes células somáticas, las neuronas se consideran uno de los tipos celulares con mayor gasto energético debido a la arborización y el transporte intracelular, la excitabilidad neuronal, la función sináptica, etc. En consecuencia, las mitocondrias se consideran orgánulos clave en el correcto funcionamiento de las neuronas, no solo por su capacidad bioenergética, sino también por sus propiedades como amortiguadoras de calcio o transductores de señales (91,93). Recientemente, se ha comenzado a estudiar el impacto de la función y la señalización mitocondrial en el desarrollo neuronal temprano, de forma que la actividad mitocondrial parece ser un requisito indispensable para la correcta diferenciación de las NSC.

Durante el proceso de diferenciación a neurona madura, se produce un cambio metabólico de la glucólisis al sistema OXPHOS acompañado por modificaciones en las mitocondrias. Las NSC utilizan la glucólisis para el metabolismo celular, aunque también presentan mitocondrias que sirven para producir diferentes sustratos metabólicos esenciales para la proliferación. Estas mitocondrias parecen tener una morfología más redondeada e inmadura que, durante la diferenciación mediante procesos de remodelación y dinámica mitocondrial, terminan creando una red de mitocondrias tubulares con abundantes crestas y matriz densa en las neuronas maduras. Estos cambios en el estado mitocondrial de la célula parecen fluctuar a lo largo de la neurogénesis (91,92,94–101). Muchos estudios correlacionan el cambio metabólico con un aumento tanto de la masa mitocondrial como de los niveles de mtDNA debido a un incremento en la biogénesis (95,98,99). No obstante, en otros casos no se han observado estas diferencias, sugiriendo que el cambio metabólico no se asocia a un aumento en la cantidad de mitocondrias, sino a

una mayor dependencia del sistema OXPHOS de las mitocondrias ya existentes (91,102). Esta transformación metabólica está mediada por alteraciones en la expresión de reguladores metabólicos. Moléculas implicadas en la actividad mitocondrial, como el calcio o las ROS, actuarían como mensajeros activando un programa transcripcional nuclear. De esta forma, el metabolismo energético de la célula podría determinar el destino final de la célula mediante la regulación génica (91,93,99,101). Por último, durante la diferenciación, las células extienden neuritas lo que se asocia con una redistribución de la localización de las mitocondrias desde la zona perinuclear a los axones y las dendritas. Las mitocondrias parecen desempeñar un papel importante en el crecimiento de estas neuritas, el ensamblaje del citoesqueleto asociado, la polarización neuronal, el mantenimiento y la plasticidad de axones y dendritas, el transporte a lo largo de estas estructuras, y el funcionamiento sináptico (92,103,104).

Por tanto, el desarrollo embrionario, especialmente del cerebro, es un proceso que exige altos niveles de energía, por lo que el correcto funcionamiento de las mitocondrias se considera esencial para satisfacer las demandas energéticas, además de regular la proliferación y la diferenciación neuronal (91,100). Diversos estudios demuestran que mutaciones en el mtDNA o en proteínas implicadas en la actividad mitocondrial conducen a una diferenciación neuronal deficiente como consecuencia de una disfunción mitocondrial (105–107). De hecho, los síndromes neurológicos suelen ser la presentación clínica más común en los trastornos mitocondriales como el síndrome de Kearns-Sayre, NARP, MELAS, MERRF o, en concreto, el síndrome de Leigh que se desarrolla como consecuencia de un déficit importante en la producción de energía en el cerebro en desarrollo (108,109).

I.5.3. Xenobióticos OXPHOS y neurotoxicidad del desarrollo

Los xenobióticos OXPHOS alteran la homeostasis mitocondrial por su acción sobre la replicación, la transcripción, la traducción mitocondrial o, directamente, sobre la función OXPHOS. Dada la importancia de la mitocondria en el desarrollo neuronal y la neurogénesis, cualquier insulto sobre esta puede llevar a defectos en el establecimiento de las neuronas.

Variedad de xenobióticos OXPHOS, entre ellos algunos fármacos comercializados en la actualidad o tóxicos ambientales, afectan a la diferenciación neuronal en modelos *in vitro*. Concretamente, la disfunción mitocondrial asociada a la exposición a estos compuestos conlleva una diferenciación ineficiente y una falta de maduración de las neuronas, incluyendo neuritogénesis y sinaptogénesis incompleta, alteración en la producción de neurotransmisores, o déficits de proteínas específicas de la ruta dopaminérgica (107,110–113). Asimismo, multitud de estudios realizados en modelos animales con exposición prenatal o perinatal a diversos xenobióticos OXPHOS, principalmente tóxicos ambientales, han demostrado capacidades motoras disminuidas, reducción de la cantidad de neuronas dopaminérgicas en la SN, o caída de los niveles del neurotransmisor dopamina o de moléculas de la ruta dopaminérgica, como la tirosina hidroxilasa (TH) o DAT (82,88,114–125).

En resumen, la neurogénesis disminuida podría tener repercusión en el desarrollo de la PD. Dado que la función OXPPOS es importante para la neurogénesis, que se produce en las primeras etapas de establecimiento del sistema nervioso, una exposición temprana a xenobióticos OXPPOS podría predisponer al individuo a padecer la PD en la edad adulta.

I.6. La terapia antirretroviral

Desde que se identificó el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) como agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), hace ya cuatro décadas, en torno a 85,6 millones de personas han contraído la infección por HIV y 40,4 millones de personas han muerto por enfermedades relacionadas con el AIDS (126). Gracias al desarrollo de la terapia antiviral, tanto la morbilidad como la mortalidad asociada a la infección por HIV ha mejorado considerablemente, aumentando la esperanza de vida y retrasando o previniendo la progresión del AIDS (127,128).

La terapia antirretroviral combinada (ART) ha conseguido suprimir casi en su totalidad la replicación viral en la mayoría de los pacientes con HIV en tratamiento. Dicha terapia se basa en la administración simultánea de fármacos con distintas dianas sobre el ciclo de vida del virus (127,128). Los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NRTI) fueron la primera clase de drogas antirretrovirales aprobadas contra el HIV, concretamente la zidovudina, también conocida como azidotimidina (AZT). Estos fármacos actúan inhibiendo la transcriptasa reversa del virus, cuya función se basa en la síntesis de DNA bicatenario a partir del RNA monocatenario viral, un paso esencial en el proceso de replicación del virus. Durante la transcripción, los NRTI se introducen en el sitio activo de la enzima provocando la terminación temprana del DNA proviral. Estos compuestos se consideran prodrogas, ya que en el interior celular se convierten en derivados trifosforilados para ser funcionalmente activos (127–129). Desde entonces, se han desarrollado diversos tipos de fármacos entre los que se incluyen los inhibidores de la proteasa (PI), como el atazanavir (ATV). La proteasa vírica escinde las poliproteínas precursoras virales para generar las proteínas maduras necesarias para la formación del virión, proceso clave en la maduración del virus. Estos PI están diseñados para bloquear la proteasa viral mimetizando el estado de transición con el sustrato (127,128,130,131). Los últimos fármacos en ser desarrollados han sido los inhibidores de la integrasa (INI), como el raltegravir (RAL). La integrasa viral actúa incorporando el DNA bicatenario viral en el DNA de la célula huésped mediante un enlace covalente entre ambas cadenas. En concreto, los inhibidores de la transferencia de la cadena de la integrasa (INSTI), actualmente los únicos INI aprobados para el tratamiento contra el HIV, se basan en inhibir el dominio catalítico de la enzima de forma que se bloquea la transferencia de la cadena (127,128,132). Aunque en su mayoría dichos tratamientos suelen tolerarse bien, pueden presentar efectos adversos conocidos, o todavía desconocidos, tanto a corto como a largo plazo.

Entre los efectos secundarios destaca la toxicidad mitocondrial producida por la exposición a NRTI. Estos fármacos, además de inhibir la transcriptasa reversa del virus, presentan afinidad variable por la POLG. En base a dicha interacción con la polimerasa mitocondrial se propuso la “hipótesis de la DNA polimerasa γ ” como eje central de la toxicidad producida por NRTI. Dicha teoría se fundamenta en la disminución de los niveles de mtDNA por la exposición a esta clase de drogas, lo que conduce a una caída en la síntesis de proteínas mitocondriales implicadas en la OXPPOS causando privación de energía. Como resultado de la alteración en OXPPOS se produce una mayor fuga de electrones, provocando un aumento de ROS que puede dañar tanto estructuras mitocondriales como el propio mtDNA. Finalmente, el entorno generado se manifiesta como disfunción mitocondrial (133–136). A pesar de los estudios que han correlacionado una disminución en los niveles de mtDNA con la presencia de NRTI, otros casos han descrito alteraciones mitocondriales en ausencia de depleción o inhibición de la síntesis del mtDNA. Por ende, la hipótesis de la DNA polimerasa γ sería insuficiente para explicar la toxicidad producida por estos fármacos. Actualmente, dicha toxicidad se considera que puede ser originada por diversos eventos de carácter multifactorial que pueden no ser compartidos por todos los fármacos pertenecientes a esta clase. Dada su naturaleza como análogos de nucleósidos o nucleótidos, podrían producir desequilibrios en el *pool* de estos compuestos tanto a nivel celular como mitocondrial, alterando el correcto funcionamiento de variedad de reacciones que requieren de estas moléculas como sustrato. Por tanto, los mecanismos de toxicidad propuestos incluyen, entre otros, la inhibición de quinasas endógenas, transportadores de nucleósidos o complejos del sistema OXPPOS de forma directa, aunque también podrían afectar a la fosforilación o el ensamblaje de estos complejos de la ETC. De manera que la ausencia de depleción del mtDNA no debería interpretarse como la ausencia de toxicidad, debido al alcance de los efectos mitocondriales y metabólicos de los NRTI. Independientemente de la acción del fármaco, el resultado final se refleja en una disminución de la síntesis de ATP (137–139).

I.6.1. Contribución de la terapia antirretroviral a los trastornos neurodegenerativos

Desde la aplicación de la ART se ha conseguido evitar casi por completo los casos de demencia grave asociada al HIV, gracias a la reducción de la replicación vírica hasta niveles mínimos o indetectables en el sistema nervioso central. Sin embargo, el uso de fármacos antirretrovirales se podría relacionar con trastornos neurocognitivos como consecuencia de sus efectos adversos, entre ellos la toxicidad mitocondrial, que forma parte de la patología de múltiples enfermedades neurodegenerativas (140). Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento con antirretrovirales, concretamente NRTI, provoca alteraciones mitocondriales en modelos neuronales que incluyen disfunción del sistema OXPPOS o alteraciones de la homeostasis mitocondrial (141,142). Asimismo, estudios poblacionales han asociado la ART con la aparición de síntomas parkinsonianos indistinguibles de la PD idiopática (143–145). Teniendo en cuenta estos resultados, parece que la ART podría generar

un entorno nocivo que aceleraría el proceso de envejecimiento. De esta forma, el daño neuronal asociado actuaría como desencadenante de enfermedades neurodegenerativas como la PD.

I.6.2. Tratamiento antirretroviral perinatal

El inicio de la ART inmediatamente después del diagnóstico del HIV ha mejorado considerablemente la esperanza de vida de las personas infectadas. Desde entonces, la población de mujeres infectadas por HIV que reciben tratamiento a lo largo del embarazo y, por tanto, la cantidad de niños expuestos a fármacos antirretrovirales *in utero* ha aumentado drásticamente. De hecho, a diferencia de la mayoría de los fármacos, dicha terapia se recomienda administrar en el embarazo y la lactancia para evitar la transmisión vertical del virus, e incluso se incluye la profilaxis postnatal en los regímenes de administración (146–148).

La terapia perinatal conlleva la exposición a fármacos antirretrovirales durante las primeras etapas de formación del individuo, pudiendo producir alteraciones que afecten al correcto desarrollo del organismo. La disfunción mitocondrial derivada del tratamiento antirretroviral se ha determinado en múltiples seguimientos realizados a niños no infectados expuestos a ART, principalmente AZT o combinaciones con este. Estos mostraban actividades reducidas de los complejos de la ETC asociadas a sintomatología clínica, histopatología y/o bioquímica similar a la observada en niños con enfermedades mitocondriales congénitas (149,150). Otros análisis han descrito alteraciones del mtDNA, aumento del estrés oxidativo, morfología mitocondrial aberrante o desregulación metabólica en niños, tejidos como cordón umbilical o placenta, y modelos animales (151–156). Aunque los casos graves de disfunción mitocondrial durante el embarazo suelen ser raros, la toxicidad producida podría tener consecuencias adversas en etapas posteriores de la vida.

Algunos estudios han relacionado la alteración de la función mitocondrial con síntomas neurológicos o anomalías cerebrales en niños expuestos a ART (149,150). Investigaciones posteriores han demostrado alteraciones en la capacidad proliferativa de NSC, la neurogénesis y el desarrollo tanto morfológico como funcional de modelos neuronales *in vitro*, y en la neurogénesis prenatal en modelos *in vivo* (142,152,157,158). También se ha informado de daños morfológicos mitocondriales, así como depleción del mtDNA en cerebro de primates expuestos *in útero* (156). En definitiva, la exposición perinatal a ART podría predisponer al individuo a padecer enfermedades neurológicas asociadas a disfunción mitocondrial.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Hipótesis

La teoría DOHaD sugiere que los factores ambientales a los que está expuesto un individuo durante el periodo prenatal, neonatal y la infancia están asociados al estado de salud en la edad adulta y la vejez, siendo factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades.

La terapia antirretroviral se emplea para el tratamiento crónico de infección por HIV y, de manera excepcional a lo normalmente recomendado, su régimen de administración se extiende al embarazo ya que evita la transmisión del virus de madre a hijo. Esta terapia incluye la combinación de diferentes fármacos con dianas específicas, entre las que se encuentran los inhibidores de la transcriptasa reversa como la azidotimidina. Estos compuestos podrían provocar complicaciones mitocondriales. De hecho, existe evidencia de patología mitocondrial en pacientes infectados con HIV en tratamiento con estos medicamentos.

La mitocondria se considera la principal fuente de energía de la célula por su función OXPHOS. Dado que la neurogénesis se trata de un proceso con una gran demanda energética, el sistema OXPHOS debe ser importante para la diferenciación neuronal. Dicha neurogénesis se produce principalmente durante el desarrollo fetal. Por tanto, una alteración de la función mitocondrial producida durante este periodo prenatal podría desencadenar un fallo en la neurogénesis con consecuencias negativas en el futuro.

Por otro lado, se conocen las implicaciones mitocondriales en la enfermedad de Parkinson. Los enfermos de Parkinson presentan fallos en el sistema nigroestriatal debido a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Se ignora la etiología del Parkinson, aunque se considera una enfermedad multifactorial asociada a diversas posibles causas entre las que se encuentra la disfunción mitocondrial.

En resumen, la hipótesis de esta tesis doctoral propone que la exposición prenatal a xenobióticos OXPHOS, en particular a inhibidores de la transcriptasa reversa, reduciría la capacidad OXPHOS y podría alterar la diferenciación de neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo fetal y, en consecuencia, causar una predisposición patológica en el individuo adulto para padecer la enfermedad de Parkinson.

II.2. Objetivos

Como objetivo principal nos planteamos estudiar el efecto de la ART, recomendada contra el HIV y administrada durante el embarazo, sobre el desarrollo del sistema nervioso. Concretamente, evaluar el impacto de estos xenobióticos sobre la neurogénesis, en particular la diferenciación de neuronas dopaminérgicas.

1. Caracterización y diferenciación de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y las células madre neurales humanas (hNSC) como modelos celulares *in vitro* para el estudio de la neurogénesis.
2. Análisis del efecto de fármacos empleados en la terapia antirretroviral, administrados durante la diferenciación neuronal de las SH-SY5Y y las hNSC, sobre la función OXPHOS y la capacidad de diferenciación neuronal.
3. Estudio funcional, anatómico-patológico y genético-molecular de ratones envejecidos cuyas madres fueron expuestas al AZT en el embarazo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Caracterización de los modelos celulares

Los modelos celulares presentan ciertas limitaciones, ya que se consideran sistemas sencillos que en muchos casos no reproducen el microambiente celular encontrado en un organismo. En cambio, constituyen una buena alternativa para el estudio de algunas enfermedades puesto que permiten el uso de modelos de origen humano, con tiempos de experimentación más cortos, mayor reproducibilidad, y mayor simplicidad para el estudio de mecanismos moleculares concretos (159–162).

La inaccesibilidad a poblaciones neuronales vivas de pacientes con PD constituye una barrera importante a tener en cuenta en la investigación de esta enfermedad. Por ello, los modelos celulares con características similares a las neuronas afectadas en la PD han sido de gran relevancia en el estudio de rutas bioquímicas implicadas en la patogenia de la enfermedad. Estos modelos se han empleado para reproducir alteraciones causadas por mutaciones asociadas a la PD, estudiar la toxicidad de determinadas sustancias relacionadas con el desarrollo de la enfermedad, o cribar compuestos terapéuticos (159–162). Para el desarrollo de la tesis se emplearon la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y células madre neurales humanas (hNSC) derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), desarrolladas en nuestro laboratorio a partir de fibroblastos (163).

III.1.1. Caracterización genética

Debido a la posibilidad de contaminación cruzada descrita en algunas líneas celulares, se realizó un perfil *short tandem repeat* (STR) para autenticar la línea celular SH-SY5Y, analizando un total de 16 marcadores. Este perfil STR consiste en el análisis de secuencias cortas en tándem altamente polimórficas dispersas por el genoma (107,164,165). Comparando la huella genética resultante con el perfil STR disponible en la base de datos *American Type Culture Collection* (ATCC), se obtuvo una concordancia total con los 9 marcadores disponibles. De este modo, se verificó la autenticidad de la línea empleada (Tabla III.1) (107).

Tabla III.1. Huella genética nuclear de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. CHR, cromosoma; STR, *short tandem repeat*; ATCC, *American type culture collection*. (107)

CHR	2	2	3	4	5	5	7	8
STR	D2S1338	TPOX	D3S1358	FGA	CSF1PO	D5S818	D7S820	D8S1179
SH-SY5Y	17, 19	8, 11	15, 16	23.2, 24	11	12	7, 10	15
SH-SY5Y (ATCC)		8, 11			11	12	7, 10	
CHR	11	12	13	16	18	19	21	X
STR	TH01	vWA	D13S317	D16S539	D18S51	D19S433	D21S11	AMEL
SH-SY5Y	7, 10	14, 18	11	8, 13	13, 16	13,14	31, 31.2	X
SH-SY5Y (ATCC)	7, 10	14, 18	11	8, 13				X

Resultados y discusión

Las líneas celulares cultivadas durante periodos de tiempo prolongados pueden sufrir alteraciones en el cariotipo, no solo por sus características genéticas, sino por las condiciones de cultivo (166). También se han descrito alteraciones cromosómicas producidas durante el proceso de reprogramación para la obtención de hiPSC (167–169). Por todo ello, para comprobar la estabilidad cromosómica, se analizó del cariotipo tanto de la línea SH-SY5Y como de las hiPSC que dieron origen a las hNSC empleadas (Figura III.1) (107,163).

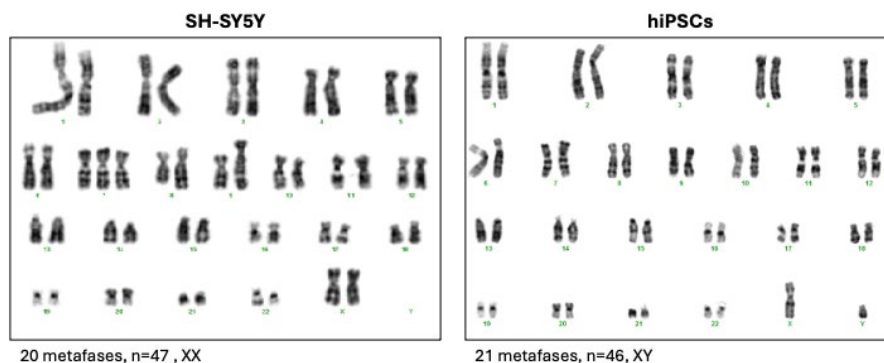


Figura III.1. Cariotipo de los modelos celulares empleados. En la parte superior de cada cariotipo se muestra el nombre de la línea celular. Debajo de cada uno se indica el número de metafases analizadas y el número modal de los cromosomas cuantificados (n) y los cromosomas sexuales. Se muestran imágenes representativas de los cariotipos obtenidos para cada línea, con los pares de cromosomas ordenados según morfología y tamaño (cariograma). hiPSC, Célula madre pluripotente inducida humana. (107,163)

En el cariotipado de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se analizaron 20 metafases que mostraron un rango entre 46 – 48 cromosomas, siendo el número modal de 47 (107). Las anomalías cromosómicas observadas fueron $ins(1q)$, $+7$, $?der(8)(q24)$, $add(9)(q34?)$, $der(22)add(22)(q13)$, coincidiendo con las alteraciones reportadas anteriormente (170–173). Por otro lado, el estudio del cariotipo de la línea celular de hiPSC se analizaron 21 metafases, obteniendo en todos los casos un número de cromosomas igual a 46, sin alteraciones cromosómicas reseñables (163). En base a estos resultados, las líneas celulares se consideraron suficientemente estables para ser buenos modelos celulares.

III.1.2. Diferenciación a neurona madura

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, derivada de la línea parental SK-N-SH establecida a partir de un neuroblastoma metastásico en 1970, ha sido ampliamente utilizada en la investigación neurocientífica como modelo celular neuronal, incluyendo el estudio de la PD. Las células SH-SY5Y presentan propiedades similares a las neuronas, destacando la expresión de marcadores neuronales y la síntesis de varios neurotransmisores, entre ellos la dopamina. Esta línea celular permite la diferenciación *in vitro* hacia un fenotipo neuronal funcionalmente maduro, adquiriendo características morfológicas, bioquímicas, ultraestructurales y electrofisiológicas que le hacen asemejarse más a las neuronas (160,161,174–177)

Durante la diferenciación de las células SH-SY5Y, se realizó un análisis con el módulo Neurotrack del sistema Incucyte® que permitió obtener imágenes de contraste de fase donde se observaron cambios morfológicos. Las células diferenciadas mostraron mayor polaridad, formando agrupaciones de cuerpos neuronales y extendiendo neuritas ramificadas (Figura III.2 A). Al cuantificar estos parámetros, se confirmó un aumento significativo tanto en la longitud de las neuritas como en su ramificación comparando las células diferenciadas con las células sin diferenciar al comienzo del proceso (Figura III.2 B). Estos cambios morfológicos se asocian a un incremento de los niveles de expresión del mRNA del marcador neuronal β III-tubulina (TUBB3) en las células diferenciadas (Figura III.2 C), que, como constituyente principal de los microtúbulos, permite la adecuada orientación y el mantenimiento de los axones.

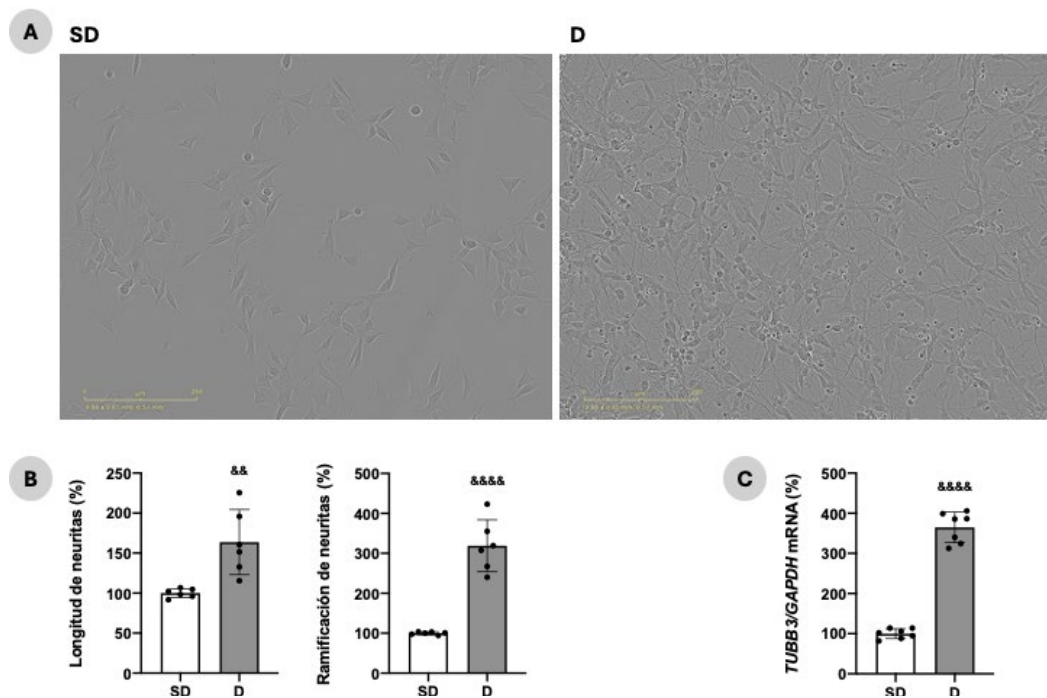


Figura III.2. Diferenciación de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. **A)** A la izquierda se muestra una imagen representativa de las células SH-SY5Y al inicio de la diferenciación. A la derecha se muestra una imagen representativa de las células SH-SY5Y tras los 7 días de diferenciación. Las imágenes se tomaron con el software del equipo Incucyte®. **B)** Parámetros extraídos con el módulo Neurotrack del sistema Incucyte® para el análisis de la diferenciación neuronal. Cada medida extraída de un pocillo concreto se normaliza frente a la cuantificación celular existente a tiempo cero en este. Longitud de neuritas; SD: 100,0 ± 5,6 (6); D: 163,7 ± 40,8 (6). Ramificación de neuritas; SD: 100,0 ± 3,4 (6); D: 318,9 ± 65,0 (6). **C)** Niveles de mRNA del marcador neuronal *TUBB3* determinados por qPCR normalizados por *GAPDH*. SD: 100,0 ± 12,4 (7); D: 364,8 ± 38,2 (7). Los valores medios de las células sin diferenciar se consideran el 100 %. Prueba t de Student desapareado: && p ≤ 0,01 (vs. SD); &&&& p < 0,0001 (vs. SD). SD, sin diferenciar; D, diferenciadas; TUBB3, β III-tubulina; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Resultados y discusión

Gracias a su similitud con las neuronas y su capacidad de diferenciación, las células SH-SY5Y se han consolidado como un modelo neuronal sumamente útil en el estudio de procesos metabólicos y funcionales asociados a la neurodegeneración vinculada a la PD, como la disfunción mitocondrial. Una de las principales ventajas de este modelo celular deriva de su origen metastásico, ya que le proporciona la capacidad de proliferación ilimitada. En cambio, este mismo origen hace que la línea celular presente aneuploidía, influyendo en sus condiciones fisiológicas y distanciándolas del funcionamiento normal de una célula euploide (160,175).

El desarrollo de las primeras células madre pluripotentes inducidas (iPSC) murinas por Takahasi y Yamanaka en 2006 revolucionó el ámbito de la investigación en lo que se refiere a modelos celulares. Esta técnica se basa en la reprogramación de células somáticas mediante la transfección de varios factores de transcripción (178). Más tarde, consiguieron generar iPSC desde fibroblastos humanos, con propiedades similares a las células madre embrionarias y capacidad de diferenciarse a las distintas capas germinales (179). La generación de hiPSC en el campo de la PD se ha centrado en desarrollar modelos neuronales derivados de pacientes, principalmente con mutaciones asociadas a la enfermedad, con el objetivo de dilucidar mecanismos patológicos, testar potenciales agentes farmacológicos e investigar sobre una posible terapia celular (160,161,180–183). En nuestro laboratorio, se generaron hiPSC a partir de fibroblastos control, que fueron diferenciadas en un proceso de dos fases hasta alcanzar el fenotipo de neurona madura, pasando por el estado de célula madre neural (NSC) (163). La posibilidad de trabajar con estas hNSC suponía una mejora respecto al modelo neuronal anterior, la línea celular SH-SY5Y, que tiene origen neuroblástico. A diferencia de esta última, las hNSC proporcionan un modelo celular euploide con capacidad de diferenciación a neurona madura, simulando el proceso de neurogénesis acontecido en el desarrollo cerebral.

Tras la semana de diferenciación de las hNSC a neurona, al igual que en la línea SH-SY5Y, se observaron cambios morfológicos donde las neuronas maduras presentaban gran polaridad, formando notables agrupaciones de los somas y extendiendo largas proyecciones ramificadas. Estas neuritas lograban formar estructuras similares a las redes neuronales con conexiones entre ellas (Figura III.3 A). En la cuantificación de estos parámetros, se determinó un incremento significativo en la longitud y la ramificación de las neuritas al comparar las neuronas diferenciadas con las hNSC previas a la diferenciación (Figura III.3 B). Estas largas neuritas necesitan una remodelación del citoesqueleto para crecer y mantenerse; en consecuencia, los niveles de mRNA de TUBB3 se multiplicaron de forma significativa en las neuronas maduras (Figura III.3 C).

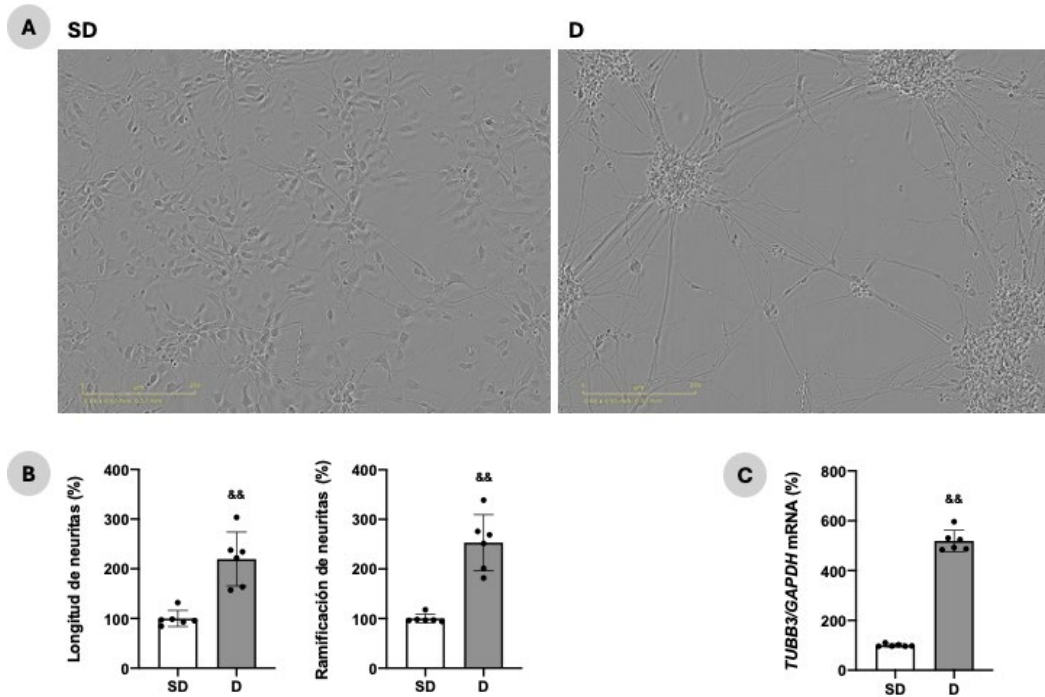


Figura III.3. Diferenciación de las células madre neurales humanas (hNSC). **A)** A la izquierda se muestra una imagen representativa de las células hNSC en el momento de comienzo de la diferenciación. A la derecha se muestra una imagen representativa de las células tras los 7 días de diferenciación. Las imágenes se tomaron con el software del equipo Incucyte®. **B)** Parámetros extraídos con el módulo Neurotrack del sistema Incucyte® para el análisis de la diferenciación neuronal. Cada medida extraída de un pocillo concreto se normaliza frente a la cuantificación celular existente a tiempo cero en este. Longitud de neuritas; SD: 100,0 ± 16,3 (6); D: 219,6 ± 54,1 (6). Ramificación de neuritas; SD: 100,0 ± 8,9 (6); D: 253,0 ± 56,4 (6). **C)** Niveles de mRNA del marcador neuronal *TUBB3* determinados por qPCR normalizados por *GAPDH*. SD: 100,0 ± 5,6 (6); D: 518,9 ± 42,9 (6). Los valores medios de las células sin diferenciar se consideran el 100 %. Prueba Mann Whitney: && $p \leq 0,01$ (vs. SD). SD, sin diferenciar; D, diferenciadas; *TUBB3*, β III-tubulina; *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

La capacidad de diferenciación de ambos modelos celulares es fundamental para el desarrollo de esta tesis, dado que el objetivo principal es el estudio del efecto de la ART sobre el desarrollo neuronal, que supone la diferenciación de células madre neurales a neuronas maduras. Tanto en la línea SH-SY5Y diferenciada como en las neuronas derivadas de hNSC se consiguió formar una red con largas extensiones de neuritas, aumentando la expresión del mRNA de la *TUBB3*, uno de los principales marcadores neuronales.

III.2. Efecto de la azidotimidina sobre la diferenciación neuronal en el modelo de neuroblastoma humano SH-SY5Y

La terapia antirretroviral ha supuesto un gran avance en la lucha contra el HIV, ya que ha aumentado la esperanza de vida de las personas afectadas, además de evitar la trasmisión materno-fetal. La zidovudina o azidotimidina (AZT), primera droga antirretroviral autorizada, pertenece a la clase de fármacos NRTI que afectan a la replicación del virus por inhibición de la transcriptasa reversa. Este fármaco, ampliamente utilizado para el tratamiento del HIV, se ha asociado con alteraciones de la homeostasis mitocondrial produciendo disfunción del sistema OXPHOS. A su vez, los NRTI también se han relacionado con trastornos neurológicos que podrían estar causados por su toxicidad mitocondrial.

Para estudiar los efectos del AZT, se empleó una concentración similar a la máxima encontrada en plasma humano que se encuentra en torno a 5 μ M (157,184). También se incluyó una concentración diez veces superior.

III.2.1. Parámetros funcionales de la mitocondria

El tratamiento con AZT a 5 μ M durante la diferenciación de la línea SH-SY5Y no afectó a los niveles de ATP mitocondrial (Figura III.4 A). Asimismo, esta misma dosis de fármaco no alteró el consumo de oxígeno respecto al control. Sin embargo, al aumentar la concentración de AZT, la respiración endógena disminuyó de forma significativa (Figura III.4 B). Alteraciones en la respiración mitocondrial causada por AZT se han observado en modelos neuronales y otros tipos celulares con concentraciones variables de fármaco (141,185–187). De hecho, estudios previos han demostrado que la dosis de 5 μ M afecta al consumo de oxígeno en la línea SH-SY5Y diferenciada con 5 mM de galactosa, en ausencia de glucosa (107). Por tanto, a pesar de que no se observaron cambios significativos en los parámetros funcionales con la concentración de 5 μ M, estos resultados muestran que el AZT puede afectar a la actividad mitocondrial de neuronas derivadas de SH-SY5Y en presencia del fármaco.

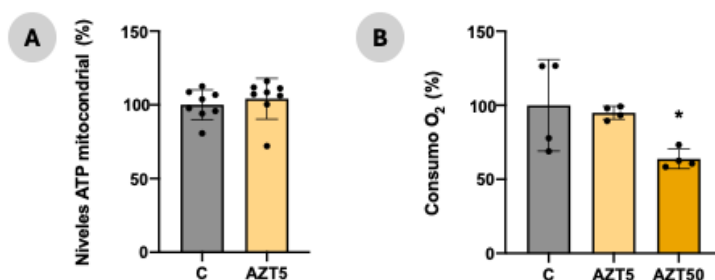


Figura III.4. Parámetros funcionales mitocondriales de la línea SH-SY5Y tras la diferenciación a neurona en presencia de AZT. A) Niveles de ATP mitocondrial por célula viable. C: 100,0 ± 10,2 (8); AZT5: 104,1 ± 13,8 (8). **B)** Respiración endógena por mg de proteína. C: 100,0 ± 31,0 (4); AZT5: 95,0 ± 4,5 (4); AZT50: 63,8 ± 6,6 (4). Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. Prueba ANOVA + Dunnett: * p ≤ 0,05 (vs. C). AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M.

III.2.2. Estudio de la diferenciación neuronal

La diferenciación a neurona de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y se analizó con el módulo Neurotrack del sistema Incucyte®. El análisis de los parámetros proporcionados determinó que ambas concentraciones de AZT reducían significativamente tanto la extensión como la ramificación de las neuritas comparado con la línea diferenciada sin tratar (Figura III.5).

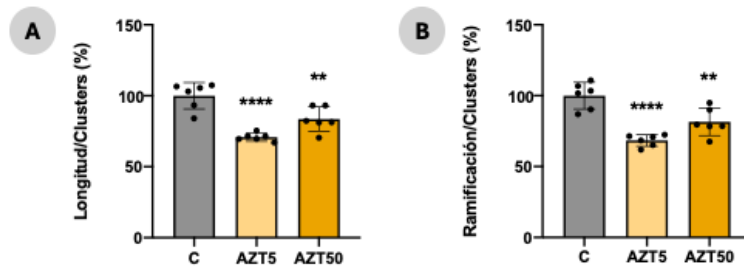


Figura III.5. Análisis de la diferenciación neuronal de la línea SH-SY5Y en presencia de AZT. A) Longitud de neuritas/*cell-body clusters*. C: 100,0 ± 9,4 (6); AZT5: 70,8 ± 2,8 (6); AZT50: 83,6 ± 8,6 (6). **B)** Ramificación de neuritas/*cell-body clusters*. C: 100,0 ± 9,4 (6); AZT5: 68,4 ± 4,1 (6); AZT50: 81,5 ± 9,7 (6). Ambos parámetros fueron analizados con el módulo Neurotrack del sistema Incucyte®. Cada medida extraída de un pocillo concreto se normaliza frente a la cuantificación celular existente a tiempo cero en este. Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. Prueba ANOVA + Dunnett: ** $p \leq 0,01$ (vs. C); **** $p < 0,0001$ (vs. C). AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μM ; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μM .

El crecimiento de los axones se asocia a una redistribución del citoesqueleto. Como ya se observó previamente, la extensión de neuritas durante la diferenciación de la línea SH-SY5Y produce un aumento de los niveles de mRNA de proteínas que forman parte de los microtúbulos (Figura III.6). La TUBB3 permite la orientación y el mantenimiento de los axones; a su vez, la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) parece estar involucrada en endurecer y estabilizar estos microtúbulos. Ambos marcadores neuronales muestran incrementos significativamente más bajos de los niveles de mRNA en las células diferenciadas en presencia de 5 μM de AZT respecto al control diferenciado (Figura III.6).

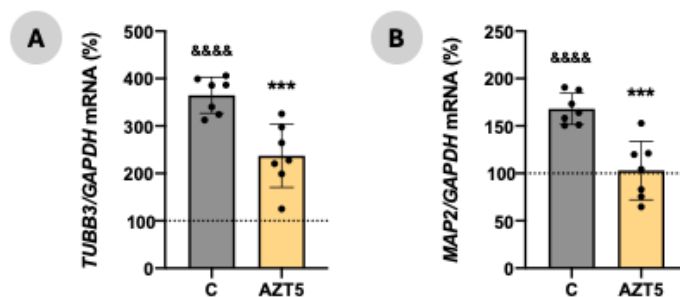


Figura III.6. Niveles de mRNA de marcadores neuronales de la línea SH-SY5Y tras la diferenciación a neurona en presencia de AZT. A) Niveles de mRNA de *TUBB3* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. SD: $100 \pm 12,4$ (7); C: $364,8 \pm 38,2$ (7); AZT5: $237,1 \pm 66,6$ (7). **B)** Niveles de mRNA de *MAP2* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. SD: $100 \pm 14,0$ (7); C: $168,0 \pm 16,5$ (7); AZT5: $103,1 \pm 30,9$ (7). Los valores medios de las células sin diferenciar sin tratar (SD) se consideran el 100 %, representado por la línea de puntos. Prueba t de Student desapareado: **** $p < 0,0001$ (vs. SD); *** $p \leq 0,001$ (vs. C). AZT, azidotimidina; *TUBB3*, β III-tubulina; *MAP2*, proteína asociada a microtúbulos 2; *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M.

Múltiples estudios acerca de xenobióticos OXPHOS han confirmado sus efectos sobre la diferenciación de distintos tipos celulares, incluyendo la generación de neuronas (107,188–190). De hecho, varios tóxicos mitocondriales han sido utilizados para estudiar y modelar la disfunción neuronal, tanto en la línea SH-SY5Y como en otros modelos celulares (112,113,191–193). Del mismo modo, existen estudios sobre AZT donde se muestra que este fármaco puede producir alteraciones estructurales y funcionales en modelos neuronales (107,157,194). En nuestro caso, las alteraciones morfológicas observadas tras la diferenciación de la línea SH-SY5Y en presencia de AZT, caracterizadas por una menor extensión y ramificación de las neuritas, se asociaron a una disminución de los niveles de mRNA de marcadores neuronales en comparación con las células control.

A pesar de no obtener una evidencia clara de afectación mitocondrial a bajas concentraciones de AZT en las células SH-SY5Y, podría ser que los defectos observados durante la obtención de neuronas maduras estén relacionados con una disfunción mitocondrial, dada la cantidad de estudios que asocian los NRTI con problemas en la mitocondria. El uso de una línea de origen metastásico podría influir en el metabolismo celular, ya que estas células presentan mayor actividad glucolítica, pudiendo ser menos dependientes del sistema OXPHOS (102). En consecuencia, estas alteraciones mitocondriales podrían tener un menor impacto. En resumen, nuestros resultados sugieren que concentraciones de AZT similares a las encontradas en el plasma de pacientes tratados podrían tener efectos en la diferenciación neuronal, posiblemente asociados a una afectación de la homeostasis mitocondrial.

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y es un modelo celular ampliamente utilizado, con la ventaja de tener fondo genético humano. Estas células se encuentran a disposición de toda la comunidad científica, de hecho, nuestro laboratorio tiene una extensa experiencia en su uso. Sin embargo, las células SH-SY5Y tiene origen tumoral y, a pesar de su estabilidad genética, presentan determinadas aberraciones cromosómicas y trisomía del cromosoma 7. Por ello, tras el desarrollo y la optimización de la diferenciación de hNSC en el laboratorio, se decidió continuar con los experimentos en esta nueva línea generada. Como se describe previamente, estas células derivan de una línea iPSC obtenida en nuestro grupo a partir de fibroblastos control. En consecuencia, existe una variabilidad en los estudios con hNSC inherente al origen o la procedencia de la línea. Aunque los experimentos con hNSC suelen ser más costosos comparados con las células SH-SY5Y debido a las condiciones de mantenimiento de este tipo de línea celular, su origen euploide y su capacidad de diferenciación la convierten en un modelo celular idóneo para el desarrollo de esta tesis. Pocos estudios publicados emplean el modelo de NSC para investigar los efectos de los antirretrovirales, incluido el AZT. Al realizar la búsqueda con los términos “((neural stem cell) OR (NSC)) AND (antiretroviral)” en la base de datos PubMed, se encuentran en torno a 100 resultados; tras restringirla a AZT, únicamente se obtienen 16 referencias. El uso de estas células permite estudiar los efectos del AZT sobre un proceso de neurogénesis más similar al fisiológico, proporcionando unas características bioquímicas y funcionales más semejantes a las de una neurona.

III.3. Efecto de la azidotimidina sobre la diferenciación neuronal en el modelo de células madre neurales

Tras confirmar alteraciones en la diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y debidas a la presencia de AZT, se continuaron los estudios en el modelo celular hNSC. Dado que la ART consta de una combinación de varios fármacos con diferentes dianas sobre el HIV, se evaluó el efecto de dos clases adicionales de antirretrovirales en la diferenciación de las hNSC a neurona madura. Se emplearon el atazanavir (ATV) como inhibidor de la proteasa viral y el raltegravir (RAL) como inhibidor de la integrasa viral, exponiendo las células a concentraciones similares a las máximas encontradas en plasma humano que se encuentran en torno a 3 μM y 15 μM , respectivamente (195–198). También se incluyó una concentración diez veces superior para ambos fármacos. En ningún caso se obtuvo un efecto determinante sobre parámetros mitocondriales ni una disminución en la diferenciación neuronal (Ver resultados en Anexo 1.). Teniendo en cuenta estos resultados, junto con el costoso uso de esta línea celular, la mayoría de los experimentos se centraron en el antirretroviral AZT, del cual constan evidencias suficientes sobre sus efectos secundarios sobre la mitocondria.

III.3.1. Parámetros bioquímicos y funcionales de la mitocondria

La diferenciación de células madre a células diferenciadas maduras conlleva un cambio metabólico desde la glucólisis a la respiración mitocondrial. Esta transición se suele asociar a la maduración y la biogénesis mitocondrial, que se acompaña de un aumento de niveles de mtDNA, entre otros parámetros. Sin embargo, en nuestro caso, la diferenciación de hNSC a neurona madura supuso una disminución en los niveles de mtDNA (Figura III.7). Este resultado concuerda con otros estudios que muestran un número de copias invariable o disminuido tras la diferenciación a neurona (102,107,199,200). Por el contrario, algunas investigaciones sugieren que esta transformación metabólica conlleva variaciones dinámicas en el número de copias de mtDNA a lo largo de la diferenciación (94,201). Por tanto, se debería tener en cuenta el momento específico en que se determinan los niveles de mtDNA durante la diferenciación hacia un destino celular definitivo y la maduración completa de la línea. Por otro lado, la normalización con respecto a la masa celular total también puede variar los resultados de parámetros como la masa mitocondrial o las copias de mtDNA (199).

Tras siete días de exposición a AZT durante la diferenciación de las hNSC, se observó una menor disminución en los niveles de mtDNA proporcional a la concentración de fármaco, siendo este incremento estadísticamente significativo con la dosis alta (Figura III.7).

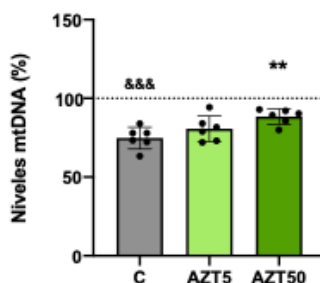


Figura III.7. Niveles de mtDNA de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. Datos determinados por qPCR. SD: $100,0 \pm 10,5$ (6); C: $74,8 \pm 7,0$ (6); AZT5: $80,7 \pm 8,2$ (6); AZT50: $88,4 \pm 4,9$ (6). Los valores medios de las células sin diferenciar sin tratar (SD) se consideran el 100 % representado por la línea de puntos. Prueba t de Student despareado: &&& $p \leq 0,001$ (vs. SD). Prueba ANOVA + Dunnett: ** $p \leq 0,01$ (vs. C). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; mtDNA, DNA mitocondrial; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μM ; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μM .

Desde los primeros estudios sobre los posibles efectos secundarios de la exposición a AZT, este se asoció a un descenso en el número de copias del mtDNA por su afinidad por la polimerasa mitocondrial (135). No obstante, estudios posteriores evidenciaron alteraciones en el funcionamiento OXPHOS en ausencia de depleción e, incluso, con un aumento de los niveles de mtDNA en modelos neuronales y otros tipos celulares (107,137,141,202,203). En concreto, un estudio llevado a cabo en células HeLa mostró variaciones en la cantidad de mtDNA causadas por la exposición a 800 μM de AZT en función del tiempo de exposición; el

contenido de mtDNA aumentaba significativamente en los pases 5 y 11, volvía a unos niveles similares al control en el pase 35, y disminuía de forma significativa en el pase 71. Los autores propusieron que este aumento transitorio del número de copias del mtDNA podría ocurrir como un evento compensatorio temprano ante los efectos del AZT que, tras la exposición crónica, conduce a una pérdida del mtDNA (204). Resultados similares se obtuvieron en las células K562 expuestas a AZT durante 72 días, aunque en este caso no se produjo depleción en los pases avanzados (205). En adelante, se han determinado otras dianas del AZT como transportadores de nucleósidos, quinasas o complejos del sistema OXPHOS (137,139,206).

Para evaluar los efectos del AZT sobre los RNA mitocondriales, se analizaron los niveles de expresión de algunos genes codificados en el mtDNA mediante qPCR. A pesar de que en ningún caso los resultados mostraron diferencias significativas, el análisis de la expresión del gen *MT-RNR1*, codificante de la subunidad del rRNA 12S del ribosoma mitocondrial, mostró una tendencia al alza en aquellas células diferenciadas en presencia de la concentración más elevada de AZT (Figura III.8 A). Asimismo, los niveles de mRNA tanto de *MT-ND1* como de *MT-ND6*, ambas subunidades del CI codificadas en el mtDNA, parecían aumentar levemente en las neuronas diferenciadas tratadas con esta misma dosis de AZT (Figura III.8 B, C).

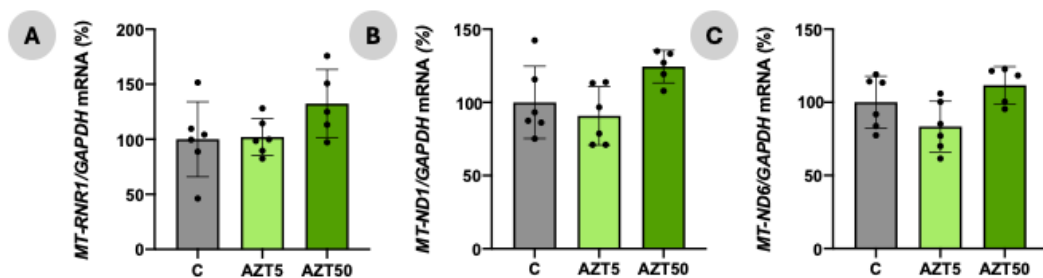


Figura III.8. Niveles de mRNA de genes codificados en el mtDNA de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. **A)** Niveles de mRNA de *MT-RNR1* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. C: 100,0 ± 34,0 (6); AZT5: 102,2 ± 16,6 (6); AZT50: 132,4 ± 31,1 (5). **B)** Niveles de mRNA de *MT-ND1* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. C: 100,0 ± 24,7 (6); AZT5: 90,8 ± 19,9 (6); AZT50: 124,5 ± 11,1 (5). **C)** Niveles de mRNA de *MT-ND6* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. C: 100,0 ± 17,8 (6); AZT5: 83,4 ± 17,3 (6); AZT50: 111,7 ± 12,7 (5). Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; mtDNA, DNA mitocondrial; mRNA, RNA mensajero; *MT-RNR1*, 12S rRNA; *MT-ND1*, NADH deshidrogenasa 1; *MT-ND6*, NADH deshidrogenasa 6; *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μM; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μM.

Posteriormente, se realizó un estudio de RNA-seq que permitió comprobar la expresión de la mayoría de las subunidades de la cadena respiratoria (en el Anexo 2. se puede ver la expresión génica diferencial de todas las subunidades identificadas en el estudio de RNA-seq). La exposición a AZT durante la diferenciación neuronal de la línea hNSC causó alteraciones significativas en la expresión de algunos genes OXPHOS codificados tanto en el mtDNA como en el nDNA (Figura III.9). A nivel general, se observó un aumento en la

Resultados y discusión

expresión de los genes mitocondriales, junto con una reducción de la expresión de los genes nucleares. En concreto, el tratamiento con 50 μM de AZT supuso un incremento significativo en los niveles de mRNA de todas las subunidades codificadas en la mitocondria para el CI, así como del gen *MT-ATP8* codificante para una subunidad de la ATP sintasa; también se observa un aumento en los niveles de *MT-ATP6* que no alcanza significancia estadística. En cambio, la diferenciación en presencia de 50 μM de AZT condujo a una reducción significativa de algunos genes nucleares codificantes de subunidades del sistema OXPHOS, aproximadamente un tercio de los genes del CI y del CIV, la mitad de los genes del CIII y del CV, y la subunidad SDHA del CII.

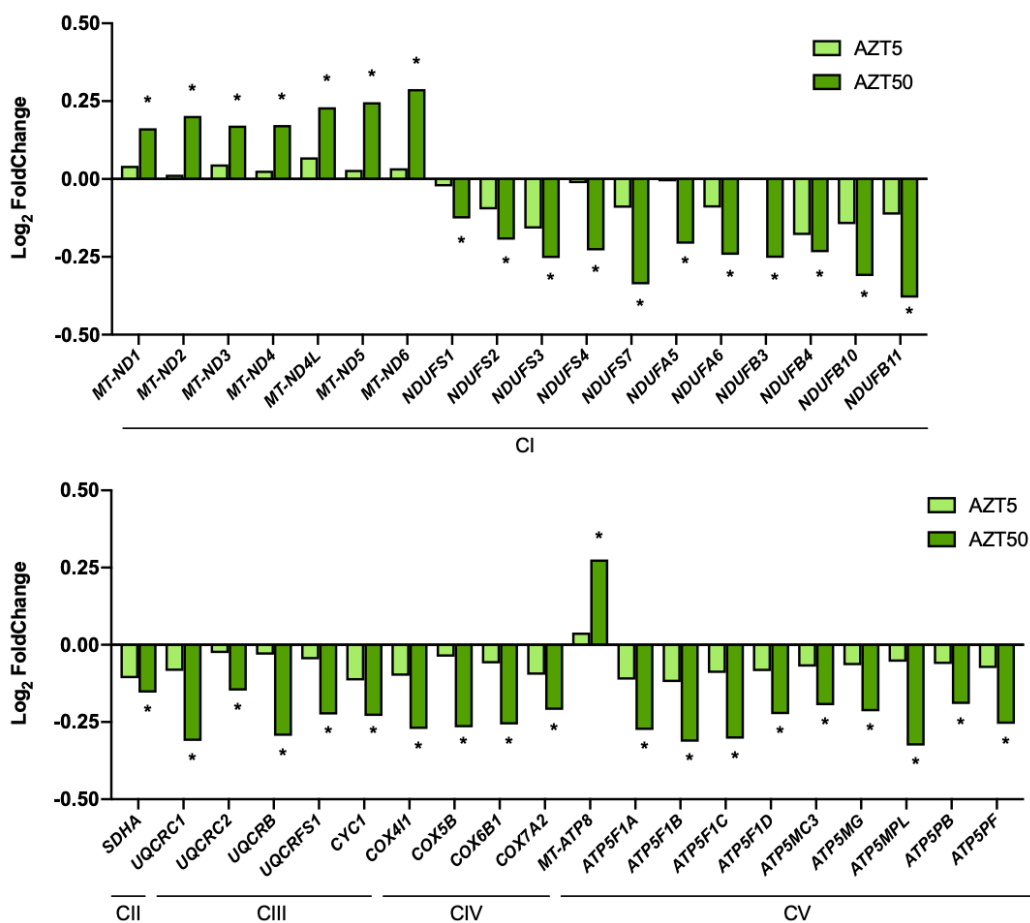


Figura III.9. Expresión génica diferencial de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. Se representa la magnitud del cambio en \log_2 obtenida mediante RNA-seq de la expresión de aquellos genes de las subunidades del sistema OXPHOS que mostraron diferencias significativas (p -valor ajustado $\leq 0,05$) comparado con las hNSC diferenciadas en ausencia del fármaco. C (3); AZT5 (3); AZT50 (3). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μM ; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μM .

Para comprobar si los resultados obtenidos en los niveles de mRNA se traducían en variaciones en la cantidad de proteína, se evaluaron mediante western blot algunas subunidades del sistema OXPHOS. En efecto, aquellas subunidades codificadas en el núcleo mostraban una tendencia decadente, alcanzando diferencias significativas para NDUFB8 y SDHA en aquellas células diferenciadas en presencia de una dosis alta de AZT (Figura III.10 A-D). Del mismo modo, la subunidad COX1 codificada en la mitocondria mostraba un aumento, siendo significativo en las neuronas expuestas a una concentración elevada de AZT (Figura III.10 A, E).

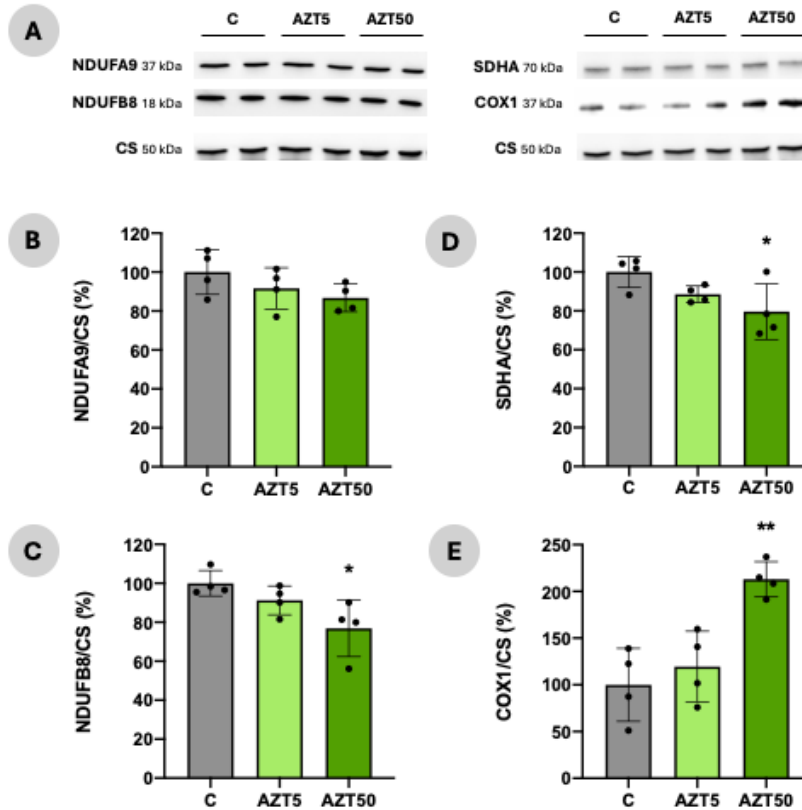


Figura III.10. Determinación de la cantidad de proteína de subunidades de distintos complejos del sistema OXPHOS en las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. A) Imágenes representativas de la inmunodetección por western blot de subunidades de complejos del sistema OXPHOS. **B)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de NDUFA9 normalizado por CS. C: $100,0 \pm 11,4$ (4); AZT5: $91,7 \pm 10,6$ (4); AZT50: $86,7 \pm 7,1$ (4). **C)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de NDUFB8 normalizado por CS. C: $100,0 \pm 6,5$ (4); AZT5: $91,3 \pm 7,4$ (4); AZT50: $76,9 \pm 14,6$ (4). **D)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de SDHA normalizado por CS. C: $100,0 \pm 8,0$ (4); AZT5: $88,6 \pm 4,2$ (4); AZT50: $79,6 \pm 14,3$ (4). **E)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de COX1 normalizado por CS. C: $100,0 \pm 39,0$ (4); AZT5: $119,5 \pm 37,8$ (4); AZT50: $212,9 \pm 18,9$ (4). Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. Prueba ANOVA + Dunnett: * $p \leq 0,05$ (vs. C); ** $p \leq 0,01$ (vs. C). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; NDUFA9, NADH:ubiquinona oxidorreductasa subunidad A9; NDUFB8, NADH:ubiquinona oxidorreductasa subunidad B8; SDHA, succinato deshidrogenasa subunidad A; CS, citrato sintasa; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M.

Con el objetivo de buscar explicación a los resultados observados, se analizaron los niveles de mRNA obtenidos mediante RNA-seq de genes nucleares codificantes de proteínas implicadas en alguno de los procesos de la expresión mitocondrial. La exposición a una concentración elevada de AZT durante la diferenciación neuronal provocó una reducción de los niveles de mRNA en muchos de los genes que mostraban diferencias significativas respecto al control sin tratar, ya fueran proteínas implicadas en la transcripción o la traducción mitocondrial, el procesamiento y la degradación del mRNA mitocondrial o la degradación de proteínas mitocondriales (Ver resultados en Anexo 3). Dado que no se produjo un aumento en los niveles de mRNA de proteínas implicadas en la transcripción, probablemente el incremento en la cantidad de mRNA mitocondrial sea consecuencia de alteraciones en el procesamiento o de una disminución de la tasa de degradación, lo que provocaría la acumulación de este mRNA. Asimismo, un proceso semejante podría estar ocurriendo a nivel de las proteínas mitocondriales, lo cual explicaría el aumento observado en la cantidad de COX1.

Por último, se evaluó si las variaciones en la expresión de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS podían tener repercusión en la función de estos. Los resultados mostraron que la exposición a AZT durante la diferenciación neuronal no provocó alteraciones en la actividad específica del CIV (Figura III.11 A). Además, como marcador de contenido mitocondrial, se determinó la actividad de la citrato sintasa (CS) que se trata de una enzima de la matriz mitocondrial codificada en el nDNA que no forma parte del sistema OXPHOS. En este caso, el tratamiento con AZT tampoco afectó a la actividad específica de la CS (Figura III.11 B).

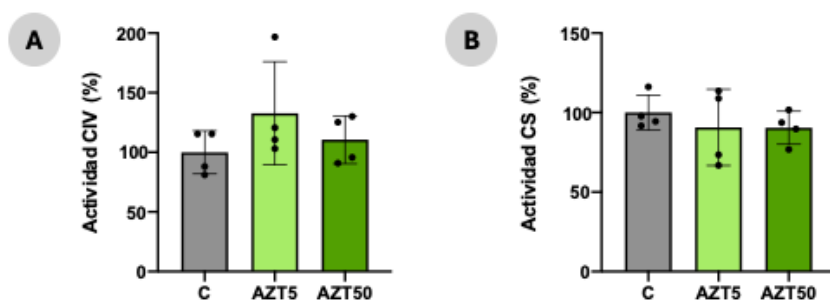


Figura III.11. Actividad enzimática mitocondrial en las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. A) Actividad específica del CIV. C: $100,0 \pm 18,0$ (4); AZT5: $132,8 \pm 43,3$ (4); AZT50: $110,5 \pm 20,1$ (4). **B)** Actividad específica de la CS. C: $100,0 \pm 11,1$ (4); AZT5: $90,7 \pm 24,0$ (4); AZT50: $90,5 \pm 10,4$ (4). Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; CIV, complejo IV; CS, citrato sintasa; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M.

La existencia de una coregulación entre la expresión mitocondrial y nuclear de genes codificantes para el sistema OXPHOS se considera un canon bastante aceptado. Sin embargo, algunos artículos han demostrado que, en estado estacionario, los niveles de mRNA de la mayoría de las subunidades codificadas en la mitocondria suelen ser más elevados que los mRNA codificados en el núcleo (207–209). Asimismo, se han identificado diferencias entre las cantidades de mRNA de los genes OXPHOS codificados en el mtDNA (207,210,211). Teniendo en cuenta que el mtDNA se transcribe de forma policistónica, múltiples factores pueden estar implicados en estas variaciones, como modificaciones postranscripcionales, estabilidad y tasa de degradación de los mRNA, entre otros. (209,210). Concretamente, un estudio sobre la expresión en el cerebro primitivo, que incluye el hipotálamo, los ganglios basales y la amígdala, mostró una correlación negativa entre la expresión génica de las subunidades del mtDNA y del nDNA. Los autores proponen que esta coexpresión negativa mtDNA-nDNA actúa como un mecanismo de control para regular el sistema OXPHOS ante los altos niveles de transcripción del mtDNA, dado el carácter altamente oxidativo de estas regiones cerebrales (212). Cabe destacar que, en determinadas condiciones patológicas como la PD o la enfermedad de Alzheimer, se han observado aumentos en los niveles de mRNA de algunas subunidades codificadas en la mitocondria, pero no de otras. En algunos casos, esto se asocia con el mantenimiento o la reducción de los niveles de mRNA de las subunidades codificadas en el núcleo (213–216). Del mismo modo la exposición a cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis mitocondrial de proteínas, provocó un aumento de la cantidad de mRNA codificado en la mitocondria, junto con alteraciones en la expresión de genes nucleares de las subunidades OXPHOS (217,218). En concreto, en la línea SH-SY5Y la inhibición de la síntesis proteica provocó una disminución de la actividad del CIV, un aumento en el mtDNA y el mRNA mitocondrial, y una caída tanto en los niveles de mRNA como en la cantidad de proteína de algunas subunidades de los complejos codificadas en el núcleo (218).

En cuanto a los efectos reportados del AZT sobre la expresión mitocondrial, la búsqueda bibliográfica identificó un número limitado de estudios realizados al respecto. Se ha informado que una exposición larga de las células HeLa, entorno al pase 36, a 800 μ M de AZT causó un aumento de la expresión de múltiples genes nucleares y mitocondriales codificantes de subunidades OXPHOS, acompañado de un aumento transitorio de los niveles de mtDNA (204). Asimismo, el tratamiento de células linfoblastoides K562 con AZT durante 74 días provocó un aumento transitorio tanto de los niveles de mtDNA como de los niveles de mRNA mitocondriales (205). En ambos casos, proponen que estas alteraciones cursan como compensación a los efectos producidos por el AZT sobre la mitocondria. Por otro lado, el tratamiento con 5 μ M de AZT durante la diferenciación neuronal de la línea SH-SY5Y no alteró la cantidad de las subunidades SDHA y COX1 del sistema OXPHOS (107). En cambio, la exposición a AZT de las células H9c2 de cardiomioblastos de rata hasta el pase 39 mostró alteraciones en la cantidad de proteína relativa de COX1/SDHA, asociadas a un déficit en el consumo de oxígeno (185). En cuanto a la actividad de los complejos OXPHOS, el tratamiento

Resultados y discusión

de mioblastos de origen humano con concentraciones crecientes de AZT, hasta 200 μM , no provocó cambios en la actividad del CIV ni en la actividad de la CS. Únicamente se observó una caída significativa de la actividad del CIV en las células tras 7 días de diferenciación en presencia de 5 mM de AZT (219). Por último, el tratamiento de mitocondrias aisladas de células de hepatoma HepG2 con 10 o 50 μM de AZT disminuyó significativamente la actividad del CI, probablemente como consecuencia de una incapacidad para fosforilar la subunidad NDUFB11 causada por la exposición a AZT. Los autores sugieren que esta inhibición de la fosforilación podría deberse a la interacción del fármaco con el CI (139).

Para determinar el impacto global del AZT sobre la funcionalidad mitocondrial, se analizaron diversos parámetros del sistema OXPHOS. El tratamiento con AZT durante la diferenciación neuronal de las hNSC provocó una disminución en los niveles de ATP mitocondrial, de forma significativa para aquellas células expuestas a la dosis alta (Figura III.12 A). Asimismo, este déficit en la síntesis de ATP se asoció a una reducción significativa de la respiración endógena en las hNSC diferenciadas en presencia de 50 μM de AZT (Figura III.12 B).

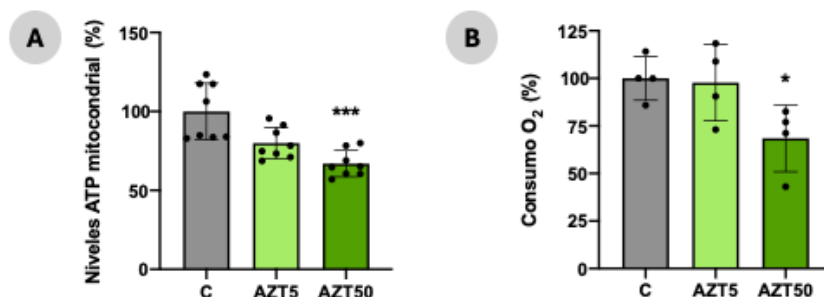


Figura III.12. Parámetros funcionales mitocondriales de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. A) Niveles de ATP mitocondrial por célula viable. C: $100,0 \pm 17,9$ (8); AZT5: $80,0 \pm 10,0$ (8); AZT50: $66,9 \pm 8,4$. Prueba Kruskal-Wallis + Dunn: *** $p \leq 0,001$ (vs. C). **B)** Respiración endógena por mg de proteína. C: $100,0 \pm 11,6$ (4); AZT5: $97,7 \pm 20,1$ (4); AZT50: $68,5 \pm 17,6$ (4). Prueba ANOVA + Dunnett: * $p \leq 0,05$ (vs. C). Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μM ; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μM .

Múltiples estudios han evaluado los efectos de diversos fármacos antirretrovirales sobre la funcionalidad del sistema OXPHOS en modelos neuronales u otros tipos celulares. En células cerebrocorticales de rata, el tratamiento con 10 μM de AZT durante 7 días no afectó a los niveles de ATP de las neuronas expuestas, aunque si mostraban daños asociados a una disminución de marcadores neuronales (MAP2; sinaptofisina, SYP) (194). Otros estudios realizados en la línea HMC3, que posee características similares a cultivos primarios de microglía, revelaron reducciones leves pero significativas en los niveles de ATP (aproximadamente 8 %) después de 24 h de tratamiento con 6 μM de AZT (220). La exposición al fármaco de otros modelos celulares, en concreto las células de hepatoma

humano HepG2, disminuyó significativamente los niveles de ATP tras 24 y 120 h de tratamiento con 7,1 μM de AZT, sin causar cambios significativos en los niveles de mtDNA (221). Por otro lado, la exposición durante 5 días a 100 μM de AZT causó una disminución del consumo de oxígeno basal en neuronas corticales primarias (141). Los terminales nerviosos aislados del estriado de rata también mostraron déficits en la respiración mitocondrial tras una incubación de 2 h con 25 μM de AZT (186). Asimismo, la línea SH-SY5Y redujo la respiración endógena en las neuronas obtenidas tras el tratamiento con 5 μM de AZT durante la diferenciación (107). Otros tipos celulares, como la línea H9c2 derivada de tejido embrionario de corazón de rata o la línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1, mostraron una disminución significativa del consumo de oxígeno basal en la mayoría de los pases analizados tras exposiciones prolongadas (hasta pase 36 en H9c2 y pase 33 en HL-1) a concentraciones de 50 o 10 μM de AZT, respectivamente, asociado a una morfología mitocondrial aberrante (185). Por último, neuronas derivadas de iPSC de pacientes de PD idiopático también exhibieron una caída significativa en los parámetros de respiración mitocondrial, junto con un aumento en la cantidad de mitocondrias deformadas (222).

Según nuestros resultados y teniendo en cuenta estudios previos realizados sobre AZT, el fármaco podría interrumpir de algún modo la funcionalidad del CI, ya sea por interacción directa o por mecanismos indirectos. En consecuencia, esta alteración produciría un deterioro del funcionamiento del sistema OXPHOS que se reflejaría en una reducción del consumo de oxígeno y la síntesis de ATP mitocondrial. Como mecanismo compensatorio, la célula aumentaría el número de copias del mtDNA e incrementaría tanto los niveles de mRNA mitocondrial como la cantidad de proteína de estas subunidades OXPHOS. Además, la administración de AZT parece impactar en la fisiología y el metabolismo celular provocando una disminución de la expresión de genes nucleares codificantes tanto para subunidades OXPHOS como para proteínas implicadas en la expresión mitocondrial. En definitiva, a pesar de no poder determinar con exactitud el mecanismo de acción o la diana concreta del AZT sobre la mitocondria, está claro que el fármaco afecta a la homeostasis mitocondrial provocando alteraciones en la funcionalidad del sistema OXPHOS, como indica la disminución observada tanto en la síntesis de ATP mitocondrial como en el consumo de oxígeno.

III.3.2. Estudio de la morfología neuronal

La neurogénesis está asociada a determinados cambios morfológicos desde la hNSC a la neurona que implican una reorganización del citoesqueleto para la proyección axonal y la formación de conexiones neuronales. Estas transformaciones estructurales asociadas a la diferenciación neuronal dependen de un correcto funcionamiento mitocondrial principalmente por su aporte energético y otras funciones críticas. Por tanto, dado que la exposición a AZT produjo alteraciones mitocondriales, se decidió evaluar posibles defectos en la morfología neuronal.

Resultados y discusión

El estudio de la diferenciación a neurona de la línea hNSC mediante el módulo Neurotrack evidenció una reducción significativa tanto en la extensión como en la ramificación de las neuritas, en ambas concentraciones de AZT empleadas (Figura III.13).

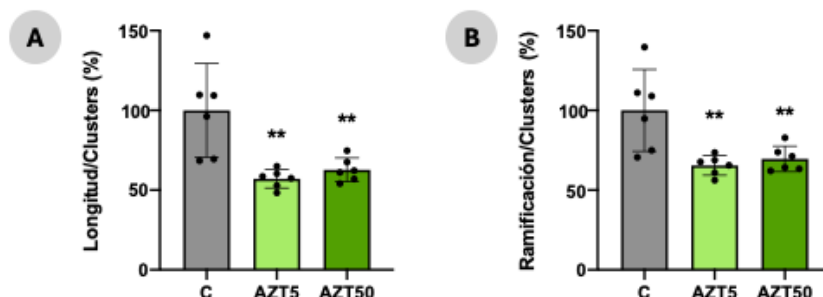


Figura III.13. Análisis de la diferenciación neuronal de las hNSC en presencia de AZT. A) Longitud de neuritas/*cell-body clusters*. C: 100,0 ± 29,4 (6); AZT5: 57,1 ± 5,8 (6); AZT50: 62,7 ± 7,5 (6). **B)** Ramificación de neuritas/*cell-body clusters*. C: 100,0 ± 25,7 (6); AZT5: 65,5 ± 6,2 (6); AZT50: 69,5 ± 8,0 (6). Ambos parámetros fueron analizados con el módulo Neurotrack del sistema Incucyte®. Cada medida extraída de un pocillo concreto se normaliza frente a la cuantificación celular existente a tiempo cero en este. Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. Prueba ANOVA + Dunnett: ** p ≤ 0,01 (vs. C). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 µM; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 µM.

Posteriormente, se realizó la inmunofluorescencia mediante el marcaje de β III-tubulina, como componente clave en el citoesqueleto de las neuronas (Figura III.14). Aparentemente tanto la cantidad como el tamaño de las agrupaciones de cuerpos celulares o *clusters* disminuirían en presencia del fármaco. Asimismo, el grosor de las neuritas parecería menor, y se podría apreciar alguna neurita con morfología aberrante o truncada.

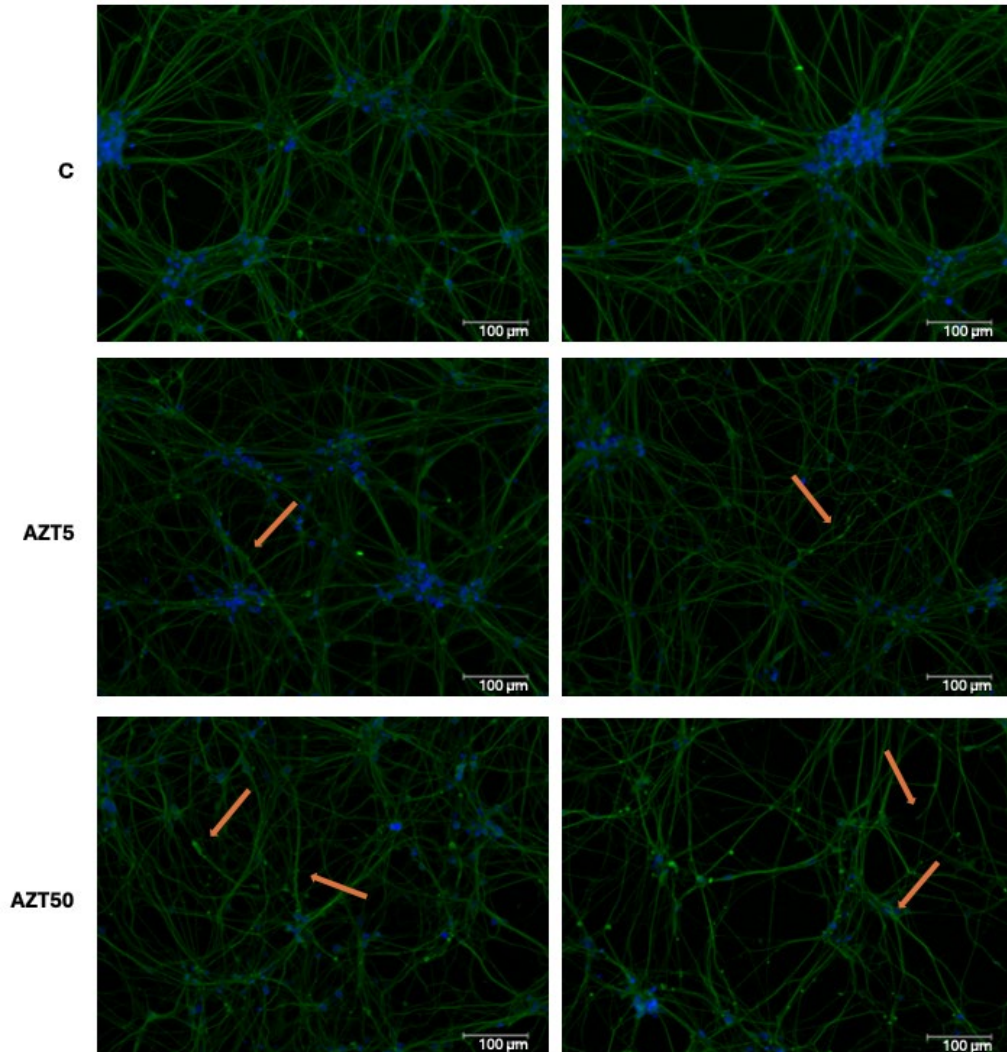


Figura III.14. Imágenes representativas del marcaje con TUBB3 en hNSC diferenciadas a neurona madura en presencia de AZT. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la TUBB3 (en verde) y los núcleos celulares marcados con DAPI (en azul). Las flechas naranjas indican neuritas con morfología aberrante o truncadas. hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; TUBB3, β III-tubulina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M

Numerosos estudios han demostrado que la disfunción mitocondrial conlleva alteraciones morfológicas en poblaciones neuronales. La inhibición del sistema OXPPOS con rotenona durante la diferenciación neuronal de células madre embrionarias o iPSC produce una reducción de la longitud de las neuritas en función de la concentración, reflejado en un menor marcaje de la proteína TUBB3 (110,111). De manera similar, neuronas derivadas de células madre embrionarias de ratón diferenciadas en presencia de antimicina (inhibidor del CIII) muestran menor número de procesos neuronales, de menor complejidad estructural y

tamaño, e incluso ausencia de estos procesos en función de los días de exposición y la concentración empleada; además, el marcaje de TUBB3 confirma una morfología neuronal inmadura (111,190). Asimismo, la diferenciación neuronal se impide casi por completo en presencia de otro inhibidor del CIII, el mixotiazol (111). El tratamiento con un inhibidor del CIV, el cianuro potásico, durante la diferenciación neuronal conlleva la formación de neuritas de menor longitud, disminuyendo la cantidad de TUBB3 observada mediante inmunofluorescencia (110). Neuronas derivadas de iPSC de pacientes de PD idiopático también muestran neuritas de menor longitud y una menor cantidad de estas, junto con niveles de marcaje de TUBB3 disminuidos (222,223). Por otro lado, distintos agentes tóxicos que producen disfunción mitocondrial alteran la morfología neurítica en células SH-SY5Y diferenciadas, cultivos primarios de neuronas ganglionares de la raíz dorsal sensorial de ratón, cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata, o neuronas derivadas de iPSC, mostrando perlas neuríticas y fragmentación (191,224,225). Otros autores demostraron que el tratamiento con AZT *in vitro* disminuye la capacidad de las células madre y los progenitores neurales para formar colonias o neuroesferas de mayor tamaño como reflejo de una autorrenovación más reducida. Además, reduce la neurogénesis inducible en células madre astrocíticas multipotentes de ratón, disminuyendo las células positivas para TUBB3 (157).

Nuestros resultados muestran una menor agrupación en *clusters* por parte de los cuerpos neuronales, que visiblemente son menores y menos abundantes tras la exposición a AZT. Además, la administración del fármaco durante la diferenciación neuronal produce una formación deficiente de neuritas. De modo que el tratamiento con AZT compromete la adquisición de una morfología adecuada, esencial para generar neuronas maduras.

III.3.3. Marcadores de diferenciación neuronal

Con el objetivo de confirmar si las alteraciones morfológicas producidas por la presencia de AZT durante la diferenciación se corresponden con variaciones a nivel bioquímico, se decidió evaluar distintos marcadores neuronales.

Como se observó previamente en la caracterización de la línea, la diferenciación de las hNSC a neurona madura implica un aumento de la expresión de *TUBB3* asociado al crecimiento y la remodelación del citoesqueleto para conformar los axones (Figura III.15 A). Por otro lado, considerando la hipótesis sobre el posible desarrollo futuro de la PD, se quiso comprobar la expresión de la TH como marcador dopaminérgico, ya que es la enzima limitante en la síntesis de dopamina. En efecto, con este protocolo de diferenciación se produce un aumento significativo en los niveles de mRNA del gen *TH* como resultado de la obtención de neuronas dopaminérgicas maduras (Figura III.15 B). Por último, se evaluó la expresión de nestina (*NES*), una proteína constituyente de filamentos intermedios expresada principalmente en células madre del sistema nervioso central. Como era de esperar, tras la diferenciación a neurona madura, los niveles de mRNA de este gen decaen de forma significativa respecto a las hNSC (Figura III.15 C).

Entonces, se procedió a analizar la expresión de estos genes tras la diferenciación neuronal en presencia de AZT. Los resultados mostraron que el aumento de los niveles de mRNA del marcador neuronal *TUBB3* se redujo significativamente de forma proporcional a la concentración de fármaco en comparación con el control diferenciado (Figura III.15 A). De igual forma, la expresión del gen *TH* disminuyó en presencia del fármaco, siendo significativo con la dosis alta (Figura III.15 B). Finalmente, al analizar los niveles de mRNA del marcador de madre neural *NES*, se observó una menor disminución de forma significativa con la concentración elevada de AZT, mostrando una expresión similar a la línea hNSC (Figura III.15 C).

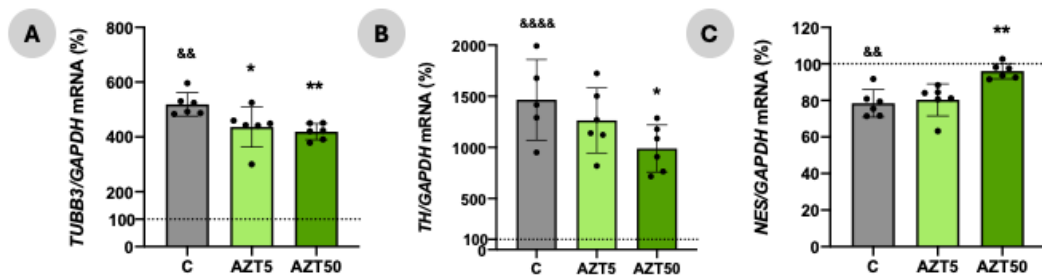


Figura III.15. Niveles de mRNA de marcadores neuronales de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. A) Niveles de mRNA de *TUBB3* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. SD: $100,0 \pm 5,6$ (6); C: $518,9 \pm 42,9$ (6); AZT5: $436,5 \pm 73,5$ (6); AZT50: $419,3 \pm 29,7$ (6). Prueba Mann Whitney: && $p \leq 0,01$ (vs. SD). Prueba ANOVA + Dunnett: * $p \leq 0,05$ (vs. C); ** $p \leq 0,01$ (vs. C). **B)** Niveles de mRNA de *TH* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. SD: $100,0 \pm 31,6$ (5); C: $1466,0 \pm 394,1$ (5); AZT5: $1263,0 \pm 316,8$ (6); AZT50: $989,3 \pm 230,4$ (6). Prueba t de Student desapareado: &&&& $p < 0,0001$ (vs. SD). Prueba ANOVA + Dunnett: * $p \leq 0,05$ (vs. C). **C)** Niveles de mRNA de *NES* normalizados por *GAPDH* determinados por qPCR. SD: $100,0 \pm 14,4$ (6); C: $78,4 \pm 7,6$ (6); AZT5: $80,3 \pm 8,8$ (6); AZT50: $96,0 \pm 4,2$ (6). Prueba t de Student desapareado: && $p \leq 0,01$ (vs. SD). Prueba Kruskal-Wallis + Dunn: ** $p \leq 0,01$ (vs. C). Los valores medios de las células sin diferenciar sin tratar (SD) se consideran el 100 % representado por la línea de puntos. hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; mRNA, RNA mensajero; *TUBB3*, β III-tubulina; *TH*, tirosina hidroxilasa; *NES*, nestina; *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M.

Resultados y discusión

Posteriormente, se realizó un estudio de expresión génica diferencial mediante RNA-seq que permitió evaluar el efecto del AZT sobre otros genes relevantes en las neuronas y corroborar los resultados obtenidos por qPCR tanto para *TUBB3* como para *TH*. En ambos casos, la expresión de estos genes disminuyó la expresión de forma significativa con la dosis alta de fármaco (Figura III.16), aunque cabe destacar que los niveles de mRNA de *TUBB3* previos ya se veían afectados con la concentración baja (Figura III.15 A). Podría ser que la significancia en los análisis por RNA-seq se hubiera perdido (p -valor ajustado = 0,0597) como consecuencia del número reducido de réplicas. Otros genes estudiados codifican para proteínas del citoesqueleto que, junto con la *TUBB3*, tienen gran importancia estructural en las neuronas maduras (*MAP2*; proteína tau asociada a los microtúbulos, *MAPT*; doblecortina, *DCX*; proteína 43 asociada al crecimiento, *GAP43*). También se evaluó la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la sinaptogénesis y otras funciones sinápticas como la plasticidad o la formación de vesículas (*SYP*; glucoproteína de vesícula sináptica, *SV2A*; sinapsina 1, *SYN1*; receptor neuronal de pentraxina, *NPTXR*; pentraxina neuronal 2, *NPTX2*; proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1, *PEBP1*; γ -sinucleína, *SNCG*). Asimismo, se consideró la expresión del gen *NSE* que codifica para una enolasa específica neuronal expresada en una etapa avanzada de la diferenciación. Todos estos genes, considerados marcadores de diferenciación neuronal, mostraron niveles de mRNA reducidos en presencia de AZT en comparación con las células diferenciadas control, siendo significativo con la concentración alta de fármaco (Figura III.16 A).

Por último, se estudiaron genes codificantes de factores de transcripción vinculados a la diferenciación de neuronas dopaminérgicas (neurogenina 2, *NEUROG2*; factor de transcripción bHLH 1 de la familia achaete-scute, *ASCL1*; *paired box 5*, *PAX5*; *engrailed homeobox 1*, *EN1*; *engrailed homeobox 2*, *EN2*; *homeobox LIM 1 β* , *LMX1B*). Estos mostraron una expresión disminuida que alcanzaba diferencias significativas con la concentración alta de AZT (Figura III.16 B).

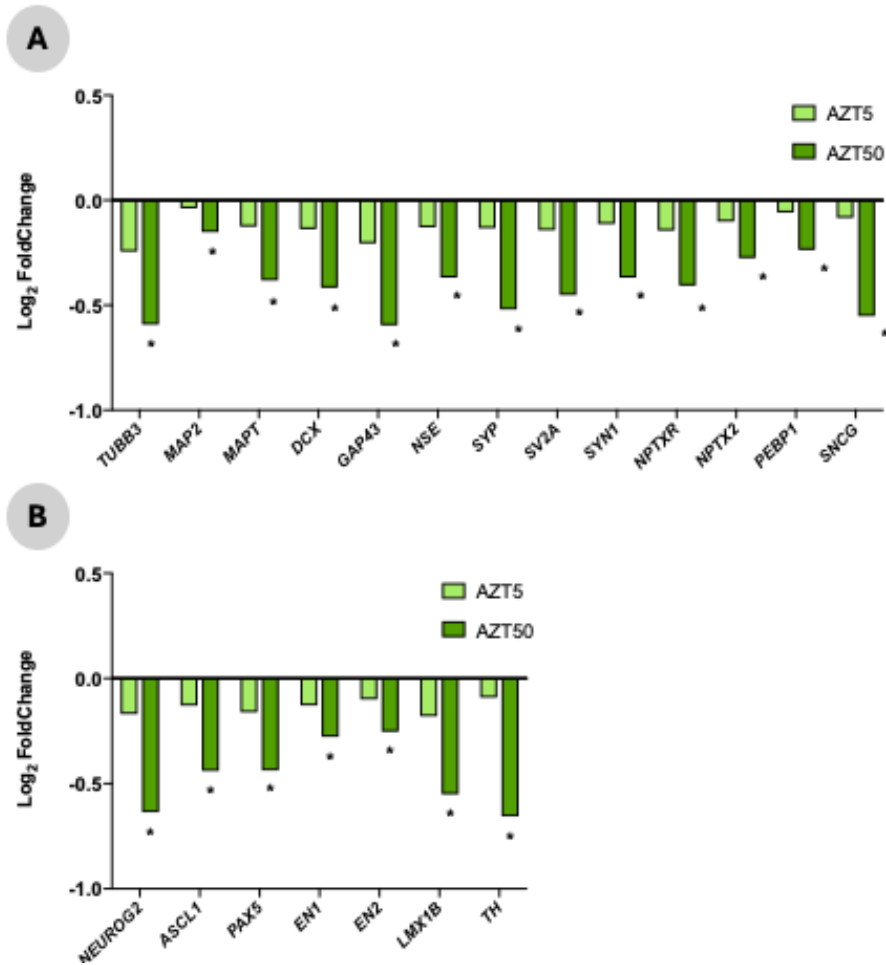


Figura III.16. Expresión génica diferencial de marcadores neuronales de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. Se representa la magnitud del cambio en \log_2 obtenida mediante RNA-seq de la expresión de genes implicados en la generación y el funcionamiento de neuronas maduras **(A)** y neuronas dopaminérgicas **(B)** que mostraron diferencias significativas (* p-valor ajustado $\leq 0,05$) comparado con las hNSC diferenciadas en ausencia del fármaco. C (3); AZT5 (3); AZT50 (3). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μM ; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μM .

Resultados y discusión

Finalmente, se comprobó si los resultados de mRNA obtenidos se traducían en alteraciones a nivel de proteínas. Para ello, se evaluó la cantidad de proteína de dos marcadores estudiados previamente mediante su inmunodetección por western blot. Se seleccionaron la proteína TUBB3 como marcador de neurona madura y la proteína TH como marcador de neurona dopaminérgica madura. Al igual que se observó un aumento de mRNA de los dos marcadores tras la diferenciación neuronal, la cantidad de las proteínas correspondientes también aumentó en las neuronas diferenciadas comparado con la línea hNSC (Figura III.17). Cabe destacar que en el inmunoblot de la TH se detectaron dos bandas correspondientes a distintas isoformas de la proteína. Para la cuantificación de esta, únicamente se consideró la banda de menor peso molecular que corresponde a las isoformas 1 y 2, principales isoformas en el cerebro humano (226).

El tratamiento con AZT durante la diferenciación neuronal supuso un menor aumento en la expresión de la proteína TUBB3 (Figura III.17 A, B) proporcional a la concentración de fármaco, obteniendo diferencias significativas con la dosis elevada. Por otro lado, la cantidad de proteína TH también mostró un menor incremento de la expresión de forma significativa para ambas concentraciones de AZT (Figura III.17 A, C).

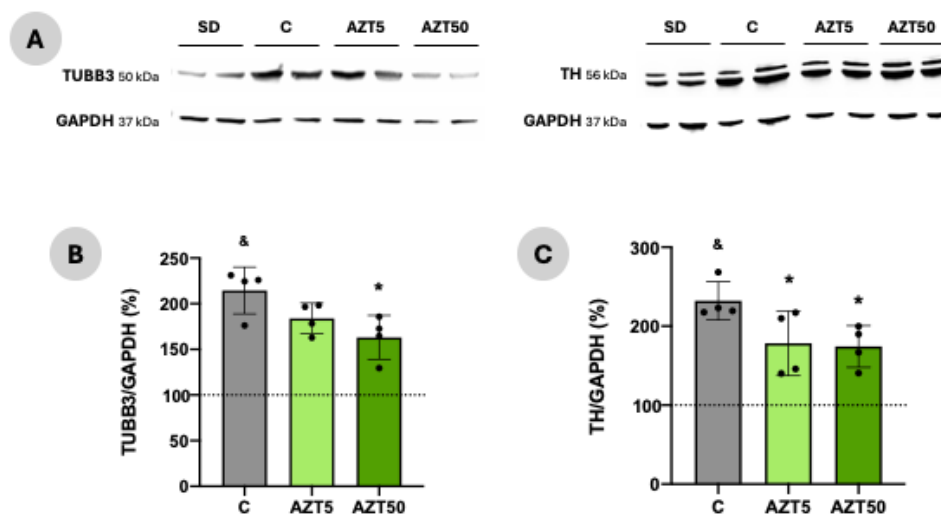


Figura III.17. Determinación de la cantidad de proteína de marcadores neuronales de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. A) Imágenes representativas de la inmunodetección por western blot de marcadores neuronales. **B)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de TUBB3 normalizado por GAPDH. SD: $100,0 \pm 33,4$ (4); C: $214,4 \pm 25,6$ (4); AZT5: $183,9 \pm 16,7$ (4); AZT50: $163,1 \pm 24,1$ (4). **C)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de TH normalizado por GAPDH. SD: $100,0 \pm 16,6$ (4); C: $232,1 \pm 24,2$ (4); AZT5: $178,3 \pm 40,9$ (4); AZT50: $174,3 \pm 26,4$ (4). Los valores medios de las células sin diferenciar sin tratar (SD) se consideran el 100 % representado por la línea de puntos. Prueba Mann-Whitney: & $p \leq 0,05$ (vs. SD). Prueba Kruskal-Wallis + Dunn: * $p \leq 0,05$ (vs. C). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; TUBB3, β III-tubulina; TH, tirosina hidroxilasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M.

Existen evidencias de que la disfunción mitocondrial disminuye la neurogénesis. De hecho, la cantidad de proteína TUBB3 y TH disminuye tras la diferenciación de las SH-SY5Y en presencia de AZT (107). De igual forma, la exposición a contaminantes ambientales, como pesticidas, durante la diferenciación de la línea SH-SY5Y puede provocar alteraciones en la homeostasis mitocondrial; en consecuencia, se produce una caída en los niveles de mRNA y la cantidad de proteína de marcadores neuronales, como GAP43, TUBB3, SYP o SYN1, y en la expresión del marcador dopaminérgico TH (112). Inhibidores del sistema OXPHOS, como la antimicina, la rotenona, el mixotiazol o el cianuro, también disminuyen la expresión tanto de la TUBB3 como de la TH en neuronas derivadas de células madre embrionarias de ratón y en células SH-SY5Y diferenciadas (111,113,190). El tratamiento con rotenona o cianuro durante la diferenciación de hiPSC a neurona dopaminérgica produce un descenso en la cantidad de proteína SYP y los niveles de mRNA de marcadores tempranos y tardíos en la maduración, como *EN1* o *MAP2* (110). Por otro lado, ensayos de tomografía por emisión de positrones de enfermos de Parkinson han mostrado pérdida de densidad sináptica en la región de la SN asociada a la gravedad de los síntomas mediante el estudio del marcador sináptico SV2A (227). También se han encontrado niveles disminuidos de los marcadores sinápticos NPTXR y NPTX2, entre otros, en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de PD (228).

En base a nuestros resultados, la exposición a AZT durante la diferenciación disminuye la expresión de múltiples marcadores de neurona madura y factores de transcripción de la vía dopaminérgica, probablemente debido a una disrupción del funcionamiento OXPHOS. Como potencial tóxico mitocondrial, el AZT parece afectar a la generación de neuronas maduras, incluidas las neuronas dopaminérgicas, ya sea por limitar la diferenciación aumentando la cantidad de hNSC presentes al finalizar el proceso, y/o por inducir fallos en la diferenciación de modo que las neuronas quedan en un estado intermedio de madurez.

III.4. Efecto de la exposición prenatal a azidotimidina en ratones envejecidos

De acuerdo con la hipótesis de los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad, la exposición perinatal a un tóxico durante el desarrollo del sistema nervioso podría causar alteraciones que favorezcan la aparición de enfermedades neurodegenerativas en la vejez. De modo que, tras confirmar los defectos en la diferenciación neuronal como consecuencia del tratamiento con AZT, se decidió ampliar el estudio con un modelo murino. El uso del modelo animal permitió evaluar el impacto de la exposición a AZT durante el desarrollo cerebral en el proceso de envejecimiento, así como su posible conexión con el desarrollo de la PD. Para ello, la administración de AZT se llevó a cabo durante los días embrionarios correspondientes a la neurogénesis dopaminérgica. Además, teniendo en cuenta que la PD afecta a poblaciones envejecidas, los ratones a estudiar se encontraban en una edad avanzada de madurez.

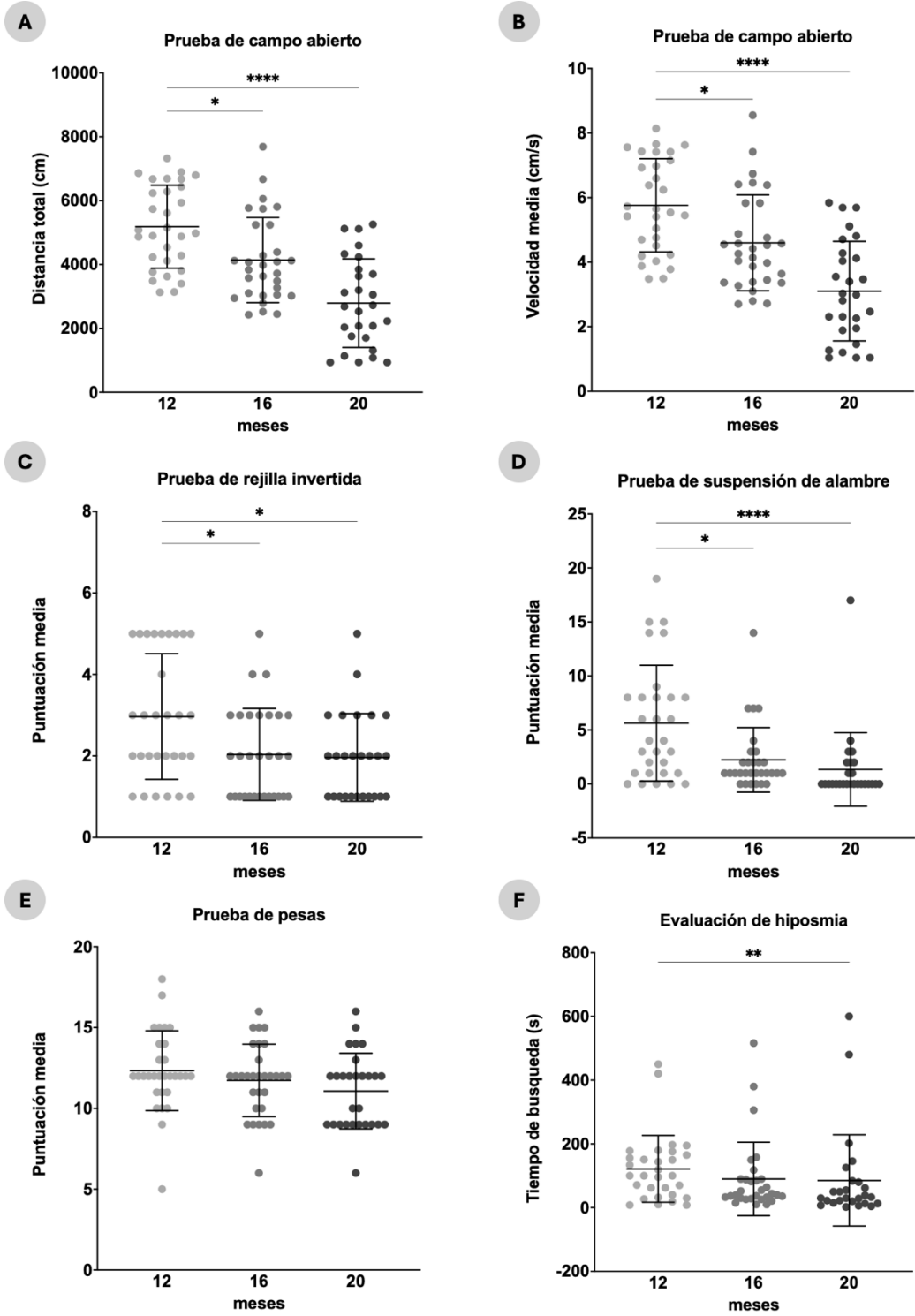
Para estos estudios se escogió el modelo de ratón C57BL/6J ya que se trata de una cepa de uso habitual en el campo de la neurociencia. Concretamente, esta cepa de ratón ha sido extensamente utilizada para modelar o estudiar enfermedades neurodegenerativas como la PD. Además, el ratón se considera un buen modelo para estudios relacionados con el envejecimiento debido a su vida relativamente corta (229).

La dosis de AZT administrada a las hembras gestantes para el desarrollo de este estudio se calculó de acuerdo con el método de normalización de la superficie corporal, obteniendo una dosis equivalente a la de humanos (600 mg/día en humanos). Así, las cantidades utilizadas fueron 2,5 mg/día de AZT, equipolente a la dosis en humanos, y el doble de esta.

Efecto del envejecimiento sobre el comportamiento funcional del ratón C57BL/6J

El envejecimiento se trata de un fenómeno natural producido por cambios bioquímicos que causan un deterioro fisiológico progresivo asociado al declive de funciones motoras, cognitivas y sensoriales. Existen muchas enfermedades asociadas a la vejez para las que la edad avanzada se considera un factor de riesgo. Por consiguiente, la investigación sobre estas enfermedades en modelos animales se debería realizarse en individuos envejecidos. En cambio, pocos estudios relacionados con la vejez o enfermedades vinculadas a esta se han extendido más allá de la mediana edad en ratones (89,230).

Para analizar los efectos del envejecimiento sobre determinadas funciones fisiológicas comúnmente afectadas en la PD, los ratones se sometieron a una batería de pruebas en diferentes edades a lo largo de su etapa adulta (12, 16 y 20 meses). Durante la prueba de campo abierto, realizada para evaluar la actividad locomotora, tanto la distancia total recorrida como la velocidad media disminuyeron significativamente de forma proporcional a la edad (Figura III.18 A, B). En la prueba de rejilla invertida, que evalúa la fuerza muscular de las extremidades, se observó una reducción significativa ya determinante a partir de los 16 meses (Figura III.18 C). Asimismo, la prueba de suspensión de alambre mostró una disminución significativa de la puntuación media asociada a la edad, indicando una menor fuerza muscular en las extremidades anteriores y una peor coordinación motora (Figura III.18 D). En cambio, en la prueba de pesas, que mide la fuerza de agarre de las extremidades anteriores, los ratones envejecidos mostraban resultados similares a los obtenidos con 12 meses (Figura III.18 E). Por último, la evaluación de la hiposmia reflejó una reducción significativa en la capacidad olfativa de los ratones a mayor edad comparados con edades más jóvenes (Figura III.18 F).



(Pie de figura en la página siguiente)

Figura III.18. Efecto del envejecimiento sobre el comportamiento conductual de ratones envejecidos. A) Distancia total recorrida durante la prueba de campo abierto (cm). 12 m: 5187 ± 1300 (30); 16 m: 4140 ± 1335 (30); 20 m: 2793 ± 1388 (27). **B)** Velocidad media durante la prueba de campo abierto (cm/s). 12 m: $5,76 \pm 1,45$ (30); 16 m: $4,60 \pm 1,49$ (30); 20 m: $3,10 \pm 1,54$ (27). **C)** Puntuación en la prueba de rejilla invertida. 12 m: $2,97 \pm 1,54$ (30); 16 m: $2,03 \pm 1,13$ (30); 20 m: $1,96 \pm 1,08$ (26). **D)** Puntuación en la prueba de suspensión de alambre. 12 m: $5,63 \pm 5,35$ (30); 16 m: $2,23 \pm 2,99$ (30); 20 m: $1,35 \pm 3,41$ (26). **E)** Puntuación en la prueba de pesas. 12 m: $12,33 \pm 2,47$ (30); 16 m: $11,73 \pm 2,24$ (30); 20 m: $11,07 \pm 2,34$ (28). **F)** Tiempo de búsqueda en la evaluación de hiposmia (s). 12 m: $121,7 \pm 104,7$ (30); 16 m: $89,97 \pm 115,3$ (30); 20 m: $85,38 \pm 143,0$ (26). Prueba Kruskal-Wallis + Dunn: * $p \leq 0,05$ (vs. C); ** $p \leq 0,01$ (vs. C); *** $p < 0,0001$ (vs. C).

Estos resultados apoyan observaciones previas que determinaron un efecto significativo de la edad sobre la actividad locomotora y la fuerza muscular, así como sobre funciones cognitivas o sensoriales, que mostraron cierto declive asociado a la vejez (229,231–233). Otros autores han vinculado el envejecimiento y la decadencia funcional con una disminución de marcadores neuronales implicados en la neurogénesis o en la función sináptica, entre otros, y con el deterioro de rutas bioquímicas concretas como la disfunción mitocondrial (233,234). También se ha demostrado una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas y en los niveles de dopamina asociada a la edad, que podrían ser la causa de alteraciones locomotoras en estos ratones; además, se observaron anomalías en la morfología mitocondrial de estas regiones dopaminérgicas afectadas (232). Muchas de estas rutas alteradas por el envejecimiento estarían implicadas también en la patología de diversas enfermedades neurodegenerativas.

III.4.1. Pruebas conductuales

Como se menciona previamente, se observó un deterioro funcional asociado al envejecimiento sobre la mayoría de las pruebas conductuales realizadas, a excepción de la prueba de pesas. Este patrón no solo se presentó en los ratones control, sino que se repitió en ambas condiciones de estudio con AZT (Figura III.19).

Al evaluar los efectos del fármaco, no se encontraron diferencias en la prueba de campo abierto que analiza la actividad locomotora (Figura III.19 A, B). Cabe destacar que estos fueron los parámetros más acusados por el efecto del envejecimiento. Se advirtió cierto declive, sin llegar a ser significativo, tanto en la prueba de rejilla invertida como en la prueba de suspensión de alambre a los 12 meses de edad, ambas relacionadas con la fuerza muscular (Figura III.19 C, D). Estos resultados no se mantuvieron en los análisis realizados a los ratones en edades más avanzadas, lo que sugiere que el deterioro asociado a la edad podría camuflar esos indicios iniciales de afectación causada por AZT. En cambio, en la prueba de pesas se determinó una disminución de la puntuación media proporcional a la concentración de fármaco en las tres edades estudiadas en comparación con el vehículo, alcanzando diferencias significativas en aquellos ratones expuestos a mayor dosis de AZT (Figura III.19 E). Por último, se observó un aumento significativo en el tiempo de búsqueda de los ratones expuestos *in utero* a la dosis de 2.5 mg de AZT a los 20 meses de edad (Figura III.19 F).

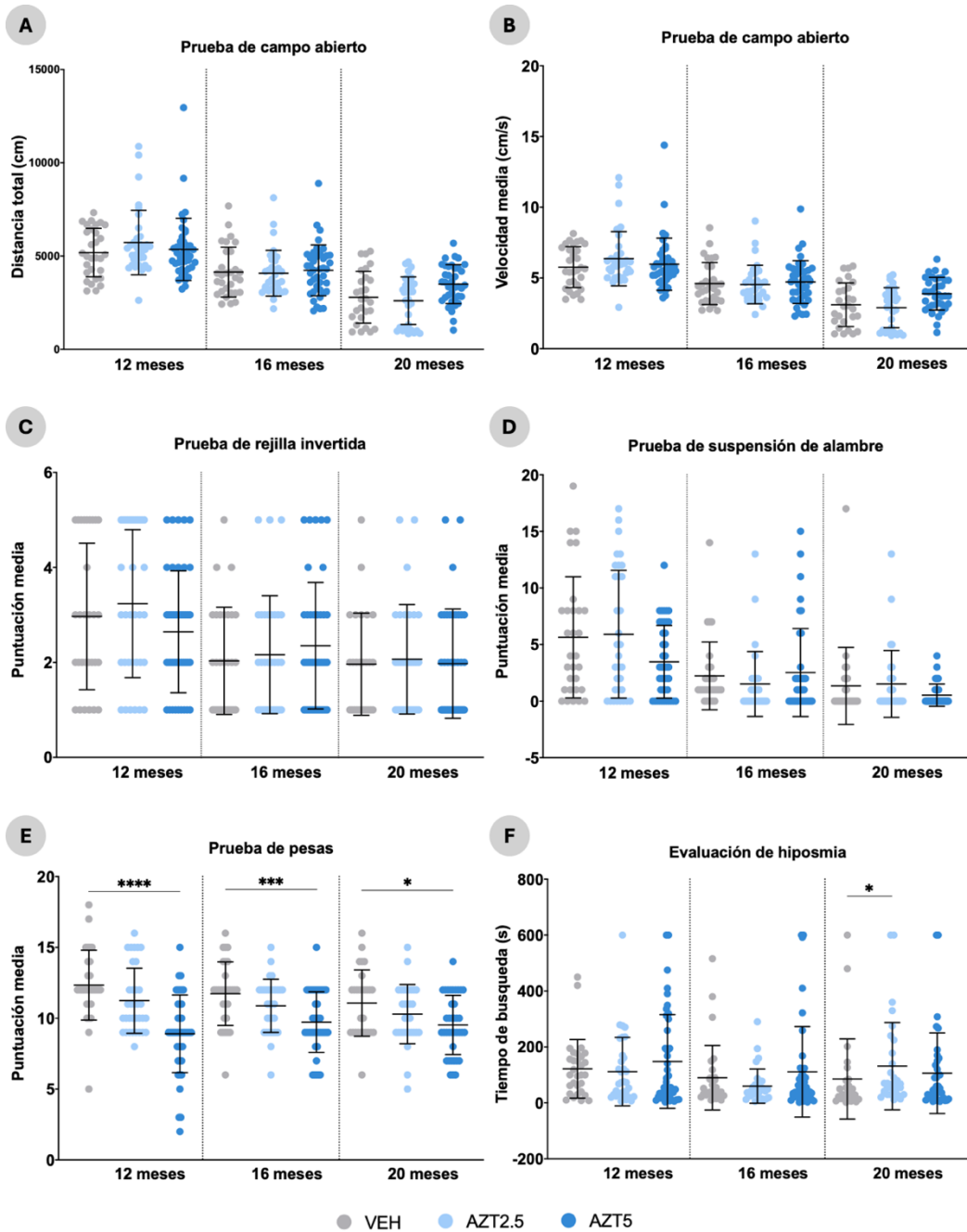


Figura III.19. Efecto de la exposición prenatal a AZT sobre el comportamiento conductual de ratones envejecidos. **A)** Distancia total recorrida durante la prueba de campo abierto (cm). **B)** Velocidad media durante la prueba de campo abierto (cm/s). **C)** Puntuación obtenida en la prueba de rejilla invertida. **D)** Puntuación obtenida en la prueba de suspensión de alambre. **E)** Puntuación obtenida en la prueba de pesas. **F)** Tiempo de búsqueda en la evaluación de hiposmia (s). Prueba Kruskal-Wallis + Dunn: * $p \leq 0,05$ (vs. C); *** $p \leq 0,001$ (vs. C); ** $p < 0,0001$ (vs. C). AZT, azidotimidina; VEH, ratones expuestos a vehículo; AZT2.5, ratones expuestos a AZT 2,5 μM ; AZT5, ratones expuestos a AZT 5 μM . (Ver pie de figura completo en Anexo 4). **Anexo 4Anexo 4Anexo 4Anexo 4**

Estudios previos que analizaron el efecto de la exposición prenatal a AZT en el modelo murino no evidenciaron alteraciones graves sobre el desarrollo neuroconductual, a excepción de leves efectos en la función motora o en la conducta (235–240). En concreto, la administración de AZT a hembras embarazadas CD-1, desde el día 10 de gestación hasta el parto o hasta el día 10 de lactancia, afectó a la frecuencia de *rearing* (levantarse sobre las patas traseras) y al acicalamiento en la descendencia a los 45 y 70 días de edad, alteraciones que los autores atribuyeron a un efecto del fármaco sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Esta exposición prenatal también supuso un retraso en la maduración de respuestas específicas asociadas a la fuerza de agarre (235–238,240). Otras investigaciones en roedores han demostrado que la exposición prenatal a xenobióticos OXPPOS, como MPTP o paraquat, provoca alteraciones en la actividad locomotora de los animales asociado a déficits en el sistema dopaminérgico (117,120,125). Cabe destacar que el tratamiento postnatal con estas drogas también conduce a déficits motores, que incluyen un declive en la fuerza de agarre, causados por degeneración de la vía dopaminérgica (241,242). De hecho, estudios clínicos acerca de la sintomatología de pacientes de PD relacionaron un deterioro de las capacidades motoras finas, como la fuerza de agarre, con el desarrollo de PD e, incluso, con la severidad de la enfermedad (243–246). Además, estudios poblacionales han observado una reducida fuerza de agarre en individuos con HIV tratados con antirretrovirales (247).

En resumen, los ratones expuestos prenatalmente a AZT mostraron un deterioro de la fuerza muscular, concretamente una disminución significativa de la fuerza de agarre, ya afectada desde los 12 meses de edad. En base a nuestros resultados y a observaciones previas, se podría suponer que la exposición prenatal a AZT tiene un efecto sobre el desarrollo del sistema nervioso central que conduce a alteraciones neuroconductuales.

III.4.2. Parámetros bioquímicos de la mitocondria

Múltiples estudios han estudiado efectos de los antirretrovirales sobre parámetros mitocondriales en individuos adultos con HIV, tratados principalmente con NRTI, debido a la hipótesis inicialmente sustentada en la posible inhibición de la polimerasa mitocondrial por este tipo de fármacos.

Nuestros análisis no determinaron diferencias significativas en los niveles de mtDNA determinados a partir de homogenado de tejido cerebral de ratones expuestos prenatalmente al antirretroviral AZT, tras 22 meses desde la exposición (Figura III.20 A). Del mismo modo tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de mRNA de COX1, subunidad del CIV codificada en el mtDNA, (Figura III.20 B) ni en la cantidad de proteína de COX1 o SDHA, subunidad del CII codificada en el nDNA (Figura III.20 C-E). En cambio, la exposición prenatal a AZT supuso una disminución de la actividad específica del CIV en tejido cerebral de ratón, alcanzando diferencias significativas en aquellos ratones expuestos a la dosis de 2.5 mg (Figura III.20 F).

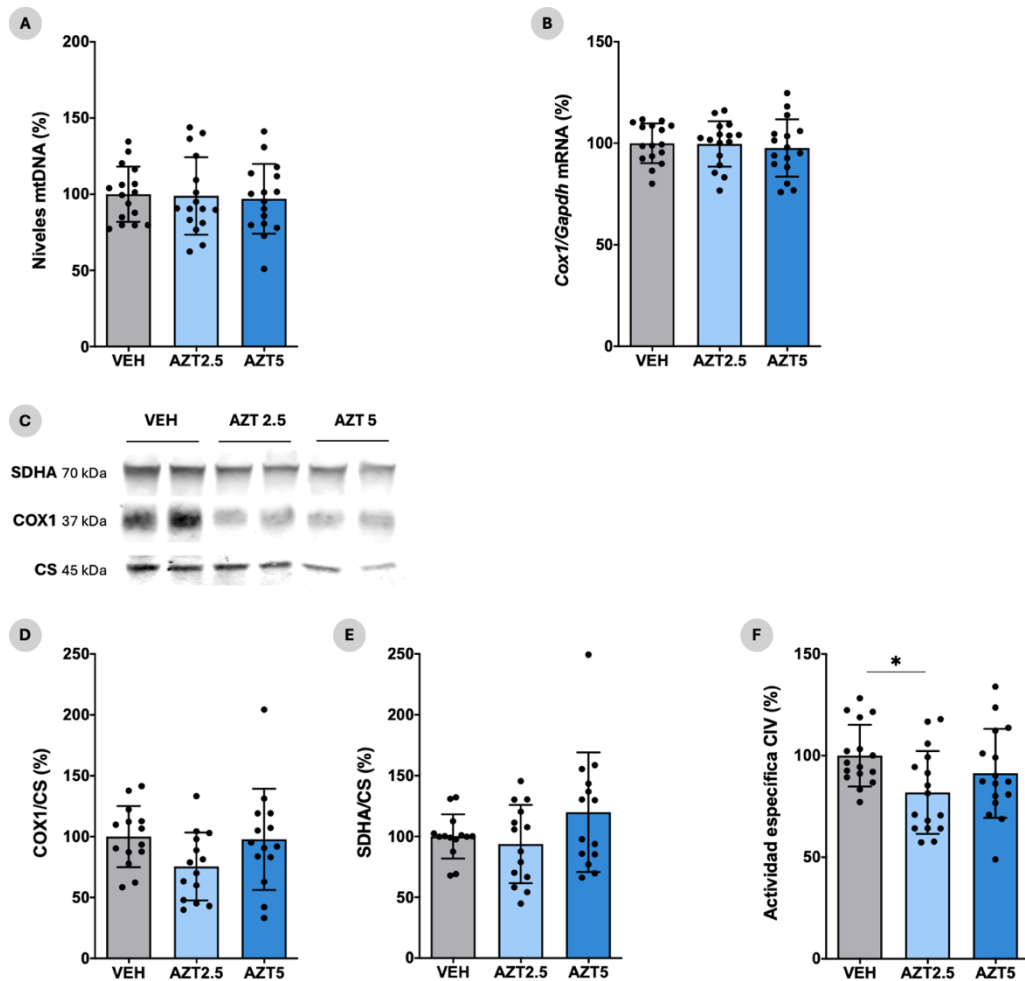


Figura III.20. Parámetros bioquímicos mitocondriales del cerebro de ratones envejecidos tras la exposición prenatal a AZT. A) Niveles de mtDNA determinados por qPCR. VEH: $100,0 \pm 18,11$ (16); AZT2.5: $98,88 \pm 25,42$ (16); AZT5: $97,02 \pm 22,94$ (16). **B)** Niveles de mRNA de *Cox1* normalizados por *Gapdh* determinados por qPCR. VEH: $100,0 \pm 9,76$ (16); AZT2.5: $99,66 \pm 11,20$ (16); AZT5: $97,68 \pm 14,11$ (16). **C)** Imágenes representativas de la inmunodetección por western blot de subunidades de complejos del sistema OXPHOS. **D)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de COX1 normalizado por CS. VEH: $100,0 \pm 25,12$ (14); AZT2.5: $75,47 \pm 27,84$ (14); AZT5: $97,75 \pm 41,63$ (14). **E)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de SDHA normalizado por CS. VEH: $100,0 \pm 18,18$ (14); AZT2.5: $93,70 \pm 32,21$ (14); AZT5: $119,90 \pm 49,12$ (14). **F)** Actividad específica del CIV. VEH: $100,0 \pm 15,20$ (16); AZT2.5: $81,85 \pm 20,37$ (16); AZT5: $91,32 \pm 21,88$ (16). Los valores medios de los ratones expuestos únicamente al vehículo se consideran el 100 %. Prueba ANOVA + Dunnett: * $p \leq 0,05$ (vs. VEH). AZT, azidotimidina; mtDNA, DNA mitocondrial; mRNA, RNA mensajero; *Cox1*, citocromo C oxidasa 1 ; *Gapdh*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; COX1, citocromo C oxidasa 1; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; SDHA, succinato deshidrogenasa subunidad A; CS, citrato sintasa; CIV, complejo IV; VEH, ratones expuestos a vehículo; AZT2.5, ratones expuestos a AZT 2,5 μM ; AZT5, ratones expuestos a AZT 5 μM .

La exposición postnatal a AZT no mostró diferencias en el número de copias de mtDNA en el cerebro de ratones tras un mes o cuatro meses de tratamiento. En cambio, la exposición al fármaco durante cuatro meses produjo depleción del mtDNA en neuronas únicas obtenidas mediante microdissección por captura láser del tejido cerebral de los ratones; a diferencia de estas neuronas, las células gliales obtenidas del mismo tejido no reflejaban ningún cambio en los niveles de mtDNA (202). Un estudio llevado a cabo en primates determinó una caída en los niveles de mtDNA en el cerebro de crías de 1 año expuestas prenatalmente a AZT durante la segunda semana de embarazo (156). Al evaluar diversos estudios sobre efectos de la ART en el mtDNA de niños expuestos durante el desarrollo fetal, se observan variedad de resultados. Algunos autores reportaron una cantidad de copias de mtDNA disminuida en leucocitos de sangre periférica de recién nacidos asociada a la exposición a HIV, con una mayor reducción en aquellos tratados prenatalmente con AZT, que se mantuvo en el tiempo durante los dos años de estudio (151). Otro estudio realizado en células mononucleares de sangre periférica obtenidas tras el nacimiento mostró una disminución en los niveles de mtDNA asociada a la exposición a HIV, aunque esta reducción no era tan pronunciada si los fetos habían estado expuestos a su vez a AZT. En estos casos, la depleción del mtDNA se recuperaba a los 5 años en los niños tratados con antirretrovirales, alcanzando niveles semejantes a los controles (248). En cambio, otros autores encontraron niveles de mtDNA aumentados en muestras de sangre de bebés expuestos a ART que se mantuvieron desde el nacimiento hasta los últimos análisis realizados a los 8 meses de edad. Este incremento mostraba una correlación positiva con la duración de la exposición *in utero* a la ART y los investigadores sugirieron que este aumento del contenido de mtDNA probablemente era el resultado de un proceso adaptativo ante la disfunción mitocondrial producida por el fármaco. Además, este mismo estudio determinó niveles de mRNA mitocondrial reducidos en los mismos fetos expuestos a ART en los tres primeros días de vida, aunque esta diferencia con el control se desapareció en los análisis posteriores (249). En cuanto a las actividades enzimáticas de los complejos del sistema OXPHOS, primates expuestos prenatalmente a diversos antirretrovirales, entre ellos AZT, no mostraron diferencias significativas respecto a los controles (156). Por el contrario, estudios realizados con niños expuestos perinatalmente a AZT, con un cuadro clínico compatible con disfunción mitocondrial, mostraban actividades anormalmente bajas de al menos uno de los complejos del sistema OXPHOS, habitualmente el CI o el CIV, en alguno de los tejidos analizados, ya sean linfocitos circulantes, músculo esquelético, músculo cardíaco o hígado, tras meses o años desde el tratamiento antiviral. Además, estos niños mostraban síntomas neurológicos, en algunos casos asociados a anomalías cerebrales detectadas por resonancia magnética (149,150). Por último, la exposición perinatal a una combinación de antirretrovirales que incluía AZT causaba anomalías morfológicas en las mitocondrias del tejido cerebral en primates, que persistieron hasta los 3 años (250).

Considerando que los pocos estudios contrastados aportan observaciones diferentes o contradictorias, en base a nuestros resultados, la exposición prenatal a AZT conduce a alteraciones leves de la homeostasis mitocondrial en el tejido cerebral de ratones a los 22 meses de edad, destacando una reducción significativa de la actividad de CIV.

III.4.3. Estudio de factores genéticos como posible nexo entre la exposición prenatal y sus efectos en la vejez

La exposición prenatal a AZT no produjo patrones de bandas de menor tamaño en la electroforesis del amplificado de mtDNA completo a partir de homogenado cerebral de ratones envejecidos. Es decir, el tratamiento con AZT no conduce a deleciones en el mtDNA (Figura III.21 A). Igualmente, la secuenciación de la región variable del mtDNA no mostró mutaciones causadas por la exposición al fármaco (datos no mostrados). Por último, la metilación global del DNA de tejido cerebral de ratones envejecidos tampoco se vio afectada por la exposición prenatal a AZT (Figura III.21 B).

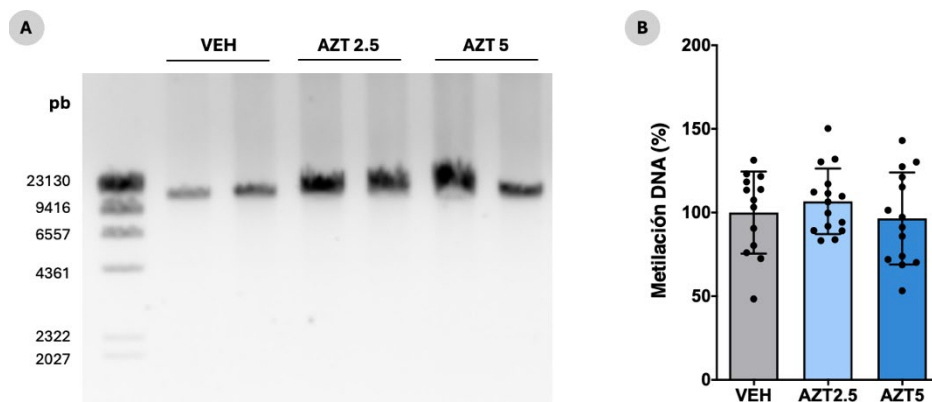


Figura III.21. Factores genéticos estudiados en el cerebro de ratones envejecidos tras la exposición prenatal a AZT. A) Imagen representativa de los productos de PCR Larga para la determinación de deleciones en el mtDNA. **B)** Niveles de metilación global del DNA obtenidos mediante determinación cuantitativa del porcentaje de 5-metilcitosina (5-mC) en el genoma. VEH: 100,0 ± 24,55 (13); AZT2.5: 106,70 ± 19,60 (15); AZT5: 96,49 ± 27,50 (14). Los valores medios de los ratones expuestos únicamente al vehículo se consideran el 100 %. pb, pares de bases; VEH, ratones expuestos a vehículo; AZT2.5, ratones expuestos a AZT 2,5 μM; AZT5, ratones expuestos a AZT 5 μM.

El tratamiento con antirretrovirales en ratones durante cuatro meses provocó deleciones en el mtDNA de neuronas cerebrales capturadas por microdissección láser, a diferencia de la exposición a AZT que causó depleción del mtDNA (202). Un estudio acerca de la inestabilidad del mtDNA en neonatos, cuyas madres infectadas con HIV recibieron AZT durante el embarazo, mostró deleciones heteroplásmicas en el mtDNA de muestras de sangre seca, pero no mutaciones puntuales, en comparación con aquellos no expuestos a HIV ni ART. Los investigadores encontraron una asociación entre la carga viral presente en la madre y la presencia de deleciones y el nivel de heteroplasmia de estas, por tanto, no

podieron descartar un impacto directo del HIV o proteínas de este sobre la inestabilidad observada del mtDNA (154). En cambio, otros ensayos han confirmado la incorporación de AZT en el nDNA o el mtDNA del cerebro de algunos ratones y primates expuestos al fármaco durante el desarrollo embrionario, aunque los datos eran altamente variables (251,252). Con respecto a la metilación del DNA, la exposición a AZT de un modelo celular de roedor provocó un aumento en los niveles de 5-metilcitosina, indicando hipermetilación del DNA; en cambio, estudios llevados a cabo en células humanas no encontraron cambios en el porcentaje de 5-metilcitosina. En ambos casos, los autores observaron una resistencia al fármaco adquirida probablemente por la inactivación del gen de la timidina quinasa, enzima responsable de la fosforilación del AZT, mediante cambios epigenéticos (253,254). Estudios recientes han mostrado modificaciones en el perfil de metilación del DNA de tejido cardíaco de ratón tras el tratamiento con AZT, mostrando hipermetilación e hipometilación a partes iguales en distintas regiones del DNA (255).

En definitiva, el análisis de deleciones o mutaciones en la región variable del mtDNA no denotó cambios perceptibles en ratones de 22 meses de edad como consecuencia de la exposición prenatal a AZT. Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de metilación global del DNA, aunque los genes metilados podrían diferir de las muestras control.

III.4.4. Estudio de la vía dopaminérgica

Los estudios acerca de las consecuencias del tratamiento con NRTI en el sistema nervioso central son escasos, y todavía más limitados cuando se trata de su efecto sobre la vía dopaminérgica nigroestriatal. Partiendo de la hipótesis de esta tesis, centrada en la predisposición a desarrollar PD por causa de la exposición prenatal a NRTI, se evaluaron las consecuencias sobre la SN y las neuronas dopaminérgicas de ratones envejecidos tratados con AZT durante los días embrionarios correspondientes a la neurogénesis dopaminérgica de esta región concreta.

La SN de ratones expuestos prenatalmente a AZT, evaluada a los 22 meses de edad, no mostró diferencias significativas en la tinción inmunohistoquímica de la proteína TH con respecto al control (Figura III.22).

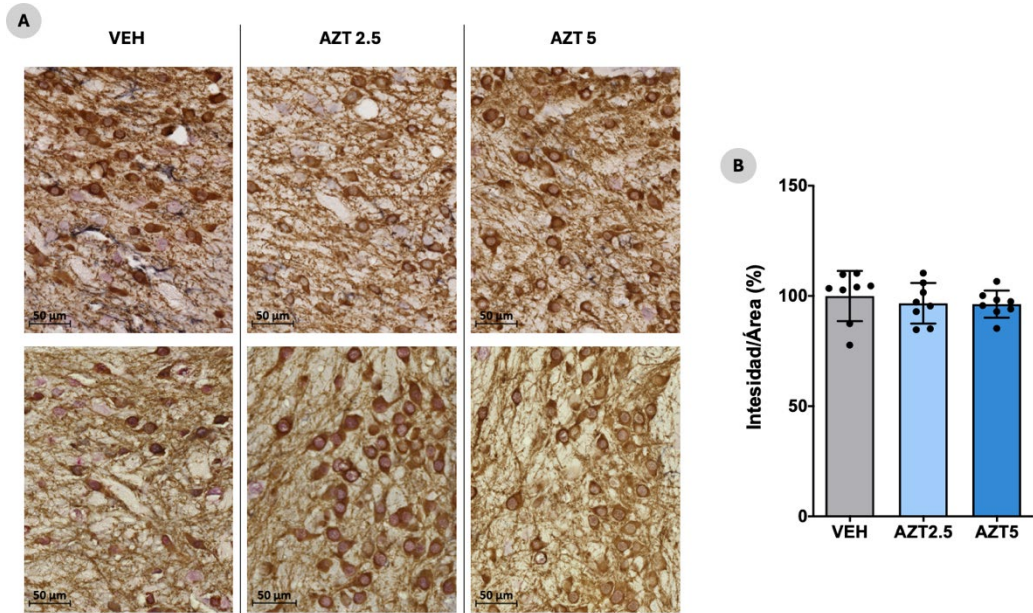


Figura III.22. Análisis histológico de la sustancia negra del cerebro de ratones envejecidos tras la exposición prenatal a AZT. A) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de la TH de una sección de la SN. **B)** Cuantificación de la intensidad normalizada por el área de tinción de la TH. VEH: $100,0 \pm 11,41$ (8); AZT2.5: $96,68 \pm 9,19$ (8); AZT5: $96,31 \pm 6,15$ (8). Los valores medios de los ratones expuestos únicamente al vehículo se consideran el 100 %. AZT, azidotimidina; TH, tirosina hidroxilasa; SN, *substantia nigra*; VEH, ratones expuestos a vehículo; AZT2.5, ratones expuestos a AZT 2,5 μM ; AZT5, ratones expuestos a AZT 5 μM .

Resultados y discusión

Los estudios de expresión en el homogenado de cerebro de ratones envejecidos no revelaron alteraciones en los niveles de mRNA de *En1*, *Nr4a2* o TH (Figura III.23 A-C), considerados marcadores de neurona dopaminérgica, ni en la cantidad de proteína de TH (Figura III.23 D, E) o DAT (Figura III.23F). En cambio, al analizar los niveles del neurotransmisor dopamina se determinó una reducción significativa en los ratones expuestos prenatalmente a ambas concentraciones de AZT (Figura III.24).

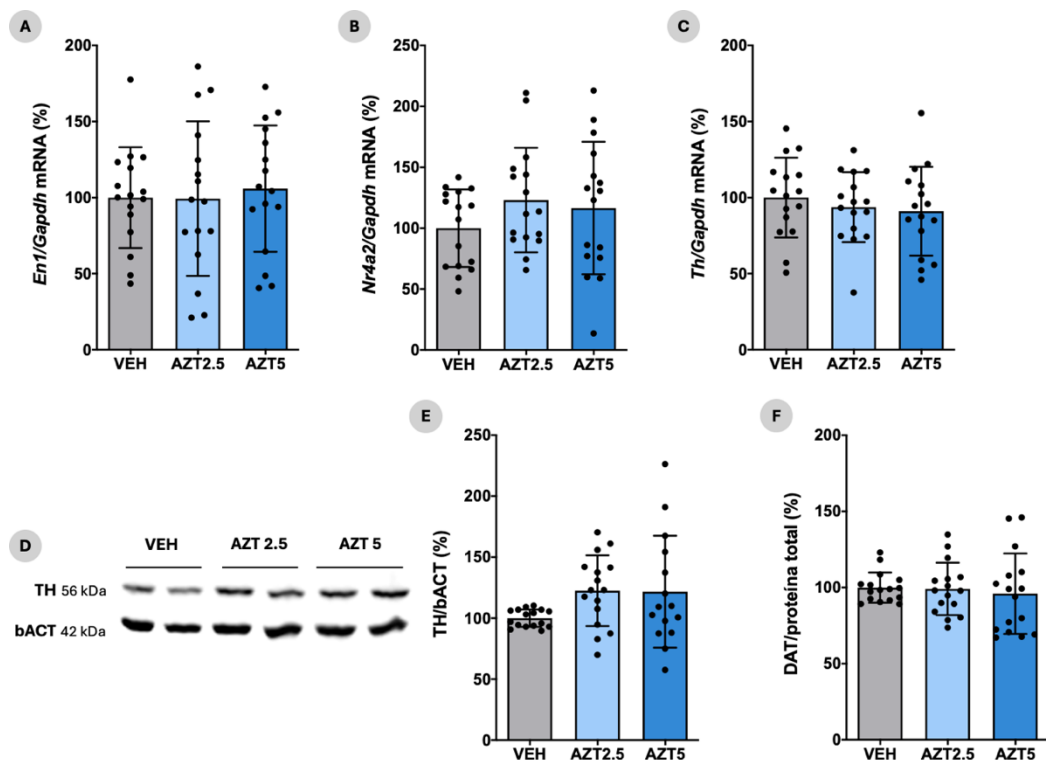


Figura III.23. Expresión de marcadores de diferenciación dopaminérgica del cerebro de ratones envejecidos tras la exposición prenatal a AZT. **A)** Niveles de mRNA de *En1* normalizados por *Gapdh* determinados por qPCR. VEH: 100,0 ± 33,12 (16); AZT2.5: 99,30 ± 50,81 (16); AZT5: 105,90 ± 41,55 (16). **B)** Niveles de mRNA de *Nr4a2* normalizados por *Gapdh* determinados por qPCR. VEH: 100,0 ± 31,86 (16); AZT2.5: 123,10 ± 42,92 (16); AZT5: 116,50 ± 54,36 (16). **C)** Niveles de mRNA de *Th* normalizados por *Gapdh* determinados por qPCR. VEH: 100,0 ± 26,22 (16); AZT2.5: 93,70 ± 22,98 (16); AZT5: 91,06 ± 29,20 (16). **D)** Imágenes representativas de la inmunodetección por western blot de la proteína TH. **E)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de TH normalizada por bACT. VEH: 100,0 ± 7,61 (16); AZT2.5: 122,50 ± 28,98 (16); AZT5: 121,7 ± 45,84 (15). **F)** Determinación mediante ELISA de la cantidad de proteína DAT normalizada por proteína total. VEH: 100,0 ± 9,92 (16); AZT2.5: 99,14 ± 17,21 (16); AZT5: 95,98 ± 26,41 (16). Los valores medios de los ratones expuestos únicamente al vehículo se consideran el 100 %. AZT, azidotimidina; mRNA, RNA mensajero; *En1*, *engrailed homeobox 1*; *Nr4a2*, receptor nuclear subfamilia 4 grupo A miembro 2; *Th*, tirosina hidroxilasa; *Gapdh*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; TH, tirosina hidroxilasa; bACT, β-actina; DAT, transportador de dopamina; VEH, ratones expuestos a vehículo; AZT2.5, ratones expuestos a AZT 2,5 μM; AZT5, ratones expuestos a AZT 5 μM.

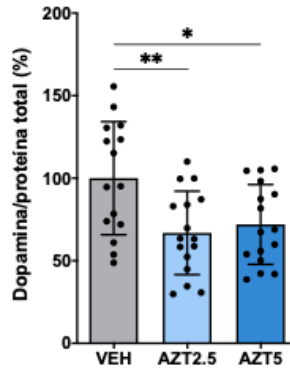


Figura III.24. Determinación de la cantidad del neurotransmisor dopamina en el cerebro de ratones envejecidos tras la exposición prenatal a AZT. Datos determinados por ELISA. VEH: $100,0 \pm 34,29$ (15); AZT2.5: $66,86 \pm 25,27$ (16); AZT5: $71,98 \pm 24,19$ (16). Los valores medios de los ratones expuestos únicamente al vehículo se consideran el 100 %. Prueba ANOVA + Dunnett: * $p \leq 0,05$ (vs. VEH); ** $p \leq 0,01$ (vs. VEH). AZT, azidotimidina; VEH, ratones expuestos a vehículo; AZT2.5, ratones expuestos a AZT 2,5 μM ; AZT5, ratones expuestos a AZT 5 μM .

Un estudio sobre la exposición prenatal a AZT determinó niveles aumentados del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el córtex y el hipotálamo de los ratones expuestos. Teniendo en cuenta que el BDNF promueve tanto la diferenciación como la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, se propuso que el incremento de los niveles de BDNF actuaba como un mecanismo neuroprotector contra las consecuencias deletéreas del AZT en estas neuronas (256). Otra investigación en un modelo murino sobre el tratamiento perinatal con AZT determinó una reducción de la neurogénesis inducida y alteraciones en las neuroesferas derivadas de las células madre astrocíticas multipotentes extraídas del sistema nervioso central de crías expuestas (157). Por otro lado, la exposición prenatal a otros xenobióticos OXPPOS ha demostrado tener efectos nocivos sobre las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. El tratamiento con MPTP durante 8 días en el desarrollo embrionario (E9-E17) supuso una disminución de los niveles de dopamina en la inmunohistoquímica del estriado en ratones de 1 y 6 semanas de edad, en cambio no se observaron alteraciones en la cantidad de TH (124). Otros autores, que evaluaron la exposición prenatal a MPTP tras una administración puntual (E12) a alta concentración, determinaron una caída en la cantidad de células positivas para la TH en la región nigroestriatal de los fetos expuestos (119). El tratamiento con paraquat en un modelo murino durante el embarazo también condujo a un déficit de neuronas inmunorreactivas a la TH en la SN de los ratones expuestos prenatalmente a la edad de 60 días (117). La administración gestacional en modelos murinos de diversos xenobióticos OXPPOS, como atrazina, MPTP o paraquat, conlleva una reducción en los niveles de dopamina, normalmente asociada a alteraciones de marcadores dopaminérgicos (Nr4a2, TH o DAT), en animales de hasta 12 meses de edad (89). Otros estudios realizados en primates también determinaron niveles de dopamina reducidos en los animales expuestos prenatalmente a MPTP a las 20

Resultados y discusión

semanas o los 5 meses de edad (121,257). Además, se ha observado que los ratones expuestos de forma prenatal a MPTP o maneb mostraban una gran vulnerabilidad ante una segunda exposición a MPTP o paraquat, respectivamente, en comparación con aquellos ratones no expuestos durante el desarrollo (82,83,120). En concreto, después de administrar 10 mg/kg de MPTP a las 12 semanas de edad, los niveles de TH y dopamina, entre otros, mostraban una caída muy superior en los ratones expuestos prenatalmente a la droga, obteniendo un efecto leve en aquellos no expuestos previamente (120). En muchos casos, el tratamiento prenatal con este tipo de drogas provoca alteraciones en las pruebas funcionales, como déficits en la actividad locomotora, asociadas al declive del sistema dopaminérgico. Se debe tener en cuenta que estos xenobióticos OXPHOS con efecto en las neuronas dopaminérgicas poseen una mayor toxicidad, con efectos secundarios más graves, en comparación con la toxicidad del AZT a las concentraciones aquí evaluadas.

En resumen, parece que la exposición prenatal a AZT conlleva un déficit en la síntesis de dopamina en ratones envejecidos. Podría ser que las neuronas dopaminérgicas existentes en los ratones expuestos sean incapaces de sintetizar la misma cantidad de dopamina que las de los ratones control a los 22 meses de edad. Además, es posible que las alteraciones inducidas por el AZT sobre los niveles de dopamina estén relacionadas con los cambios de comportamiento en animales expuestos a AZT observados en esta tesis, así como en otros estudios reseñados previamente.

Cabe destacar que las pruebas realizadas en esta tesis se llevaron a cabo entre la edad adulta y la vejez de los ratones, desde los 12 hasta los 20 meses de edad, y los análisis bioquímicos y anatomopatológicos se realizaron en ratones envejecidos (22 meses). Existe la posibilidad de que los efectos del deterioro funcional asociado al envejecimiento y las rutas bioquímicas afectadas por la vejez hayan enmascarado posibles afecciones causadas por el fármaco, dada las evidencias acerca del declive mitocondrial o la degeneración dopaminérgica asociadas a la edad (230,232,234). De hecho, algunos autores han sugerido que el envejecimiento conduce a un estado pre-parkinsoniano, de modo que los factores genéticos o ambientales que deterioran el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas acelerarían los procesos naturales asociados a la vejez, desencadenando la PD. Por tanto, el envejecimiento se consideraría una característica central, incluso necesaria, en la PD idiopática (230).

Se debe tener en cuenta que las dosis empleadas a lo largo de la tesis no deberían suponer grandes efectos a nivel funcional al ser similares a aquellas encontradas en el plasma de pacientes o equivalentes a las dosis administradas a humanos. En caso contrario, las consecuencias devastadoras que tuviese el fármaco comprometerían seriamente la salud o la integridad de los individuos tratados.

La mayoría de los estudios de farmacocinética o farmacodinámica se realizan en individuos sanos o en pacientes, mientras que muy pocos estudios incluyen embarazadas. Esto supone una limitación a la hora de extrapolar las dosis a mujeres gestantes, ya que su volumen corporal varía durante el embarazo. Además, otros factores podrían influir en los parámetros farmacológicos de la droga en cuestión. En cuanto a la exposición fetal, resulta difícil precisar la concentración de fármaco que alcanza al feto. Otros parámetros como el volumen o el tamaño del feto o su incapacidad para detoxificar la droga, debido al desarrollo incompleto del hígado, podrían condicionar la cantidad de fármaco a la cual el feto está expuesto *in utero*.

Aunque actualmente el AZT no se encuentra entre los fármacos de primera línea para el tratamiento del HIV, continúa una alternativa terapéutica empleada. Además, el AZT se considera el fármaco de elección para el tratamiento de mujeres intraparto para prevenir la transmisión vertical del virus, y para la profilaxis postnatal de los neonatos durante un mínimo de 2 semanas, pudiendo aumentar o combinar con otros antirretrovirales en función del riesgo de transmisión vertical (258–260).

Al realizar la siguiente búsqueda “((prenatal) OR (perinatal) OR (in utero)) AND (antirretroviral) AND (mitochondr*) AND ((central nervous system) OR (neuron*))” en PubMed, únicamente se reportan 8 resultados. Destaca la poca cantidad de estudios que se han realizado sobre la exposición prenatal a fármacos antirretrovirales en relación a la toxicidad mitocondrial en el sistema nervioso central. La limitada cantidad de investigaciones al respecto refleja las dificultades existentes en la obtención de muestras cerebrales en los estudios poblacionales. No obstante, también existe poca investigación en modelos animales que permiten replicar la exposición *in utero* a la ART, ya que resulta complicado simular dicha exposición prenatal en un modelo celular. En concreto, la mayoría de los estudios poblacionales sobre los efectos mitocondriales del AZT se han realizado en adultos en tratamiento donde se han analizado diversos tejidos, obteniendo variedad de resultados al respecto. Por todo ello, se debería poner el foco de atención en las consecuencias de la exposición a NRTI durante el desarrollo, ya que podrían desencadenar problemas futuros asociados a la disfunción mitocondrial. De hecho, desde el comienzo de la terapia antirretroviral con la aprobación del AZT contra el HIV han transcurrido menos de 40 años, de modo que los individuos expuestos prenatal o perinatalmente a este tipo de fármacos todavía no han alcanzado la vejez. Por tanto, es pronto para determinar si el tratamiento con antirretrovirales durante el desarrollo predispone al individuo a padecer enfermedades degenerativas asociadas a la edad.

CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

1. Ambos modelos celulares poseen capacidad de diferenciación, característica determinante en esta tesis para el estudio de la neurogénesis. Tanto en la línea celular SH-SY5Y diferenciada como en las neuronas derivadas de hNSC se forma una red compleja con largas extensiones de neuritas, aumentando la expresión del mRNA de la TUBB3, uno de los principales marcadores neuronales. En definitiva, los dos modelos neuronales se consideran idóneos para estudios futuros sobre la generación de neuronas maduras.
2. El tratamiento con AZT durante la diferenciación a neurona madura de ambas líneas celulares provoca déficits en la cadena de transporte de electrones y, en el caso de las hNSC, en la síntesis de ATP mitocondrial. La administración del fármaco en las neuronas derivadas de hNSC causa un incremento en los niveles de mtDNA, así como un aumento tanto de los niveles de mRNA mitocondrial como de la cantidad de proteína de estas subunidades OXPHOS, que podría cursar como un efecto compensatorio de la célula ante un fallo en el funcionamiento del sistema OXPHOS. Esta disfunción mitocondrial parece ser la causante de una capacidad de diferenciación reducida en los dos modelos empleados, que queda reflejada en sus defectos morfológicos y en la disminución de múltiples marcadores neuronales, incluidos varios de neurona dopaminérgica.
3. La exposición prenatal a AZT de los ratones C57BL/6J provoca una disminución de la actividad del CIV en el cerebro de los animales envejecidos. Asimismo, el tratamiento *in utero* conduce a un descenso de los niveles del neurotransmisor dopamina cuyo déficit causa la PD. Esta reducción en la síntesis de dopamina, probablemente relacionada con las alteraciones en la función mitocondrial, podría desencadenar el deterioro de la fuerza muscular observado en estos ratones envejecidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Líneas celulares y material biológico

Para el desarrollo de la presente tesis se emplearon tanto la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y como hNSC provenientes de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), desarrolladas en nuestro laboratorio a partir de fibroblastos (163).

También se trabajó con tejido cerebral derivado del estudio realizado en ratones de la cepa C57BL/6J (apartado V.3). Para la obtención de las muestras, tras el sacrificio de los animales, se extrajo rápidamente el cerebro, de forma que una mitad de este se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C para el análisis bioquímico. Posteriormente, esta mitad de cerebro fue homogeneizada en el mortero con nitrógeno líquido, dividido en varias fracciones y congelado a -80 °C hasta la extracción correspondiente. La otra mitad se recogió en formaldehído para el análisis histológico.

V.2. Cultivos celulares

V.2.1. Materiales y equipos de cultivo celular

Tanto el material plástico estéril empleado (placas o frascos de cultivos, tubos Falcon, criotubos, etc.) como los filtros de jeringa Acrodisc® GHP de 0,22 µm de tamaño de poro utilizados para la esterilización de soluciones procedieron de TPP®. Se emplearon también jeringas de diferente volumen de la casa BD. Las pipetas serológicas utilizadas provenían de Sarstedt. El material de vidrio usado en la manipulación de las células se esterilizó a 121 °C en un autoclave durante 30 min a 1 atmósfera de presión.

El trabajo con células se realizó en campanas de flujo laminar vertical, modelo LaminAir (Holten) y modelo NU-437-400E (Nuaire). Las líneas celulares se mantuvieron durante su crecimiento en incubadores a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂, modelo DHD AutoFlow Incubator (Nuaire). Medios de cultivo u otros reactivos se atemperaron, en caso de ser necesario, previo a su uso, en un baño termostatzado modelo Precistern (P-Selecta). Las células se visualizaron en un microscopio invertido modelo DMIL (Leica). Para las centrifugaciones realizadas tanto en los procesos de mantenimiento celular como en la obtención del pellet celular se empleó una centrifuga Allegra X-22 (Beckman Coulter).

V.2.2. Mantenimiento de cultivos celulares

Todas las manipulaciones de las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical en condiciones estériles. Las células se cultivaron en ausencia de antibióticos. El medio se cambió cada dos días en ambas líneas celulares empleadas.

Materiales y métodos

La línea celular SH-SY5Y se cultivó en medio Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM) de alto contenido en glucosa (25 mM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS). Previo a los estudios bioquímicos, las células se mantuvieron en DMEM de bajo contenido en glucosa (5 mM) también suplementado con un 10 % de FBS durante al menos 48 h. Todos los compuestos pertenecen a la marca Gibco™ (ThermoFisher Scientific).

Para el mantenimiento de la línea hNSC, se emplearon placas recubiertas con sustrato CELLstart™. Se preparó una dilución 1:100 en suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco (DPBS) Ca²⁺ Mg²⁺ en un volumen adecuado para cubrir por completo la superficie del soporte empleado y se incubó durante 1 h a 37 °C. Justo antes del uso de la placa, se retiró el volumen excedente. La línea hNSC se creció en medio StemPro completo compuesto por medio KnockOut™ DMEM/F-12, suplemento neuronal StemPro™ 1x, 100 ng/μl factor de crecimiento epidérmico (EGF), 100 ng/μl factor de crecimiento de los fibroblastos-básico (bFGF) y suplemento GlutaMAX™ 1x. Todos los compuestos pertenecen a la marca Gibco™ (ThermoFisher Scientific).

Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 80 % de confluencia se recogieron para sembrarlas en placas de cultivo nuevas, considerándose un pase más. Para ello, la línea SH-SY5Y se lavó con suero salino tamponado con fosfato (PBS) (Gibco™, ThermoFisher Scientific) para eliminar restos de proteínas del suero que inhiben la acción de la tripsina; entonces, se incubaron con TrypLE™ Express (Gibco™, ThermoFisher Scientific) para la disociación celular durante 3 min a 37 °C. En el caso de las hNSC, las células se lavaron con DPBS sin Ca²⁺ Mg²⁺ (Gibco™, ThermoFisher Scientific); posteriormente, se incubaron con Accutase® (Sigma-Aldrich) para la disociación celular durante 3 min a 37 °C. Tras comprobar que las células estaban despegadas, se recogieron en un Falcon en un volumen de medio cinco veces superior al volumen de reactivo utilizado. Finalmente, se centrifugaron a 378 o 300 x g durante 5 min, respectivamente. Tras obtener el pellet, se procesó según la finalidad del momento; para resembrarlas, se resuspendió en el volumen adecuado de forma que la suspensión celular obtenida se añadió a las placas, preparadas con la matriz de crecimiento en caso de necesitarla.

V.2.3. Congelación y descongelación de células

Para la congelación celular se utilizaron criotubos de 2 ml resistentes al nitrógeno líquido y el crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

El pellet celular obtenido se resuspendió en medio de congelación. En el caso de la línea SH-SY5Y este medio consistió en DMEM suplementado con 20 % de FBS y un 10 % de DMSO. Para las hNSC se suplementó el medio de crecimiento con 10 % de DMSO. A continuación, los criotubos se introdujeron en un Mr. Frosty que se guardó en el congelador a -80 °C. El sistema de congelación Mr. Frosty consiste en un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isoamílico y que, al ser sometido a congelación, permite un descenso gradual de la

temperatura de 1 °C/min que favorece una buena conservación celular. Las células se mantuvieron en el recipiente aproximadamente durante 24 h y, entonces, se pasaron a nitrógeno líquido donde se almacenaron hasta su posterior utilización.

Para la descongelación, en el caso de las células SH-SY5Y se resuspendió directamente el contenido del criotubo en un tubo Falcon de 15 ml con medio de mantenimiento. En el caso de las hNSC se atemperó el criotubo en el baño de agua a 37 °C hasta quedar un pequeño cristal y, luego, el contenido se resuspendió en un tubo Falcon de 15 ml con medio de crecimiento previamente atemperado. A continuación, tanto las células SH-SY5Y como las hNSC se centrifugaron a 378 x g o 200 x g durante 5 o 4 min, respectivamente. Finalmente, se retiró el sobrenadante para eliminar el DMSO que resulta tóxico para las células a temperatura ambiente, y el pellet celular obtenido se resuspendió con el medio de crecimiento para sembrarlo a la placa de cultivo adecuada.

V.2.4. Recuento celular

El recuento celular se realizó utilizando el Countess® Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific) diseñado para el conteo de células (desde 1×10^4 hasta 1×10^7 células/ml) y la evaluación de la viabilidad. Para ello se empleó la técnica estándar de azul tripán, que es un colorante capaz de penetrar en las células muertas, ya que estas presentan una membrana plasmática desestructurada.

Así pues, se mezclaron 20 µl de suspensión celular con el mismo volumen de azul tripán. La mezcla se pipeteó por duplicado en el interior de la cámara desechable. A continuación, el dispositivo realizó el conteo de forma automática.

V.2.5. Análisis de contaminación con *Mycoplasma* spp.

Periódicamente se llevó a cabo el control de contaminación por micoplasma en las líneas celulares utilizadas. Para el análisis se recogieron alícuotas de 2 ml de medio de cultivo tras 48 h de contacto con las células. Estas muestras se enviaron al servicio de cultivo celular del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud para su análisis mediante MycoAlert™ Mycoplasma Detection (Lonza) con el lector Synergy™ HT (BioTek).

V.2.6. Purificación de la línea de células madre neurales por el método de separación celular magnética

La tecnología MACS® permite la separación magnética de poblaciones celulares basadas en antígenos de superficie, proporcionando un método rápido y suave para el aislamiento de células viables y funcionales mediante el marcaje de epítomos con anticuerpos específicos conjugados con bolitas o *beads* superparamagnéticas.

En este caso, se emplearon MicroBeads Anti-PSA-NCAM. El anticuerpo Anti-PSA-NCAM reconoce el ácido polisialílico (PSA) que está unido al dominio extracelular de la molécula de

adhesión celular neural (NCAM). De forma que se empleó PSA-NCAM como marcador de células neurales inmaduras.

Para la purificación se siguió el protocolo del fabricante Miltenyi Biotec. En resumen, la suspensión celular se marcó magnéticamente con las *beads* para cargarlas en una columna MACS® colocada en el campo magnético de un separador MACS. De esta forma, las células PSA-NCAM⁺ marcadas magnéticamente quedaron retenidas dentro de la columna; mientras que las células no marcadas pasaron libremente a través de esta. Tras retirar la columna del campo magnético, las células PSA-NCAM⁺ retenidas magnéticamente se eluyeron como fracción celular seleccionada. Finalmente, estas células se cultivaron con normalidad siguiendo los métodos descritos previamente.

V.2.7. Diferenciación a neurona madura

Diferenciación a neurona de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Para la diferenciación de la línea SH-SY5Y, se sembraron 15 000 células/cm² en medio DMEM de bajo contenido en glucosa (5 mM) suplementado con 10 % de FBS. A las 24 h de sembradas, las células se cambiaron al medio de diferenciación; dicho medio se reemplazó por medio fresco cada tres días durante una semana.

El medio de diferenciación neural para la línea SH-SY5Y se compone de Neurobasal™-A sin glucosa ni piruvato, suplemento B27™ 1x, suplemento CultureOne™ 1x, suplemento GlutaMAX™ 1x, suplemento N-2 1x, 10 µM ácido retinoico, 5 mM glucosa, y 1 mM piruvato. Todos los compuestos pertenecen a la marca Gibco™ (ThermoFisher Scientific), excepto la glucosa y el piruvato pertenecientes a Sigma-Aldrich.

Diferenciación a neurona de células madre neurales

Para la diferenciación de las hNSC, se sembraron 30 000 células/cm² en medio StemPro completo. A las 24 h de sembradas, las células se cambiaron al medio de diferenciación; dicho medio se reemplazó por medio fresco cada tres días durante una semana.

En la diferenciación se emplearon placas o frascos cubiertos con poli-L-ornitina y laminina. Para su preparación, se recubrió la superficie con poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 µg/ml en H₂O apta para cultivos celulares; entonces, se incubó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua estéril y se incubó durante 2 h a 37 °C con laminina (ThermoFisher Scientific) a una concentración de 10 µg/ml en agua apta para cultivos celulares. Finalmente, se hizo un lavado con DPBS sin Ca²⁺ Mg²⁺ (Gibco™, ThermoFisher Scientific) y se añadió el medio StemPro completo. Todo el proceso se realizó con un volumen adecuado para cubrir la superficie del soporte empleado.

El medio de diferenciación neural para las hNSC se compone de Neurobasal™-A sin glucosa ni piruvato, suplemento B27™ sin suero 1x, suplemento CultureOne™ 1x,

suplemento GlutaMAX™ 1x, 200 µM ácido ascórbico, 5 mM glucosa, y 1 mM piruvato. Todos los compuestos pertenecen a la marca Gibco™ (ThermoFisher Scientific), excepto la glucosa y el piruvato pertenecientes a Sigma-Aldrich.

V.2.7.1. Tratamientos con drogas

Para evaluar el efecto de las diferentes drogas sobre la diferenciación a neurona, las células fueron expuestas a estas durante el proceso de diferenciación. Para evitar un potencial efecto sobre la adherencia celular, estas se sembraron en su medio de mantenimiento; pasadas 24 h de la siembra, se cambió al medio de diferenciación en el cual se disolvió el fármaco en cuestión a la concentración deseada. Este medio se renovó cada tres días durante la semana de diferenciación por medio fresco con droga. El stock de todas las drogas empleadas se encontraba disuelto en agua apta para cultivos celulares.

En todos los casos, en paralelo a los tratamientos, se sembraron células para diferenciar sin drogas que se emplearon como control de diferenciación.

V.2.8. Estudio de la diferenciación neural mediante el sistema Incucyte

Para el estudio de la diferenciación neuronal, se empleó el equipo Incucyte® (Sartorius AG), una plataforma cuantitativa en tiempo real de imágenes de células vivas que permite la visualización y la cuantificación del comportamiento celular a lo largo del tiempo mediante la recopilación y el análisis automático de imágenes dentro de un incubador. En particular, el Incucyte® se programó con el módulo Neurotrack para que adquiriese imágenes cada 12 h. Una vez analizadas las imágenes mediante el software Neurotrack, este proporcionó un conjunto de métricas. En el caso del estudio de la diferenciación neural en ambas líneas, se midieron la longitud y la ramificación de neuritas; para evaluar los efectos de los fármacos estudiados sobre el crecimiento de las neuritas se midieron tanto la longitud de estas como su ramificación normalizadas frente a los grupos de cuerpos celulares o *cell-body cluster*.

V.2.9. Inmunofluorescencia de cultivos celulares

Para la inmunofluorescencia de células fijadas, las células se lavaron con PBS o DPBS para, posteriormente, fijar con paraformaldehído al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, se lavaron dos veces con PBS o DPBS. Entonces, las células se trataron con Tritón X-100 al 0,1 % durante 15 min a temperatura ambiente con el fin de permeabilizar. Finalmente, se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) al 5 % durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear la superficie y evitar uniones inespecíficas.

Para el marcaje de las proteínas, las células se incubaron con el anticuerpo anti-TUBB3 (conejo, 1:1000, Abcam) en una solución de PBS con BSA al 1 % y Tritón X-100 al 0,1 % durante 2 h a temperatura ambiente. Tras dicha incubación, se lavó dos veces con Tritón X-100 al 0,1 %. Entonces, se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor™ 488 goat anti-

Materiales y métodos

rabbit IgG (H+L) (cabra, 1:1000, Invitrogen) protegido de la luz durante 1 h a temperatura ambiente. De nuevo, se lavaron las células dos veces con Tritón X-100 al 0,1 %. Finalmente, se incubaron las células con una solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1:1000 en PBS durante 10 min para teñir los núcleos celulares.

Para descartar la existencia de uniones inespecíficas, en todos los casos se realizó paralelamente un control de anticuerpo secundario, siguiendo el mismo procedimiento, pero sustituyendo la incubación con el anticuerpo primario por PBS.

Las preparaciones se visualizaron hasta 30 – 90 min después a través de la estación de imagen EVOS® FLoid®Cell Imaging Station (ThermoFisher Scientific). El sistema permite tomar las imágenes directamente desde la propia placa de cultivo.

V.3. Modelo animal

Para estudiar el efecto de la exposición prenatal a AZT, se empleó un modelo murino, concretamente ratones de la cepa C57BL/6J adquiridos en Charles River Laboratories (Francia). El objetivo del estudio era correlacionar defectos en la neurogénesis inducidos por la exposición prenatal a AZT con posibles consecuencias asociadas al envejecimiento, en particular el desarrollo de la PD de ataque tardío. Por tanto, los tratamientos se realizaron durante el periodo fetal y los animales se mantuvieron hasta los 22 meses de edad (Figura V.1), que equivale aproximadamente a 77 años en humanos.

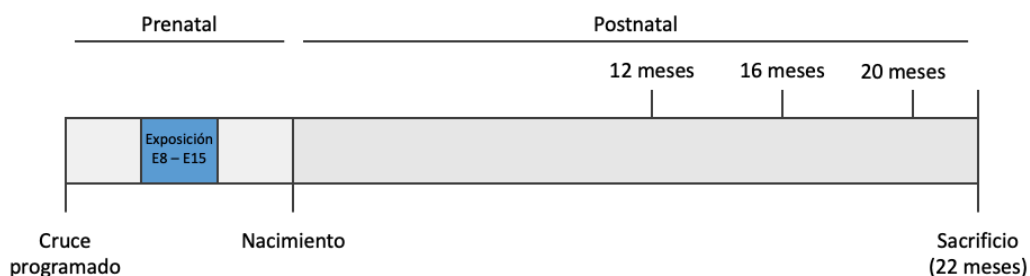


Figura V.1. Línea temporal del proyecto para estudiar el efecto de la exposición prenatal a AZT llevado a cabo en el modelo murino C57BL/6J. E8 y E15 indican días embrionarios.

Durante el desarrollo del estudio, los animales se albergaron en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Los ratones se alojaron en jaulas blandas con filtro superior en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, 55 ± 10 % de humedad y 22 ± 2 °C de temperatura controlada. Los animales tuvieron acceso tanto a agua osmotizada y esterilizada en autoclave como a alimentos irradiados (dieta de mantenimiento para roedores 2914 Teklad Global 14 % de proteínas). Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo la Licencia de Proyecto PI17/00166 aprobada por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y el uso de los animales

se realizaron de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD53/2013, que cumple con la Directiva 2010/63 de la Unión Europea relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Para comenzar el proyecto, tras un tiempo de aclimatación de 3,5 a 4,5 semanas, se llevaron a cabo los cruces programados entre hembras de 12,5 – 13,5 semanas de edad con machos exreproductores. A la mañana siguiente se examinó la presencia de tapón vaginal para confirmar el embarazo. Además, en el día embrionario 7 (E7) todas las hembras se pesaron para evaluar la ganancia de peso.

Al igual que en humanos, las neuronas dopaminérgicas del ratón se desarrollan principalmente en el periodo prenatal. En concreto, en ratones la especificación y la diferenciación de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio ocurre entre los días embrionarios E9 y E14 y entre E11.5 y E15, respectivamente (261–264). Por ello, el tratamiento se administró a las hembras gestantes desde el día E8 hasta el día E15 (Figura V.1). Dichas hembras se distribuyeron al azar en varios grupos correspondientes a vehículo, dosis baja de fármaco (AZT 2,5 mg/día) o dosis alta de fármaco (5 mg/día). La dosis de 2,5 mg se calculó de acuerdo al método de normalización de la superficie corporal siendo equivalente a los 600 mg/día de AZT que reciben los humanos. El tratamiento se administró mediante sonda nasogástrica (10 µl/g de peso corporal), sin superar el límite máximo permitido de 2 ml/100 g para soluciones acuosas, según recomendaciones de la OECD (265,266).

Esta generación de ratones se mantuvo hasta los 22 meses. Durante este tiempo, se realizó el seguimiento del peso corporal en tres momentos: al mes de nacer, antes de las pruebas conductuales, y previo al sacrificio. Las diferentes pruebas conductuales (apartado V.3.1), se escogieron para evaluar parámetros motores u olfativos que podrían estar afectados en la PD. Estas pruebas se llevaron a cabo en tres etapas diferentes una vez ya alcanzada la mediana edad, 12 meses (45 años en humanos), 16 meses (55 años en humanos) y 20 meses (70 años en humanos) (Figura V.1).

Al llegar a los 22 meses los ratones se sacrificaron por dislocación cervical para la realización de estudios bioquímicos e histológicos.

V.3.1. Pruebas conductuales

V.3.1.1. Prueba de campo abierto

La actividad locomotora se evaluó en un aparato de campo abierto (8). Se colocó a cada ratón en el centro del cuadrado de arena (45 x 45 x 40 cm) y se le permitió explorarla durante 15 min. Durante este periodo, se registró la distancia total (actividad locomotora) y la velocidad de movimiento (cm/s). Los datos se registraron utilizando el sistema de seguimiento por vídeo Smart Junior (Panlab) operado por ordenador.

V.3.1.2. Prueba de rejilla invertida

Esta prueba se utilizó para evaluar la fuerza muscular de las cuatro extremidades en los ratones (267). Los animales se colocaron en el centro de una tapa de jaula estándar con rejilla metálica y se voltearon suavemente hasta quedar suspendidos cabeza abajo a 40 cm por encima de una jaula limpia. Se registró el tiempo que tardaban en caer de la rejilla; el tiempo máximo permitido por ensayo era de 90 s. Si un ratón no realizaba el tiempo máximo, se repetía la prueba hasta 3 veces, y se promediaban los datos de los tres ensayos. Los tiempos de caída se puntuaron de la siguiente manera: caída entre 1 y 10 s = 1, caída entre 11 y 25 s = 2, caída entre 26 y 60 s = 3, caída entre 61 y 90 s = 4, caída después de 90 s = 5.

V.3.1.3. Prueba de suspensión de alambre

Esta prueba se utilizó para evaluar tanto la fuerza de las extremidades anteriores como la coordinación motora (268). Un alambre de 55 cm de ancho y 2 mm de grosor se colocó a dos soportes verticales situados a 30 cm sobre una zona de caída suave. Se sujetó un ratón por la cola y se colocó en el centro del alambre, colgando de sus extremidades anteriores. La puntuación inicial se registró como 10. Cuando un ratón caía o alcanzaba uno de los lados del alambre, la puntuación disminuía o aumentaba en 1, respectivamente. Después de una caída o cada vez que el ratón alcanzaba un extremo del alambre, se volvía a colocar en la posición original en el centro del alambre. El procedimiento se repitió hasta que la puntuación de caída llegó a cero o el tiempo total de suspensión alcanzó los 3 min.

V.3.1.4. Prueba de pesas

La fuerza de agarre de la extremidad anterior se midió mediante una prueba de levantamiento de peso empleando alambre de acero al que se acoplaron eslabones de cadena de acero con pesos crecientes (20, 33, 46, 59, 72, 85 y 98 g) (267). Se sujetaba a un ratón por la cola y se le permitía agarrar el alambre de acero unido al peso más bajo. Si el ratón era capaz de sujetar la pesa con sus patas delanteras durante 3 s, se probaba la siguiente pesa más pesada. Si la pesa se caía antes de 3 s, se repetía el procedimiento con la misma pesa. Si el ratón fallaba en tres pruebas consecutivas, se daba por terminado el experimento. La puntuación final se calculó como el producto del número máximo de eslabones mantenidos durante 3 s más el tiempo que el animal fue capaz de levantar la siguiente cadena más grande.

V.3.1.5. Evaluación de la hiposmia

Para comprobar la función olfativa, se realizó la prueba de búsqueda de galletas (269). Los ratones se familiarizaron con la galleta de chocolate durante tres días antes de la prueba. Se aplicó una restricción alimentaria durante más de 18 h antes de la prueba. El día de la prueba, cada ratón se colocó individualmente en una jaula limpia que contenía 3 cm de lecho fresco y se dejó aclimatar durante 5 min. Tras la aclimatación, se enterró una galleta de

chocolate (3 g) 0,5 cm bajo el lecho en una esquina de la jaula y se colocó al ratón en el borde opuesto. Se registró el tiempo que tardaba el ratón en descubrir la galleta hasta un límite máximo de 15 min.

V.4. Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

V.4.1. Aislamiento de DNA total a partir de muestras biológicas o cultivos celulares

El DNA total se extrajo utilizando SPEEDTOOLS DNA Extraction (Biotools) tanto para células como para homogenado de tejido cerebral. Antes de la extracción, las células en cultivo se recogieron por tripsinización, se centrifugaron y se lavaron con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación. Tras la obtención del pellet celular, este se congeló a -80 °C hasta el momento de la extracción. Durante la extracción se siguieron las indicaciones del fabricante para células en cultivo crecidas en monocapa o tejido.

V.4.2. Aislamiento de RNA total a partir de muestras biológicas o cultivos celulares

El RNA total se extrajo utilizando NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) tanto para células como para homogenado de tejido cerebral. Antes de la extracción, las células en cultivo se recogieron por tripsinización, se centrifugaron y se lavaron con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación. Durante la extracción se siguieron las indicaciones del fabricante para células en cultivo crecidas en monocapa o tejido.

V.4.3. Retrotranscripción de RNA total

El DNA complementario (cDNA) monocatenario se obtuvo mediante *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis* (Roche) utilizando como molde RNA total extraído previamente del pellet celular (apartado V.4.2). Para ello, se emplearon 250 ng de RNA, o el máximo volumen permitido si la concentración no era suficiente, junto con los reactivos en un volumen final de 20 μ l (Tabla V.1).

Tabla V.1. Mezcla de reacción para la retrotranscripción de RNA a cDNA.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μ l)	Concentración final
RNA total		variable	
<i>Random hexamer primer</i>	600 pmol/ml	2	60 μ M
H ₂ O		Hasta 11,4 μ l	
Tampón de reacción	5x	4	1x 8 mM MgCl ₂
Inhibidor de Rnasas	40 U/ml	0,5	20 U
Mezcla de dideoxinucléotidos	10 mM de cada	2	1 mM de cada
Ditiotreitol (DTT)		1	5 mM
Transcriptasa reversa		1,1	22 U

Materiales y métodos

Inicialmente, se añadió el volumen correspondiente de RNA junto con 2 µl de *Random hexamer primer* y agua hasta completar 11,4 µl. Entonces se incubó la mezcla a 65 °C durante 10 min en el termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™). Tras enfriar en hielo, se añadieron 8,6 µl de la mezcla con los reactivos restantes. Finalmente, se llevaron a cabo los correspondientes ciclos de temperatura en el termociclador (Tabla V.2). La muestra de cDNA obtenida se conservó a -20 °C hasta su uso.

Tabla V.2. Programa de temperaturas para la retrotranscripción del RNA a cDNA.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
29	10
48	60
85	5

V.4.4. Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

La cantidad de ácidos nucleicos se determinó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000). Se midió la absorbancia tanto a 260 nm para cuantificar la cantidad de DNA o RNA, como a 230 y 280 nm para calcular la pureza de dicha muestra.

En primer lugar, se realizaron dos medidas con agua destilada, la segunda de ellas para fijar el valor del blanco. Posteriormente, se añadió 1 – 2 µl de las muestras de DNA o RNA a cuantificar y se obtuvieron los valores de concentración de ácidos nucleicos, ya calculados por el programa informático asociado. Los ratios de absorbancia para evaluar la pureza se consideraron óptimos cuando se encontraban entre 1,8 – 2,0 para 260/280 nm o 2,0 – 2,2 para 230/280 nm.

V.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de 100 ng de DNA total extraído de tejido cerebral de ratón (apartado V.4.1). Las condiciones de la PCR varían en función de las características de la región de DNA a amplificar y de la enzima DNA polimerasa utilizada. Para comprobar la ausencia de contaminación durante la preparación de los reactivos, en cada experimento se preparó un tubo adicional con la mezcla de reacción que carecía de DNA (blanco).

V.4.5.1. Amplificación del mtDNA completo (PCR larga)

La determinación de deleciones en el mtDNA se realizó mediante PCR larga. Para ello, se utilizó como molde DNA total, junto con dos oligonucleótidos diseñados para amplificar el mtDNA completo de ratón (Tabla V.3).

Tabla V.3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación completa del mtDNA de ratón.

Oligonucleotido	Secuencia 5'→3'
MsmL293	5'-TAAACGAAAGTTTGACTAAGTTATACCTCTTAGGG-3'
MsmH171	5'-TTAAGCTATTTAATGTGCTTGATACCCTCTCC-3'

Tanto los volúmenes de reactivos (ThermoFisher Scientific) (Tabla V.4) como las condiciones de la reacción (Tabla V.5) se recogen en las siguientes tablas:

Tabla V.4. Mezcla de reacción para la amplificación completa del mtDNA de ratón.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μl)
Phusion Master MIX with GC Buffer	2x	12,5
MsmL293	25 μM	0,5
MsmH171	25 μM	0,5
DNA (100 ng)		Variable
H ₂ O		Hasta 25 μl

Tabla V.5. Programa de temperaturas para la amplificación completa del mtDNA de ratón.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
98	30 s	1
98	10 s	30
67,2	30 s	
72	10 min	
72	10 min	1
4	20 min	1

V.4.5.2. Amplificación de la región control del mtDNA para su secuenciación

Para la secuenciación de la región control del mtDNA, en primer lugar, se amplificó dicha región mediante PCR. Para ello, se utilizó como molde DNA total, junto con dos oligonucleótidos diseñados para amplificar la región control del mtDNA de ratón (Tabla V.6) (ThermoFisher Scientific). En este caso, la mezcla de reacción utilizada EmeraldAmp® Max PCR Master Mix pertenece a la casa comercial Takara.

Tabla V.6. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región control del mtDNA de ratón.

Oligonucleotido	Secuencia 5'→3'
MsmL15198	5'-AACACCCATTTATTATCATTGGCC-3'
MsmH177	5'-TAAGCTATTTAATGTGCTTGATACC-3'

Materiales y métodos

Tanto los volúmenes de reactivos (Tabla V.7) como las condiciones de la reacción (Tabla V.8) se recogen en las siguientes tablas:

Tabla V.7. Mezcla de reacción para la amplificación de la región control del mtDNA de ratón.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μ l)
EmeraldAmp® Max PCR Master Mix	2x	12,5
MsmL15198	25 μ M	0,5
MsmH177	25 μ M	0,5
DNA (100 ng)		Variable
H ₂ O		Hasta 25 μ l

Tabla V.8. Programa de temperaturas para la amplificación de la región control del mtDNA de ratón.

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
94	5 min	1
94	45 s	35
64	30 s	
72	3 min	
72	5 min	1
4	5 min	1

V.4.6. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación electroforética de ácidos nucleicos se realizó en geles de agarosa que permiten la separación de los mismos en función de su tamaño.

Para la preparación de las muestras, 5 μ l de amplificado se mezclaron con 2 μ l de tampón de carga (Ficoll 400 al 15 %, azul de bromofenol al 0,2 %, en tampón de electroforesis (TBE)).

Para la electroforesis de ácidos nucleicos, se emplearon geles horizontales de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La agarosa se disolvió en tampón TBE (Tris 50 mM, Ácido Bórico 50 mM, EDTA-Na 1 mM, pH 8,3) calentado la mezcla en un horno microondas, a 0,7 % para el análisis de amplificados procedentes de PCR larga o 1 % para el análisis de amplificados procedentes de PCR para secuenciación. Tras añadirle bromuro de etidio (1 μ g/ml), la solución se dejó gelificar en camas de 50 o 100 ml (Bio-Rad). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 30-60 min, en función de la separación deseada. A continuación, el resultado se visualizó mediante la exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta (Gel Doc™, Bio-Rad).

V.4.7. Secuenciación de la región control del mtDNA

Tras comprobar por electroforesis la correcta amplificación del fragmento de la región control del mtDNA, se purificaron las muestras. Para ello, 10 µl de muestra se mezclaron con 4 µl de ExoSAP-IT™ Express, que contiene exonucleasa I y fosfatasa alcalina (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción se recogen en la siguiente tabla (Tabla V.9):

Tabla V.9. Programa de temperaturas para la purificación con ExoSAP-IT™ Express.

Temperatura (°C)	Tiempo
37	4 min
80	1 min
4	

Posteriormente, las muestras se enviaron al servicio de secuenciación automática en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Para la secuenciación se emplearon los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región control del mtDNA (Tabla V.6), junto con otro adicional, MsmtL15422 (5'-TGGTATTCTAATTAATACTACTTCTTG-3').

Para analizar las secuencias se utilizó el software Sequencher v 4.1.4. Este programa permite el alineamiento de varias secuencias, de modo que se alinearon las secuencias obtenidas (solapantes entre sí) con la secuencia de referencia del mtDNA (DQ106412.1). Entonces, el programa detecta los cambios producidos en las mismas, ya sean cambios de base, deleciones o inserciones, y así se pueden analizar los polimorfismos presentes en las muestras.

V.4.8. Determinación de la metilación global del DNA

El kit MethylFlash™ Methylated DNA Quantification (Epigentek) permite cuantificar la cantidad de 5-metilcitosina, un indicador clave en la metilación del DNA. Esta metilación del DNA supone la unión covalente de un grupo metilo al carbono 5 del anillo de citosina por acción de enzimas metiltransferasas.

La microplaca proporcionada en este kit está pre-tratada para tener una gran afinidad por el DNA. Cuando los estándares o las muestras (100 ng de DNA) se añaden a los pocillos de la microplaca, se incuban a 37 °C durante 90 min para favorecer su unión a la superficie de la placa. Tras varios lavados, se incuba con el anticuerpo de captura durante 60 min a temperatura ambiente. De nuevo, se lava la placa varias veces y se añade el anticuerpo de detección para incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, tras una serie de lavados, se incuba con una solución de amplificación de señal durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se lava varias veces la placa y se añade la solución de

sustrato a cada pocillo donde se producirá la reacción colorimétrica. Esta reacción finaliza con la adición de la solución de parada tras aproximadamente 10 min de incubación protegido de la luz. La absorbancia se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. La cuantificación del porcentaje de 5-metilcitosina de las muestras se calculó comparando su absorbancia con la recta estándar construida a partir de un DNA hipermetilado incluido en el kit. Para la realización de este ensayo se siguieron las instrucciones del protocolo del fabricante, midiendo la absorbancia mediante el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

V.4.9. Determinación del número de copias de mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real a partir de DNA

La medida de los niveles de mtDNA se basó en la técnica de sondas TaqMan® que consiste en la determinación simultánea del genoma mitocondrial junto con el genoma nuclear. En las muestras procedentes de cultivos celulares de origen humano, la sonda mitocondrial con el fluoróforo fluoresceína (FAM) está diseñada para que hibride en una zona muy conservada del mtDNA (gen *MT-RNR1*), mientras que la nuclear con el fluoróforo de xanteno asimétrico (VIC) hibrida en el gen de la RNAsa P. A continuación, se muestran las secuencias tanto de los oligonucleótidos como de la sonda FAM (Tabla V.10) diseñadas para el gen *MT-RNR1*; en el caso de la RNAsa P, se empleó el reactivo TaqMan™ RNase P assay (ThermoFisher Scientific) marcado con el fluoróforo VIC. En el caso de las muestras procedentes de tejido de ratón, la sonda mitocondrial con fluoróforo FAM también está diseñada para que hibride en una zona muy conservada del mtDNA (gen *Mt-rnr1*), mientras que la nuclear con fluoróforo VIC hibrida en el gen de la Gapdh. En ambos casos se emplearon reactivos que contienen la mezcla de sonda Taqman® con oligonucleótidos específicos para cada gen (ThermoFisher Scientific).

Tabla V.10. Secuencias de los oligonucleótidos y la sonda FAM empleados para cuantificar el número de copias de mtDNA y su temperatura de hibridación.

Oligonucleotido	Secuencia 5'→3'	Temperatura hibridación (°C)
12S-L (directo)	CCACGGGAACAGCATGTATT	58,4
12S-H (reverso)	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2
Sonda MT-FAM	FAM-TGCCAGCCACCGCG	69,3

Para las muestras derivadas de células de origen humano, se emplearon rectas estándar realizadas a partir de una mezcla de dos plásmidos que contenía 9×10^6 copias del gen mitocondrial y 9×10^4 copias del gen nuclear. Desde esta se realizaron diluciones seriadas 1:3 (en tampón Tris-HCl 10 mM pH = 8,5). La reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo a partir de 15 ng de DNA total de cada muestra. Para ello, se prepararon diluciones en agua estéril libre de DNAsas de cada muestra a la concentración adecuada para cargar el mismo volumen de DNA.

En el caso de las muestras derivadas de tejido cerebral de ratón, la reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo a partir de 10 ng de DNA total de cada muestra. Para ello, se prepararon diluciones en agua estéril libre de DNAsas de cada muestra a la concentración adecuada para cargar el mismo volumen de DNA.

Tanto los volúmenes de reactivos (Tabla V.11, Tabla V.12) como las condiciones de la reacción (Tabla V.13) se recogen en las siguientes tablas:

Tabla V.11. Mezcla de reacción para cuantificar el número de copias de mtDNA en humano.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μl)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2x	10
Oligo 12S-L	5 μM	0,5
Oligo 12S-H	5 μM	0,5
Sonda MT-FAM	5 μM	0,5
<i>RNAsa P</i> (VIC)	20x	1
DNA	3 ng/ μl	5
H ₂ O		2,5

Tabla V.12. Mezcla de reacción para cuantificar el número de copias de mtDNA en ratón.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μl)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2x	10
12S (FAM)	20x	1
<i>Gapdh</i> (VIC)	20x	1
DNA	5 ng/ μl	2
H ₂ O		6,0

Tabla V.13. Programa de temperaturas para cuantificar el número de copias de mtDNA.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

La PCR a tiempo real fue monitorizada por el StepOne™ System (Applied Biosystems). Los resultados, analizados en el programa StepOne v2.3, se expresaron como ΔCt entre la sonda mitocondrial y la nuclear. Posteriormente se relativizaron a la muestra control para obtener el porcentaje relativo de expresión.

V.4.10. Determinación de los niveles de expresión de transcritos de mRNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación de los niveles de mRNA de los distintos genes estudiados se llevó a cabo mediante la técnica de sondas TaqMan® en el StepOne™ System (Applied Biosystems). Para ello, se utilizó como molde RNA extraído de células en cultivo o de muestras biológicas (apartado V.4.2), o cDNA previamente sintetizado (apartado V.4.3). El gen estudiado se determinó mediante una sonda marcada con fluoróforo FAM; simultáneamente, se midió un gen constitutivo o de referencia mediante una sonda marcada con fluoróforo VIC (Tabla V.14).

Tabla V.14. Sondas Taqman® (ThermoFisher Scientific) empleadas para la determinación de la expresión de transcritos de mRNA tanto nucleares como mitocondriales.

Gen	Producto codificado	Especie	Fluoróforo
<i>MT-RNR1</i>	12S rRNA	Humano	FAM
<i>MT-ND1</i>	NADH deshidrogenasa 1	Humano	FAM
<i>MT-ND6</i>	NADH deshidrogenasa 6	Humano	FAM
<i>TUBB3</i>	β III tubulina	Humano	FAM
<i>MAP2</i>	Proteína asociada a microtúbulos 2	Humano	FAM
<i>TH</i>	Tirosina hidroxilasa	Humano	FAM
<i>NES</i>	Nestina	Humano	FAM
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Humano	VIC
<i>Cox1</i>	Citocromo c oxidasa 1	Ratón	FAM
<i>En1</i>	<i>Homeobox engrailed-1</i>	Ratón	FAM
<i>Nr4a2</i>	Receptor nuclear subfamilia 4 grupo A miembro 2	Ratón	FAM
<i>Th</i>	Tirosina hidroxilasa	Ratón	FAM
<i>Gapdh</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Ratón	VIC

Para la determinación a partir de RNA, en cada reacción se emplearon 10 ng. Para ello, se prepararon diluciones en agua estéril libre de RNAsas de cada muestra a la concentración adecuada para cargar el mismo volumen de RNA. Tanto los reactivos necesarios (TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step, Applied Biosystems™) (Tabla V.15) como las condiciones de reacción (Tabla V.16) se recogen en las siguientes tablas:

Tabla V.15. Mezcla de reacción para la determinación de los niveles de expresión de un transcrito a partir de RNA.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μ l)
TaqMan® RT Enzyme Mix	40x	0,5
TaqMan® RT-qPCR Mix	2x	10
Sonda FAM	20x	1
Sonda VIC	20x	1
cDNA	5 ng/ μ l	2
H ₂ O		5,5

Tabla V.16. Programa de temperaturas para la determinación de los niveles de expresión de un transcrito a partir de RNA.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
48	15 min	1
95	10 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

Para la determinación partiendo de cDNA, en cada reacción se emplearon 100 ng. Para ello, se prepararon diluciones en agua estéril libre de DNAsas de cada muestra a la concentración adecuada para cargar el mismo volumen de cDNA. Tanto los reactivos necesarios (TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems™) (Tabla V.17) como las condiciones de reacción (Tabla V.18) se recogen en las siguientes tablas:

Tabla V.17. Mezcla de reacción para la determinación de los niveles de expresión de un transcrito a partir de cDNA.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μ l)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2x	10
Sonda FAM	20x	1
Sonda VIC	20x	1
cDNA	20 ng/ μ l	5
H ₂ O		3

Tabla V.18. Programa de temperaturas para la determinación de los niveles de expresión de un transcrito a partir de cDNA.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

Los resultados, analizados en el programa StepOne v2.3, se expresaron como ΔC_t entre el gen de interés y el gen constitutivo. Posteriormente se relativizaron a la muestra control para obtener el porcentaje relativo de expresión.

V.4.11. Preparación de muestras de RNA para análisis por RNA-seq

El análisis del transcriptoma de la línea hNSC diferenciada a neurona madura se llevó a cabo mediante una RNA-seq por parte del servicio GENEWIZ® de la empresa Azenta Life Sciences.

Tras los siete días de diferenciación a neurona, en presencia o no del fármaco en estudio, las células se recogieron para la extracción de RNA total (apartado V.4.2). Las muestras se evaluaron para confirmar que se alcanzaba la cantidad mínima de RNA necesario para el estudio (250 ng) y que la pureza basada en el ratio de absorbancia 260/280 se encontraba entre 1,8 - 2,2 (apartado V.4.4); se estudió el número de integridad del RNA (RIN) mediante un análisis de alta sensibilidad con el sistema TapeStation (Agilent Technologies) corroborando que las muestras poseían un RIN ≥ 6 . Posteriormente, se enviaron las muestras a la empresa donde realizaron el estudio de RNA-seq. Para ello, generaron una genoteca de cDNA que se secuenció con la plataforma NovaSeq mediante la tecnología Illumina, obteniendo al menos 30 millones de lecturas por muestra analizada. Finalmente, la empresa realizó el análisis bioinformático de los datos que enviaron junto con los datos crudos del estudio.

V.5. Extracción, manipulación y análisis de proteínas

V.5.1. Extracción de proteínas

V.5.1.1. Extracción de proteínas a partir de muestras biológicas o cultivos celulares para Western blot

Para los análisis por Western blot, los cultivos de hNSC diferenciadas se recogieron por tripsinización, se centrifugaron y se lavaron con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación. Tras obtener el pellet celular, este se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción.

Dependiendo de la cantidad de pellet o de tejido homogenado se añadieron entre 40 – 50 o 150 – 250 μ l, respectivamente, de tampón RIPA autoclavado (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,5 % desoxicolato de sodio, 5 mM EDTA, 1 % Tritón X-100) con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). La suspensión se incubó durante 15 min a 4 °C en una noria giratoria, favoreciendo la rotura de las membranas celulares por acción del detergente. A continuación, la suspensión se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 15 700 x g para eliminar restos celulares. Finalmente, se recuperó el extracto proteico para congelar a -80 °C hasta su uso.

V.5.1.2. Extracción de proteínas a partir de muestras biológicas o cultivos celulares para determinación de actividad enzimática y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Para estos ensayos, los cultivos de hNSC diferenciadas se recogieron por tripsinización, se centrifugaron y se lavaron con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación. Tras la obtención del pellet celular, este se congeló a -80 °C hasta el momento de la extracción.

En función de la cantidad de pellet o de tejido homogenado se añadieron entre 50 – 60 μ l o 12,5 % (p/v), respectivamente, de PBS con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). La suspensión se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló rápidamente a 37 °C; este procedimiento se repitió tres veces. La suspensión obtenida se conservó a - 80 °C hasta su uso; previamente, en el caso del homogenado procedente de tejido cerebral de ratón, se centrifugó durante 5 min a 5000 x g para recuperar el sobrenadante.

V.5.2. Determinación de la cantidad de proteína total mediante el método de Bradford

El método de Bradford para medir de la cantidad de proteínas totales presente en un homogenado está basado en una reacción colorimétrica que permite cuantificar su concentración empleando la absorbancia.

Para establecer una relación entre una concentración proteica y su correspondiente absorbancia, se prepararon una serie de estándares a partir de una solución de BSA de concentración conocida (1 mg/ml) para obtener una recta de calibrado con los siguientes puntos: 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg proteína/ml.

A continuación, en una placa de 96 pocillos, se añadieron por triplicado 10 μ l por pocillo de muestra, diluida si era necesario, así como de las diluciones estándar. Seguidamente, se añaden 200 μ l de reactivo de Bradford diluido 1:5 en agua destilada y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Al finalizar la incubación, se determinan las absorbancias a 595 nm en el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

Para calcular la concentración de proteína en las muestras se interpolaron los valores de absorbancia en la ecuación de la recta obtenida, teniendo en cuenta la dilución realizada.

V.5.3. Método para el análisis de proteínas por Western blot

V.5.3.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida que permiten la separación de las mismas en función de su masa molecular.

Para la preparación de las muestras, estas se mezclaron con tampón de carga 2x (65,8 mM Tris-HCl pH 6,8, 26,3 % glicerol, 2,1 % dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,01 % azul bromofenol, 5 % β -mercaptoetanol). Entonces, se incubaron durante 5 min a 98 °C para su desnaturalización.

Para la electroforesis de proteínas, se emplearon geles comerciales de gradiente 4 – 15 % o 10 % Mini-PROTEAN® TGX™ gels (Bio-Rad). Tras retirar el peine, se colocó el gel en la cubeta donde se añadió el tampón de electroforesis (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3). Se lavaron bien los pocillos con el mismo tampón para, finalmente, cargar la cantidad de proteína necesaria (40 – 60 μ g). La electroforesis se realizó con el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 50 V hasta que las muestras salieron de los pocillos; a continuación, se mantuvo a 200 V hasta alcanzar la parte inferior del gel.

V.5.3.2. Transferencia a membranas fluoruro de polivinilideno (PVDF) desde geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Para la transferencia de proteínas se utilizó el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del equipo, además de las membranas comerciales (Bio-Rad). Se empleó el programa MIXED MW (durante 7 min a 2,5 A, hasta 25 V), indicado para proteínas de 5 a 150 kDa.

V.5.3.3. Inmunodetección de proteínas en membranas PVDF

La membrana PVDF se bloqueó con 5 % (p/v) de leche desnatada en polvo en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (Tabla V.19) en PBS-Tween20 0,1 % con 1 % de leche desnatada en polvo. La membrana se sometió a tres lavados de 10 min en PBS-Tween20 0,1 % para arrastrar posibles restos de anticuerpo. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario adecuado según el método de detección a la dilución correspondiente (Tabla V.19) durante 1 h a temperatura ambiente en PBS-Tween20 0,1 % con 0,1 % leche desnatada en polvo. De nuevo, la membrana se sometió a dos lavados de 10 min en PBS-Tween20 0,1 % y un lavado de 5 min de PBS. En el caso de revelado por Odyssey®, se realizó un último lavado con agua destilada para evitar las posibles interferencias del detergente Tween20.

Tabla V.19. Anticuerpos empleados y condiciones para la detección de proteínas mediante Western blot.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Condiciones	Casa comercial
NDUFB8	Ratón	1:1000	4 °C toda la noche	Invitrogen
NDUFA9	Ratón	1:1000	4 °C toda la noche	Invitrogen
SDHA	Ratón	1:1000	temp. ambiente 1 h	Abcam
COX1	Ratón	1:1000	4 °C toda la noche	Abcam
CS	Ratón	1:1000	temp. ambiente 1 h	Sigma-Aldrich
TUBB3	Conejo	1:1000	4 °C toda la noche	Abcam
TH	Conejo	1:1000	4 °C toda la noche	Sigma-Aldrich
GAPDH	Ratón	1:1000	temp. ambiente 1 h	Abcam
bACT	Ratón	1:1000	temp. ambiente 1 h	Sigma-Aldrich
Anti-ratón IgG (H+L) DyLight™ 680	Cabra	1:15 000	temp. ambiente 1 h	Invitrogen
Anti-ratón IgG (H+L) DyLight™ 800	Cabra	1:15 000	temp. ambiente 1 h	Invitrogen
Anti-conejo IgG (H+L) DyLight™ 800	Cabra	1:15 000	temp. ambiente 1 h	Invitrogen
Anti-ratón IgG (H+L) peroxidasa conjugada	Cabra	1:10 000	temp. ambiente 1 h	Invitrogen
Anti-conejo IgG (H+L) peroxidasa conjugada	Cabra	1:10 000	temp. ambiente 1 h	Invitrogen

V.5.3.3.1. Detección de proteínas mediante el sistema Odyssey

El sistema de imágenes Odyssey® utiliza dos canales fluorescentes infrarrojos (700 o 800 nm) para la detección y análisis simultáneo de proteínas. Las membranas fueron escaneadas y procesadas según los requerimientos del equipo. Una vez obtenidas las imágenes, las bandas fueron cuantificadas con el programa ImageJ.

V.5.3.3.2. Detección de proteínas mediante el sistema ChemiDoc

Para el revelado por quimioluminiscencia se empleó el sistema de imágenes ChemiDoc®. Después de 5 min de incubación con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS, las membranas se escanearon y se procesaron según los requerimientos del equipo. Las bandas fueron cuantificadas con el programa informático del equipo, Image Lab.

V.5.4. Ensayos de actividad enzimática

V.5.4.1. Determinación de la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria

Para la determinación de la actividad del CIV de la cadena respiratoria, se empleó Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay (Abcam) que se basa en la reacción de oxidación del citocromo c reducido por parte del CIV. Dicha reacción se puede seguir colorimétricamente mediante la disminución de la absorbancia a 550 nm. Para la realización de este ensayo se siguieron estrictamente las indicaciones de la casa comercial.

Materiales y métodos

Tras la preparación del citocromo c reducido, se prepararon diluciones en Enzyme Dilution Buffer a una concentración de 4 o 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de las muestras provenientes de células cultivadas o tejido cerebral de ratón, respectivamente. Entonces, se añadieron 5 μl de cada muestra diluida a la placa de 96 pocillos junto con 120 μl de citocromo c reducido diluido en Cytochrome Oxidase Assay Buffer (1:6). Después de agitar la placa, inmediatamente se lee la disminución de la absorbancia a 550 nm en el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

La actividad del CIV se calculó gracias a la pendiente de la región lineal en miliunidades de densidad óptica (mOD)/min del incremento de la absorbancia. Posteriormente el resultado se relativiza frente al control.

V.5.4.2. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa

La actividad citrato sintasa (CS) se mide como el incremento en la absorbancia a 412 nm que se produce debido a la formación de la forma aniónica del ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras añadir oxalacetato como iniciador de la reacción.

Para la determinación, se preparó una mezcla de reacción (Tabla V.20) donde el DTNB se preparó en fresco, mientras que el acetyl-CoA se almacenaba alicuotado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos, se añadieron 185 μl por pocillo de la mezcla de reacción junto con 5 μl de cada extracto proteico obtenido por el procedimiento descrito anteriormente (apartado V.5.1.2). Por último, se añadieron 10 μl de oxalacetato, preparado en fresco a una concentración de 50 mM en agua destilada; esta adición se realizó automáticamente con el pipeteador programable del aparato NOVOstar (BMG Labtech), de manera que se pudo empezar a medir en el instante justo en el que empezó la reacción.

Tabla V.20. Mezcla de reacción para la determinación de la actividad enzimática de la CS.

Componente	Concentración inicial	Volumen (μl)
Tris-HCl pH 8	1 M	15
DTNB (en Tris-HCl pH 8)	10 mM	20
Tritón X-100	10 %	2
Acetil-CoA	7 mg/ml	2
H ₂ O		146

La actividad de citrato sintasa obtenida, correspondiente a la pendiente de la recta en mOD/min del incremento de la absorbancia a 412 nm, se dividió por la cantidad total de proteínas en mg, calculada anteriormente por el método de Bradford. De esta forma, se obtuvo la actividad específica (mOD/min/mg proteína).

V.5.5. Ensayos ELISA

V.5.5.1. Determinación de los niveles de transportador de dopamina

El ensayo Mouse DAT (Dopamine Transporter) ELISA (Elabscience) se trata de un ELISA tipo sandwich. La microplaca proporcionada en este kit está pre-recubierta con un anticuerpo específico para DAT de ratón. Cuando los estándares o las muestras se añaden a los pocillos de la microplaca, se combinan con el anticuerpo específico unido a dicha placa. A continuación, se incuba cada pocillo con un anticuerpo de detección biotinilado específico para DAT de ratón. Tras varios lavados, se incuba con un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, se lava varias veces para eliminar el exceso de conjugados enzimáticos y se añade la solución de sustrato a cada pocillo donde se producirá la reacción colorimétrica; solo aquellos pocillos con DAT de ratón, anticuerpo de detección biotinilado y conjugado avidina-HRP aparecerán de color azul. La reacción enzima-sustrato finaliza con la adición de la solución de parada cambiando el color a amarillo. La absorbancia se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm, siendo proporcional a la concentración de DAT. La cuantificación de las muestras se consiguió comparando con la curva estándar de concentraciones conocidas. Para la realización de este ensayo se siguieron las instrucciones del protocolo del fabricante, midiendo la absorbancia mediante el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

V.5.5.2. Determinación de los niveles del neurotransmisor dopamina

El Dopamine Research ELISA™ (LDN) es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de dopamina de forma competitiva. La dopamina se somete a una extracción utilizando un gel de afinidad específico para cis-diol, una posterior acilación y una conversión enzimática.

El antígeno (dopamina modificada) está unido a la fase sólida de la placa de microtitulación. Estándares, controles y muestras compiten con el antígeno de la fase sólida por la unión al antisuero. Tras alcanzar el equilibrio, tanto los antígenos como los complejos de antígeno-antisuero libres se eliminan con lavados. El anticuerpo unido a la fase sólida se detecta mediante un anticuerpo IgG-conejo conjugado con peroxidasa utilizando 3,3',5,5' tetrametil-bencidina (TMB) como sustrato. La absorbancia se mide a 450 nm. La concentración de dopamina es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la placa y, por tanto, a la absorbancia detectada. La cuantificación de las muestras se consiguió comparando su absorbancia con la curva estándar de concentraciones conocidas. Para la realización de este ensayo se siguieron las instrucciones del protocolo del fabricante, midiendo la absorbancia mediante el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

V.6. Estudios funcionales del sistema OXPPOS

V.6.1. Consumo de oxígeno en células intactas

El consumo de oxígeno se midió en un oxígrafo de alta resolución llamado Oroboros® que se basa en el principio básico de la respirometría. Este principio dice que una muestra celular que consume el oxígeno presente en una cámara cerrada hará disminuir la concentración del mismo, de forma que, si se representa esta disminución frente al tiempo, se puede obtener la velocidad de consumo de oxígeno. La respirometría de alta resolución utiliza electrodos muy sensibles acoplados a un software avanzado (DatLab4) que proporciona la información simultánea de las velocidades de consumo de oxígeno, así como la estabilidad de la señal de dicho consumo.

A partir de cultivos de células diferenciadas a neurona madura, ya sean SH-SY5Y o hNSC, se obtuvo el pellet celular mediante tripsinización y centrifugación de las mismas. Este pellet se resuspendió en 2,2 ml de medio DMEM sin FBS para introducirlo en la cámara; de esta suspensión se recogió una alícuota de 20 μ l para el recuento de células. Tras cerrar la cámara, se estabilizó el flujo de oxígeno obteniéndose así el valor de respiración endógena o basal. Seguidamente, se determinó la respiración filtrante añadiendo oligomicina a 20 nM en la cámara para inhibir la ATP sintasa o CV, y la respiración desacoplada añadiendo el desacoplante carbonilcianuro-p-trifluorometoxihidrazona (FCCP) en concentraciones crecientes hasta alcanzar la respiración máxima de la línea que representa la máxima capacidad del sistema de transporte electrónico estudiado. Por último, se determinó la respiración no dependiente de la cadena respiratoria mediante la adición de cianuro potásico (KCN) a 5 mM como inhibidor del CIV, que se restó a todos los demás valores.

V.6.2. Determinación de niveles de ATP mitocondrial

Para determinar los niveles de ATP mitocondrial se empleó en primer lugar el CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (Promega) que se trata de un ensayo de fluorescencia no lítico que cuantifica el número de células vivas en una población de cultivo mediante la medición de la actividad de una proteasa conservada y constitutiva dentro de las células vivas. Posteriormente, el CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay permitió la cuantificación directa del ATP presente en el cultivo celular a través de un único reactivo que produce la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP.

Para llevar a cabo el análisis, en placas de 96 pocillos blancas (NUNC), se sembraron 5000 o 10 000 células por pocillo de la línea SH-SY5Y o hNSC respectivamente. Después de una semana de diferenciación a neurona madura, en condiciones estériles, se retiró la mitad de volumen de cada pocillo (100 μ l) para añadir 100 μ l del reactivo CellTiter-Fluor e incubar durante 30 min a 37 °C con 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia (380 – 400 Excitación/505 Emisión) mediante el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech)

obteniendo una cuantificación proporcional a la cantidad de células viables por pocillo. Posteriormente, en condiciones estériles, se lavó dos veces con PBS para incubar las células con 100 μ l por pocillo de medio DMEM *free* (Gibco™) sin suero con 1 mM piruvato (Sigma-Aldrich) y 5 mM 2-desoxi-D-glucosa (Sigma-Aldrich), para bloquear la glucólisis, durante 6 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, se incubó con 100 μ l de la mezcla de reactivos de CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, previamente mezclados y estabilizados, durante 10 min a temperatura ambiente. Para la determinación de la cantidad de ATP mitocondrial, previa agitación de la placa para favorecer el lisado de las células, se midió la luminiscencia en el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech). Los datos obtenidos se expresaron como cantidad de ATP mitocondrial por célula.

V.7. Análisis histológico de tejido cerebral de ratón

V.7.1. Preparación del tejido cerebral

Como se comenta previamente (apartado V.3), los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después de extraer el cerebro, una mitad se recogió en 10 % de formaldehído para fijar durante 24 h. Tras la fijación, los cerebros se deshidrataron mediante un gradiente ascendente de etanol, antes de ser aclarados en Safesolve (VWR Chemicals). A continuación, las muestras se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de siete μ m en un micrótopo rotatorio manual (HistoCore BIOCUT). Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio para su tinción con hematoxilina y eosina, con el fin de comprobar tanto la posición como el estado de la muestra, así como para realizar inmunohistoquímica.

V.7.2. Inmunohistoquímica de la tirosina hidroxilasa

Para evaluar la neurodegeneración dopaminérgica, las secciones se desparafinaron en Safesolve, se rehidrataron mediante un gradiente descendente de etanol y se marcaron con anticuerpos específicos anti-NeuN (ratón, 1:100, Abcam), anti-TH (conejo, 1: 100, Sigma-Aldrich) y anti-GFAP (ratón, 1:100, Sigma-Aldrich) utilizando el Kit PolyStain TS - para 2 anticuerpos de ratón y 1 de conejo en tejido de ratón (NeoBiotech). Para la realización de la inmunohistoquímica, se siguieron las instrucciones del protocolo del fabricante.

V.8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism versión 9.0.1. En primer lugar, se realizó un análisis de la normalidad de todas las variables estudiadas; dado que el número de valores por variable no superaba los 30, se empleó el test Shapiro-Wilk. De este modo, las variables normales fueron comparadas con la prueba t de Student desapareado o ANOVA, si se trataban de dos o más grupos de variables. Por otro lado, las variables que no seguían una distribución normal fueron sometidas a las pruebas no

Materiales y métodos

paramétricas de Mann Whitney o Kruskal-Wallis en función de si se trataba de dos o más grupos de variables. En caso de analizar más de dos grupos de variables, se realizaron las pruebas de comparaciones múltiples correspondientes, Dunnett para las variables paramétricas o Dunn para las no paramétricas. En todos los gráficos se representaron mediante barras las medias junto con su desviación estándar, además de los valores individuales representados como puntos. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor menor de 0,05.

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. Vol. 27, European Journal of Neurology. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 27–42.
2. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. Vol. 32, Movement Disorders. John Wiley and Sons Inc.; 2017. p. 1264–310.
3. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. J Neural Transm. 2017;124(8):901–5.
4. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 46, Neuroepidemiology. S. Karger AG; 2016. p. 292–300.
5. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. Nat Rev Dis Primers. 2017 Dec 23;3(1):17013.
6. Sociedad Española de Neurología (SEN). Al menos un 28% de los pacientes con Parkinson están sin diagnosticar. [Internet]. 2019. Available from: <https://www.sen.es/saladeprensa/pdf/Link268.pdf>
7. Sociedad Española de Neurología (SEN). Cada año se diagnostican en España unos 10.000 casos nuevos de Parkinson. [Internet]. 2023. Available from: <https://www.sen.es/saladeprensa/pdf/Link400.pdf>
8. Santos García D, Blázquez-Estrada M, Calopa M, Escamilla-Sevilla F, Freire E, García Ruiz PJ, et al. Present and future of parkinson's disease in Spain: Parkinson-2030 delphi project. Brain Sci. 2021 Aug 1;11(8).
9. Sociedad Española de Neurología (SEN). El número de afectados por Parkinson se triplicará en España en 2050. [Internet]. 2020. Available from: <https://www.sen.es/saladeprensa/pdf/Link299b.pdf>
10. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. J Neurochem. 2016;318–24.
11. Tolosa S, Scholz W, Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, Poewe W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. Vol. 20, Lancet Neurol. 2021.
12. Poewe W, Mahlknecht P. Pharmacologic Treatment of Motor Symptoms Associated with Parkinson Disease. Vol. 38, Neurologic Clinics. W.B. Saunders; 2020. p. 255–67.
13. Schapira AHV. Etiology and Pathogenesis of Parkinson Disease. Vol. 27, Neurologic Clinics. 2009. p. 583–603.

Bibliografía

14. Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. Vol. 18, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2017. p. 101–13.
15. Giguère N, Nanni SB, Trudeau LE. On cell loss and selective vulnerability of neuronal populations in Parkinson's disease. Vol. 9, *Frontiers in Neurology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
16. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*. 2003 May 1;110(5):517–36.
17. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Vol. 26, *Movement Disorders*. 2011. p. 1049–55.
18. Dawson TM, Dawson VL. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. Vol. 302, *Science*. 2003. p. 819–22.
19. Pacelli C, Giguère N, Bourque MJ, Lévesque M, Slack RS, Trudeau LÉ. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*. 2015 Sep 21;25(18):2349–60.
20. Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. Vol. 30, *Trends in Neurosciences*. 2007. p. 244–50.
21. Surmeier DJ. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *FEBS Journal*. 2018;285(19):3657–68.
22. López-González del Rey N, Blesa J, Obeso JA. Determinants of selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *ANALES RANM*. 2021 Aug 31;138(138(02)):114–23.
23. Brichta L, Greengard P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: An update. *Front Neuroanat*. 2014 Dec 15;8(DEC).
24. Schapira AHV. Calcium dysregulation in Parkinson's disease. Vol. 136, *Brain*. Oxford University Press; 2013. p. 2015–6.
25. Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Vol. 6, *Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2007. p. 933–8.
26. Sagan L. On the Origin of Mitosing Clds. Vol. 14, *J. Theoret. Biol*. 1967.
27. Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85:133–60.

28. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. Vol. 13, BMC Biology. BioMed Central Ltd.; 2015.
29. Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. Vol. 41, Trends in Biochemical Sciences. Elsevier Ltd; 2016. p. 261–73.
30. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. Vol. 21, Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Research; 2020. p. 204–24.
31. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. Trends Biochem Sci. 2000 Jul;25(7):319–24.
32. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. EMBO Journal. 2002 Apr 2;21(7):1616–27.
33. Baker N, Patel J, Khacho M. Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. Vol. 49, Mitochondrion. Elsevier B.V.; 2019. p. 259–68.
34. Lackner LL. Shaping the dynamic mitochondrial network. Vol. 12, BMC Biology. BioMed Central Ltd.; 2014.
35. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981 Apr;290(5806):457–65.
36. Montoya J, López-Pérez MJ, Díez-Sánchez, Solano A, López-Gallardo E, Dahmani Y, et al. Biogénesis y Patología Mitocondrial *. Rev Real Academia de Ciencias Zaragoza. 2005.
37. Kauppila JHK, Stewart JB. Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. Vol. 1847, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. Elsevier B.V.; 2015. p. 1354–61.
38. Zinovkina LA. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. Vol. 83, Biochemistry (Moscow). 2018. p. 233–49.
39. Peter B, Falkenberg M. TWINKLE and other human mitochondrial DNA helicases: Structure, function and disease. Vol. 11, Genes. MDPI AG; 2020.
40. Robberson DL, Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of Mitochondrial DNA. Circular Replicative Intermediates in Mouse L Cells (electron microscopy/separated strands/duplex synthesis/displacement synthesis). Vol. 69. 1972.
41. Kasamatsu H, Vinograd J. REPLICATION OF CIRCULAR DNA IN EUKARYOTIC CELLS 1 863. 1974.

Bibliografía

42. Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. Vol. 15, Human Reproduction. 2000.
43. Mckinney EA, Oliveira MT. Replicating animal mitochondrial DNA. 2013.
44. Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, et al. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. EMBO Journal. 2006 Nov 15;25(22):5358–71.
45. Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. Nature. 1981 Apr;290(5806):470–4.
46. Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. Vol. 1757, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 2006. p. 1179–89.
47. O'Brien TW. Properties of Human Mitochondrial Ribosomes. Vol. 55, IUBMB Life. 2003. p. 505–13.
48. Elston T, Wang H, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. Nature. 1998 Jan;391(6666):510–3.
49. Acín-Pérez R, Enriquez JA. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. Vol. 1837, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 2014. p. 444–50.
50. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. Mol Cell. 2008 Nov 21;32(4):529–39.
51. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis. Science (1979) [Internet]. 1983 Feb 25;219(4587):979–80. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.6823561>
52. Grünewald A, Kumar KR, Sue CM. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. Prog Neurobiol [Internet]. 2019;177(September 2018):73–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.09.003>
53. Bindoff LA, Birch-Machin M, Cartlidge NEF, Parker WD, Turnbull DM. MITOCHONDRIAL FUNCTION IN PARKINSON'S DISEASE. The Lancet [Internet]. 1989 Jul;334(8653):49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673689902912>
54. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. MITOCHONDRIAL COMPLEX I DEFICIENCY IN PARKINSON'S DISEASE. The Lancet

- [Internet]. 1989 Jun;333(8649):1269. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673689923660>
55. Henrich MT, Oertel WH, Surmeier DJ, Geibl FF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease – a key disease hallmark with therapeutic potential. Vol. 18, Molecular Neurodegeneration. BioMed Central Ltd; 2023.
 56. López-Gallardo E, Iceta R, Iglesias E, Montoya J, Ruiz-Pesini E. OXPHOS toxicogenomics and Parkinson's disease. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2011;728(3):98–106.
 57. Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2013;106–107:17–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.004>
 58. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 216–31.
 59. Buneeva O, Fedchenko V, Kopylov A, Medvedev A. Mitochondrial dysfunction in parkinson's disease: Focus on mitochondrial DNA. *Biomedicines*. 2020 Dec 1;8(12):1–22.
 60. Gao XY, Yang T, Gu Y, Sun XH. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: From Mechanistic Insights to Therapy. *Front Aging Neurosci*. 2022 Jun 20;14.
 61. Borsche M, Pereira SL, Klein C, Grünewald A. Mitochondria and Parkinson's disease: Clinical, molecular, and translational aspects. Vol. 11, *Journal of Parkinson's Disease*. IOS Press BV; 2021. p. 45–60.
 62. Moradi Vastegani S, Nasrolahi A, Ghaderi S, Belali R, Rashno M, Farzaneh M, et al. Mitochondrial Dysfunction and Parkinson's Disease: Pathogenesis and Therapeutic Strategies. Vol. 48, *Neurochemical Research*. Springer; 2023. p. 2285–308.
 63. Rani L, Mondal AC. Emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease progression: Pathogenic and therapeutic implications. Vol. 50, *Mitochondrion*. Elsevier B.V.; 2020. p. 25–34.
 64. Iglesias E, Pesini A, Garrido-Pérez N, Meade P, Bayona-Bafaluy MP, Montoya J, et al. Prenatal exposure to oxidative phosphorylation xenobiotics and late-onset Parkinson disease. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Oct 19];45:24–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29689408/>
 65. Huang M, Barges-Carot A, Riaz Z, Wickham H, Zenitsky G, Jin H, et al. Impact of Environmental Risk Factors on Mitochondrial Dysfunction, Neuroinflammation, Protein Misfolding, and Oxidative Stress in the Etiopathogenesis of Parkinson's Disease. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.

Bibliografia

66. Ayala A, Venero JL, Cano J, Machado A. Mitochondrial toxins and neurodegenerative diseases. Vol. 12, *Frontiers in Bioscience*. Bioscience Research Institute; 2007. p. 986–1007.
67. Pouchieu C, Piel C, Carles C, Gruber A, Helmer C, Tual S, et al. Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol*. 2018 Feb 1;47(1):299–310.
68. Tanner CM, Kame F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 2011 Jun;119(6):866–72.
69. James KA, Hall DA. Groundwater pesticide levels and the association with parkinson disease. *Int J Toxicol*. 2015 Jun 5;34(3):266–73.
70. Pyatha S, Kim H, Lee D, Kim K. Association between Heavy Metal Exposure and Parkinson's Disease: A Review of the Mechanisms Related to Oxidative Stress. Vol. 11, *Antioxidants*. MDPI; 2022.
71. Vellingiri B, Chandrasekhar M, Sri Sabari S, Gopalakrishnan AV, Narayanasamy A, Venkatesan D, et al. Neurotoxicity of pesticides – A link to neurodegeneration. Vol. 243, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press; 2022.
72. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A V., Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* [Internet]. 2000 Dec;3(12):1301–6. Available from: https://www.nature.com/articles/nn1200_1301
73. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the Past: Evolution, Development, and Patterns of Disease. Vol. 305, *Science*. 2004. p. 1733–6.
74. Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. Vol. 113, *Environmental Health Perspectives*. 2005. p. 1230–3.
75. Calne DB, Langston JW. AETIOLOGY OF PARKINSON'S DISEASE. Vol. 322, *The Lancet*. 1983. p. 1457–9.
76. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. Vol. 14, *NeuroToxicology*. 1993. p. 83–144.
77. Müller F, O'Rahilly R. Olfactory structures in staged human embryos. *Cells Tissues Organs*. 2004;178(2):93–116.
78. Goldstein AM, Hofstra RMW, Burns AJ. Building a brain in the gut: Development of the enteric nervous system. *Clin Genet*. 2013 Apr;83(4):307–16.

79. Von Linstow CU, Delano-Taylor M, Kordower JH, Brundin P. Does Developmental Variability in the Number of Midbrain Dopamine Neurons Affect Individual Risk for Sporadic Parkinson's Disease? Vol. 10, *Journal of Parkinson's Disease*. IOS Press; 2020. p. 405–11.
80. Charlton CG. Fetal and Environmental Basis for the Cause of Parkinson's Disease. In: *Basal Ganglia - An Integrative View*. InTech; 2013.
81. Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Richfield EK, Barlow BK, Brooks AI. Developmental pesticide exposures and the Parkinson's disease phenotype. In: *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*. 2005. p. 136–9.
82. Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M. The gestational environment and Parkinson's disease: Evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. Vol. 23, *Reproductive Toxicology*. 2007. p. 457–70.
83. Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Barlow BK, Richfield EK. Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. *Environ Health Perspect*. 2005 Sep;113(9):1263–70.
84. Miller DB, O'Callaghan JP. Do early-life insults contribute to the late-life development of Parkinson and Alzheimer diseases? Vol. 57, *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2008.
85. Grova N, Schroeder H, Olivier JL, Turner JD. Epigenetic and neurological impairments associated with early life exposure to persistent organic pollutants. Vol. 2019, *International Journal of Genomics*. Hindawi Limited; 2019.
86. Logroscino G. The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: What is the evidence? Vol. 113, *Environmental Health Perspectives*. 2005. p. 1234–8.
87. Schaefers ATU, Teuchert-Noodt G. Developmental neuroplasticity and the origin of neurodegenerative diseases. Vol. 17, *World Journal of Biological Psychiatry*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 587–99.
88. Tartaglione AM, Venerosi A, Calamandrei G. Early-life toxic insults and onset of sporadic neurodegenerative diseases—An overview of experimental studies. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer Verlag; 2016. p. 231–64.
89. Jiménez-Salvador I, Meade P, Iglesias E, Bayona-Bafaluy P, Ruiz-Pesini E. Developmental origins of Parkinson disease: Improving the rodent models. *Ageing Res Rev*. 2023;86.

Bibliografia

90. Le Grand JN, Gonzalez-Cano L, Pavlou MA, Schwamborn JC. Neural stem cells in Parkinson's disease: A role for neurogenesis defects in onset and progression. Vol. 72, Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG; 2015. p. 773–97.
91. Coelho P, Fão L, Mota S, Rego AC. Mitochondrial function and dynamics in neural stem cells and neurogenesis: Implications for neurodegenerative diseases. Vol. 80, Ageing Research Reviews. Elsevier Ireland Ltd; 2022.
92. Cheng A, Hou Y, Mattson MP. Mitochondria and neuroplasticity. Vol. 2, ASN Neuro. Portland Press Ltd; 2010. p. 243–56.
93. Kasahara A, Scorrano L. Mitochondria: From cell death executioners to regulators of cell differentiation. Vol. 24, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2014. p. 761–70.
94. Chen CT, Hsu SH, Wei YH. Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells. Vol. 1800, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 2010. p. 257–63.
95. Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park DJ, et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Oct 6;348(4):1472–8.
96. Jány AG, Nagy ÁM, Kohidi T, Ferenczi S, Tretter L, Madarász E. Differentiation-Dependent Energy Production and Metabolite Utilization: A Comparative Study on Neural Stem Cells, Neurons, and Astrocytes. Stem Cells Dev. 2016 Jul 1;25(13):995–1005.
97. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley IV CA, Ramalho-Santos J, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. PLoS One. 2011;6(6).
98. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. Vol. 18, Cell Metabolism. 2013. p. 325–32.
99. Brunetti D, Dykstra W, Le S, Zink A, Prigione A. Mitochondria in neurogenesis: Implications for mitochondrial diseases. Stem Cells. 2021 Oct 1;39(10):1289–97.
100. Gyllenhammer LE, Rasmussen JM, Bertele N, Halbing A, Entringer S, Wadhwa PD, et al. Maternal Inflammation During Pregnancy and Offspring Brain Development: The Role of Mitochondria. Vol. 7, Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging. Elsevier Inc.; 2022. p. 498–509.
101. Iwata R, Vanderhaeghen P. Regulatory roles of mitochondria and metabolism in neurogenesis. Vol. 69, Current Opinion in Neurobiology. Elsevier Ltd; 2021. p. 231–40.

102. Li D, Ding Z, Gui M, Hou Y, Xie K. Metabolic Enhancement of Glycolysis and Mitochondrial Respiration Are Essential for Neuronal Differentiation. *Cell Reprogram.* 2020 Dec 1;22(6):291–9.
103. Schwarz TL. Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jun;5(6).
104. Hall CN, Klein-Flügge MC, Howarth C, Attwell D. Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *Journal of Neuroscience.* 2012 Jun 27;32(26):8940–51.
105. Yokota M, Hatakeyama H, Ono Y, Kanazawa M, Goto YI. Mitochondrial respiratory dysfunction disturbs neuronal and cardiac lineage commitment of human iPSCs. *Cell Death Dis.* 2017;8(1).
106. Kirby DM, Rennie KJ, Smulders-Srinivasan TK, Acin-Perez R, Whittington M, Enriquez JA, et al. Transmitochondrial embryonic stem cells containing pathogenic mtDNA mutations are compromised in neuronal differentiation. *Cell Prolif.* 2009 Aug;42(4):413–24.
107. Iglesias E, Bayona-Bafaluy MP, Pesini A, Garrido-Pérez N, Meade P, Gaudó P, et al. Uridine prevents negative effects of OXPHOS xenobiotics on dopaminergic neuronal differentiation. *Cells.* 2019;8(11).
108. Montoya J, Arenas J, Ruiz-Pesini E, Martín-Casanueva MA. Rare diseases in neurometabolic pathologies. *Arbor.* 2018 Jul 1;194(789).
109. Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. Vol. 127, *Brain.* 2004. p. 2153–72.
110. Fang D, Qing Y, Yan S, Chen D, Yan SS Du. Development and Dynamic Regulation of Mitochondrial Network in Human Midbrain Dopaminergic Neurons Differentiated from iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2016 Oct 11;7(4):678–92.
111. Pashkovskaia N, Gey U, Rödel G. Mitochondrial ROS direct the differentiation of murine pluripotent P19 cells. *Stem Cell Res.* 2018 Jul 1;30:180–91.
112. Lopez-Suarez L, Awabdh S Al, Coumoul X, Chauvet C. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. Vol. 92, *NeuroToxicology.* Elsevier B.V.; 2022. p. 131–55.
113. Pesini A, Iglesias E, Bayona-Bafaluy MP, Garrido-Pérez N, Meade P, Gaudó P, et al. Brain pyrimidine nucleotide synthesis and Alzheimer disease. *Aging [Internet].* 2019 Sep 27;11(19):8433–62. Available from: <https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.102328>

Bibliografía

114. Li Y, Sun Y, Yang J, Wu Y, Yu J, Li B. Age-dependent dopaminergic dysfunction following fetal exposure to atrazine in SD rats. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 28];37(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24863964/>
115. Sun Y, Li YS, Yang JW, Yu J, Wu YP, Li BX. Exposure to atrazine during gestation and lactation periods: toxicity effects on dopaminergic neurons in offspring by downregulation of Nurr1 and VMAT2. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 28];15(2):2811–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24552878/>
116. Miranda-Contreras L, Dávila-Ovalles R, Benítez-Díaz P, Peña-Contreras Z, Palacios-Prü E. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. *Brain Res Dev Brain Res* [Internet]. 2005 Nov 7 [cited 2024 Jun 28];160(1):19–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16198425/>
117. Ait-Bali Y, Ba-M'hamed S, Bennis M. Prenatal Paraquat exposure induces neurobehavioral and cognitive changes in mice offspring. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2024 Jun 28];48:53–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27764701/>
118. Sai T, Uchida K, Nakayama H. Biochemical evaluation of the neurotoxicity of MPTP and MPP⁺ in embryonic and newborn mice. *J Toxicol Sci* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jun 28];38(3):445–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23665943/>
119. Sai T, Uchida K, Nakayama H. Acute toxicity of MPTP and MPP(+) in the brain of embryo and newborn mice. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2024 Jun 28];65(1–2):113–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21798732/>
120. Muthian G, Mackey V, King J, Charlton CG. Modeling a sensitization stage and a precipitation stage for Parkinson's disease using prenatal and postnatal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Neuroscience* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2024 Jun 28];169(3):1085–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20540993/>
121. Pérez-Otaño I, Luquin MR, Oset C, Herrero MT, Kupsch A, Oertel W, et al. Neurotoxicity induced by prenatal exposure to MPTP on the monoaminergic and peptidergic systems of the marmoset brain. *Exp Neurol* [Internet]. 1995 [cited 2024 Jun 28];131(1):108–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7534717/>
122. Ochi N, Naoi M, Mogi M, Ohya Y, Mizutani N, Watanabe K, et al. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in prenatal stage on the dopamine system in the postnatal mouse brain. *Life Sci* [Internet]. 1991 [cited 2024 Jun 28];48(3):217–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1671518/>

123. Ohya Y, Naoi M, Ochi N, Mizutani N, Watanabe K, Nagatsu T. Transplacentally-transported 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) affects the catecholamine and indoleamine levels in the fetal mouse brain. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* [Internet]. 1990 Dec [cited 2024 Jun 28];2(4):277–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1706600/>
124. Furune S, Miura K, Watanabe K, Nagao S, Takahashi H, Sakai M, et al. Transplacental effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on brain dopaminergic neurons in the mouse. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* [Internet]. 1989 Dec [cited 2024 Jun 28];79(3):279–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2575340/>
125. Weissman EM, B. Norman A, Calderon SF, Zubrycki EM, El-etri MM, Shipley MT, et al. The effect of prenatal treatment with MPTP or MPP+ on the development of dopamine-mediated behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 1989 [cited 2024 Jun 28];34(3):545–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2623012/>
126. Global HIV statistics [Internet]. Available from: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
127. Ghosh AK. Four decades of continuing innovations in the development of antiretroviral therapy for HIV/AIDS: Progress to date and future challenges. *Glob Health Med*. 2023 Aug 31;5(4):194–8.
128. Menéndez-Arias L, Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy. Vol. 43, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2022. p. 16–29.
129. Singh AK, Kumar A, Arora S, Kumar R, Verma A, Khalilullah H, et al. Current insights and molecular docking studies of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Vol. 103, *Chemical Biology and Drug Design*. John Wiley and Sons Inc; 2024.
130. Weber IT, Wang YF, Harrison RW. Hiv protease: Historical perspective and current research. Vol. 13, *Viruses*. MDPI AG; 2021.
131. Lv Z, Chu Y, Wang Y. HIV protease inhibitors: A review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*. 2015 Apr 8;7:95–104.
132. Mbhele N, Chimukangara B, Gordon M. HIV-1 integrase strand transfer inhibitors: a review of current drugs, recent advances and drug resistance. Vol. 57, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2021.
133. Kaguni LS. DNA polymerase γ , the mitochondrial replicase. Vol. 73, *Annual Review of Biochemistry*. 2004. p. 293–320.

Bibliografia

134. Lee H, Hanes J, Johnson KA. Toxicity of Nucleoside Analogues Used to Treat AIDS and the Selectivity of the Mitochondrial DNA Polymerase. Vol. 42, *Biochemistry*. 2003. p. 14711–9.
135. Lewis W, Copeland WC, Day BJ. MINIREVIEW Mitochondrial DNA Depletion, Oxidative Stress, and Mutation: Mechanisms Of Dysfunction from Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. 2001.
136. Kohler JJ, Lewis W. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2007 Apr 19;48(3–4):166–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/em.20223>
137. Lund KC, Peterson LRL, Wallace KB. Absence of a universal mechanism of mitochondrial toxicity by nucleoside analogs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul;51(7):2531–9.
138. Wallace KB. Mitochondrial off targets of drug therapy. Vol. 29, *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008. p. 361–6.
139. Lund KC, Wallace KB. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent phosphoregulation of mitochondrial complex I is inhibited by nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Jan 1;226(1):94–106.
140. Calcagno A, Di Perri G, Bonora S. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antiretrovirals in the Central Nervous System. Vol. 53, *Clinical Pharmacokinetics*. Springer International Publishing; 2014. p. 891–906.
141. Hung KM, Chen PC, Hsieh HC, Calkins MJ. Mitochondrial defects arise from nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors in neurons: Potential contribution to HIV-associated neurocognitive disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 Feb 1;1863(2):406–13.
142. Akay C, Cooper M, Odeleye A, Jensen BK, White MG, Vassoler F, et al. Antiretroviral drugs induce oxidative stress and neuronal damage in the central nervous system. *J Neurovirol*. 2014 Feb;20(1):39–53.
143. Tisch S, Brew B. Parkinsonism in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *Neurology*. 2009;73(5):401–3.
144. Dehner LF, Spitz M, Pereira JS. Parkinsonism in HIV infected patients during antiretroviral therapy – data from a Brazilian tertiary hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016 Sep 1;20(5):499–501.
145. Amod F, Holla V V., Ojha R, Pandey S, Yadav R, Pal PK. A review of movement disorders in persons living with HIV. Vol. 114, *Parkinsonism and Related Disorders*. Elsevier Ltd; 2023.

146. Ambrosioni J, Levi L, Alagaratnam J, Van Bremen K, Mastrangelo A, Waalewijn H, et al. Major revision version 12.0 of the European AIDS Clinical Society guidelines 2023. *HIV Med.* 2023 Nov 1;24(11):1126–36.
147. Ruel T, Penazzato M, Zech JM, Archary M, Cressey TR, Goga A, et al. Novel Approaches to Postnatal Prophylaxis to Eliminate Vertical Transmission of HIV. *Glob Health Sci Pract* [Internet]. 2023 Apr 28;11(2):e2200401. Available from: <http://www.ghspjournal.org/lookup/doi/10.9745/GHSP-D-22-00401>
148. Penazzato M, Kasirye I, Ruel T, Mukui I, Bekker A, Archary M, et al. Antiretroviral postnatal prophylaxis to prevent HIV vertical transmission: present and future strategies. *J Int AIDS Soc* [Internet]. 2023;26:26032. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jia2.26032/full> | <https://doi.org/10.1002/jia2.26032>
149. Blanche S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret BE, Firtion G, et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet.* 1999 Sep 25;354(9184):1084–9.
150. Barret B, Tardieu M, Rustin P, Lacroix C, Chabrol B, Desguerre I, et al. Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-1-exposed but uninfected infants. *AIDS* [Internet]. 2003 Aug;17(12):1769–85. Available from: <http://journals.lww.com/00002030-200308150-00006>
151. Poirier MC, Divi RL, Al-Harhi L, Olivero OA, Nguyen V, Walker B, et al. Long-Term Mitochondrial Toxicity in HIV-Uninfected Infants Born to HIV-Infected Mothers. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* [Internet]. 2003 Jun;33(2):175–83. Available from: <http://journals.lww.com/00126334-200306010-00010>
152. Poirier MC, Gibbons AT, Rugeles MT, Andre-Schmutz I, Blanche S. Fetal consequences of maternal antiretroviral nucleoside reverse transcriptase inhibitor use in human and nonhuman primate pregnancy. Vol. 27, *Current Opinion in Pediatrics*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 233–9.
153. Hernández S, Catalán-García M, Morén C, García-Otero L, López M, Guitart-Mampel M, et al. Placental Mitochondrial Toxicity, Oxidative Stress, Apoptosis, and Adverse Perinatal Outcomes in HIV Pregnancies Under Antiretroviral Treatment Containing Zidovudine [Internet]. 2017. Available from: www.jaids.com
154. Monnin A, Desquirit-Dumas V, Méda N, Goudenège D, Bris C, Kankasa C, et al. Mitochondrial dna instability is common in hiv-exposed uninfected newborns. *J Clin Med.* 2021 Jun 1;10(11).
155. Mataramvura H, Bunders MJ, Duri K. Human immunodeficiency virus and antiretroviral therapy-mediated immune cell metabolic dysregulation in children

Bibliografía

- born to HIV-infected women: potential clinical implications. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
156. Divi RL, Einem TL, Fletcher SLL, Shockley ME, Kuo MM, St Claire MC, et al. Progressive mitochondrial compromise in brains and livers of primates exposed in utero to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Toxicological Sciences*. 2010 Aug 11;118(1):191–201.
 157. Demir M, Laywell ED. Neurotoxic effects of AZT on developing and adult neurogenesis. *Front Neurosci*. 2015 Mar 20;9(MAR).
 158. Robertson K, Liner J, Meeker RB. Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol*. 2012 Oct;18(5):388–99.
 159. Falkenburger BH, Schulz JB. Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. In: *Parkinson's Disease and Related Disorders* [Internet]. Springer Vienna; p. 261–8. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-211-45295-0_40
 160. Schüle B, Pera RAR, Langston JW. Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? Vol. 1792, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2009. p. 1043–51.
 161. Alberio T, Lopiano L, Fasano M. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. Vol. 279, *FEBS Journal*. 2012. p. 1146–55.
 162. Falkenburger BH, Saridaki T, Dinter E. Cellular models for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 121–30.
 163. Hernández-Ainsa C, López-Gallardo E, García-Jiménez MC, Climent-Alcalá FJ, Rodríguez-Vigil C, de Villalta MGF, et al. Development and characterization of cell models harbouring mtDNA deletions for in vitro study of Pearson syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2022 Mar 1;15(3).
 164. Yu M, Selvaraj SK, Liang-Chu MMY, Aghajani S, Busse M, Yuan J, et al. A resource for cell line authentication, annotation and quality control. *Nature*. 2015 Apr 15;520(7547):307–11.
 165. Jiang T, Wang H. Identification of cross-contamination in SH-SY5Y cell line. Vol. 27, *Human Cell*. Springer Tokyo; 2014. p. 176–8.
 166. Mamaeva SE. Karyotypic evolution of cells in culture: A new concept. *Int Rev Cytol*. 1997;178:1–40.
 167. Weissbein U, Benvenisty N, Ben-David U. Genome maintenance in pluripotent stem cells. Vol. 204, *Journal of Cell Biology*. 2014. p. 153–63.
 168. Na J, Baker D, Zhang J, Andrews PW, Barbaric I. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. *Protein Cell*. 2014 Aug 1;5(8):569–79.

169. Martin U. Genome stability of programmed stem cell products. Vol. 120, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2017. p. 108–17.
170. Spengler BA, Biedler JL, Ross RA. A corrected karyotype for the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2002 Oct;138(2):177–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016546080200523X>
171. Cohen N, Betts DR, Rechavi G, Amariglio N, Trakhtenbrot L. Clonal expansion and not cell interconversion is the basis for the neuroblast and nonneuronal types of the SK-N-SH neuroblastoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;143(1):80–4.
172. Yusuf M, Leung K, Morris KJ, Volpi E V. Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics*. 2013 Feb;14(1):63–70.
173. Khan FH, Pandian V, Ramraj S, Natarajan M, Aravindan S, Herman TS, et al. Acquired genetic alterations in tumor cells dictate the development of high-risk neuroblastoma and clinical outcomes. *BMC Cancer*. 2015 Jul 10;15(1).
174. Xie HR, Hu L Sen, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Vol. 123, *Chinese Medical Journal*. 2010. p. 1086–92.
175. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. Vol. 12, *Molecular Neurodegeneration*. BioMed Central Ltd.; 2017. p. 1–11.
176. Alrashidi H, Eaton S, Heales S. Biochemical characterization of proliferative and differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 2021 May 1;145.
177. Pezzini F, Bettinetti L, Di Leva F, Bianchi M, Zoratti E, Carrozzo R, et al. Transcriptomic Profiling Discloses Molecular and Cellular Events Related to Neuronal Differentiation in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2017 May 1;37(4):665–82.
178. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
179. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
180. Hartfield EM, Fernandes HJR, Vowles J, Cowley SA, Wade-Martins R. Cellular reprogramming: A new approach to modelling Parkinson's disease. Vol. 40, *Biochemical Society Transactions*. 2012. p. 1152–7.

Bibliografía

181. Badger JL, Cordero-Llana O, Hartfield EM, Wade-Martins R. Parkinson's disease in a dish - Using stem cells as a molecular tool. Vol. 76, *Neuropharmacology*. 2014. p. 88–96.
182. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in induced pluripotent stem cell models of Parkinson's disease. Vol. 49, *European Journal of Neuroscience*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 525–32.
183. Valadez-Barba V, Juárez-Navarro K, Padilla-Camberos E, Díaz NF, Guerra-Mora JR, Díaz-Martínez NE. Parkinson's disease: An update on preclinical studies of induced pluripotent stem cells. Vol. 38, *Neurología*. Spanish Society of Neurology; 2023. p. 681–94.
184. Laskin OL, De Miranda P, Blum MR. Azidothymidine Steady-State Pharmacokinetics in Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. *Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1989 Apr 1;159(4):745–7. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/159.4.745>
185. Liu Y, Nguyen P, Baris TZ, Poirier MC. Molecular analysis of mitochondrial compromise in rodent cardiomyocytes exposed long term to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Cardiovasc Toxicol*. 2012 Jun;12(2):123–34.
186. Stauch KL, Emanuel K, Lamberty BG, Morsey B, Fox HS. Central nervous system-penetrating antiretrovirals impair energetic reserve in striatal nerve terminals. *J Neurovirol*. 2017 Dec 1;23(6):795–807.
187. Nomura R, Sato T, Sato Y, Medin JA, Kushimoto S, Yanagisawa T. Azidothymidine-triphosphate impairs mitochondrial dynamics by disrupting the quality control system. *Redox Biol*. 2017 Oct 1;13:407–17.
188. Llobet L, Toivonen JM, Montoya J, Ruiz-Pesini E, López-Gallardo E. Xenobiotics that affect oxidative phosphorylation alter differentiation of human adipose-derived stem cells at concentrations that are found in human blood. *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2015 Nov 1;8(11):1441–55.
189. Spitkovsky D, Sasse P, Kolossov E, Böttinger C, Fleischmann BK, Hescheler J, et al. Activity of complex III of the mitochondrial electron transport chain is essential for early heart muscle cell differentiation. *The FASEB Journal*. 2004;
190. Pereira SL, Grãos M, Rodrigues AS, Anjo SI, Carvalho RA, Oliveira PJ, et al. Inhibition of mitochondrial complex III blocks neuronal differentiation and maintains embryonic stem cell pluripotency. *PLoS One*. 2013 Dec 2;8(12).
191. Bao F, Shi H, Gao M, Yang L, Zhou L, Zhao Q, et al. Polybrene induces neural degeneration by bidirectional Ca²⁺ influx-dependent mitochondrial and ER-mitochondrial dynamics. *Cell Death Dis*. 2018 Oct 1;9(10).

192. Sheehan JP, Palmer PE, Helm GA, Tuttle JB. MPP 1 Induced Apoptotic Cell Death in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: An Electron Microscope Study. Vol. 48, *J. Neurosci. Res.* Wiley-Liss, Inc; 1997.
193. Magalingam KB, Somanath SD, Ramdas P, Haleagrahara N, Radhakrishnan AK. 6-Hydroxydopamine Induces Neurodegeneration in Terminally Differentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells via Enrichment of the Nucleosomal Degradation Pathway: a Global Proteomics Approach. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2022 May 1;72(5):1026–46.
194. Sanchez AB, Varano GP, De Rozieres CM, Maung R, Catalan IC, Dowling CC, et al. Antiretrovirals, methamphetamine, and HIV-1 envelope protein gp120 compromise neuronal energy homeostasis in association with various degrees of synaptic and neuritic damage. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan 1;60(1):168–79.
195. Marinaro L, Calcagno A, Ripamonti D, Cenderello G, Pirriatore V, Trentini L, et al. Efficacy, safety and pharmacokinetics of atazanavir (200 mg twice daily) plus raltegravir (400 mg twice daily) dual regimen in the clinical setting. *Journal of Clinical Virology*. 2017 Feb 1;87:30–6.
196. Elliot ER, Amara A, Pagani N, Else L, Moyle G, Schoolmeesters A, et al. Once-daily atazanavir/cobicistat and darunavir/cobicistat exposure over 72 h post-dose in plasma, urine and saliva: Contribution to drug pharmacokinetic knowledge. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017 Jul 1;72(7):2035–41.
197. Cattaneo D, Cossu M V, Fucile S, Riva A, Baldelli S, Meraviglia P, et al. Comparison of the Pharmacokinetics of Raltegravir Given at 2 Doses of 400 mg by Swallowing Versus One Dose of 800 mg by Chewing in Healthy Volunteers: A Randomized, Open-Label, 2-Period, Single-Dose, Crossover Phase 1 Study [Internet]. 2014. Available from: <http://www.kkgt.nl>
198. Blonk MI, Colbers APH, Hidalgo-Tenorio C, Kabeya K, Weizsäcker K, Haberl AE, et al. Raltegravir in HIV-1-infected pregnant women: Pharmacokinetics, safety, and efficacy. *Clinical Infectious Diseases*. 2015 Sep 1;61(5):809–16.
199. Birket MJ, Orr AL, Gerencser AA, Madden DT, Vitelli C, Swistowski A, et al. A reduction in ATP demand and mitochondrial activity with neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2011 Feb 1;124(3):348–58.
200. O'Brien LC, Keeney PM, Bennett JP. Differentiation of Human Neural Stem Cells into Motor Neurons Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Decreases Glycolytic Flux. *Stem Cells Dev*. 2015 Sep 1;24(17):1984–94.

Bibliografía

201. Facucho-Oliveira JM, Alderson J, Spikings EC, Egginton S, St. John JC. Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2007 Nov 15;120(22):4025–34.
202. Zhang Y, Song F, Gao Z, Ding W, Qiao L, Yang S, et al. Long-term exposure of mice to nucleoside analogues disrupts mitochondrial DNA maintenance in cortical neurons. *PLoS One*. 2014 Jan 20;9(1).
203. Walker UA, Setzer B, Venhoff N. Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS* [Internet]. 2002 Nov;16(16):2165–73. Available from: <http://journals.lww.com/00002030-200211080-00009>
204. Divi RL, Haverkos KJ, Humsi JA, Shockley ME, Thamire C, Nagashima K, et al. Morphological and molecular course of mitochondrial pathology in cultured human cells exposed long-term to zidovudine. *Environ Mol Mutagen*. 2007 Apr;48(3–4):179–89.
205. Papp E, Gadawski I, Côté HCF. Longitudinal effects of thymidine analogues on mtDNA, mtRNA and multidrug resistance (MDR-1) induction in cultured cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008 May;61(5):1048–52.
206. McKee EE, Bentley AT, Hatch M, Gingerich J, Susan-Resiga D. Phosphorylation of Thymidine and AZT in Heart Mitochondria: Elucidation of a Novel Mechanism of AZT Cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* [Internet]. 2004;4(2):155–68. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/CT:4:2:155>
207. Garbian Y, Ovadia O, Dadon S, Mishmar D. Gene expression patterns of oxidative phosphorylation complex I subunits are organized in clusters. *PLoS One*. 2010;5(4).
208. Duborjal H, Beugnot R, Mousson de Camaret B, Issartel JP. Large functional range of steady-state levels of nuclear and mitochondrial transcripts coding for the subunits of the human mitochondrial OXPHOS system. Vol. 12, *Genome Research*. 2002. p. 1901–9.
209. McShane E, Couvillion M, Ietswaart R, Prakash G, Smalec BM, Soto I, et al. A kinetic dichotomy between mitochondrial and nuclear gene expression drives OXPHOS biogenesis. *bioRxiv* [Internet]. 2023 Sep 6; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36824735>
210. Boehm E, Zornoza M, Jourdain AA, Magdalena AD, García-Consuegra I, Merino RT, et al. Role of FAST kinase domains 3 (FASTKD3) in post-transcriptional regulation of mitochondrial gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Dec 9;291(50):25877–87.

211. Nagao A, Hino-Shigi N, Suzuki T. Chapter 23 Measuring mRNA Decay in Human Mitochondria. Vol. 447, *Methods in Enzymology*. 2008. p. 489–99.
212. Barshad G, Blumberg A, Cohen T, Mishmar D. Human primitive brain displays negative mitochondrial-nuclear expression correlation of respiratory genes. *Genome Res*. 2018 Jul 1;28(7):952–67.
213. Gezen-Ak D, Alaylioğlu M, Genç G, Şengül B, Keskin E, Sordu P, et al. Altered transcriptional profile of mitochondrial DNA-Encoded OXPHOS subunits, mitochondria quality control genes, and intracellular ATP levels in blood samples of patients with Parkinson’s disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2020;74(1):287–307.
214. Lunnon K, Keohane A, Pidsley R, Newhouse S, Riddoch-Contreras J, Thubron EB, et al. Mitochondrial genes are altered in blood early in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*. 2017 May 1;53:36–47.
215. Manczak M, Park BS, Jung Y, Reddy PH. Differential Expression of Oxidative Phosphorylation Genes in Patients With Alzheimer’s Disease Implications for Early Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage. *Manczak et al NeuroMolecular Medicine*. 2004;147.
216. Thomas RR, Keeney PM, Bennett JP. Impaired complex-I mitochondrial biogenesis in parkinson disease frontal cortex. *J Parkinsons Dis*. 2012;2(1):67–76.
217. van der Lee R, Szklarczyk R, Smeitink J, Smeets HJM, Huynen MA, Vogel R. Transcriptome analysis of complex I-deficient patients reveals distinct expression programs for subunits and assembly factors of the oxidative phosphorylation system. *BMC Genomics*. 2015 Sep 15;16(1).
218. Gabrielli AP, Novikova L, Ranjan A, Wang X, Ernst NJ, Abeykoon D, et al. Inhibiting mtDNA transcript translation alters Alzheimer’s disease-associated biology. *Alzheimer’s and Dementia*. 2024;
219. Herzberg NH, Zorn I, Zwart R, Portegies P, Bolhuis PA. Major growth reduction and minor decrease in mitochondrial enzyme activity in cultured human muscle cells after exposure to zidovudine. *Muscle Nerve* [Internet]. 1992 Jun 13;15(6):706–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mus.880150613>
220. Lipke K, Kubis-Kubiak A, Piwowar A. The Influence of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors on Mitochondrial Activity, Lipid Content, and Fatty-Acid-Binding Protein Levels in Microglial HMC3 Cells. *Pharmaceuticals*. 2023 Dec 1;16(12).
221. Nagiah S, Phulukdaree A, Chuturgoon A. Mitochondrial and Oxidative Stress Response in HepG2 Cells Following Acute and Prolonged Exposure to Antiretroviral Drugs. *J Cell Biochem*. 2015 Sep 1;116(9):1939–46.

Bibliografía

222. Corenblum MJ, McRobbie-Johnson A, Carruth E, Bernard K, Luo M, Mandarino LJ, et al. Parallel neurodegenerative phenotypes in sporadic Parkinson's disease fibroblasts and midbrain dopamine neurons. *Prog Neurobiol.* 2023 Oct 1;229.
223. Sánchez-Danés A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jiménez-Delgado S, Caig C, Mora S, et al. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPSC-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med.* 2012 May;4(5):380–95.
224. Greenwood SM, Mizielska SM, Frenguelli BG, Harvey J, Connolly CN. Mitochondrial dysfunction and dendritic beading during neuronal toxicity. *Journal of Biological Chemistry.* 2007 Sep 7;282(36):26235–44.
225. Fross S, Mansel C, McCormick M, Vohra BPS. Tributyltin alters calcium levels, mitochondrial dynamics, and activates calpains within dorsal root ganglion neurons. *Toxicological Sciences.* 2021 Apr 1;180(2):342–55.
226. Shehadeh J, Double KL, Murphy KE, Bobrovskaya L, Reyes S, Dunkley PR, et al. Expression of tyrosine hydroxylase isoforms and phosphorylation at serine 40 in the human nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2019 Oct 1;130.
227. Holmes SE, Honhar P, Tinaz S, Naganawa M, Hilmer AT, Gallezot JD, et al. Synaptic loss and its association with symptom severity in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2024 Dec 1;10(1).
228. Bartl M, Nilsson J, Dakna M, Weber S, Schade S, Xylaki M, et al. Lysosomal and synaptic dysfunction markers in longitudinal cerebrospinal fluid of de novo Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2024 Dec 1;10(1).
229. Yanai S, Endo S. Functional Aging in Male C57BL/6J Mice Across the Life-Span: A Systematic Behavioral Analysis of Motor, Emotional, and Memory Function to Define an Aging Phenotype. *Front Aging Neurosci.* 2021 Aug 2;13.
230. Sun M, McDonald SJ, Brady RD, Collins-Praino L, Yamakawa GR, Monif M, et al. The need to incorporate aged animals into the preclinical modeling of neurological conditions. Vol. 109, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* Elsevier Ltd; 2020. p. 114–28.
231. Shoji H, Miyakawa T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2019 Jun 1;39(2):100–18.
232. Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N, Hattori N. Aging-related motor function and dopaminergic neuronal loss in C57BL/6 mice. *Mol Brain.* 2020 Mar 23;13(1).

233. Britton R, Liu AT, Rege S V., Adams JM, Akrapongpisak L, Le D, et al. Molecular and histological correlates of cognitive decline across age in male C57BL/6J mice. *Brain Behav.* 2022 Sep 1;12(9).
234. Li Y, Li Y, Yu H, Yu H, Chen C, Chen C, et al. Proteomic Profile of Mouse Brain Aging Contributions to Mitochondrial Dysfunction, DNA Oxidative Damage, Loss of Neurotrophic Factor, and Synaptic and Ribosomal Proteins. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020.
235. Calamandrei G, Rufini O, Valanzano A, Puopolo M. Long-term effects of developmental exposure to zidovudine on exploratory behavior and novelty discrimination in CD-1 mice. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2002 Jul;24(4):529–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892036202002349>
236. Calamandrei G, Venerosi A, Valanzano A, Alleva E. Effects of prenatal AZT+3TC treatment on open field behavior and responsiveness to scopolamine in adult mice. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2000 Nov;67(3):511–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305700003865>
237. Calamandrei G, Venerosi A, Branchi I, Chiarotti F, Verdina A, Bucci F, et al. Effects of Prenatal AZT on Mouse Neurobehavioral Development and Passive Avoidance Learning. Vol. 21, *Neurotoxicology and Teratology.* 1999.
238. Venerosi A, Valanzano A, Alleva E, Calamandrei G. Prenatal exposure to anti-HIV drugs: Neurobehavioral effects of zidovudine (AZT) + lamivudine (3TC) treatment in mice. *Teratology* [Internet]. 2001 Jan;63(1):26–37. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-9926\(200101\)63:1<26::AID-TERA1005>3.0.CO;2-G](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-9926(200101)63:1<26::AID-TERA1005>3.0.CO;2-G)
239. Levin ED, Brunssen S, Wolfe GW, Harry GJ. Neurobehavioral assessment of mice after developmental AZT exposure. *Neurotoxicol Teratol.* 2004 Jan;26(1):65–71.
240. Venerosi A, Valanzano A, Puopolo M, Calamandrei G. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to AZT: A preliminary investigation with the D1 receptor agonist SKF 38393 in mice. *Neurotoxicol Teratol.* 2005 Jan;27(1):169–73.
241. Tong T, Duan W, Xu Y, Hong H, Xu J, Fu G, et al. Paraquat exposure induces Parkinsonism by altering lipid profile and evoking neuroinflammation in the midbrain. *Environ Int.* 2022 Nov 1;169.
242. Herlinger AL, Almeida AR, Presti-Silva SM, Pereira EV, Andrich F, Pires RGW, et al. Behavioral, Biochemical and Molecular Characterization of a Parkinson's Disease Mouse Model Using the Neurotoxin 2'-CH3-MPTP: A Novel Approach. *Neuromolecular Med* [Internet]. 2018 Mar 13;20(1):73–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12017-018-8476-z>

Bibliografía

243. Roberts HC, Syddall HE, Butchart JW, Stack EL, Cooper C, Sayer AA. The association of grip strength with severity and duration of Parkinson's: A cross-sectional study. *Neurorehabil Neural Repair*. 2015 Oct 29;29(9):889–96.
244. Mey R, Calatayud J, Casaña J, Núñez-Cortés R, Suso-Martí L, Andersen LL, et al. Is Handgrip Strength Associated With Parkinson's Disease? Longitudinal Study of 71 702 Older Adults. *Neurorehabil Neural Repair*. 2023 Oct 1;37(10):727–33.
245. Hu W, Zhao CH, Huang YQ, Liu BP, Jia CX. Grip strength, genetic predisposition, and Incident Parkinson's disease: a prospective cohort study in the UK Biobank. *NPJ Parkinsons Dis*. 2024 Dec 1;10(1).
246. Liu M, He P, Ye Z, Zhang Y, Zhou C, Yang S, et al. Association of handgrip strength and walking pace with incident Parkinson's disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2024 Feb 1;15(1):198–207.
247. Bernard C, Font H, Diallo Z, Ahonon R, Tine JM, Abouo F, et al. Prevalence and factors associated with physical function limitation in older West African people living with HIV. *PLoS One*. 2020 Oct 1;15(10 October).
248. Aldrovandi GM, Chu C, Shearer WT, Li D, Walter J, Thompson B, et al. Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women. *Pediatrics*. 2009 Dec;124(6).
249. Côté HCF, Raboud J, Bitnun A, Alimenti A, Money DM, Maan E, et al. Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2008 Sep 15;198(6):851–9.
250. Liu Y, Shim Park E, Gibbons AT, Shide ED, Divi RL, Woodward RA, et al. Mitochondrial compromise in 3-year old patas monkeys exposed in utero to human-equivalent antiretroviral therapies. *Environ Mol Mutagen*. 2016 Aug 1;57(7):526–34.
251. Poirier MC, Patterson TA, Slikker W, Olivero OA. Incorporation of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (AZT) Into Fetal DNA and Fetal Tissue Distribution of Drug After Infusion of Pregnant Late-Term Rhesus Macaques With a Human-Equivalent AZT Dose. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes [Internet]*. 1999 Dec;22(5):477. Available from: <http://journals.lww.com/00126334-199912150-00008>
252. Olivero OA, Yuspa SH, Poirier MC, Anderson LM, Jones AB, Wang C, et al. Transplacental Effects of 3'-Azido-2',3'-Dideoxythymidine (AZT): Tumorigenicity in Mice and Genotoxicity in Mice and Monkeys. *JNCI Journal of the National Cancer Institute [Internet]*. 1997 Nov 5;89(21):1602–8. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/89.21.1602>

253. Lucarelli M, Palitti F, Carotti D, Cianfriglia M, Signoretti C, Bozzi A, et al. AZT-induced hypermethylation of human thymidine kinase gene in the absence of total DNA hypermethylation. *FEBS Lett.* 1996 Nov 4;396(2–3):323–6.
254. Nyce J, Leonard S, Canupp D, Schulz S, Wong SO. Epigenetic mechanisms of drug resistance: Drug-induced DNA hypermethylation and drug resistance (DNA methylation/epimutants/3'-azido-3'-deoxythymidine/5-fluoro-2'-deoxyuridine/gene silencing). Vol. 90, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993.
255. Koczor CA, Jiao Z, Fields E, Russ R, Ludaway T, Lewis W. AZT-induced mitochondrial toxicity: an epigenetic paradigm for dysregulation of gene expression through mitochondrial oxidative stress. *Physiol Genomics* [Internet]. 2015;47:447–54. Available from: www.physiolgenomics.org
256. Calamandrei G, Valanzano A, Puopolo M, Aloe L. Developmental exposure to the antiretroviral drug zidovudine increases brain levels of brain-derived neurotrophic factor in mice. *Neurosci Lett* [Internet]. 2002 Nov;333(2):111–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394002010236>
257. Pérez-Otaño I, Oset C, Herrero MT, Luquin MR, Kupsch A, Oertel W, et al. Neurotoxic effect of prenatal exposure to MPTP on the dopaminergic systems of the marmoset brain. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1992 Jul;217(2–3):211–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299992908733>
258. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection [Internet]. 2023 Apr. Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/pediatric-arv/antiretroviral-management-newborns-perinatal-hiv-exposure-or-hiv-infection?view=full>
259. DOCUMENTO DE CONSENSO PARA EL SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH EN RELACION CON LA REPRODUCCIÓN, EMBARAZO, PARTO Y PROFILAXIS DE LA TRANSMISION VERTICAL DEL NIÑO EXPUESTO. 2023 Dec; Available from: <https://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2024/01/Documento-de-consenso-para-el-seguimiento-de-la-infeccion-por-vih-en-relacion-con-reproduccion-embarazo-parto.pdf>
260. Recommendations for the Use of Antiretroviral Drugs During Pregnancy and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States [Internet]. 2024 Jan. Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/perinatal/whats-new?view=full>
261. Gale E, Li M. Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. Vol. 1, *Molecular brain.* 2008. p. 8.

Bibliografia

262. Bayer SA, Wills K V, Triarhou LC, Ghetti B. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. Vol. 105, *Exp Brain Res*. Springer-Verlag; 1995.
263. Veenvliet J V., Smidt MP. Molecular mechanisms of dopaminergic subset specification: Fundamental aspects and clinical perspectives. Vol. 71, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2014. p. 4703–27.
264. Luo SX, Huang EJ. Dopaminergic neurons and brain reward pathways: From neurogenesis to circuit assembly. Vol. 186, *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc.; 2016. p. 478–88.
265. OECD/OCDE 407 OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents [Internet]. 2008. Available from: <https://www.oecd.org/en.html>
266. OECD/OCDE 423 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method [Internet]. 2001. Available from: <https://www.oecd.org/en.html>
267. Deacon RMJ. Measuring the strength of mice. *J Vis Exp*. 2013;(76).
268. Van Putten M, Dorchies O, Carlson G. <https://www.treat-nmd.org/resources-and-support/sop-library/mdx-mouse-dmd/>. 2011. The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time.
269. Yang M, Crawley JN. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;(SUPPL. 48).

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos de otras clases de fármacos administrados en la terapia antirretroviral combinados con NRTI

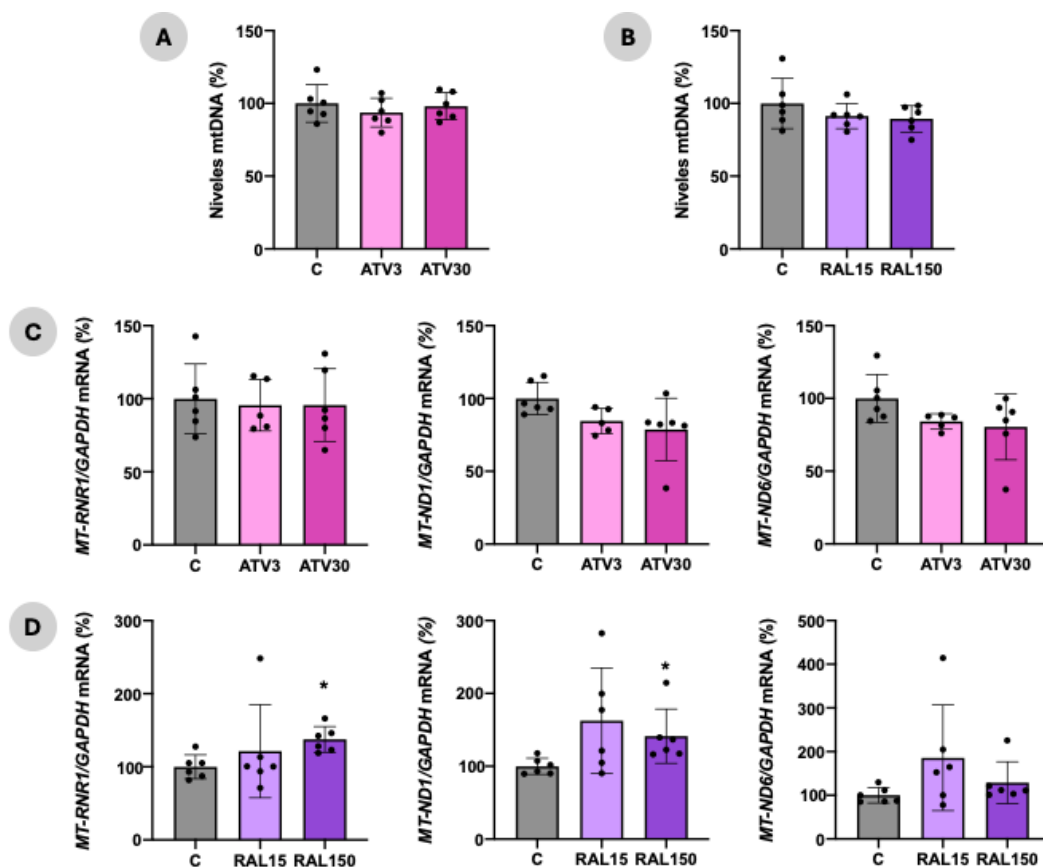


Figura 1. Parámetros bioquímicos mitocondriales de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de antirretrovirales. Niveles de mtDNA de neuronas derivadas de hNSC expuestas a ATV (A) o RAL (B) determinados por qPCR. Niveles de mRNA de genes codificados en el mtDNA (*MT-RNR1*, *MT-ND1*, *MT-ND6*) normalizados por *GAPDH* de neuronas derivadas de hNSC expuestas a ATV (C) o RAL (D) determinados por qPCR. Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. hNSC, células madre neurales humanas; ATV, atazanavir; RAL, raltegravir; mtDNA, DNA mitocondrial; mRNA, RNA mensajero; *MT-RNR1*, 12S rRNA; *MT-ND1*, NADH deshidrogenasa 1; *MT-ND6*, NADH deshidrogenasa 6; *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; C, células diferenciadas sin tratar; ATV3, células diferenciadas en presencia de ATV 3 μ M; ATV30, células diferenciadas en presencia de ATV 30 μ M; RAL15, células diferenciadas en presencia de RAL 15 μ M; RAL150, células diferenciadas en presencia de RAL 150 μ M.

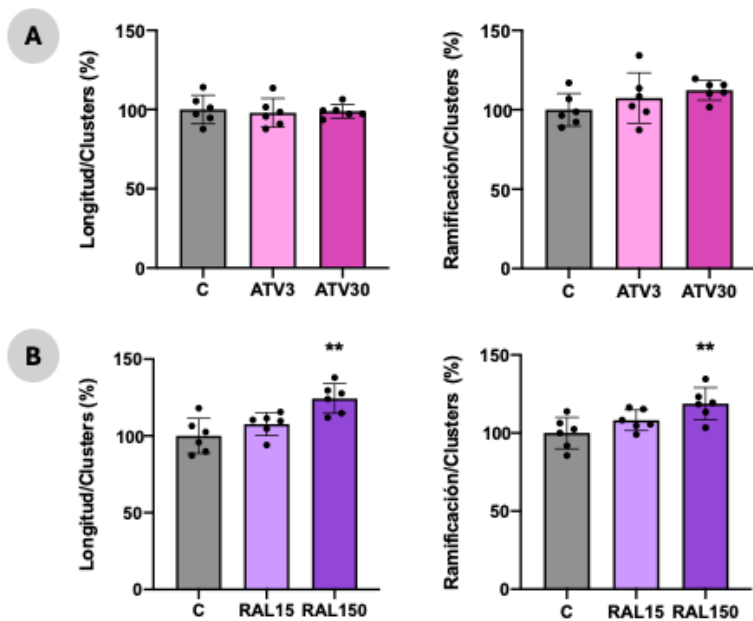


Figura 2. Análisis de la diferenciación neuronal de las hNSC en presencia de antirretrovirales. Longitud de neuritas/*cell-body clusters* y ramificación de neuritas/*cell-body clusters* de neuronas derivadas de hNSC expuestas a ATV (**A**) o RAL (**B**) obtenidos con el módulo Neurotrack del sistema Incucyte®. Cada medida extraída de un pocillo concreto se normaliza frente a la cuantificación celular existente a tiempo cero en este. Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. Prueba ANOVA + Dunnett: ** $p \leq 0,01$ (vs. C). hNSC, células madre neurales humanas; ATV, atazanavir; RAL, raltegravir; C, células diferenciadas sin tratar; ATV3, células diferenciadas en presencia de ATV 3 μM ; ATV30, células diferenciadas en presencia de ATV 30 μM ; RAL15, células diferenciadas en presencia de RAL 15 μM ; RAL150, células diferenciadas en presencia de RAL 150 μM .

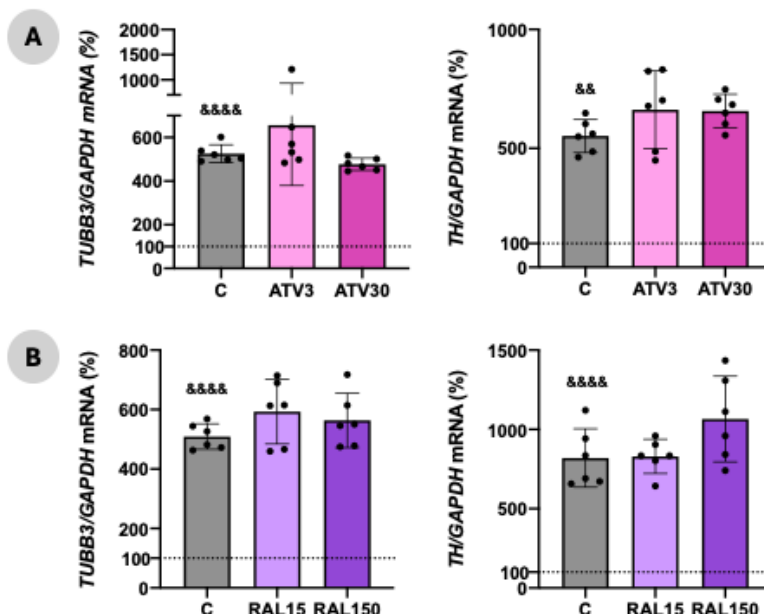


Figura 3. Niveles de mRNA de marcadores neuronales de las hNSC en presencia de antirretrovirales. Niveles de mRNA de *TUBB3* y *TH* normalizados por *GAPDH* de neuronas derivadas de hNSC expuestas a ATV (**A**) o RAL (**B**) determinados por qPCR. Los valores medios de las células diferenciadas sin tratar se consideran el 100 %. Prueba t de Student despareado: &&&& $p < 0,0001$ (vs. SD). Prueba Mann Whitney: && $p \leq 0,01$ (vs. SD). hNSC, células madre neurales humanas; ATV, atazanavir; RAL, raltegravir; mRNA, RNA mensajero; *TUBB3*, β III-tubulina; *TH*, tirosina hidroxilasa; *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; C, células diferenciadas sin tratar; ATV3, células diferenciadas en presencia de ATV 3 μ M; ATV30, células diferenciadas en presencia de ATV 30 μ M; RAL15, células diferenciadas en presencia de RAL 15 μ M; RAL150, células diferenciadas en presencia de RAL 150 μ M.

Anexo 2. Niveles de mRNA de las subunidades mitocondriales de los complejos del sistema OXPHOS analizados por RNA-seq en el modelo de células madre neurales

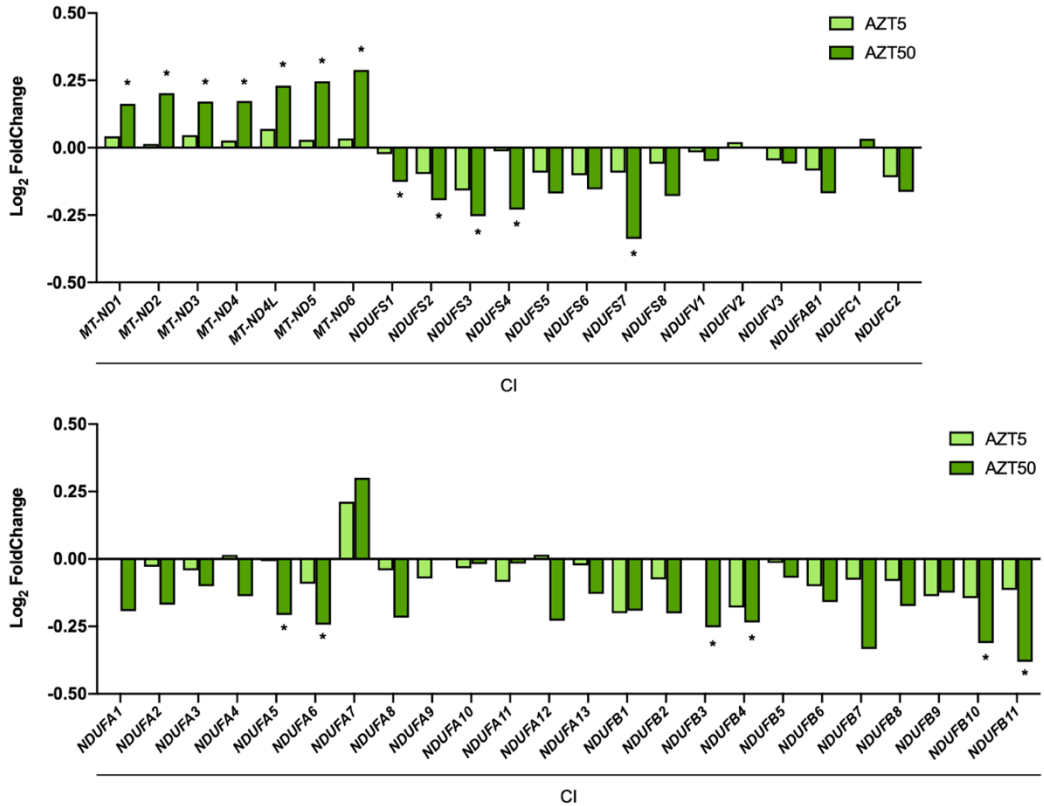


Figura 4. Expresión génica diferencial de las subunidades del complejo I del sistema OXPHOS de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. Se representa la magnitud del cambio en log₂ obtenida mediante RNA-seq comparado con las hNSC diferenciadas en ausencia del fármaco (* p-valor ajustado ≤ 0,05). C (3); AZT5 (3); AZT50 (3). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μM; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μM.

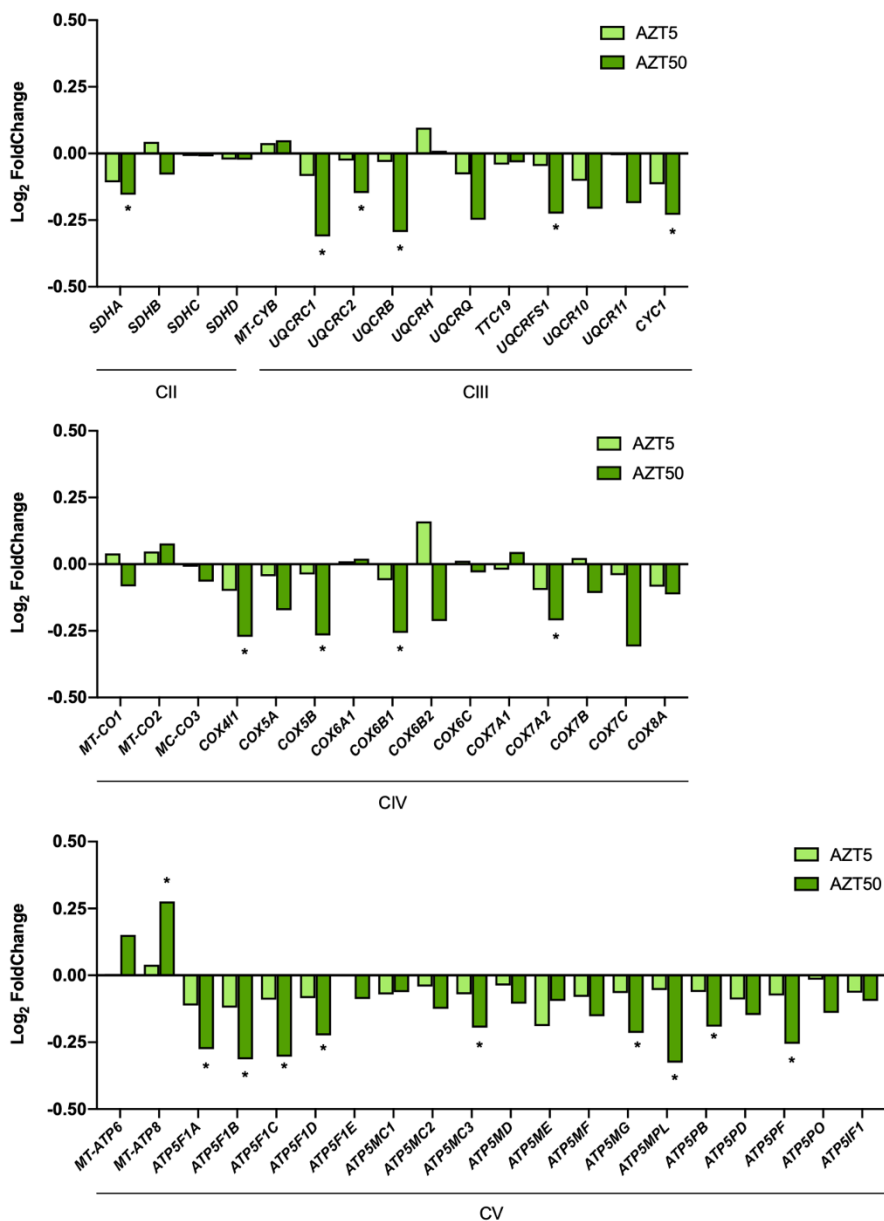


Figura 5. Expresión génica diferencial de las subunidades de los complejos II, III, IV y V del sistema OXPHOS de las hNSC tras la diferenciación a neurona madura en presencia de AZT. Se representa la magnitud del cambio en log₂ obtenida mediante RNA-seq comparado con las hNSC diferenciadas en ausencia del fármaco (* p-valor ajustado $\leq 0,05$). C (3); AZT5 (3); AZT50 (3). hNSC, células madre neurales humanas; AZT, azidotimidina; C, células diferenciadas sin tratar; AZT5, células diferenciadas en presencia de AZT 5 μ M; AZT50, células diferenciadas en presencia de AZT 50 μ M.

Anexo 3. Niveles de mRNA de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo implicadas en la replicación, la transcripción y la traducción mitocondrial, y el procesamiento y la degradación de RNA y proteínas de la mitocondria analizados por RNA-seq en el modelo de células madre neurales

Categoría/Función	Gen	Log ₂ fold change	
		AZT5	AZT50
Transcripción mitocondrial	<i>POLRMT</i>	-0,082	-0,324
	<i>TFAM</i>	-0,093	-0,210
	<i>TFB2M</i>	-0,163	-0,177
	<i>TEFM</i>	0,066	0,111
	<i>MTERF1</i>	0,003	-0,101
Procesamiento y degradación del RNA mitocondrial	<i>HSD17B10</i>	-0,136	-0,272
	<i>TRMT10C</i>	0,004	-0,171
	<i>PRORP</i>	0,165	0,344
	<i>ELAC2</i>	-0,066	-0,047
	<i>MTPAP</i>	0,003	-0,092
	<i>LRPPRC</i>	0,031	-0,012
	<i>TRNT1</i>	0,018	0,090
	<i>THG1L</i>	-0,070	0,014
	<i>SLIRP</i>	0,065	-0,090
	<i>PNPT1</i>	-0,001	-0,002
	<i>SUPV3L1</i>	-0,057	-0,039
	<i>REXO2</i>	0,215	0,253
	<i>DDX28</i>	-0,307	-0,434
	<i>DHX30</i>	-0,076	-0,183
	<i>FASTK</i>	-0,124	-0,217
	<i>FASTKD1</i>	-0,161	-0,171
	<i>FASTKD2</i>	-0,051	0,052
	<i>FASTKD3</i>	-0,132	-0,332
	<i>FASTKD4</i>	-0,050	-0,223
	<i>FASTKD5</i>	-0,009	-0,071
	<i>MRM2</i>	-0,138	-0,217
	<i>GRSF1</i>	-0,027	-0,085
	<i>MRM1</i>	-0,343	-0,308
	<i>MRM3</i>	-0,018	0,062

Aumento niveles significativo
Aumento niveles no significativo, p valor ajustado muy próximo a 0,05
Disminución niveles no significativo, p valor ajustado muy próximo a 0,05
Disminución niveles significativo

Categoría/Función	Gen	Log ₂ fold change		Categoría/Función	Gen	Log ₂ fold change	
		AZT5	AZT50			AZT5	AZT50
Aminoacil tRNA sintetasa	AARS2	0,015	0,016	Traducción mitocondrial	MTIF2	-0,036	-0,150
	CARS2	0,037	0,049		MTIF3	-0,146	-0,274
	DARS2	-0,011	0,050		TUFM	-0,128	-0,267
	EARS2	-0,019	0,002		TFSM	-0,072	-0,127
	FARS2	-0,031	-0,058		GFM1	-0,044	-0,030
	GARS	-0,058	-0,143		GUF1	-0,089	-0,040
	HARS2	-0,030	-0,057		MTRF1L	-0,032	-0,150
	IARS2	-0,054	-0,079		MRRF	0,017	0,072
	KARS	-0,046	-0,173		MTRFR	-0,055	-0,122
	LARS2	-0,082	-0,144		GFM2	-0,011	-0,006
	MARS2	-0,047	-0,385	Degradación de proteínas mitocondriales	AFG3L2	0,000	-0,119
	NARS2	-0,065	-0,190		LONP1	-0,053	-0,186
	PARS2	-0,114	-0,268		CLPP	-0,126	-0,342
	RARS2	0,012	-0,040		YME1L1	-0,002	-0,017
	SARS2	0,048	0,205		ATP23	0,064	0,012
	TARS2	-0,056	-0,153		IMMP1L	0,119	0,078
	VARS2	0,101	0,132		IMMP2L	0,238	0,603
	WARS2	-0,131	-0,028		METAP1D	0,141	0,169
	YARS2	0,030	0,062		MIP	-0,419	-0,153
					OMA1	0,113	0,100
			PARL	-0,117	-0,183		
			PMPCB	-0,009	-0,086		
			XPNPEP3	0,041	0,127		
			MEP	-0,060	-0,109		
			PITRM1	0,014	-0,007		
			HTRA2 (PARK13)	-0,139	-0,418		
			LACTB	-0,039	-0,050		

Categoría/Función	Gen	Log ₂ fold change		Gen	Log ₂ fold change	
		AZT5	AZT50		AZT5	AZT50
Proteína ribosomal mitocondrial	MRPL1	-0,124	-0,228	MRPL49	-0,032	-0,128
	MRPL10	-0,063	-0,200	MRPL50	-0,056	-0,259
	MRPL11	0,001	-0,131	MRPL51	-0,022	-0,082
	MRPL12	0,030	-0,303	MRPL52	-0,033	-0,108
	MRPL13	0,021	-0,070	MRPL53	-0,127	-0,111
	MRPL14	0,058	-0,217	MRPL54	-0,047	-0,237
	MRPL15	-0,036	-0,214	MRPL55	-0,164	-0,237
	MRPL16	-0,156	-0,078	MRPL57	-0,023	-0,050
	MRPL17	-0,017	-0,088	MRPL58	-0,041	-0,210
	MRPL18	0,066	-0,041	MRPL9	0,001	-0,136
	MRPL19	0,054	0,044	MRPS10	-0,065	-0,129
	MRPL2	-0,107	-0,228	MRPS11	-0,010	-0,070
	MRPL20	-0,064	-0,068	MRPS12	-0,151	-0,301
	MRPL21	-0,014	-0,337	MRPS14	-0,005	-0,245
	MRPL22	-0,155	-0,311	MRPS15	-0,001	-0,048
	MRPL23	-0,235	-0,290	MRPS16	-0,086	-0,140
	MRPL24	-0,056	-0,198	MRPS17	-0,033	-0,150
	MRPL27	-0,018	-0,003	MRPS18A	-0,085	-0,167
	MRPL28	-0,164	-0,354	MRPS18B	-0,089	-0,107
	MRPL3	-0,008	-0,135	MRPS18C	-0,097	-0,229
	MRPL30	-0,099	-0,169	MRPS2	-0,168	-0,332
	MRPL32	0,004	-0,169	MRPS21	-0,103	-0,202
	MRPL33	-0,018	0,051	MRPS22	-0,039	-0,050
	MRPL34	-0,022	-0,183	MRPS23	0,011	-0,124
	MRPL35	-0,015	-0,076	MRPS24	0,155	-0,153
	MRPL36	-0,060	-0,119	MRPS25	0,098	0,180
	MRPL37	-0,025	-0,056	MRPS26	-0,049	-0,273
	MRPL38	0,046	-0,048	MRPS27	-0,061	-0,082
	MRPL39	0,024	0,006	MRPS28	0,122	-0,174
	MRPL4	-0,027	-0,078	MRPS30	-0,017	-0,056
	MRPL40	-0,124	-0,240	MRPS31	0,075	-0,074
	MRPL41	-0,055	-0,165	MRPS33	-0,120	-0,191
	MRPL42	-0,025	-0,106	MRPS34	-0,081	-0,330
	MRPL43	-0,074	-0,130	MRPS35	-0,016	-0,221
	MRPL44	-0,066	-0,202	MRPS36	-0,052	-0,346
	MRPL45	-0,004	-0,126	MRPS5	0,040	-0,007
	MRPL46	-0,100	0,077	MRPS6	0,081	-0,007
	MRPL47	0,005	-0,261	MRPS7	-0,083	-0,162
	MRPL48	-0,066	-0,164	MRPS9	0,064	-0,165

Anexo 4. Pie de figura III. 19

Figura III.19. Efecto de la exposición prenatal a AZT sobre el comportamiento conductual de ratones envejecidos.

A) Distancia total recorrida durante la prueba de campo abierto (cm). 12 m: VEH: 5187 ± 1300 (30); AZT2.5: 5727 ± 1727 (34); AZT5: 5356 ± 1669 (42). 16 m: VEH: 4140 ± 1335 (30); AZT2.5: 4081 ± 1229 (32); AZT5: 4236 ± 1363 (41). 20 m: VEH: 2793 ± 1388 (27); AZT2.5: 2608 ± 1274 (31); AZT5: 3494 ± 1043 (37).

B) Velocidad media durante la prueba de campo abierto (cm/s). 12 m: VEH: $5,76 \pm 1,45$ (30); AZT2.5: $6,36 \pm 1,92$ (34); AZT5: $5,97 \pm 1,85$ (42). 16 m: VEH: $4,60 \pm 1,49$ (30); AZT2.5: $4,53 \pm 1,37$ (32); AZT5: $4,70 \pm 1,51$ (41). 20 m: VEH: $3,10 \pm 1,54$ (27); AZT2.5: $2,90 \pm 1,42$ (31); AZT5: $3,88 \pm 1,16$ (37).

C) Puntuación obtenida en la prueba de rejilla invertida. 12 m: VEH: $2,97 \pm 1,54$ (30); AZT2.5: $3,24 \pm 1,56$ (34); AZT5: $2,64 \pm 1,28$ (42). 16 m: VEH: $2,03 \pm 1,13$ (30); AZT2.5: $2,16 \pm 1,24$ (31); AZT5: $2,35 \pm 1,33$ (40). 20 m: VEH: $1,96 \pm 1,08$ (26); AZT2.5: $2,07 \pm 1,15$ (31); AZT5: $1,97 \pm 1,15$ (38).

D) Puntuación obtenida en la prueba de suspensión de alambre. 12 m: VEH: $5,63 \pm 5,35$ (30); AZT2.5: $5,90 \pm 5,64$ (33); AZT5: $3,48 \pm 3,22$ (42). 16 m: VEH: $2,23 \pm 2,99$ (30); AZT2.5: $1,52 \pm 2,86$ (31); AZT5: $2,53 \pm 3,88$ (40). 20 m: VEH: $1,35 \pm 3,41$ (26); AZT2.5: $1,52 \pm 2,95$ (31); AZT5: $0,53 \pm 0,98$ (38).

E) Puntuación obtenida en la prueba de pesas. 12 m: VEH: $12,33 \pm 2,47$ (30); AZT2.5: $11,24 \pm 2,30$ (34); AZT5: $8,91 \pm 2,74$ (42). 16 m: VEH: $11,73 \pm 2,24$ (30); AZT2.5: $10,88 \pm 1,88$ (32); AZT5: $9,73 \pm 2,14$ (40). 20 m: VEH: $11,07 \pm 2,34$ (28); AZT2.5: $10,29 \pm 2,09$ (31); AZT5: $9,53 \pm 2,09$ (38).

F) Tiempo de búsqueda en la evaluación de hiposmia (s). 12 m: VEH: $121,70 \pm 104,70$ (30); AZT2.5: $111,60 \pm 122,30$ (34); AZT5: $148,10 \pm 167,80$ (42). 16 m: VEH: $89,97 \pm 115,30$ (30); AZT2.5: $59,84 \pm 61,25$ (31); AZT5: $111,10 \pm 162,00$ (41). 20 m: VEH: $85,38 \pm 143,00$ (26); AZT2.5: $131,40 \pm 155,90$ (31); AZT5: $105,90 \pm 144,30$ (37).

Prueba Kruskal-Wallis + Dunn: * $p \leq 0,05$ (vs. C); *** $p \leq 0,001$ (vs. C); ** $p < 0,0001$ (vs. C). AZT, azidotimidina; VEH, ratones expuestos a vehículo; AZT2.5, ratones expuestos a AZT 2,5 μM ; AZT5, ratones expuestos a AZT 5 μM ; m, meses.