



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Efecto de la inhibición del sistema de fosforilación oxidativa sobre la diferenciación neuronal en la enfermedad de Alzheimer

Effect of inhibition of oxidative phosphorylation system on neural differentiation in Alzheimer's disease

Autor

Ángela Sedeño Cacciatore

Directores

Eduardo Ruiz Pesini
Alba Pesini Martín

Facultad de Ciencias

Grado en Biotecnología

Curso 2015-2016





Universidad
Zaragoza

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

A QUIEN PUEDA INTERESAR:

Alba Pesini Martín y Eduardo Ruiz Pesini, directores del trabajo fin de grado (TFG) realizado en nuestro Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria por Dña. Ángela Sedeño Cacciatore, consideramos que dicha estudiante cuenta con los conocimientos necesarios para defender el TFG titulado “Efecto de la inhibición del sistema de fosforilación oxidativa sobre la diferenciación neuronal en la enfermedad de Alzheimer”.

Zaragoza, 13 de Junio de 2016

Alba Pesini Martín
Becaria DGA

Eduardo Ruiz Pesini
Investigador ARAID

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
I. ABSTRACT	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Enfermedad de Alzheimer.....	2
2. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)	3
3. Inhibidor del sistema OXPHOS: cloruro de tributilestaño (TBTC)	5
4. Modelos celulares de la enfermedad de Alzheimer	5
III. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO	7
1. Hipótesis inicial.....	7
2. Objetivo.....	7
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Línea celular	8
2. Medios de cultivo y reactivos.....	8
3. Condiciones y procedimientos de cultivo celular.....	8
4. Medida del consumo de oxígeno en presencia de TBTC	9
5. Análisis de la viabilidad celular en presencia de TBTC.....	9
6. Diferenciación neuronal.....	10
7. Detección de proteínas por citometría de flujo.....	10
8. Análisis estadístico	11
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
1. Análisis del consumo celular de oxígeno de la línea SH-SY5Y en presencia de TBTC	12
2. Efecto de diferentes concentraciones de TBTC sobre la viabilidad celular	13
3. Diferenciación neuronal.....	15
4. Análisis de la diferenciación neuronal por citometría de flujo	18
VI. CONCLUSIONES.....	20
VI. CONCLUSIONS.....	20
VII. REFERENCIAS.....	21

I. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es un síndrome neurodegenerativo progresivo del sistema nervioso central caracterizado principalmente por deterioro cognitivo y pérdida de memoria. De acuerdo a la hipótesis de cascada mitocondrial, se ha propuesto que la causa de esta patología podría ser el declive de la funcionalidad del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial, responsable de la generación de energía en las células e implicado en la diferenciación neuronal. Puesto que este declive puede estar acrecentado por factores ambientales, se ha estudiado el efecto que tiene el cloruro de tributilestaño, un xenobiótico ambiental que inhibe el sistema de fosforilación oxidativa, sobre la diferenciación neuronal.

El estudio del efecto de concentraciones inhibitorias de la función mitocondrial de este xenobiótico se ha realizado en células SH-SY5Y, modelos celulares de enfermedad de Alzheimer ampliamente utilizados en investigación, durante procesos de diferenciación a neurona colinérgica y dopaminérgica. Concentraciones crecientes de tributilestaño disminuyen la respiración mitocondrial y parecen ser citotóxicas para la línea celular cuando se encuentra sometida a tratamiento con ácido retinoico, un agente inductor de la diferenciación. El análisis morfológico y del marcador neuronal β -III-tubulina muestran que la exposición a 50 nM de tributilestaño impide la diferenciación neuronal en todos los casos estudiados, mientras que 25 nM impide únicamente la diferenciación colinérgica.

I. ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder of the central nervous system characterized by cognitive decline and memory loss. According to the mitochondrial cascade hypothesis, a decline in mitochondrial oxidative phosphorylation system functionality – responsible for energy production and relevant in neural differentiation – has been proposed to be the main cause of this pathology. Since this decline can be augmented by environmental factors, the effect of tributyltin chloride, an environmental xenobiotic known to inhibit the oxidative phosphorylation system, in neural differentiation has been studied.

Analysis of mitochondrial inhibitory concentrations of this xenobiotic has been conducted in SH-SY5Y cell line, an Alzheimer's disease cell model used extensively in research, during differentiation to cholinergic and dopaminergic neurons. Increasing concentrations of tributyltin diminish mitochondrial respiration and seem to be cytotoxic to cells treated with retinoic acid, a differentiation inductor agent. Morphological and β -III-tubuline levels analysis show that exposure to 50 nM of tributyltin impedes neural differentiation in all cases studied, whereas 25 nM hinders cholinergic differentiation only.

II. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un síndrome neurodegenerativo progresivo del sistema nervioso central. Se caracteriza principalmente por pérdida de memoria y deterioro cognitivo debido al daño y depleción neuronal en zonas del cerebro implicadas en estas capacidades.^{1,2} Este daño termina por afectar a otras áreas cerebrales, incluyendo aquellas que permiten el desarrollo de funciones corporales básicas, convirtiendo a los pacientes en personas dependientes y resultando mortal en última instancia.²

A día de hoy la AD es la causa más común de demencia y la sexta causa de muerte en Estados Unidos.² Debido al continuo envejecimiento de la población y mayor esperanza de vida se espera que el número de casos de AD aumente un 35 % para 2030 y hasta un 110 % para el 2050,² con el consiguiente aumento en la carga social y económica que supone el tratamiento y cuidado de las personas con AD. Esto no hace sino impulsar la investigación en esta patología, para la cual todavía no existe tratamiento que frene el avance de la misma.

A nivel histopatológico, la AD se caracteriza por la aparición de placas extracelulares causadas por la agregación de un fragmento de la proteína β -amiloide, aparición de ovillos neurofibrilares formados por proteína Tau hiperfosforilada y pérdida de neuronas,¹ afectando a diferentes tipos neuronales y múltiples regiones del sistema nervioso.³ En relación a estudios de estos eventos se propuso la hipótesis de la cascada amiloide. Según esta hipótesis los fragmentos de proteína β -amiloide, generados por corte proteolítico de la proteína precursora por la vía amiloidogénica, son la causa de la enfermedad. Esta idea se fundamenta en que en casos familiares de AD se han descrito mutaciones en genes PSEN1 y PSEN2, ambos implicados en el corte de la proteína precursora amiloide.⁴ Sin embargo, la mayoría de los casos de AD son casos esporádicos de aparición tardía⁴, los cuales no quedan bien reflejados en la hipótesis de la cascada amiloide.

1.1 Hipótesis de la cascada mitocondrial

En 2004 se propuso una hipótesis alternativa: la hipótesis de la cascada mitocondrial. De acuerdo a esta hipótesis, la aparición de la enfermedad depende de la combinación de la funcionalidad basal del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), determinada por el trasfondo genético; y del declive de la misma a resultas de la edad, cuya velocidad se ve afectada por factores genéticos y ambientales.⁴ En este caso se considera que la disfunción mitocondrial afecta al procesamiento de la proteína precursora amiloide y resulta en otros eventos moleculares asociados a la patología como hiperfosforilación de Tau o inflamación.⁴

Esta hipótesis está respaldada por diversas evidencias:⁴

- Se da disfunción mitocondrial en personas con AD independientemente de la carga de o el estado de neurodegeneración, incluso en los estadios iniciales.
- Líneas celulares con mismo fondo genético nuclear y DNA mitocondrial (mtDNA) de pacientes de AD, presentan respiración mitocondrial basal disminuida.
- En personas sanas familiares de individuos con AD se observan peores resultados en tests de memoria cuando el pariente con AD es la madre, coincidiendo con que la herencia mitocondrial es materna.

1.2 Neurogénesis adulta en AD

El deterioro cognitivo propio de AD se asocia inequívocamente con la pérdida neuronal progresiva, sin embargo el compromiso de la neurogénesis parece iniciarse antes y podría estar relacionado con el comienzo de la enfermedad.⁵ Además la desregulación en la neurogénesis podría exacerbar la vulnerabilidad neuronal a la disfunción mitocondrial.⁵

La neurogénesis adulta es la generación de neuronas funcionales en el cerebro adulto a partir de células madre neurales residentes principalmente en el ventrículo lateral y el hipocampo.⁶ En el hipocampo, una de las regiones más afectadas en AD,³ este proceso probablemente contribuye al aprendizaje y la memoria,⁶ que se ven impedidos en esta patología.

Aunque la implicación de la neurogénesis adulta en la etiopatología de AD es controvertida,⁶ hay múltiples modelos de AD en los que se ha visto una disminución en la misma. Esto, unido al hecho de que se encuentra regulada por el metabolismo energético, el cual se encuentra alterado en cerebros con AD y en el que es fundamental la función mitocondrial,⁶ sugiere que puede ser un aspecto clave en esta afección.

2. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)

2.1 Bioenergética celular

En la célula, la mayoría de procesos se encuentran impulsados por la hidrólisis de adenosin trifosfato (ATP), por lo que el mantenimiento de las funciones celulares requiere del incesante reaprovisionamiento de esta molécula. Es posible mantener la homeostasis de ATP gracias a la oxidación continuada de monosacáridos, ácidos grasos y aminoácidos provenientes de la dieta. La energía química contenida en ellos se convierte, en parte, en ATP de forma directa; pero la mayor parte se transfiere en forma de electrones al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) o al dinucleótido de flavina y adenina (FAD).⁷

La reoxidación de los transportadores de electrones reducidos (NADH y FADH₂) es imprescindible no solo para mantener el proceso de oxidación de las moléculas de “combustible”, sino también para un mayor aprovechamiento energético de las mismas, puesto que resulta en generación de ATP adicionales.⁷ Dicha reoxidación puede darse en el citosol por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) o en la mitocondria por la acción del sistema OXPHOS.

La oxidación a nivel del sistema OXPHOS consigue un mayor rendimiento energético (se generan ~30 moléculas de ATP en lugar de las 2 generadas por LDH). Sin embargo, el balance entre la producción de ATP a nivel citosólico o mitocondrial depende del tipo celular, de sus requerimientos energéticos y de las condiciones en las que se encuentra.⁷

2.2 Estructura y función del sistema OXPHOS en la mitocondria

El mayor aprovechamiento energético a nivel de OXPHOS es posible gracias a sus dos partes funcionales: la cadena de transporte de electrones (ETC), que incluye los complejos respiratorios CI-IV, el citocromo c (Cyt_c) y la coenzima Q (CoQ₁₀); y la ATP sintasa (CV).⁸ Estas proteínas se encuentran embebidas en la membrana interna mitocondrial y resultan de la unión de subunidades codificadas tanto en el DNA nuclear como en el mtDNA.⁷

Los electrones provenientes de NADH y FADH₂ alcanzan la ETC a través de CI y CII. Estos electrones son cedidos a CoQ₁₀ que media su transporte a CIII, desde donde llegan al CIV a través

de Cyt_c (Figura 1.1). Es en este último complejo donde son donados a oxígeno molecular (O₂), el aceptor final, formando agua.⁷

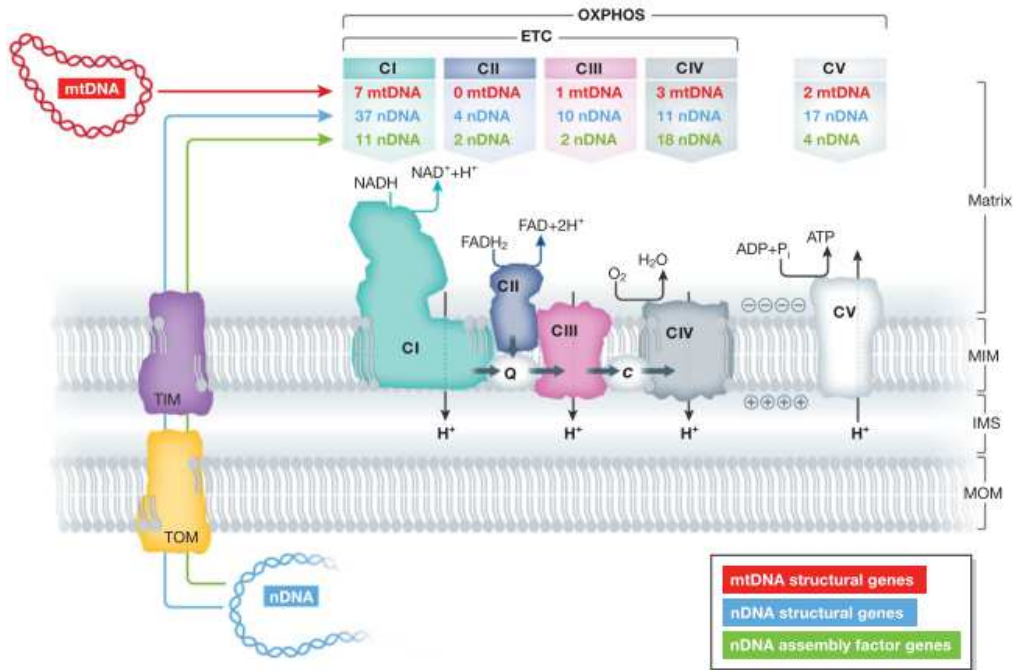


Figura 1.1 – Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Tomada de [7].

El flujo de electrones a través de ETC se encuentra acompañado del bombeo de protones al espacio intermembrana en tres puntos: CI, CIII y CIV.⁷ Así la energía generada por el transporte electrónico se emplea en generar un gradiente electroquímico que favorece el paso de protones a la matriz mitocondrial. CV aprovecha este gradiente para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, mediante el paso controlado de protones desde el espacio intermembrana y a través de las unidades que lo forman.⁷

Además de la producción de energía, el mantenimiento del gradiente electroquímico es relevante para la funcionalidad de otros transportadores integrados en la membrana interna mitocondrial, por lo que resulta esencial para mantener la integridad mitocondrial.⁷ Asimismo, el sistema OXPHOS está implicado en muchas otras funciones celulares,⁸ como la regulación de la apoptosis, mantenimiento de los niveles citosólicos de calcio, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), etc. De hecho, los niveles de ATP, ROS, calcio y el estado redox de la célula pueden comportarse como segundos mensajeros en diversos procesos.⁸

2.3 Importancia del sistema OXPHOS en células del sistema nervioso central

a. Metabolismo energético de las células del sistema nervioso central

Las neuronas son grandes consumidores de ATP y puesto que no disponen de reservas de glucógeno dependen totalmente de un flujo ininterrumpido de glucosa. Por la misma razón oxidan preferentemente este sustrato hasta CO₂ y H₂O, vía OXPHOS, obteniendo la mayor cantidad de moléculas de ATP por cada glucosa.⁷

Por ello el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial es de extrema importancia en estas células. El detrimento de la función mitocondrial se ha ligado a la neurodegeneración durante el envejecimiento fisiológico y en patologías como AD.⁷

b. Relevancia en la diferenciación neuronal

La mitocondria tiene especial relevancia durante la diferenciación, proceso en el cual se incrementa el número de copias de mtDNA, los niveles de polipéptidos codificados por mtDNA, el consumo de oxígeno y el ATP intracelular. Todo esto sugiere que la diferenciación conlleva una transición en la producción de energía, de la glicolisis al sistema OXPHOS.⁸

La función de OXPHOS resulta también relevante a otros niveles como pueda ser la producción del plasmalema necesario para el desarrollo de las neuritas. La enzima dihidrorotato deshidrogenasa, perteneciente a la ruta de biosíntesis de pirimidina, oxida dihidrorotato a orotato cediendo los electrones a CoQ₁₀ a través de la cual llegan a OXPHOS.¹ Si disminuye la actividad de OXPHOS también lo hace la producción de orotato necesario para la producción de pirimidinas y fosfolípidos de membrana relevantes en el establecimiento de sinapsis.

Estos aspectos se unen a la ya mencionada implicación del sistema OXPHOS en la regulación de segundos mensajeros como ROS, relevante en la diferenciación neuronal.⁹ En definitiva, disfunciones en OXPHOS pueden resultar en alteraciones en la diferenciación neuronal.

El proceso de neurogénesis y el sistema OXPHOS también parece encontrarse relacionados. Por un lado el sistema OXPHOS es parte central del metabolismo energético, que regula el proceso de neurogénesis; por otro, la ya comentada implicación de OXPHOS en la diferenciación neuronal, siendo ésta la culminación de la renovación neuronal. Por ello parece lógico sugerir que las alteraciones que se dan en ambos aspectos en AD podrían estar relacionadas.

3. Inhibidor del sistema OXPHOS: cloruro de tributilestaño (TBTC)

El tributilestaño (TBT) es un potente inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial (CV), por lo que inhibe el sistema OXPHOS.¹⁰ Recientemente, en este mismo grupo de investigación, se ha comprobado que el cloruro de tributilestaño (TBTC) imita los efectos fenotípicos de una mutación patológica del DNA mitocondrial.¹¹ De acuerdo a la hipótesis de la cascada mitocondrial, el detrimento de la funcionalidad de OXPHOS por factores ambientales como este puede contribuir o acelerar el desencadenamiento de las manifestaciones clínicas de la AD.

TBT se ha empleado de forma extensiva como agente anti-incrustante en formulaciones de pintura para barcos, redes, etc.¹² Este uso causó graves efectos negativos en organismos acuáticos, como por ejemplo imposex en gasterópodos, por lo que se prohibió su uso con este propósito en 2008.^{11,12} Sin embargo, su presencia en los sedimentos marinos y objetos cotidianos por sus otros usos hacen que continúe siendo una amenaza para la salud pública.

El TBT llega a los humanos a través del consumo de pescado y marisco contaminado, además de a través de objetos cotidianos en cuya fabricación se emplean estos compuestos.¹² No es de extrañar, por tanto, que se haya detectado presencia de TBT en muestras humanas. Por ello, y porque su naturaleza permite el paso a través de la barrera hematoencefálica,¹¹ se plantea la posibilidad de que este xenobiótico pueda contribuir a la aparición de AD.

4. Modelos celulares de la enfermedad de Alzheimer

El estudio de estos aspectos en AD requiere modelos experimentales capaces de replicar las características de esta enfermedad; actualmente existen diversos modelos si bien ninguno es una aproximación ideal.¹³ En este caso se va a hacer uso de un modelo *in vitro* basado en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y se ha empleado ampliamente como modelo de neurona desde los años ochenta ya que estas células poseen propiedades bioquímicas y funcionales de neurona y son capaces de proliferar en cultivo durante tiempos prolongados.¹⁴ Sin embargo, la línea celular desdiferenciada presenta algunas limitaciones, como menor sensibilidad a neurotoxinas, que hacen preferible el uso de estas células una vez se han diferenciado a neurona madura.¹⁴ La línea SH-SY5Y puede diferenciarse a diferentes tipos neuronales al ser tratada con agentes tales como ácido retinoico (RA), ésteres de forbol, factores neurotróficos, etc.¹⁵

Puesto que en AD hay una amplia denervación colinérgica cortical,³ lo que sugiere que estas células son vulnerables selectivamente a esta patología, estudiar la afectación de este tipo neuronal es clave al estudiar AD. Por otra parte, AD no cursa con daño tan importante de los sistema catecolaminérgicos de noradrenalina y dopamina como el del sistema colinérgico, si bien cierta proporción de enfermos de AD tienen síntomas parkinsonianos.³ En ellos se comprueba pérdida neuronal en la sustancia negra capaz de originar hipofunción dopaminérgica, por lo que el estudio de este tipo celular también es de interés.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

1. Hipótesis inicial

La exposición a xenobióticos que afectan a la función del sistema OXPHOS, tales como el TBTC, puede resultar en una disfunción mitocondrial. A su vez, los fallos funcionales en OXPHOS pueden, de acuerdo con la hipótesis de la cascada mitocondrial, precipitar la aparición de eventos histopatológicos propios de AD.

El detrimento de la función mitocondrial en neuronas es especialmente relevante debido a la importancia de estas en su bioenergética y su implicación en otros procesos como la diferenciación neuronal. Por ello se espera que la biogénesis neuronal adulta se vea impedida en presencia de TBTC contribuyendo así a la patología propia de AD.

2. Objetivo

El objetivo del presente proyecto es comprobar el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de TBTC sobre la diferenciación neuronal en modelos celulares de AD de neurona colinérgica y dopaminérgica.

Se han establecido los siguientes objetivos específicos secuenciales en el tiempo:

1. Comprobación del efecto de diferentes concentraciones de TBTC en la respiración mitocondrial de cultivos de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y sin diferenciar y en proceso de diferenciación.
2. Establecimiento de concentraciones de TBTC viables para el cultivo y diferenciación de línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y a neurona colinérgica.
3. Cultivo y diferenciación a neuronas colinérgicas de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y en presencia de diferentes concentraciones de TBTC.
4. Cultivo y diferenciación a neuronas dopaminérgicas de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y en presencia de diferentes concentraciones de TBTC.
5. Estudio del efecto de la exposición a diferentes concentraciones de TBTC sobre la diferenciación neuronal colinérgica y dopaminérgica mediante el análisis del marcador β -III-tubulina (TUBB3).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Línea celular

Se emplea la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (94030304 ECACC). La línea se autenticó previamente en el grupo de investigación mediante perfiles *short tandem repeats* (STR). Se verificó al comprobar su correspondencia con los perfiles descritos en American Type Culture Collection (ATCC) y European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (véase Anexo I).

2. Medios de cultivo y reactivos

Compuestos básicos en cultivo celular	
Suero fetal bovino (FBS)	GIBCO®
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (4'5 g/l)	GIBCO®
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) no glucose	GIBCO®
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7'4	GIBCO®
Piruvato sódico (50 mg/ml)	Sigma
L-Glutamina	Sigma
Tripsina	Sigma
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Panreac
Dimetil sulfóxido (DMSO) Hybri-Max™	Sigma
Compuestos empleados en diferenciación neuronal	
Ácido holo-transretinoico (RA)	Sigma
Factor neurotrófico recombinante derivado de cerebro (BDNF)	Life technologies
12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)	Sigma
Inhibidores del sistema OXPPOS	
Cloruro de tributilestaño (TBTC)	Sigma
Cianuro de potasio (KCN)	Fluka
Otros	
Solución permeabilizadora: PBS, pH 7'3, FBS, saponina y NaN ₃ al 0'1 %.	Invitrogen
Paraformaldehído	Fluka
Azul tripán (0'4 %)	Invitrogen
Etanol 100 %	S.A.E.Q.S.A.

Tabla IV.1 – Listado de medios de cultivo y reactivos empleados.

3. Condiciones y procedimientos de cultivo celular

Los cultivos celulares se realizaron en placas de 150 mm de diámetro, para medida del consumo de oxígeno; placas de 100 mm de diámetro para los cultivos de mantenimiento; y placas de 6 pocillos (TPP), para la curva de viabilidad. El material de vidrio se esterilizó previamente en un autoclave (Raypa®) y las disoluciones agregadas al cultivo fueron filtradas con filtros de 0'22 µm (TPP). Las manipulaciones se llevaron a cabo en campana de flujo laminar vertical (Holten LaminiAir HB 2448 o Nuaire UN-437-400E) y bajo condiciones estériles.

El medio se cambió cada 2-3 días, adicionando 2-4 ml del medio correspondiente. Las células se cultivaron en un incubador a 37 °C con un 5 % de CO₂ (modelo DHD AutoFlow Incubator de Nuaire). Los cultivos celulares se realizaron en ausencia de antibióticos.

En primer lugar se creó un pool de células de la línea SH-SY5Y para poder trabajar con ellas a lo largo del proyecto. Los cultivos de mantenimiento se realizaron en placas de 100 mm con 10 ml de medio DMEM 4'5 g/l glucosa y 10 % FBS. Cuando las células alcanzaban un 80 % de confluencia se resemebraron. Para ello se tripsinizaron añadiendo 2 ml de tripsina al 0'25 % y EDTA a 0'53 mM, tras un lavado con PBS. Tras la tripsinización se le adicionó una cantidad mayor de medio con FBS, se recogieron, se centrifugaron 5 min a 1400 rpm (Beckman Coulter Allegra™ X – 22, rotor S x 4250) y se resuspendieron en el medio requerido para su distribución en varias placas.

En el caso de congelación, el pellet celular se resuspendió en medio suplementado con un 20 % de FBS y un 10 % de DMSO. Las suspensiones celulares se mantuvieron al menos 24 h en un contenedor de congelación "Mr.Frosty™" (Thermo Scientific), de forma previa a su almacenamiento a -80 °C. La descongelación se realizó resuspendiendo el contenido del criotubo en tubo Falcon de 15 ml (TPP) con medio de cultivo fresco atemperado. La resuspensión se centrifugó, tras lo cual se retiró el sobrenadante para eliminar el DMSO y se resuspendieron las células en el medio apropiado para su distribución en placas de cultivo.

Los cultivos celulares se visualizaron en un microscopio invertido modelo DMIL (Leica). Para la obtención de imágenes se empleó el software LAS EZ desarrollado por Leica.

4. Medida del consumo de oxígeno en presencia de TBTC

El consumo de oxígeno se midió con un oxígrafo de alta resolución (Oroboros®) asociado al software DatLab, utilizado para la adquisición y análisis de datos.

Para esta técnica se partió de células con una confluencia del 80 % en placas de cultivo de 150 mm en dos condiciones:

- **Sin diferenciar:** incubadas en medio DMEM sin glucosa, piruvato 1 mM, galactosa 5 mM y FBS al 10 % durante 6 días.
- **Diferenciadas:** incubadas en medio DMEM sin glucosa, piruvato 1 mM, galactosa 5 mM, FBS al 10 % y RA 10 μM durante 6 días.

Estas células se tripsinizaron y centrifugaron a 378 x g durante 5 minutos. A continuación, se contaron y el pellet celular obtenido se diluyó hasta una concentración 1×10^6 de células/ml. Después de introducir 2 ml de muestra en la cámara de medida, se cerró la cámara y, una vez que se estabilizó el flujo, se obtuvo la denominada respiración endógena o de rutina.

Seguidamente, se midió la respiración en presencia de concentraciones crecientes de TBTC. Para ello se añadió TBTC hasta alcanzar concentraciones de 25, 50, 75 y 100 nM. La cuantificación se realizó tras la estabilización de la señal para cada caso. Finalmente se determinó la respiración no dependiente de cadena respiratoria, inhibiendo el complejo IV con KCN.

La determinación de consumo de oxígeno se realizó en tres experimentos independientes y se alternaron las cámaras de medida para evitar errores que deriven de la variación de las mismas.

5. Análisis de la viabilidad celular en presencia de TBTC

A fin de determinar el efecto de la droga sobre la viabilidad celular, se cultivó a lo largo de 14-15 días la línea celular en presencia de TBTC a 0, 25, 50, 100 nM en medio DMEM sin glucosa suplementado con piruvato 1 mM, galactosa 5 mM y FBS al 10 % en placas de 6 pocillos.

Cada 2-3 días se recogió (por tripsinización y posterior centrifugación) un pocillo correspondiente a cada concentración de TBTC. Las células recogidas se resuspendieron 1:1 con Azul Tripán, tras lo cual se contabilizaron por medio del contador automático Countess Automated Cell Counter® (Invitrogen™) en las cámaras de contaje apropiadas para el mismo.

Las curvas de viabilidad se crearon en Excel (Microsoft Office) representando número de células frente al tiempo transcurrido de acuerdo a los datos obtenidos. Se ajustaron los datos a una curva exponencial del tipo $N = a \cdot e^{b \cdot t}$ donde el tiempo de duplicación es $DT = \frac{\ln 2}{b}$.

6. Diferenciación neuronal

6.1. Diferenciación a neurona colinérgica

La exposición secuencial de la línea celular SH-SY5Y a RA y BDNF da lugar a poblaciones con morfología neuronal.¹⁶ Basándose en esto, miembros del grupo de investigación han puesto a punto un protocolo de diferenciación que da lugar a caracteres de neurona colinérgica madura en la línea SH-SY5Y.

El protocolo consiste en el cultivo de la línea celular SH-SY5Y en medio DMEM sin glucosa suplementado con piruvato 1 mM, galactosa 5 mM, FBS al 10 % y RA 10 μ M durante 11 días, seguido de 2 días en cultivo con medio similar suplementado con BDNF 50 ng/ml en lugar de RA. A fin de comprobar el efecto de la presencia de TBTC sobre la diferenciación, se adicionaron a diferentes cultivos TBTC a concentraciones finales de 0, 25 y 50 nM, respectivamente, las cuales se mantuvieron durante todo el protocolo. Para cada condición se mantuvo un cultivo control a misma concentración de TBTC, pero al que no se adiciona RA ni BDNF durante el protocolo.

Se sembraron $1'2 \times 10^4$ de células totales en los cultivos sin TBTC y $3'5 \times 10^4$ células totales para aquellos a las que sí se adiciona TBTC, ambos en placas de 6 pocillos (TPP). La siembra se realizó con medio DMEM 4'5 g/l glucosa y 10 % FBS, el cual se mantuvo durante al menos 24 h. Tras el comienzo del protocolo se cambiaron los medios cada 2-3 días, adicionando 2-4 ml del correspondiente medio fresco en función de las necesidades del cultivo.

6.2. Diferenciación a neurona dopaminérgica

Siguiendo un protocolo ya descrito anteriormente,¹⁷ se ha cultivado la línea celular SH-SY5Y en medio DMEM sin glucosa suplementado con piruvato 1 mM, galactosa 5 mM, FBS al 10 % y RA 10 μ M durante 5 días, seguido de 3 días en cultivo con medio similar suplementado con TPA 180 nM en lugar de RA. Al igual que en el caso anterior se adicionó TBTC a concentraciones finales de 0, 25 y 50 nM, las cuales se mantuvieron durante todo el protocolo. De forma paralela se mantuvieron los correspondientes cultivos control, a misma concentración de TBTC, sin adición de RA ni TPA.

Se sembraron $2'0 \times 10^4$ células totales por pocillo en placas de 6 pocillos (TPP). La siembra se realizó con medio DMEM 4'5 g/l glucosa y 10 % FBS, el cual se mantuvo durante 24 h. Tras el comienzo del protocolo se cambiaron los medios correspondientes a las diferentes condiciones cada 2-3 días, adicionando 2-3 ml del correspondiente medio fresco.

7. Detección de proteínas por citometría de flujo

Tras el tratamiento de diferenciación se recogieron las células previamente tripsinizadas, se centrifugaron a 14.000 x g durante 5 min y se lavaron con PBS. Los pellets se fijaron con 200 μ l

de paraformaldehído al 4 % a 4 °C hasta su utilización. Después se lavaron con PBS y centrifugaron a 10⁴ rpm durante 5 minutos en una centrifuga Eppendorf MiniSpin® plus.

El pellet se dividió en fracciones equivalentes en las diferentes muestras. Se resuspendió cada fracción en 100 µl de solución permeabilizadora con el anticuerpo primario diluido (*Tabla IV.2*). Se incubaron *overnight* a 4 °C. Se lavó con PBS y se centrifugó a 10⁴ rpm durante 5 minutos. Se resuspendió con el anticuerpo secundario y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, protegidos de la luz. Se lavó con PBS y se centrifugó a 10⁴ rpm durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendió en 200 µl de PBS y se analizó por citometría de flujo.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
Beta III tubulina (TUBB3)	Conejo (policlonal)	1/1000	Sigma
Alexa fluor® 488 anti-Rabbit IgG	Cabra (policlonal)	1/1000	Life technologies

Tabla IV.2 – Listado de anticuerpos empleados en el marcaje para citometría de flujo.

Las muestras se analizaron por triplicado en el citómetro de flujo FACSAria BD en el canal FL1 con el software FACSDiva. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Weasel.

8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se han analizado estadísticamente con el software StatView 5. Se han obtenido medias, desviaciones estándar y se han estudiado estadísticamente mediante prueba t de Student desapareada en aquellos datos en los que era posible. Se considera que tienen significancia estadística cuando *p*-valor < 0'05.

Los análisis se han representado con el software GraphPad Prism 5.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis del consumo celular de oxígeno de la línea SH-SY5Y en presencia de TBTC

A fin de estudiar el efecto de la exposición a TBTC sobre el sistema de fosforilación oxidativa se ha realizado una respirometría en células cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de TBTC. El principio de la respirometría señala que una muestra celular que consume el oxígeno presente en una cámara cerrada hará disminuir la concentración del mismo, y si se representa esta disminución frente al tiempo, se puede obtener la velocidad de consumo de oxígeno.¹⁸ El análisis de la cinética del consumo de oxígeno se emplea como herramienta en el estudio de estados celulares fisio- y patológicos, siendo un indicativo del estado de la función mitocondrial.

Las células empleadas en este ensayo proceden de la línea celular SH-SY5Y de origen tumoral. Tal y como apuntó O. Warburg, las células cancerosas muestran actividad glicolítica aumentada y fosforilación oxidativa disminuida incluso en presencia de oxígeno, lo que se conoce como efecto Warburg.¹⁹ Este hecho resulta en una mayor resistencia a xenobióticos que afectan negativamente a la función mitocondrial.²⁰ El estudio de los efectos de xenobióticos de este tipo, como es el caso del TBTC, requiere forzar la dependencia de la línea celular empleada en la fosforilación oxidativa mitocondrial lo que puede conseguirse sustituyendo la glucosa del medio de cultivo por galactosa.²⁰ En estas condiciones aumenta el consumo de oxígeno y la susceptibilidad a tóxicos mitocondriales.

Por consiguiente, el cultivo celular se ha realizado en medios libres de glucosa suplementados con galactosa. Asimismo se ha suplementado el medio de cultivo con RA en las concentraciones a emplear en los ensayos de diferenciación neuronal posteriores, manteniendo el correspondiente control sin dicha suplementación, a fin de comprobar si se dan cambios en la respuesta celular al TBTC.

La adición secuencial de concentraciones crecientes de TBTC resulta en la disminución del consumo de oxígeno en las células analizadas (*Figura V.1*). La disminución es estadísticamente significativa en las células no tratadas con RA a concentraciones de TBTC igual o mayor a 50 nM, mientras que en las células tratadas lo es para todas las concentraciones de TBTC analizadas.

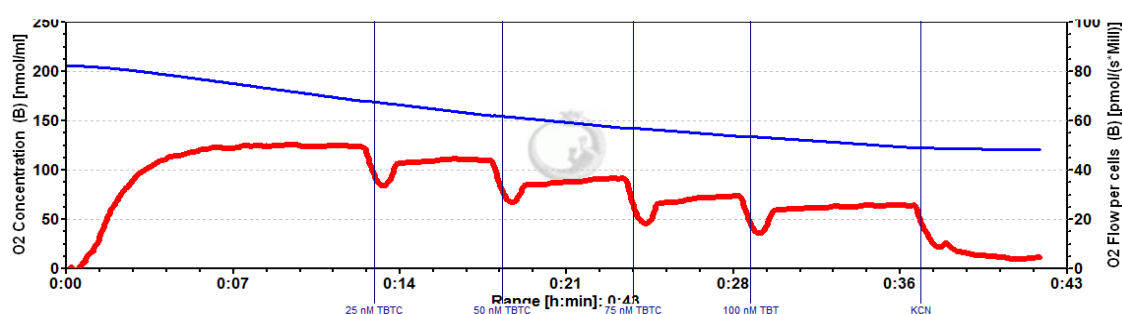


Figura V.1 – Consumo de oxígeno de células SH-SY5Y. Gráfica de consumo de oxígeno en células utilizando un oxígrafo de alta resolución Oroboros® Oxygraph-2k. Línea azul: concentración de oxígeno. Línea roja: flujo de oxígeno en la cámara.

Se observa que los valores de consumo de oxígeno tienden a ser mayores para las células tratadas con RA (*Figura V.2A*), si bien las diferencias no son estadísticamente significativas. Durante la diferenciación celular se da una transición de la producción de energía de la glicolisis al OXPHOS,⁸ que en neuronas está asociada a un incremento de la respiración celular basal.⁹ Por tanto, parece lógico suponer que la tendencia a tener mayor respiración en células tratadas se debe a que dicho tratamiento está induciendo la diferenciación neuronal, a pesar de no

corresponder al tratamiento completo. Al no tratarse del tratamiento completo la transición metabólica puede no haberse completado y que por ello las diferencias entre células sin tratamiento y con él no resulten significativas.

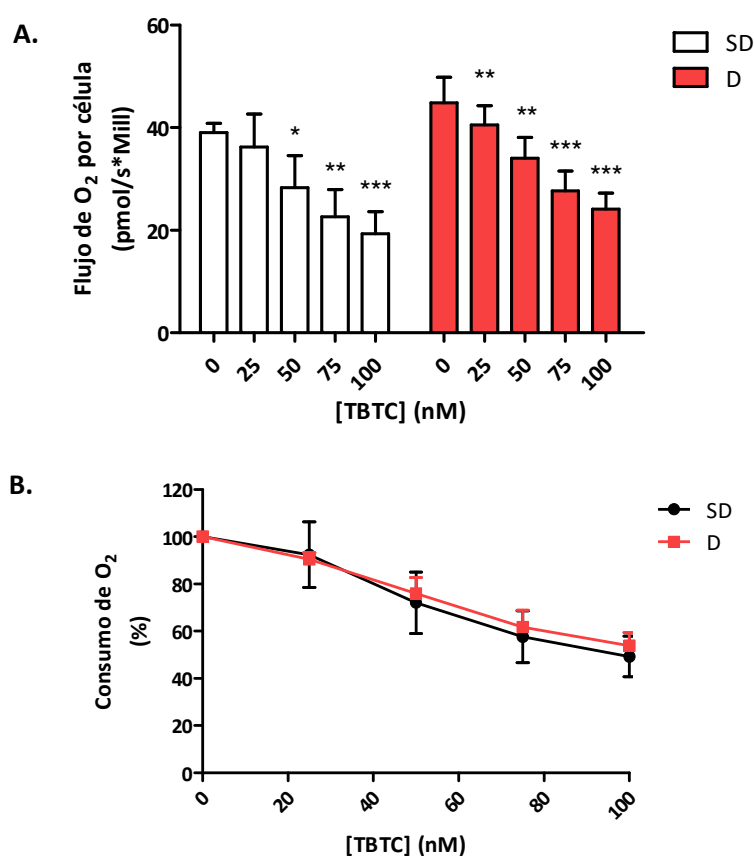


Figura V.2 – Análisis consumo de oxígeno en SH-SY5Y en presencia de TBTC. A) Histograma del consumo de oxígeno de células SH-SY5Y a diferentes concentraciones de TBTC. B) Representación de la disminución del consumo de oxígeno porcentual respecto de las células en ausencia de TBTC. D: células en tratamiento de diferenciación. SD: células sin tratamiento. p-valor <0'05 (*), <0'01 (**), <0'001 (***) respecto al valor a 0 nM de TBTC.

La reducción porcentual en el consumo de oxígeno es dosis-dependiente: el consumo de oxígeno es menor cuanto mayor es la concentración de TBTC a la que se expone a las células (Figura V.2B). Para el caso de las células tratadas con RA, la regresión lineal de los datos da lugar a una expresión del tipo: $y = -0'4839 \cdot x + 100'58$ con un $R^2 = 0'99$; donde “y” es la reducción en el consumo de oxígeno y “x” la concentración de TBTC. Para las células sin tratar la ecuación es similar ($y = -0'5452 \cdot x + 101'52$; $R^2 = 0'9781$) por lo que la relación entre el cambio en el consumo y la concentración de xenobiótico parece ser independiente del estado de diferenciación de la línea celular

El efecto inhibitor de la respiración del TBTC concuerda con que haya sido previamente descrito como inhibidor del sistema OXPPOS.¹¹

2. Efecto de diferentes concentraciones de TBTC sobre la viabilidad celular

Antes de realizar el estudio del efecto del TBTC sobre la diferenciación neuronal es necesario comprobar que las concentraciones que van a emplearse de este xenobiótico no impidan la finalización de los protocolos de diferenciación proyectados. Para ello se ha realizado una curva

de viabilidad a lo largo de 14 días (336 horas) a diferentes concentraciones de TBTC en condiciones similares a las que se van a emplear en la diferenciación.

El conteo celular a lo largo de estos 14 días de cultivos de SH-SY5Y sugiere que concentraciones crecientes de TBTC reducen la capacidad proliferativa y/o supervivencia celular (*Figura V.3*). Cuando la concentración de xenobiótico es 100 nM el número de células en los primeros días es muy reducido (*Figura V.4D*), habiéndose de discontinuar el cultivo a partir del cuarto día. En el resto de concentraciones de TBTC empleadas (0, 25 y 50 nM) es posible la compleción de la curva de viabilidad (*Figura V.4*), por lo que podrían emplearse éstas para los ensayos de diferenciación.

No es posible determinar de acuerdo a los datos obtenidos si el impacto negativo sobre la viabilidad de los cultivos se debe a la inhibición del sistema OXPHOS o a otros efectos que pueda tener el compuesto. Aun con todo, esta toxicidad celular apunta que podría tener consecuencias deletéreas en el sistema nervioso similares a la depleción neuronal que se da en la AD.

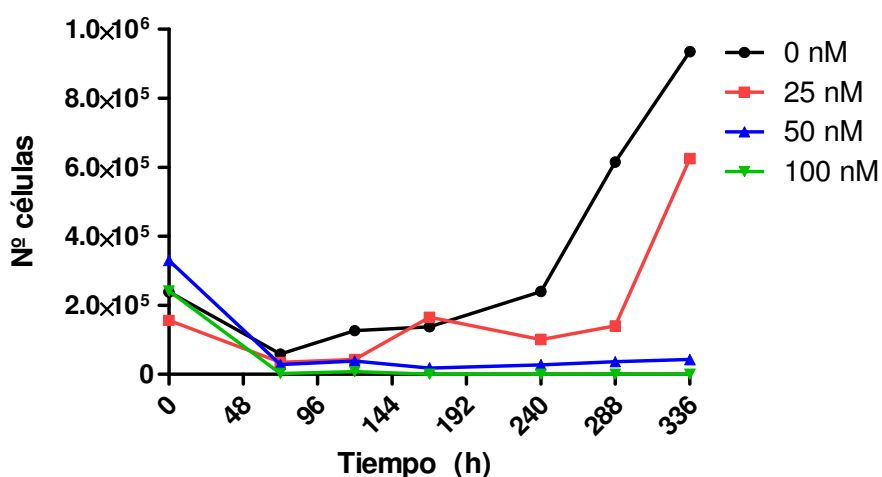


Figura V.3 – Curva de viabilidad de SH-SY5Y en presencia de TBTC. Representación de la cantidad de células SH-SY5Y en cultivo en presencia de TBTC a concentraciones de 0, 25, 50 y 100 nM a diferentes tiempos (en horas).

Se puede calcular el tiempo de duplicación para las diferentes concentraciones de TBTC dadas. Para ello se ha considerado la fase exponencial del crecimiento, sin considerar valores discordantes con la tendencia. En el caso de una concentración de TBTC 0 nM se obtiene 67'2 h ($R^2 = 0'98$), para 25 nM son 64'8 h ($R^2 = 0'93$) y para 50 nM son 561'6 h ($R^2 = 0'17$). Estos valores discrepan enormemente con el tiempo habitual de doblaje descrito en la literatura de 41'3 h.¹⁷

Las discrepancias en los tiempos de doblaje, así como la brusca bajada en el número de células que se aprecia en los 3 primeros días de cultivo, sugieren que las células sembradas no se han adherido bien. Además, al partir de bajo número de células se ha de considerar que los resultados son poco fiables.

Aun con todo, se ha decidido prescindir de la concentración 100 nM de TBTC y emplear aquellas en las que sí podría finalizarse los protocolos de diferenciación de acuerdo a nuestros datos. Así pues se han establecido 0, 25 y 50 nM de TBTC como las concentraciones a emplear en los experimentos subsiguientes. Estas concentraciones se encuentran en el rango de aquellas descritas en muestras de sangre en humanos. La mayor concentración de tributilestaño

registrada en muestras sanguíneas es 85 ng/ml (equivalente a 260 nM aproximadamente),¹² por lo que se trabaja en un rango al que muchas personas pueden estar expuestas.

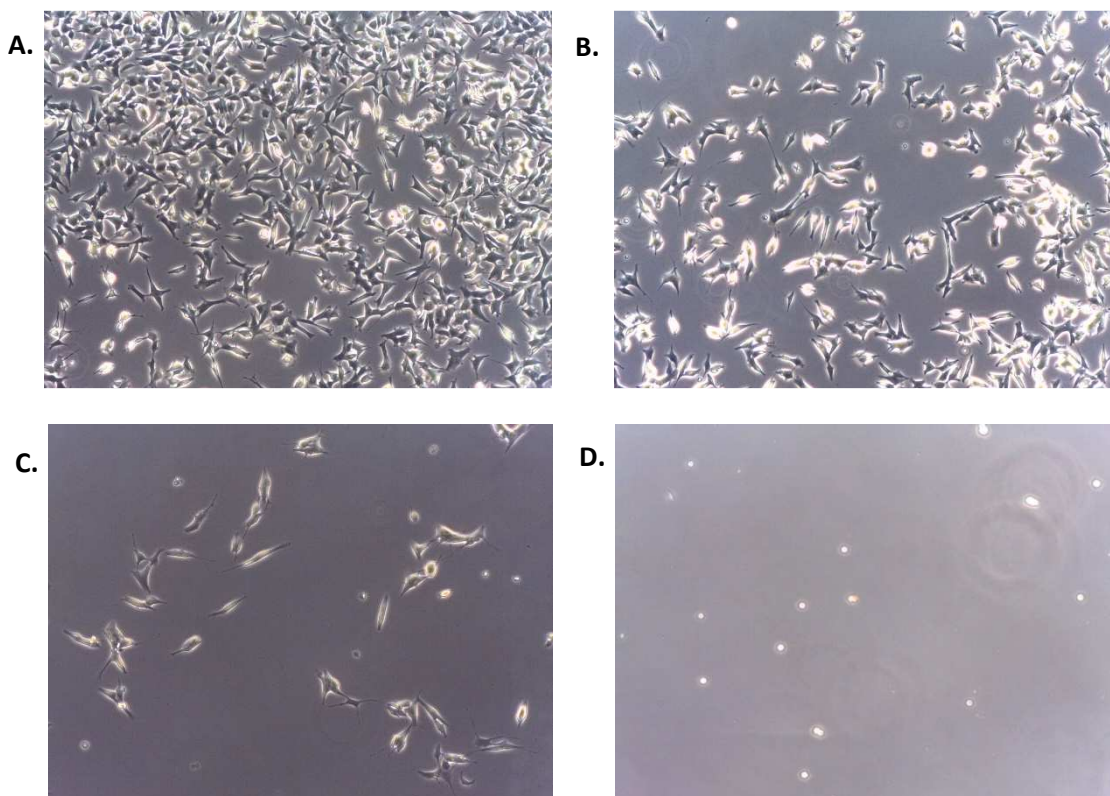


Figura V.4 - Viabilidad de SH-SY5Y en presencia de TBTC. Imágenes de microscopía (microscopio invertido, objetivo 10x) de cultivos de la línea celular SH-SY5Y en concentraciones de TBTC A) 0, B) 25, C) 50 y D) 100 nM. Todas son a 366 h, salvo D, a 96 h.

3. Diferenciación neuronal

3.1 Diferenciación neuronal colinérgica en células SH-SY5Y

Tras la culminación del protocolo de diferenciación a neurona colinérgica puede apreciarse que el fenotipo morfológico neuronal se ha acentuado en aquellos cultivos tratados con RA y BDNF (Figura V.5). Este fenotipo se evidencia en la producción y extensión de neuritas; considerando neurita cualquier expansión del soma de una neurona, ya sea dendrita o axón.

En el control no tratado con el xenobiótico es posible ver células no diferenciadas que presentan morfología aplanada y adherencia al sustrato, que también están presentes en el resto de cultivos en mayor o menor medida. Se ha descrito que la línea parental SK-N-SH, de la que deriva SH-SY5Y, comprende dos fenotipos morfológicamente diferenciados: neuroblástico (tipo-N) y adherentes (tipo-S), que pueden experimentar transdiferenciación.¹⁶ En diversos artículos se relata la aparición de estas células tras tiempos prolongados de cultivo en presencia de RA,¹⁶ por lo que parece lógico suponer que las células adherentes aquí mostradas corresponden a este tipo celular. Aunque estas células están presentes también en los cultivos no sometidos a diferenciación, la proporción aumenta en los tratados, posiblemente debido a la atenuación de la proliferación de las células tipo-N cuando se están diferenciando.

Al comparar los cultivos tratados con TBTC puede apreciarse menor cantidad de células presentes a mayores cantidades de xenobiótico, lo que concuerda con las conclusiones extraídas

de la curva de viabilidad realizada previamente. En cuanto al efecto de TBTC sobre la diferenciación es difícil realizar comparaciones a simple vista debido a las diferencias en la cantidad de neuronas.

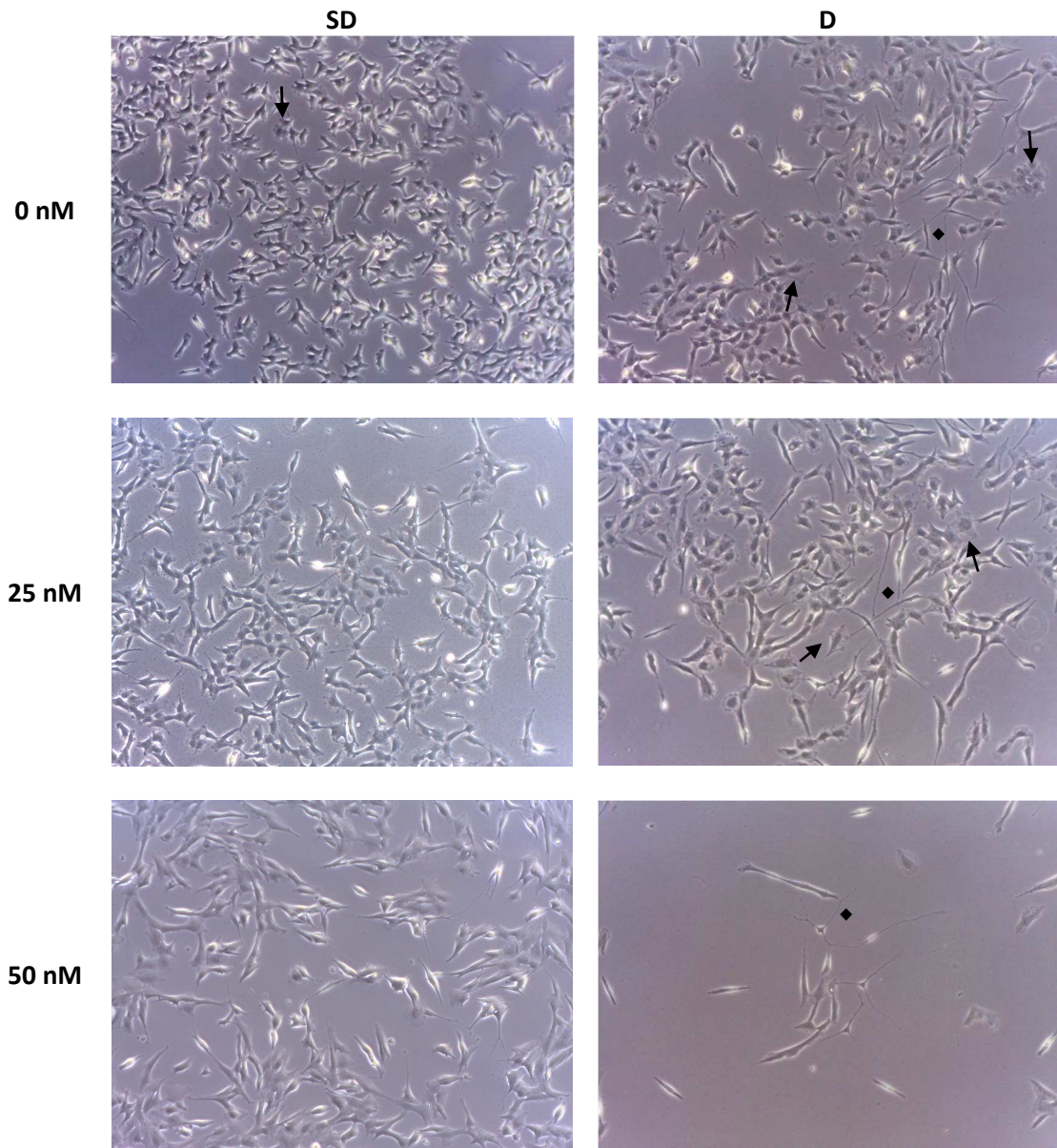


Figura V.5 – Diferenciación colinérgica en presencia de TBTC. Imágenes de microscopía (microscopio invertido, objetivo 10x) de cultivos de la línea celular SH-SY5Y (336 h) sometidas a protocolo de diferenciación RA+BDNF (D) y sin tratar (SD). Las concentraciones se refieren a la concentración de TBTC mantenida durante el protocolo. ↑: células tipo-S, ◆: neuritas

3.2 Diferenciación neuronal dopaminérgica en células SH-SY5Y

El protocolo de diferenciación a neurona dopaminérgica empleado, basado en el tratamiento con RA y TPA, resulta en la adquisición de morfología neuronal, con la producción y extensión de neuritas de forma destacable (Figura V.6). La aparición de estas prolongaciones somáticas resulta en la elongación del soma con respecto a las células sin tratar.

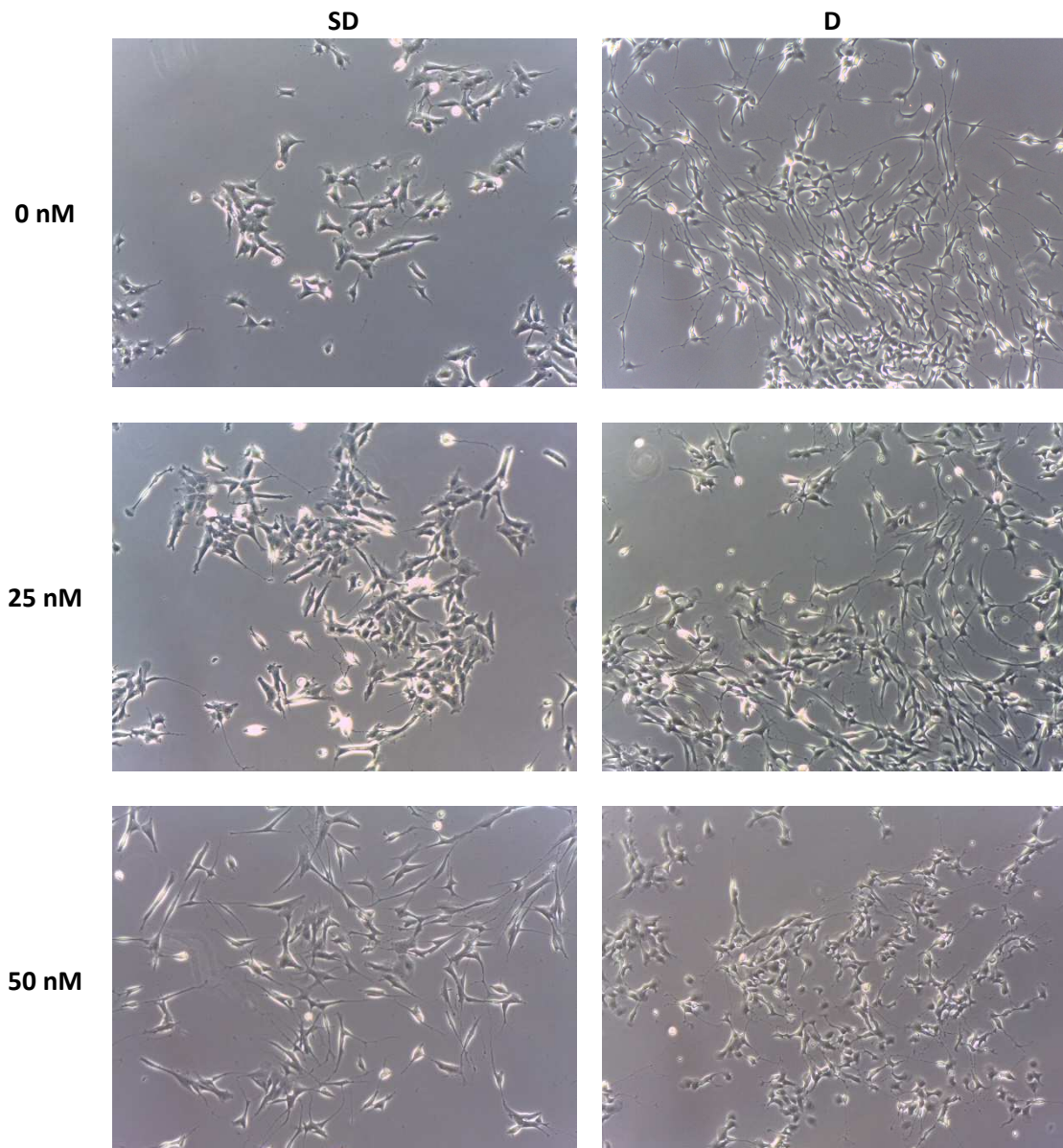


Figura V.6 – Diferenciación dopaminérgica en presencia de TBTC. Imágenes de microscopía (microscopio invertido, objetivo 10x) de cultivos de la línea celular SH-SY5Y (120 h) sometidas a protocolo de diferenciación RA+TPA (D) y sin dicho tratamiento (SD). Las concentraciones se refieren a la concentración de TBTC mantenida durante el protocolo.

Se observa que en los cultivos no tratados con RA y TPA también se da cierto fenotipo neuronal, siendo este aparentemente mayor cuanto mayor es la concentración de TBTC. Esto sugiere que el TBTC podría estar afectando a la morfología en estos casos.

Se han descrito diversas dianas celulares para el TBT.¹⁰ Una de ellas es el receptor X retinoico (RXR), un tipo de receptor nuclear que reconoce a la forma cis del ácido retinoico, para el cual el tributilestaño es un agonista.¹⁰ El RA ejerce su efecto al unirse al receptor de ácido retinoico (RAR), el cual heterodimeriza con RXR; este heterodímero se une a elementos de respuesta a RA resultando en la activación transcripcional de genes implicados en la diferenciación,¹⁴ tales como el receptor tropomiosina quinasa B, que es sobre el que luego actúa BDNF.¹⁵ La unión de TBTC a RXR podría estar relacionada con que ciertas concentraciones resulten en un fenotipo neuronal, aunque no den lugar a diferenciación como tal.

Por su parte, en los cultivos tratados con RA y TPA se aprecia que las células cultivadas en presencia de TBTC presentan menor cantidad de neuritas en conjunto. Además las cultivadas en 50 nM de este xenobiótico tienen somas de apariencia menos elongada, así como neuritas finas con protuberancias a lo largo de las mismas. Esto podría sugerir que el TBTC está afectando a la diferenciación, al menos, a nivel de la producción de neuritas.

4. Análisis de la diferenciación neuronal por citometría de flujo

Los cambios morfológicos mostrados no constituyen por sí solos un indicador de la diferenciación hacia un fenotipo neuronal. Por ello es necesario emplear un marcador neuronal como indicativo de la diferenciación, para lo cual se emplea la β -III-tubulina (TUBB3). TUBB3 es un marcador que se ve aumentado en todas las células con diferenciación neuronal y se emplea como marcador de diferenciación.¹⁵

El análisis de los niveles de TUBB3 se ha realizado por citometría de flujo (*Figura V.7*). Los valores obtenidos muestran que tanto en el protocolo de diferenciación a neurona colinérgica como a neurona dopaminérgica se ha dado diferenciación neuronal en ausencia de TBTC de forma estadísticamente significativa. Aun con todo no se podría establecer a partir de los datos disponibles si las diferenciaciones han sido específicas del tipo neuronal que se pretendía; para ello sería necesario recurrir a marcadores específicos de cada tipo neuronal.

En cuanto al efecto del TBTC sobre la diferenciación, en el caso de la diferenciación colinérgica no hay significancia estadística entre la diferencia de los valores de TUBB3 con respecto a los respectivos controles, con lo que se considera que no ha habido diferenciación. En el caso de la diferenciación dopaminérgica, se aprecia que a 25 nM se da diferenciación de acuerdo a la estadística. En este mismo caso, a 50 nM de TBTC se ve una reducción elevada de la diferenciación. Esto concuerda con las observaciones realizadas por microscopía.

Se ha de puntualizar que aquellas diferenciaciones a neurona dopaminérgica que son estadísticamente significativas tienen un aumento en la expresión de TUBB3 no muy elevada y el registro de fluorescencia solapa en gran parte con el del control. Convendría repetir la diferenciación a fin de comprobar la reproducibilidad de estos resultados y si realmente son significativos a nivel biológico.

Puesto que en la diferenciación dopaminérgica son necesarias concentraciones mayores de TBTC para inhibir la diferenciación que en el caso colinérgico, esto podría sugerir que estas últimas son más sensibles al efecto de este xenobiótico. En pacientes con AD se observa depleción acusada de neuronas colinérgicas,³ con lo que una mayor sensibilidad podría explicar esta mayor afectación *in vivo*.

El hecho de que el TBTC afecte a la diferenciación neuronal negativamente podría ser indicativo de su potencial para inhibir la neurogénesis adulta, que parece asociarse con la pérdida neuronal propia de la AD.⁵ Esto podría dar lugar a estudios posteriores sobre el mecanismo molecular subyacente a este impedimento y para comprobar si el efecto es equiparable al descrito en AD.

Sin embargo, no se puede establecer que la inhibición del sistema OXPHOS sea la única causa de que el TBTC resulte en un impedimento para la diferenciación. Ciertamente es que el sistema OXPHOS tiene especial relevancia en la diferenciación neuronal,^{1,8,9} pero el TBTC podría actuar sobre otras dianas que resulten en alteraciones en la diferenciación.

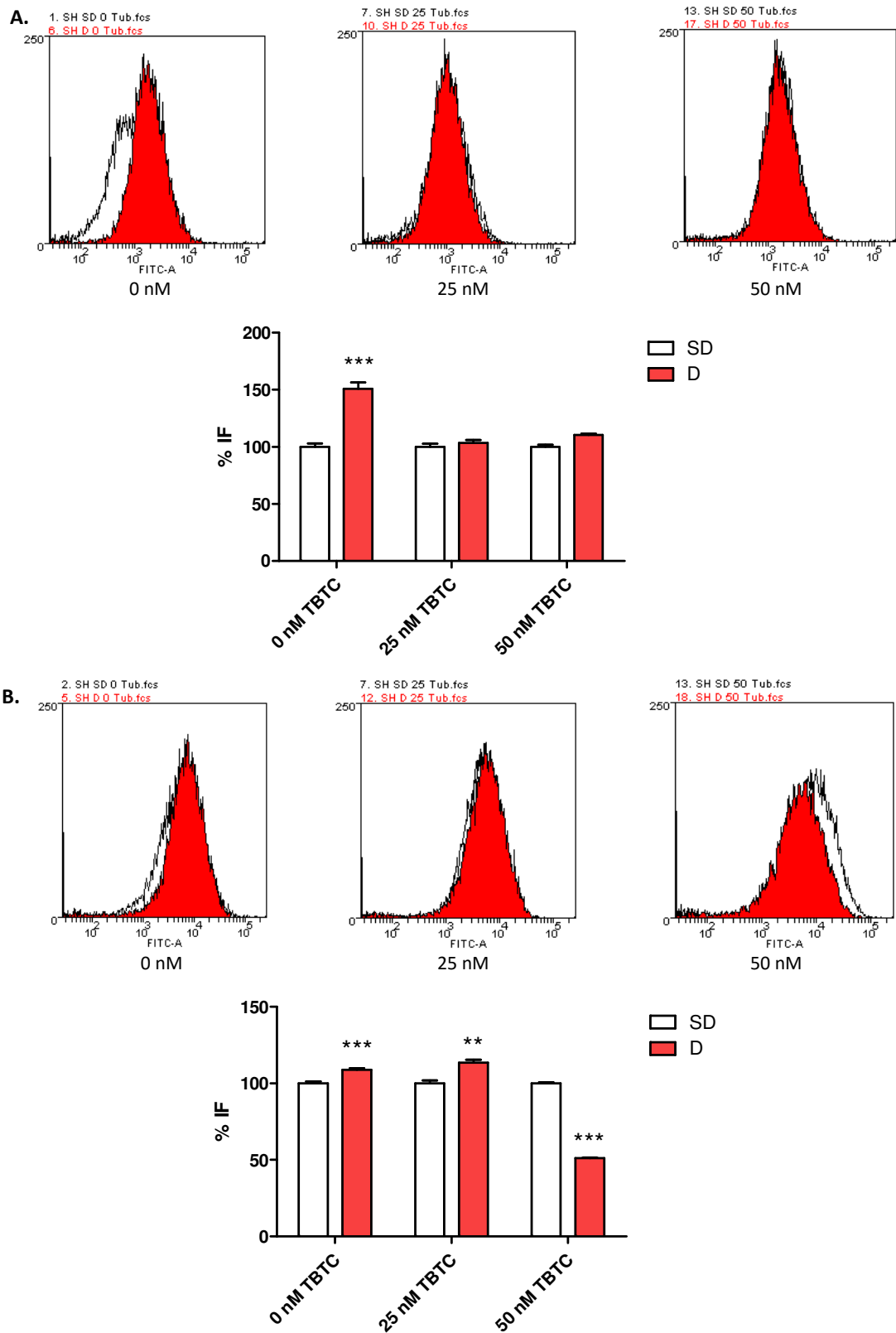


Figura V.7 – Niveles de β -III-tubulina tras diferenciación de SH-SY5Y. Expresión de β -III-tubulina (% IF) en células sin tratamiento de diferenciación (SD) y en células tratadas (D). Dichos tratamientos son: A) a neurona colinérgica y B) a neurona dopaminérgica. p -valor $<0'05$ (*), $<0'01$ (**), $<0'001$ (***) con respecto al correspondiente control (SD).

VI. CONCLUSIONES

1. Conforme se añade TBTC disminuye el consumo de oxígeno, indicativo de la disminución en la respiración mitocondrial, en la línea celular SH-SY5Y de forma dosis-dependiente.
2. La adición de TBTC afecta por igual a células tratadas con ácido retinoico y sin tratar, si bien las tratadas tienen una mayor tasa de consumo de oxígeno.
3. Altas concentraciones de TBTC parecen afectar negativamente a la supervivencia celular de la línea SH-SY5Y en cultivo *in vitro*.
4. Los protocolos de diferenciación neuronal empleados dan lugar a un fenotipo morfológico neuronal que corresponde con un aumento del marcador TUBB3.
5. La presencia de concentraciones de 25 nM o mayores de TBTC durante el proceso de diferenciación a neurona colinérgica impide la diferenciación neuronal.
6. La presencia de concentraciones de 50 nM de TBTC durante el proceso de diferenciación a neurona dopaminérgica impide la diferenciación neuronal y resulta en disminución de los valores de TUBB3 respecto a células no tratadas con agentes inductores de la diferenciación.

VI. CONCLUSIONS

1. Oxygen consumption decreases, indicating a lessened mitochondrial respiration, as TBTC is added to cell line SH-SY5Y in a dose-dependent manner.
2. TBTC addition affects both retinoic acid-treated cells and untreated cells in a similar fashion, in spite of treated cells showing higher oxygen consumption.
3. High TBTC concentrations seem to negatively affect cellular survival of cell line SH-SY5Y *in vitro*.
4. Neural differentiation followed yield a neural morphological phenotype which corresponds with an increase in TUBB3 levels.
5. Exposure to ≥ 25 nM TBTC during cholinergic differentiation hampers neural differentiation.
6. Exposure to 50 nM TBTC during dopaminergic differentiation hampers neural differentiation and results in lessened TUBB3 levels compared to cells not treated with differentiation inductor agents.

VII. REFERENCIAS

1. Pesini A, Iglesias E, Garrido N, Bayona-Bafaluy MP, Montoya J, Ruiz-Pesini E. OXPPOS, Pyrimidine Nucleotides, and Alzheimer's Disease: A Pharmacogenomics Approach. *J Alzheimer's Dis.* 2014;42(1):87-96.
2. Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2015;11(3):332-384.
3. López-Pousa S, López A, Coria F, et al. La enfermedad de Alzheimer. In: Alberca R, López-Pousa S, eds. *Enfermedad de Alzheimer Y Otras Demencias*. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana; 2002:147-325.
4. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(8):1219-1231.
5. Lazarov O, Marr RA. Neurogenesis and Alzheimer's disease: At the crossroads. *Exp Neurol.* 2010;223(2):267-281.
6. Sun P, Hua Q, Schmitt AG. Energy Metabolism, Adult Neurogenesis and their Possible Roles in Alzheimer's Disease: A Brief Overview. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(5):493-502.
7. Koopman WJH, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. OXPPOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J.* 2012;32(1):9-29.
8. Martínez-Romero Í, Emperador S, Llobet L, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitogenomics: Recognizing the Significance of Mitochondrial Genomic Variation for Personalized Medicine. *Curr Pharmacogenomics Person Med.* 2011;9:84-93.
9. Agostini M, Romeo F, Inoue S, et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* April 2016:1-13 (in press).
10. Kotake Y. Molecular Mechanisms of Environmental Organotin Toxicity in Mammals. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(11):1876-1880.
11. López-Gallardo E, Llobet L, Emperador S, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Effects of Tributyltin Chloride on Cybrids with or without an ATP Synthase Pathologic Mutation. *Environ Health Perspect.* April 2016:1-33 (in press).
12. Sousa AC a, Pastorinho MR, Takahashi S, Tanabe S. History on organotin compounds, from snails to humans. *Environ Chem Lett.* 2014;12(1):117-137.
13. Li X, Bao X, Wang R. Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening. *Int J Mol Med.* December 2015: (in press).
14. Xie H, Hu L, Li G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(8):1086-1092.
15. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1069-1082.
16. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, et al. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *J Neurochem.* 2002;75(3):991-1003.

17. Iglesias E. *Disfunción del sistema de fosforilación oxidativa en la enfermedad de parkinson: desarrollo de un modelo celular*. Universidad de Zaragoza. 2014.
18. Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Méndez G, Eberl T, Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr*. 1995;27(6):583-596.
19. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2011;1807(6):568-576.
20. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. Circumventing the Crabtree effect: Replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci*. 2007;97(2):539-547.