



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO  
GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**Estudio del mecanismo de acción de la proteína  
neuroprotectora ApoD en modelos experimentales de  
enfermedades neurodegenerativas.**

*Study of the mechanism of action of the neuroprotective protein  
ApoD in experimental models of neurodegenerative diseases.*

Autora:

**D<sup>a</sup>. Irene Arias Girotti**

Tutores:

**D. Diego Sánchez Romero y D<sup>a</sup>. Beatriz Durán Alonso**

---

**TÍTULO:** Estudio del mecanismo de acción de la proteína neuroprotectora ApoD en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas.

**AUTORA:** D<sup>a</sup>. Irene Arias Girotti

**TUTORES:** D. Diego Sánchez Romero y D<sup>a</sup>. Beatriz Durán Alonso

**DEPARTAMENTO:** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

---

**TRIBUNAL**

---

**PRESIDENTE:** D<sup>a</sup>. Marita Hernández García (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

**SECRETARIO:** D<sup>a</sup>. Pilar Ciudad Velasco (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

**VOCAL:** D<sup>a</sup>. Irene Cózar Castellano (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

**SUPLENTE 1:** D<sup>a</sup>. Teresa Pérez García (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

**SUPLENTE 2:** D. José Ramón López López (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

---

---

**FECHA:**

**CALIFICACIÓN:**

---

## RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas son un problema de gran impacto social y económico, de difícil diagnóstico y tratamiento. Por ello es crucial la búsqueda y estudio de sus mecanismos moleculares. La relación entre el estrés oxidativo y las células del SNC está bien establecida como motivo de degeneración, por lo que este proyecto se ha enfocado en el estudio de la proteína ApoD, que tiene un significativo poder antioxidante, especialmente en las membranas celulares. Se ha propuesto el uso de una sonda fluorescente que reaccione frente a la peroxidación lipídica de las membranas como consecuencia del estrés oxidativo (BODIPY-C11) para comprobar la actividad de ApoD en la línea celular HeLa. Para tomar las medidas se ha utilizado un equipo que combina técnicas de microscopía automatizada y detección convencional en microplaca: el Cytation5. El estrés oxidativo se evaluó mediante dos métodos: inmunocitoquímica con anticuerpo anti-4-HNE y medida de fluorescencia con BODIPY-C11. Los resultados probaron que, por lo general, BODIPY-C11 es una técnica más eficaz que la inmunocitoquímica. Se comprueba la gran utilidad de BODIPY-C11 para medir el estado de las membranas celulares bajo estrés oxidativo. Sin embargo, con los experimentos realizados, no se obtiene la suficiente evidencia como para realizar afirmaciones sobre la utilidad de BODIPY-C11 para la determinar la acción de ApoD, aunque los resultados preliminares obtenidos son prometedores para el futuro desarrollo de esta línea de investigación.

### Palabras clave

Enfermedades neurodegenerativas, peroxidación lipídica, estrés oxidativo, ApoD, BODIPY-C11, HeLa.

---

### ABSTRACT

*Neurodegenerative diseases are a problem with great social and economic impact, difficult to diagnose and treat. For this reason, the search and study of their molecular mechanisms are crucial. The relationship between oxidative stress and CNS cells is well established as a reason for degeneration, so this project has focused on the study of the ApoD protein, which has significant antioxidant power, especially in cell membranes. The use of a fluorescent probe that reacts against lipid peroxidation of membranes as a consequence of oxidative stress (BODIPY-C11) has been proposed to validate ApoD activity in the HeLa cell line. To take the measurements, equipment that combines automated microscopy techniques and conventional microplate detection has been used: the Cytation5. Oxidative stress was evaluated by two methods: immunocytochemistry with anti-4-HNE antibody and fluorescence measurements with BODIPY-C11. The results proved that the measurement of Bodily fluorescence using the Cytation5 system is a more reliable method measure for lipid peroxidation than immunocytochemistry. The great utility of BODIPY-C11 to measure the state of cell membranes under oxidative stress is validated. However, with the experiments carried out, not enough evidence is obtained to make statements about the utility of BODIPY-C11 to determine the action of ApoD, although the preliminary results obtained are promising for the future development of this line of research.*

### Keywords

*Neurodegenerative diseases, lipidic peroxidation, oxidative stress, ApoD, BODIPY-C11, HeLa.*

## AGRADECIMIENTOS

Es con gran ilusión que dedico este espacio a reconocer y agradecer a todas las personas que han sido una parte integral para que pudiera realizar este proyecto.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis tutores, Diego y Bea, por su guía experta, apoyo y dedicación en cada etapa del trabajo; su paciencia y compromiso han sido fundamentales para aprender y crecer en un ámbito que desconocía. Además, extender mi agradecimiento a Lola, que no dejó de preguntarme con entusiasmo todos los días qué tal salían las cosas y me proporcionó valiosísimos consejos. Jorge y Andrea, muchísimas gracias por ser además de compañeros excelentes, nuevos amigos. Trabajar con vosotros ha sido un privilegio y una experiencia muy enriquecedora. Gracias por preocuparos tanto por el proyecto como por mí.

A mi querida hermana, *Leli*, que soporta lo bueno, lo malo y lo peor de mí: gracias por estar a mi lado, escucharme, todas las infusiones que me preparas, apoyarme y reírte de mis tonterías (además de compartir las tuyas). A Zaira, David, Laura, Guille y Jorge, gracias por acompañarme siempre, por compartir conmigo los mejores momentos de la carrera (y no solo de la carrera), y por enseñarme siempre cariño incondicional. No podría pedir un círculo mejor.

Por último, pero no menos importante, quiero dedicar un agradecimiento especial a mis padres, Alessandra y Javier, y a mi familia, que, a pesar de todo, siempre quedan detrás de mí para levantarme en mis caídas y se llevan lo peor de estas. Gracias por creer en mí.

# ÍNDICE

Lista de tablas y figuras	7
1. Introducción	8
1.1. Finalidad	8
1.2. Antecedentes	8
1.2.1. Epidemiología e impacto económico de las enfermedades neurodegenerativas	8
1.2.2. Bases biológicas de las enfermedades neurodegenerativas	10
1.3. Estado actual de los conocimientos científico-técnicos	11
1.3.1. Apolipoproteína ApoD	11
1.3.2. Métodos de medida del estrés oxidativo	14
1.3.3. BODIPY-C11	15
1.4. Justificación de la propuesta	18
2. Hipótesis y objetivos	19
2.1. Hipótesis	19
2.2. Objetivo principal	19
2.3. Objetivos específicos del proyecto	19
2.4. Objetivos específicos de formación en el TFG	20
3. Material y métodos	21
3.1. Materiales y reactivos	21
3.2. Métodos	21
3.2.1. Congelación y descongelación de células	21
3.2.2. Mantenimiento y expansión del cultivo celular	22
3.2.3. Fijación de las células	22
3.2.4. Marcaje de núcleos con Hoechst	22
3.2.5. Tratamientos con Paraquat y proteína ApoD	22
3.2.6. Tinción con anticuerpo anti-4-HNE	23
3.2.7. Cuantificación relativa de lípidos peroxidados con BODIPY-C11	23
3.2.8. Procedimientos de medida en el equipo Cytation 5	23
3.2.8.1. Visualización de imágenes	24
3.2.8.2. Contaje de células	24
3.2.8.3. Detección y toma de medida de lípidos peroxidados con BODIPY-C11	24
3.2.9. Análisis de imagen de inmunocitoquímica de 4-HNE en Matlab	25
4. Resultados	25
4.1. Experimento 1: primeras pruebas con el sistema de imagen Cytation5 y células HeLa	25
4.2. Experimento 2: evaluación del estrés oxidativo provocado por el PQ mediante el marcaje inmunocitoquímico de 4-HNE	26
4.3. Experimento 3: titulación de PQ para la inducción del estrés oxidativo	28
4.4. Experimento 4: titulación de BODIPY-C11 en células control y tratadas con PQ	30
4.5. Experimento 5: reajuste de titulación en pruebas con BODIPY-C11	33
4.6. Experimento 6: adición de ApoD a diferentes concentraciones	34
5. Discusión	35
5.1. Análisis y discusión	35
5.2. Limitaciones	37
5.3. Consecución de los objetivos	39

6. Conclusiones	40
Bibliografía	41
Apéndice	45
Glosario de abreviaturas	45
Código	46

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1: Gráfica de la evolución de la esperanza de vida en España desde el 2005 hasta el 2021 (INEbase / Demografía y población /Cifras de población y Censos demográficos /Proyecciones de población / Últimos datos).

Fig. 2: Gráfica de los costes económicos totales (suma de costes directos e indirectos) para una serie de enfermedades neurodegenerativas (Neuroalianza, 2016).

Fig. 3: Representación de la estructura terciaria de la proteína ApoD (Eichinger *et al.*, 2007).

Fig. 4: Esquema de la estructura química del núcleo de BODIPY-C11 (Wafa Mazi, 2019).

Fig. 5: Esquema de la estructura química de la molécula de una sonda BODIPY-C11 (Stockert, 2021).

Tabla 1: Tabla de los materiales y reactivos utilizados durante la realización del proyecto.

Fig. 6: Espectros de excitación y emisión de las señales de BODIPY-C11 en su estado oxidado y no oxidado. Obtenida de su referencia en ThermoFisher.

Fig. 7: Imagen de células teñidas con Hoechst, sobre la que está actuando el algoritmo de reconocimiento de bordes del Cytation5.

Fig. 8: Evaluación de las células mediante inmunocitoquímica por anti-4-HNE a dilución 1:1.000.

Fig. 9: Evaluación de las células controles mediante inmunocitoquímica por anti-4-HNE.

Fig. 10: Imágenes de fluorescencia del anticuerpo anti-4-HNE para el tratamiento de PQ a 48 h.

Fig. 11: Gráfica de la intensidad de verde para las imágenes de fluorescencia de anti-4-HNE tras 48 h de exposición a PQ.

Fig. 12: Imágenes de fluorescencia del anticuerpo anti-4-HNE para el tratamiento de PQ a 24 h.

Fig. 13: Gráficas de los resultados de las tres medidas para los tres instantes de tiempo.

Fig. 14: Gráficas de la comparativa del efecto temporal sobre las tres señales medidas.

Fig. 15: Gráficas de la proporción de BODIPY-C11 oxidado en cada pocillo, a cada uno de los 3 tiempos evaluados.

Fig. 16: Gráficas de la ratio de BODIPY-C11 oxidado para cada concentración de BODIPY-C11.

Fig. 17: Gráficas de los valores de la medida de excímeros para cada concentración de BODIPY-C11.

Fig. 18: Gráficas de las ratios de BODIPY oxidado obtenidas para cada una de las condiciones.

## **1. Introducción**

### **1.1. Finalidad**

Este proyecto busca comprobar los efectos protectores de la proteína apolipoproteína D (ApoD) frente a la peroxidación lipídica de las membranas de las células del sistema nervioso. Se estudia en especial el fenómeno de la peroxidación lipídica, siendo este uno de los mecanismos de degeneración de las células nerviosas implicados en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Para ello se propone una metodología que utiliza la sonda de fluorescencia BODIPY-C11, un fluoróforo que reacciona ante la presencia de productos de peroxidación lipídica oxidándose un enlace doble de su estructura, y, como consecuencia, cambia la longitud de onda en la que emite señal en su nuevo estado oxidado.

Mediante esta propuesta se aprovechan las características del BODIPY-C11 para medir los estados de peroxidación y para observar el efecto antioxidante de la proteína ApoD; se han caracterizado su comportamiento y aplicaciones sobre un modelo celular inmortal de células HeLa. Como resultado final se persigue obtener una nueva forma de comprobar el efecto neuro-protector frente a la peroxidación lipídica de la proteína ApoD y corroborar la evidencia de su función fisiológica.

### **1.2. Antecedentes**

#### **1.2.1. Epidemiología e impacto económico de las enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas están fuertemente asociadas a la edad; de hecho, de entre todos los factores de riesgo de contraer una enfermedad neurodegenerativa, el factor de mayor impacto es la edad (Hou *et al.*, 2019). Se estima que, en España desde los 2000 hasta 2020, la esperanza de vida en hombres y mujeres ha crecido, respectivamente, de 75,9 a 79,6 y de 82,7 a 85,1 años, y que, en 2035, la esperanza de vida al nacimiento alcanzaría los 83,2 años en los hombres y los 87,7 en las mujeres, siguiendo un crecimiento exponencial. Por otro lado, si se mantienen las tendencias demográficas actuales, España crecerá en más de cuatro millones de habitantes en los 15 próximos años, siendo un 26% de ellos población de 65 años y más (INEbase / Demografía y población /Cifras de población y Censos demográficos /Proyecciones de población / Últimos datos) (Figura 1).

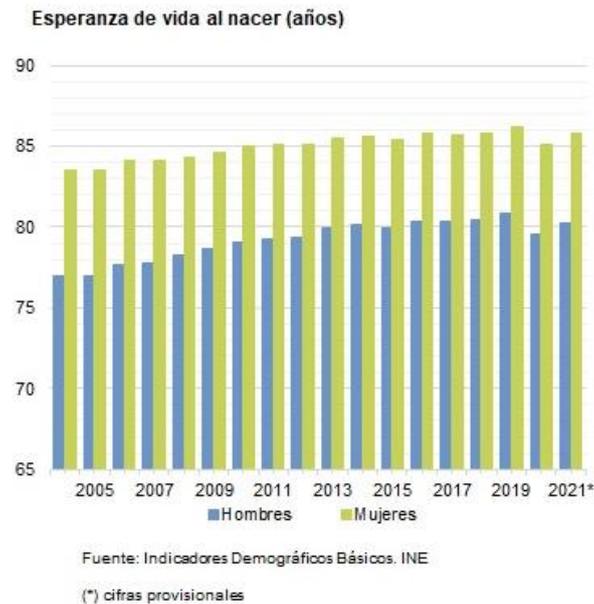


Fig. 1: Gráfica de la evolución de la esperanza de vida en España desde el 2005 hasta el 2021. Se observa el aumento progresivo de la esperanza de vida a lo largo de los años en ambos sexos. Cabe destacar la bajada pronunciada que aparece en el año 2020 como consecuencia de la pandemia del COVID-19. Obtenido de (INEbase / Demografía y población /Cifras de población y Censos demográficos /Proyecciones de población / Últimos datos).

Paralelamente al incremento de la esperanza de vida, en los próximos años se espera un incremento de la incidencia de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades de carácter crónico (de origen hereditario o adquirido), caracterizadas por una disfunción progresiva del Sistema Nervioso Central (SNC) por la pérdida de poblaciones neuronales específicas. Esto genera en el paciente una discapacidad a muchos niveles: física, intelectual y/o social, lo que da lugar a una dependencia clínica y social, y una disminución de la calidad de vida tanto del paciente como de sus cuidadores. [www.sanidad.gob.es](http://www.sanidad.gob.es). 2006

Existe una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas, por su prevalencia y gravedad se pueden destacar: enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Se estima que, en España, hay entre 10-15 casos por 1.000 personas al año de EA, con una prevalencia que se duplica cada 5 años aproximadamente; para la EP, en grupos de edad de los 65 a 79 años se diagnostican 38.235 pacientes. La ELA es la tercera enfermedad más prevalente, con una incidencia universal constante entre 1 y 2 casos por cada 100.000 habitantes por año [www.sanidad.gob.es](http://www.sanidad.gob.es). 2006.

Desde el punto de vista económico, se puede descomponer su efecto en función de los costes directos (aquellos relacionados directamente con las características y necesidades propias de la enfermedad, como son las hospitalizaciones, contratación de cuidadores, tiempos de descanso...) y los indirectos (fruto de las limitaciones generadas en la vida del afectado, esto es la pérdida de productividad laboral, costes de sustitución profesionales o de mortalidad, entre otros). Según el informe de *Neuroalianza* (Universidad Complutense y Neuroalianza, 2016), se obtienen unos costes directos por afectado (calculados a partir de los objetos empleados durante la enfermedad, las acciones y servicios, tratamientos) un total de 13.063€. Por otro lado, los costes indirectos por afectado suman los 7.248€ al año. En términos de coste de oportunidad, el impacto más significativo de estas afecciones es la disminución de oportunidades laborales tanto para el afectado como para los cuidadores principales. Según (Neuroalianza, 2016), teniendo en cuenta

costes directos e indirectos, el coste medio total en 2015 de las enfermedades neurodegenerativas en España fue de 23.354€ por paciente.

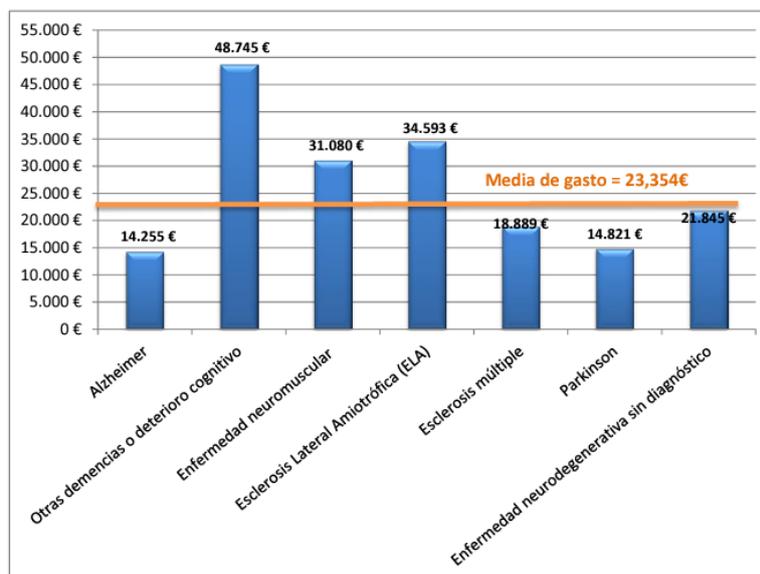


Fig. 2: Gráfica de los costes económicos totales (suma de costes directos e indirectos) para una serie de enfermedades neurodegenerativas. Con respecto a lo mencionado en el párrafo anterior, en esta gráfica se observa que el gasto total medio tiene un valor de 23.354€, siendo la enfermedad de menor gasto el *Alzheimer* y el que más el grupo de *Otras demencias o deterioro cognitivo* (engloba más grupos de enfermedades neurodegenerativas). Obtenida de (Neuroalianza, 2016).

### 1.2.2. Bases biológicas de las enfermedades neurodegenerativas

Los trastornos neurodegenerativos varían con respecto de sus presentaciones clínicas, pero, además, pueden presentar características clínicas superpuestas unos con respecto de otros. Por lo general, se utilizan en la práctica varias modalidades diagnósticas: uso de biomarcadores, técnicas de imagen (resonancia magnética y medicina nuclear, principalmente), pruebas de laboratorio (en su mayoría, análisis de líquido cefalorraquídeo) e, incluso, análisis del perfil genético de cada paciente. Sin embargo, estas técnicas no son las más empleadas en la práctica: los biomarcadores pueden ser inespecíficos e inexactos, las imágenes no son prueba diagnóstica suficiente, las pruebas de laboratorio no siempre son válidas para cualquier etapa de la enfermedad y el análisis de ADN del paciente no es reproducible para todos los pacientes. Para estas enfermedades, la precisión y un diagnóstico precoz son cruciales para poder beneficiarse de los tratamientos que retarden la aparición de posteriores alteraciones, por lo que los diagnósticos se realizan fundamentalmente en base al análisis clínico de los síntomas. Por otro lado, el tratamiento de estas enfermedades es extremadamente complejo, y se enfoca más en la paliación de los síntomas que en la propia enfermedad, aunque, por ejemplo, en el caso de la EP sí se aplican algunos tratamientos farmacológicos en fases iniciales, como es el caso de la levodopa (Erkinen *et al.*, 2018; Hansson, 2021).

Aunque se conocen algunas de las correlaciones de los factores genéticos y ambientales con el padecimiento de la enfermedad, se dispone de un conocimiento extenso acerca de las características histológicas y moleculares de las enfermedades neurodegenerativas (Checkoway *et al.*, 2011). La etiología de estas enfermedades es de origen multifactorial, sin embargo, se está enfocando la problemática en torno a las mitocondrias por su papel en las reacciones de oxidación-reducción (redox) (Lewis and Spillane, 2019).

La mitocondria es un orgánulo presente en células eucariotas, responsable de la realización de procesos esenciales para la vida de la célula: es la responsable de la mayor parte de la reserva energética de ATP (adenosín trifosfato) a través de la fosforilación oxidativa en la respiración celular, regulación del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, señalización de los procesos redox, regulación de la apoptosis y, en la neurona, participa en la formación de las sinapsis en las terminales dendríticas (Geddes and Sullivan, 2009). Una disfunción en alguna de las tareas de la mitocondria puede dar pie a la formación de especies reactivas del oxígeno (durante el proceso de respiración, el aceptor final de electrones es el oxígeno) o del nitrógeno; las especies reactivas (ER) pueden provocar la peroxidación lipídica y la aceleración de la tasa de mutación del ADN mitocondrial, generando un mayor desequilibrio en el funcionamiento de la mitocondria, que degenera en mayor generación de reactivos, entrando en un bucle vicioso (Lewis and Spillane, 2019; Ahmad, Ed. 2012).

Las células disponen naturalmente de antioxidantes que suponen una barrera de protección para la célula, pero si se da un desequilibrio en la generación de especies reactivas, se excede la capacidad de protección de la barrera y se expone la célula al estrés oxidativo. El cerebro es precisamente una diana característica del estrés oxidativo: su alto contenido en lípidos poliinsaturados, alto consumo de  $\text{O}_2$  durante sus procesos metabólicos y elevada actividad mitocondrial, lo convierten en un tejido más propenso. Algunos estudios clínicos y preclínicos señalan niveles más altos de biomarcadores de estrés oxidativo y más bajos de biomarcadores de defensa antioxidante del cerebro afectado por enfermedades degenerativas. Estos reactivos reaccionan con algunas moléculas celulares, como los lípidos de las membranas celulares, induciendo la peroxidación lipídica que conduce a la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados, que, a su vez, dan lugar a la formación de aldehídos reactivos como son el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Son estos aldehídos los que alteran la estructura (y, por tanto, la funcionalidad) de moléculas esenciales para el correcto funcionamiento de la célula, como son el ADN, lípidos o algunas proteínas (Dugger and Dickson, 2017; Niedzielska *et al.*, 2015).

### **1.3. Estado actual de los conocimientos científico-técnicos**

#### **1.3.1. Apolipoproteína ApoD**

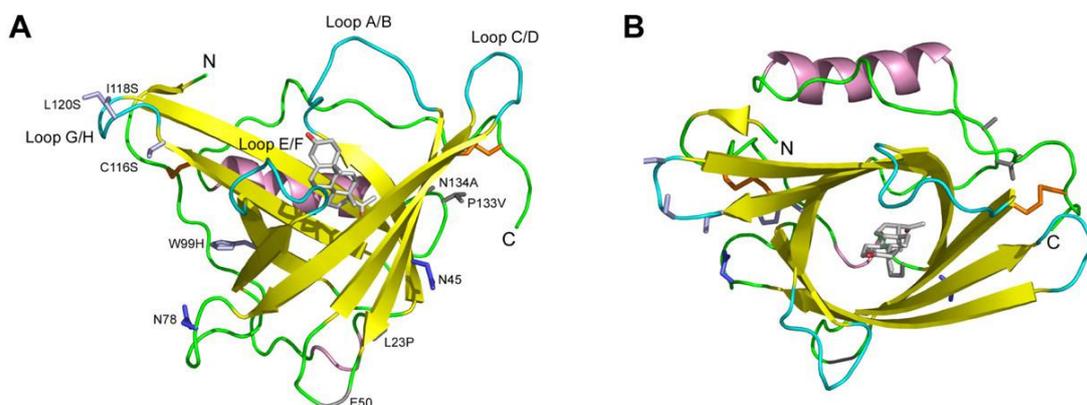
La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína de 29 kDa, que fue detectada por primera vez por Ayrault-Jarrier, Levy y Polonovski en 1963 como un componente distinto entre las lipoproteínas plasmáticas en el ser humano (Ayrault Jarrier *et al.*, 1963), y caracterizada parcialmente en 1973 por McConathy y Alaupovic (McConathy and Alaupovic, 1976). A nivel estructural, sin embargo, se relaciona con las lipocalinas, una familia de proteínas extracelulares de gran diversidad estructural y funcional, cuya característica fundamental es de unión y transporte de moléculas hidrofóbicas. (Elliott *et al.*, 2010; Flower, 1996)

Según la información provista en el *National Center for Biotechnology Information*, el gen codificante para la ApoD se encuentra en el cromosoma 3 en el ser humano, con una localización en 3q29 (en el brazo largo del cromosoma, región 2 y banda 9), y está formado por un total de 5 exones.

Desde el punto de vista de la expresión del gen de ApoD, se evidencia una mayor transcripción en las glándulas mamarias y SNC (Rassart *et al.*, 2020), aunque esto no es siempre un indicativo directo de la cantidad de proteína secretada. De hecho, es muy habitual que aparezca en grandes

concentraciones en determinados órganos del organismo en los cuales el gen no se traduce, como puede ser el hígado, glándulas suprarrenales, pulmones, entre otros. En otras especies como el ratón, posee un patrón de expresión y secreción parecida al ser humano, concentrándose en el SNC. En ratones, la mayor parte de la proteína también se encuentra en el SNC (Li *et al.*, 2016). Las principales células que expresan el ARNm de ApoD son los fibroblastos cercanos a los vasos sanguíneos (Boyles *et al.*, 1989), y, en el sistema nervioso, las células gliales (como astrocitos y oligodendrocitos), aunque en el caso del sistema nervioso periférico el gen viene expresado por los fibroblastos endoneurales y las células de Schwann (García-Mateo *et al.*, 2014).

Esta proteína está formada por una serie de 169 residuos, la cual posee dos sitios de glicosilación; esto explica que el peso molecular de la proteína madura varíe entre 20 y 32 kDa; de hecho, la ApoD cerebral tiene un peso más bajo que la ApoD periférica (su glicosilación varía en función del sitio en el que se produce la proteína). A nivel de estructura terciaria (Figura 3), la proteína está formada por 8 láminas  $\beta$  antiparalelas y una hélice  $\alpha$ . Las láminas  $\beta$  forman una cavidad cónica, y la hélice  $\alpha$  posee la capacidad de cerrar dicha cavidad por la parte inferior de la cavidad; esta es una estructura típica dentro de la familia de las lipocalinas (Eichinger *et al.*, 2007; Rassart *et al.*, 2020).



**Fig. 3: Representación de la estructura terciaria de la proteína ApoD.** La imagen A representa la proteína en un plano lateral, mientras que la imagen B representa la proteína en un plano transversal visto desde la parte inferior. En amarillo se representan las 8 láminas  $\beta$  características de su estructura, en rosa la hélice  $\alpha$ , en verde y azul claro los bucles que unen las láminas y hélice (nominados por pares con letras). En naranja vienen representados los enlaces disulfuro. Obtenida de (Eichinger *et al.*, 2007).

La cavidad formada por las láminas es hidrofóbica, y es ahí donde recibe los diferentes ligandos de la proteína. Esta cavidad posee una forma de cilindro invertido o embudo, con un ancho de aproximadamente 10 por 15 Å en su entrada y una profundidad de alrededor de 15 Å. Algunos de sus residuos hidrófobos se concentran en el extremo abierto del cono, lo que facilita su interacción con lipoproteínas y membranas celulares. Posee cinco residuos cisteína, cuatro de los cuales forman dos puentes disulfuro (Cys-8 con Cys-114, y Cys-41 con Cys-165), de esta manera fijan los segmentos N-terminal y C-terminal con sendas cadenas del cono. El residuo cisteína restante es el encargado de formar puentes disulfuro con otras proteínas ApoD, formando dímeros (se han observado monómeros, dímeros y tetrámeros), o con otras apolipoproteínas.

La oligomerización es una característica común de las lipocalinas y se sabe que afecta a la unión con su ligando. ApoD se dimeriza durante el estrés oxidativo (evidenciado en estudios realizados en pacientes con EP en etapas tardías). Se intuye que la dimerización se relaciona con el mecanismo antioxidante tras la interacción de una de sus metioninas con hidroperóxidos lipídicos (producto del estrés oxidativo en las membranas) (Bhatia *et al.*, 2012a).

ApoD tiene una gran capacidad de unión con moléculas hidrofóbicas, lo cual se evidencia en su variedad de ligandos: el principal ligando es el ácido araquidónico, con una afinidad expresada en  $K_a$  de  $10^8 \text{ M}^{-1}$  en humanos; esteroides (de hecho, ApoD es el principal componente proteico del líquido de los quistes mamarios); colesterol (se une a las membranas plasmáticas celulares, e incluso se ha relacionado con el transporte al hígado de colesterol HDL); y otros ligandos, como por ejemplo la bilirrubina y ácido retinoico (el cual se ha relacionado con la diferenciación celular). ApoD puede interactuar con una gran cantidad de compuestos, de ello se pueden extraer dos conclusiones: la principal es que existe una controversia acerca de considerar ciertos ligandos como tales debido a si su afinidad es lo suficientemente significativa. Por otro lado, conlleva su implicación en diversos procesos y funciones, lo que supone definir su función como un problema complejo (Rassart *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista de las funciones en el sistema nervioso, ApoD tiene una relevancia directa para la función cerebral saludable. De hecho, se conoce la implicación de la proteína en la EA ya que se observa que su nivel en el líquido cefalorraquídeo e hipocampo de sujetos enfermos es 3 veces más alto que los valores de un sujeto sano.

La función más interesante de ApoD en el contexto de este proyecto es la de su papel antioxidante: se ha demostrado que esta cataliza la reducción de hidroperóxidos de ácido eicosatetraeicoico a través de un residuo de metionina altamente conservado, protegiendo las membranas celulares (Bhatia *et al.*, 2012b). Los hidroperóxidos son una fuente potencial de formación de radicales libres en la célula; la proteína actúa reduciéndolos a sus formas no reactivas, frenando de esta manera la cascada de reacciones de peroxidación en la célula (Dassati *et al.*, 2014). Por otro lado, además de tener un papel antioxidante, actuando en el metabolismo de los eicosanoides peroxidados, ApoD influye también sobre algunas vías inflamatorias porque existe una proporción de eicosanoides peroxidados/reducidos que regula la síntesis de leucotrienos inflamatorios (Phillis *et al.*, 2006). Tras la realización de un análisis del hipocampo en pacientes de EA en etapas tardías, se evidencia la presencia dímeros ApoD, los cuales se correlacionan positivamente con los valores de dienos conjugados (los cuales son un marcador de peroxidación lipídica). En este caso, la dimerización de ApoD es relevante, ya que se produce debido a la oxidación del residuo de metionina altamente conservado (responsable de reducir los peróxidos lipídicos), que produce una nueva forma de la proteína ApoD con la tendencia de formar dímeros a través de enlaces disulfuro (Fyfe-Desmarais *et al.*, 2023).

Aunque no se trate de una enfermedad neurodegenerativa, para ahondar en la relación de la proteína con las enfermedades neurológicas, cabe mencionar los estudios que relacionan las alteraciones del cromosoma en el que viene codificado el gen de ApoD, con el padecimiento de esquizofrenia. El cromosoma 3 se relaciona estrechamente con la esquizofrenia, y un polimorfismo del gen ApoD se asocia con un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad a largo plazo. Además, uno de los fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de esta enfermedad (clozapina) aumenta los niveles de ApoD en modelos animales de ratón (Elliott *et al.*, 2010).

### 1.3.2. Métodos de medida del estrés oxidativo y de la peroxidación lipídica.

Los métodos para la medida del estrés oxidativo celular son variados en función de su enfoque; la detección de radicales libres, detección de los productos de la oxidación y peroxidación, medidas de los agentes antioxidantes y marcadores de la peroxidación.

El abordaje más intuitivo que se podría aplicar al problema sería el de la detección de las propias especies reactivas (ER) causantes del estrés oxidativo. Hay algunas técnicas ya en desarrollo para estudiar estos parámetros *in vivo*, como es el caso de la resonancia de *spin* de los electrones de banda L, obteniendo imágenes de resonancia magnética (detecta la presencia de electrones desapareados) en la que se evidencian dichas especies utilizando sondas (se unen a las especies reactivas estabilizándolas y marcándolas). Sin embargo, ninguna de estas sondas es apta para su uso en humanos, aunque sí existen sondas para estudios con muestras humanas. En la detección de las ER existe un problema decisivo: las ER poseen permanencia corta en los sistemas *in vivo*, por lo que no se pueden medir directamente y por ello se desarrollan nuevas técnicas de detección, teniendo como objetivo los marcadores con una mayor vida media en los sistemas. Una de las posibles soluciones a este problema sería introducir en el sistema sondas que reaccionen con dichas ER, como se mencionó anteriormente con las sondas de la resonancia de *spin*, y detectando estas sondas siguiendo diferentes metodologías (Halliwell and Whiteman, 2004). Esto último ya ha sido probado en muestras *ex vivo* (Haywood *et al.*, 1999), utilizando sondas aromáticas (Themann *et al.*, 2001) y urato (Kaur and Halliwell, 1990). Para pruebas *in vitro*, también existen sondas fluorescentes que reaccionan con las especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, estas pruebas siguen presentando el problema de la baja durabilidad y la poca aplicación en humanos.

Si las especies reactivas son poco estables aun estando neutralizadas por las sondas, las medidas podrían enfocarse en torno a los efectos de dichas especies reactivas. En primer lugar, se pueden obtener medidas de los productos de la oxidación. La mayoría de los oxidantes altamente reactivos reaccionan prácticamente con todas las moléculas biológicas; el ADN, los lípidos, las proteínas y los antioxidantes. Los efectos de la oxidación sobre las proteínas incluyen cambios estructurales (fragmentación de la secuencia de la molécula, oxidación de las cadenas laterales), generación de nuevas especies reactivas, formación de productos reactivos (hidroperóxidos, cloraminas y bromaminas), además de proteínas carboniladas. El análisis de los productos generados tras la oxidación de las proteínas comprende la detección de marcadores genéricos, la detección inmunológica de productos de oxidación, la cuantificación de los productos específicos y la detección de enlaces cruzados. Para ello, algunos ejemplos de técnicas utilizadas son la ELISA (ensayo inmunológico), técnicas varias de fluorescencia, HPLC (técnica cromatográfica) entre otros. Sin embargo, estas pruebas no tienen valor decisivo por sí solas, la mayoría son inespecíficas acerca de sus sustratos y sensibles a artefactos (Davies, 2005). En el caso del ADN, los productos resultantes de su oxidación suponen la modificación de bases y azúcares. Dichos productos se pueden medir mediante HPLC, cromatografía de gases (GC)-MS, cromatografía líquida (LC)-MS y técnicas basadas en anticuerpos (Halliwell and Whiteman, 2004), y aunque se obtienen mejores resultados en comparación con el caso de las proteínas en términos de precisión y especificidad, siguen presentando ciertas desventajas.

Los productos de la oxidación de lípidos, o productos de la peroxidación lipídica merecen una mención especial desde el punto de vista de este proyecto. Los principales productos primarios de la peroxidación lipídica son los hidroperóxidos lipídicos. Como productos secundarios, se obtienen diferentes aldehídos, que son habitualmente los productos que se suelen medir para evaluar la peroxidación lipídica. Entre estos aldehídos, se encuentran el malondialdehído, el

propanal, el hexanal y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). El malondialdehído se reporta como el producto más mutagénico de la peroxidación lipídica, mientras que el 4-HNE es el más tóxico (es considerado hoy en día como uno de los biomarcadores de peroxidación lipídica más importantes). De manera general, se utilizan técnicas como el TBARS (cuantificación de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico) y la cuantificación de isoprostanos (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas o LC-MS, o espectrometría de masas en tándem MS/MS) para la cuantificación de productos de la peroxidación lipídica. Para la detección del malondialdehído, es imprescindible mencionar el TBARS, aunque es notoriamente inespecífica y poco precisa para estudios *in vivo* (Ayala *et al.*, 2014). Para la detección del 4-HNE se han utilizado sondas como el borohidruro de sodio marcado con hidrógeno ( $\text{NaB}[^3\text{H}]\text{H}_4$ ), aunque conduce a la derivatización no específica de otras proteínas modificadas con carbonilo, lo cual amplifica el efecto oxidante en la célula. El enfoque más común y fiable para la detección de aductos de 4-HNE es el uso de anticuerpos, que reconocen el 4-HNE unido a las cadenas laterales de aminoácidos de las proteínas. Es el método más fiable en términos de especificidad y sensibilidad, sin embargo, muchas técnicas inmunológicas requieren mucho tiempo para su aplicación, pueden presentar especificidad cruzada y no son especialmente reproducibles (Uchida, 2003).

Por último, cabe mencionar los métodos de medidas de los agentes antioxidantes. Dentro de este grupo, se pueden diferenciar las enzimas y los agentes no enzimáticos antioxidantes. Las enzimas antioxidantes más comúnmente utilizadas como diana para la medida de estrés oxidativo son la catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, superóxido dismutasa, glutatión-S-transferasa (Sies *et al.*, 2017). Muchos de los enfoques para obtener estas medidas van dirigidas hacia los ensayos de reducción del sustrato de cada enzima, fluorimetría y espectrofotometría, estudios de cinética competitiva, y estudios específicos de cada enzima, como es el caso del glutatión reductasa, con el método Brehe y Burch. Sin embargo, muchos de estos métodos son muy complejos, inespecíficos y con bajo valor decisivo (Mendonça *et al.*, 2022).

Los mecanismos antioxidantes no enzimáticos comprenden: la unión de proteínas (como es el caso por ejemplo de la transferrina) a iones metálicos prooxidantes, como hierro y cobre; la protección contra el daño macromolecular por proteínas tales como proteínas de estrés o de choque térmico; y la reducción de radicales libres por donantes de electrones, como GSH, vitamina E ( $\alpha$  tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bilirrubina y ácido úrico (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). Para evaluar la actividad de estas moléculas *in vitro*, se incluyen el método de extinción DPPH, el método ABTS, el método del pirogalol y el ensayo ORAC. Sin embargo, estos ensayos no son válidos para evaluar sus efectos sobre cualquier molécula intracelular, por lo que introducen cierta inespecificidad a su medida (Liu *et al.*, 2022).

### 1.3.3. BODIPY-C11

Los compuestos de tinción 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY) fueron descubiertos en 1968 por Treibs y Kreuzer (Treibs and Kreuzer, 1968), y suelen ser pequeñas moléculas con capacidad de absorción de la radiación UV y emisión de picos de fluorescencia con rendimientos cuánticos elevados (Loudet and Burgess, 2007). Estas técnicas están cada vez más presentes en los ámbitos de obtención de imagen y señal celular como sondas fluorescentes, son utilizados para el etiquetado vital de orgánulos celulares, visualización microscópica de procesos metabólicos y localización de fármacos con actividad biológica. Sin embargo, su aplicación más prominente es la de sonda para el marcaje de moléculas o compuestos de composición lipídica: ácidos grasos, ésteres de colesterol, fosfolípidos, gotas de lípidos y procesos

de tráfico de lípidos, entre otros (Stockert, 2021). Su utilidad es relevante, por otra parte, debido además a sus propiedades que le confieren una estructura estable, siendo relativamente sensibles a la polaridad, al pH de su entorno, estabilidad térmica y fotoquímica, la formación de estado de triplete insignificante, buena solubilidad y ser lo suficientemente estables en condiciones fisiológicas (Loudet and Burgess, 2007; Ulrich *et al.*, 2008).

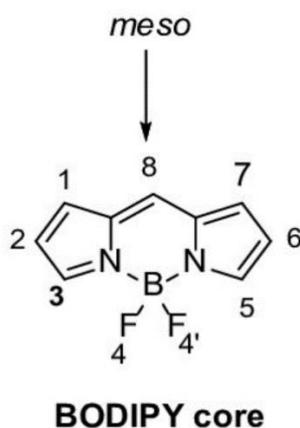


Fig. 4: Esquema de la estructura química del núcleo de BODIPY-C11. Obtenida de (Wafa Mazi, 2019).

El núcleo BODIPY-C11 (Figura 4) se utiliza ampliamente como andamio molecular en el diseño de derivados sofisticados en estudios biomédicos; teranósticos, sondas de imagen y sensibilizadores fotodinámicos. En el contexto de este proyecto, se introducirán las sondas cuya utilidad se relaciona con la detección de la peroxidación lipídica. Se utilizan esencialmente dos sondas BODIPY-C11-fenilbutadieno, a saber 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-ácido-s-indaceno-3-undecanoico (BODIPY-C11) y 4-difluoro-3,5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY-C11-2PB). Estas sondas son derivados de acilo, y las abreviaturas normalmente utilizadas incluyen el número de átomos de carbono de la cadena de ácidos grasos (que se corresponde con su longitud) seguido de las longitudes de onda de excitación/emisión como superíndice, es decir, en el caso del BODIPY-C11, la nomenclatura utilizada en la bibliografía es BODIPY-581/591-C11 (Stockert, 2021).

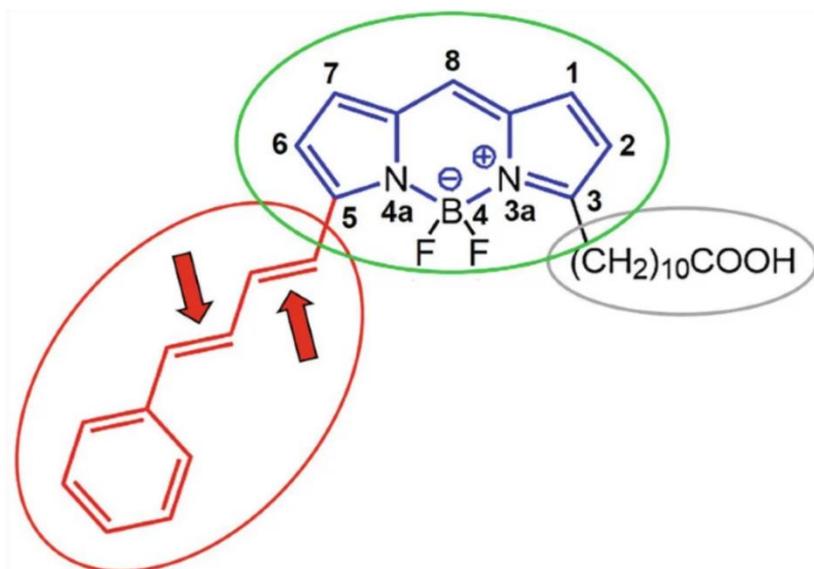


Fig. 5: Esquema de la estructura química de la molécula de una sonda BODIPY-C11. El núcleo BODIPY-C11 (rodeado en verde), unido al residuo de fenilbutadieno (rodeado en rojo), cuyos enlaces de butadieno son los que se oxidan para emitir la fluorescencia verde (marcados con las flechas rojas). La conjugación del núcleo BODIPY-C11 con el grupo de fenilbutadieno genera la fluorescencia roja. Por último, el residuo de ácido graso saturado (rodeado en gris) es de longitud de 11 carbonos, y proporciona parte de sus características lipofílicas. Obtenida de (Stockert, 2021).

BODIPY-C11 funciona como un análogo de ácido graso en el que el núcleo de difluoruro de dipirrometano de boro se sustituye con una fracción fenólica, que informa del daño oxidativo que sufren las membranas lipídicas en virtud de su propia susceptibilidad al daño oxidativo (Drummen *et al.*, 2004; Stockert, 2021). Esto es así ya que la sonda es exclusivamente sensible a las especies de radicales libres (es decir, los peroxilos) que hayan sido formadas por los hidroperóxidos, pero no de los hidroperóxidos *per se* (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010). Profundizando más en la sensibilidad de la molécula, se ha evidenciado que es insensible a las ER del oxígeno y óxido nítrico, pero claramente sensible al peroxinitrito (Stockert, 2021).

Mediante un análisis de espectrometría de masas de la molécula, se pudo observar que el motivo por el que la molécula sirve como sonda para la peroxidación lipídica es que se produce la interrupción del puente dieno insaturado que une el núcleo de BODIPY-C11 y el resto fenilo terminal (Figura 5). Esto genera productos de ácido carboxílico unidos al núcleo de BODIPY-C11, y es lo que da como resultado el cambio de emisión fluorescente desde la longitud de 595 nm (perteneciente al espectro del color rojo) a una longitud de 520 nm (espectro del verde) (Drummen *et al.*, 2004). Esta oxidación del enlace es irreversible, por lo que las sondas que reaccionaron a los productos de la peroxidación lipídica son irre recuperables, y este es otro de los puntos de interés para la utilización de esta molécula (Stockert, 2021).

Algunos estudios reportan que BODIPY-C11 es significativamente más sensible al daño oxidativo que los lípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados, que son el principal objetivo de los agentes reactivos oxidantes durante los procedimientos de peroxidación lipídica (consultar el apartado 1.2. Antecedentes) (Drummen *et al.*, 2002). Por ello, se comporta como agente antioxidante en presencia de estos ácidos grasos (un fenómeno que en la bibliografía se denomina como *sacrificio propio*), lo que supone que la sonda posee principalmente dos efectos adversos para el estudio de la peroxidación lipídica: subestima el efecto de los antioxidantes (esto es relevante para este proyecto, ya que la proteína objetivo de estudio tiene como principal efecto ser agente antioxidante), y da una sobreestimación del efecto del daño oxidativo (Stockert, 2021).

Cabe tener en cuenta otro fenómeno; se ha observado que, para la aplicación de los tintes en altas concentraciones, para la señal de fluorescencia verde, es decir, para el estado oxidado, se revelan áreas de fluorescencia en el espectro rojo. Esto se ha relacionado con la formación de dímeros y excímeros (dímeros excitados). Los excímeros o dímeros de BODIPY-C11 se forman como consecuencia de la proximidad entre dos moléculas de BODIPY-C11, excitado y no excitado, que se unen (la emisión de excímeros de longitud de onda larga es detectable a niveles de incorporación de 1:10 mol:mol aproximadamente (BODIPY Lipid Probes, 2003) (Pap *et al.*, 1999).

De hecho, se han evidenciado tres mecanismos que aparecen bajo la condición de un valor alto en la fracción molar de BODIPY-C11 que pueden introducir comportamientos no lineales en la relación entre la fluorescencia y la concentración de BODIPY-C11: la anteriormente mencionada formación de excímeros, la autoextinción de sus moléculas (o *self-quenching*, un proceso biomolecular en el que se experimenta una reducción del rendimiento cuántico de la fluorescencia, sin experimentar modificaciones en el espectro de emisión), y la transferencia de energía por resonancia (la forma no oxidada de BODIPY-C11 extingue la fluorescencia de la forma oxidada, ya que absorbe su energía excitatoria) (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista práctico, se han evidenciado una serie de ventajas o factores que esta metodología proporciona. Los métodos de tinción de BODIPY-C11 son muy versátiles en términos de toma de imagen y de señal, dado que los espectros de emisión de señal de oxidado y no oxidado están bien separados, se permite obtener ambas señales simultáneamente utilizando técnicas como la microscopía de fluorescencia, microscopía de escáner laser confocal, fluorimetría y citometría de flujo (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010). Mediante las técnicas de imagen, se puede observar la distribución de la señal de BODIPY-C11 a nivel subcelular, por lo que se puede realizar un estudio de las actividades oxidantes a este nivel. De hecho, se discute mediante la evaluación microscópica que la sonda se distribuye de manera no homogénea a lo largo de las membranas celulares, con una zona predominante en la zona perinuclear, sin mostrar preferencia por ningún orgánulo en especial (Drummen *et al.*, 2002).

En comparación con otros métodos de detección de la peroxidación lipídica en los que la detección es específica exclusivamente de un compuesto, como es el caso de por ejemplo el TBARS, BODIPY-C11 es más sensible a la peroxidación lipídica. Además, según el proyecto (Domínguez-Rebolledo *et al.*, 2010) en el que realizaron estudios de proliferación se concluye que BODIPY-C11 no influye en la proliferación celular, y que la citotoxicidad de esta molécula se determina baja. Además, se demostró que la molécula es bastante estable y no pierde sus propiedades de fluorescencia a lo largo del tiempo en ausencia de estrés oxidativo. De todo ello se extrae una conclusión más; si la molécula es estable y no produce citotoxicidad en las muestras, se pueden realizar estudios de diversos compuestos en una misma muestra simultáneamente.

#### **1.4. Justificación de la propuesta**

Debido al aumento de la esperanza de vida de la población, y la fuerte correlación entre la edad y el padecimiento de las enfermedades neurodegenerativas, son cada vez más las personas de tercera edad diagnosticadas y afectadas por este tipo de enfermedades. Estas enfermedades tienen un gran impacto en las vidas tanto de los pacientes como de sus personas cercanas, además de suponer un gran impacto social y económico en la sociedad. Actualmente, el diagnóstico de la mayoría de los trastornos neurodegenerativos se basa en el análisis clínico de los síntomas, sin poder contar con otro tipo de técnicas diagnósticas lo suficientemente robustas. Esto supone una

limitación importante debido a que el diagnóstico precoz en este tipo de enfermedades es crucial, y muchos de los síntomas empleados para el diagnóstico son característicos de etapas avanzadas de la enfermedad. Por otro lado, dada la complejidad de la etiología de las enfermedades, su tratamiento es extremadamente complicado y se dirige más hacia paliar los síntomas. La implicación de la apolipoproteína D en los procesos biomoleculares de algunas enfermedades neurodegenerativas es bien conocida; las enfermedades neurodegenerativas se relacionan con una mayor tasa de estrés oxidativo en las neuronas, suponiendo la pérdida de la función de estas. ApoD se comporta como agente antioxidante en dichas células, protegiendo las membranas celulares. Se ha observado que en el caso de las enfermedades neurodegenerativas aparece la versión dimerizada de ApoD como consecuencia de dicho estrés oxidativo. Si bien existen muchos métodos para la detección de estrés oxidativo, presentan ciertas desventajas, como su inespecificidad, bajo valor decisivo en la determinación, baja aplicabilidad para estudios *in vivo* entre otros. Esto motiva a perseguir un nuevo método de medida cuyo objetivo sea la evaluación de las membranas celulares en células vivas; es por ello por lo que se propone el uso de compuestos BODIPY, y más concretamente, de BODIPY-C11.

Por tanto, se ha detectado que las enfermedades neurodegenerativas son un problema de gran peso a nivel social y personal, que requiere tanto un método diagnóstico eficaz y específico, como una posible aplicación de tratamientos de base biomolecular. En este aspecto se determina que pueden ser de utilidad las sondas de BODIPY-C11 para la detección de estrés oxidativo en célula viva, y el rol de ApoD en la protección de membranas celulares frente a dicho estrés.

## **2. Hipótesis y objetivos**

### **2.1. Hipótesis**

Tras lo expuesto en los apartados anteriores se propone la siguiente hipótesis:

‘El método de tinción BODIPY-C11 es efectivo para la medida de la actividad protectora que efectúa ApoD sobre las membranas celulares cuando se encuentran frente a un estrés oxidativo’.

### **2.2. Objetivo principal**

El objetivo principal de este proyecto de investigación consiste en estandarizar el uso de la sonda de BODIPY-C11 para la medida cuantitativa de peróxidos lipídicos en cultivos celulares sometidos a estrés oxidativo experimental con Paraquat, como paso previo a comprobar si el efecto neuroprotector de ApoD frente a la peroxidación lipídica se debe a la oxidación de membranas.

### **2.3. Objetivos específicos del proyecto**

Con respecto a los objetivos específicos del proyecto de investigación, se proponen:

1. Titulación de PQ atendiendo a las medidas de sus efectos sobre la línea celular HeLa a diferentes densidades de siembra.
2. Establecimiento de los parámetros y ajustes óptimos en la toma de imágenes y medidas en el equipo de Cytation5 relacionados con este proyecto.
3. Estudio de la titulación de BODIPY-C11 para la toma de medidas indicativas del estrés oxidativo en cultivos de la línea celular HeLa.

4. Estudio de la relación entre diferentes métodos de medida de peroxidación para la caracterización de BODIPY-C11.
5. Observación de los efectos de la adición de ApoD al cultivo celular de HeLa mediante las sondas BODIPY-C11.

## **2.4. Objetivos específicos de formación en el TFG**

Desde el punto de vista de este proyecto como un proyecto formativo de la autora, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Aprendizaje de técnicas de laboratorio para cultivos celulares.
2. Adquisición de conocimientos en técnicas de inmunocitoquímica.
3. Desarrollo de las competencias necesarias para comparar diferentes métodos de detección de peroxidación lipídica.
4. Aplicación de los conocimientos en análisis de imagen adquiridos durante la carrera en el ámbito biomolecular.
5. Adquirir, analizar, interpretar y gestionar información del ámbito en el que se desenvuelve el proyecto.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales y reactivos

A continuación, se incluye una tabla con los reactivos y componentes que se han utilizado durante la realización del proyecto:

Recurso o reactivo	Fabricante o fuente	Referencia
<i>Células</i>		
HeLa	ATCC	CCL-2
<i>Reactivos para cultivo celular</i>		
DMEM	Gibco	31053-028
Suero fetal bovino	Gibco	Cat#11573397
Tripsina	Gibco	25200-072
Penicilina-estreptomicina	Gibco	15140-122
L-glutamina	Lonza	Cat#BE17-605F
DMSO	Alfa Aesar	J66650
<i>Reactivos para los tratamientos de los cultivos celulares</i>		
Paraquat	Aldrich	856177
Proteína ApoD	Purificación en el laboratorio	Ruiz <i>et al.</i> , 2013
<i>Reactivos para fijación celular, permeabilización y bloqueo</i>		
Formaldehído	Polysciences	Cat# 04018
Tween20	BioRad	1610781
<i>Reactivos para tinción, inmunocitoquímica y medidas de peroxidación lipídica</i>		
Hoechst	Invitrogen	Cat#H3570
Anticuerpo anti-4-Hidroxi-2-nonenal	Alpha Diagnostic International	Cat# HNE12-S
Anticuerpo D-anti-IgG-G-Alexa488	Jackson ImmunoResearch	AB_2340428
BODIPY-C11	ThermoFisher	Cat# D3861
<i>Otros materiales para cultivo celular</i>		
Placas de 24 y 96 pocillos	Nunclon	
Centrífuga	Eppendorf	Centrifuge 5810R
Incubadora	Heraeus	
<i>Materiales para la toma de medidas e imágenes</i>		
Cytation5	Agilent	

Tabla 1: Tabla de los materiales y reactivos utilizados durante la realización del proyecto. Se divide en secciones en función del uso que se le ha dado a cada material.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Congelación y descongelación de células

Las células utilizadas durante la realización de este proyecto pertenecen a la línea celular HeLa (ATCC CCL-2), células epiteliales derivadas de un adenocarcinoma cervicouterino. Los viales de células congeladas se recogieron de los congeladores de -80°C de temperatura o del tanque de

nitrógeno líquido y se descongelaron sumergiéndolos en el baño a 37 °C (durante 30-60 segundos, no más para evitar que el DMSO presente en el medio de congelación dañara las células). Se recogió el contenido de cada vial y se introdujo en un tubo de centrifuga que contenía medio de cultivo ya atemperado, se centrifugó a 1.000 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en medio de cultivo, y se sembró.

Pasadas 24 h tras la siembra en la incubadora, se realizó un cambio de medio.

### **3.2.2. Mantenimiento y expansión del cultivo celular**

Las células se mantuvieron y cultivaron en medio DMEM (con alta concentración de D-glucosa, a 4,5 g/L) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (30 minutos a 56°C), 1% de L-glutamina y 1% P/S (penicilina 10 U/ $\mu$ L, estreptomycin 10  $\mu$ g/ $\mu$ L). La densidad celular óptima de los cultivos (indicada por el proveedor) es de 20.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se sembraron en: frascos T-25, placas de 24 y 96 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 90-95% de humedad en la incubadora. Para realizar los pases, se lavaron los cultivos con PBS y se levantaron las células enzimáticamente utilizando tripsina a 0,25% (se dejó actuar aproximadamente 2-3 min en la incubadora, y se inactivó con medio de cultivo). Se recogió esa suspensión, se centrifugó a 1.000 rpm durante 3 min, se aspiró el sobrenadante, se suspendió el *pellet* en 1 mL de medio de cultivo, y, tras realizar el conteo de las células utilizando una cámara de Neubauer, se tomó el volumen necesario para sembrar la densidad de células deseada.

Los conteos manuales se realizaron diluyendo 1:10 la suspensión celular obtenida, utilizando medio de cultivo, e introduciendo un volumen (normalmente 10  $\mu$ L) en cada ranura del hemocitómetro (cámara Neubauer). El conteo se realiza por inspección visual en el microscopio a magnificación x10.

### **3.2.3. Fijación de las células**

La fijación química se realizó para poder conservar las células durante más tiempo. Tras un lavado en PBS, se añadió a los pocillos formaldehído al 4% en PBS, dejándolo actuar durante aproximadamente 10-15 min a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con PBS (5 minutos para cada lavado). Las células fijadas se guardaron en PBS y a 4 °C.

### **3.2.4. Marcaje de núcleos con Hoechst**

Para la tinción nuclear se utilizó una dilución de Hoechst, que para mejorar la precisión y reproducibilidad de los experimentos se utilizó una dilución 1:10. En primer lugar, se retiró el medio o líquido de los pocillos y se añadió la solución diluida en PBS, si las células estaban fijadas; o en medio de tratamiento, si el estudio se realizaba con células vivas en cultivo. Se dejó actuar durante 10-15 min, a temperatura ambiente con agitación y protegido de la luz. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con PBS.

### **3.2.5. Tratamientos con Paraquat y proteína ApoD**

Por precisión y comodidad en los experimentos, se utilizó un stock 40 mM de Paraquat (Metil viologen hidrato de dicloruro, abreviado PQ). Antes del tratamiento se realizaron dos lavados con PBS para retirar restos del suero que interferirían en el ensayo. Para realizar la adición de PQ,

este se diluyó en medio de tratamiento (DMEM utilizado para medio de cultivos celulares mencionado anteriormente, al que se le añadió un 1% de P/S y 1% de L-glutamina). Se dejó actuar durante aproximadamente 24-48 h a concentraciones comprendidas entre 0,05-0,5 mM; transcurrido este tiempo, se retiró y se lavó con PBS.

La proteína ApoD de la que se disponía (proveniente de la purificación a partir de fluido de quistes mamarios (Ruiz *et al.*, 2013)) se utilizó a una concentración de 3  $\mu$ M. En los tratamientos realizados, se adicionó la ApoD simultáneamente al PQ. Se añade ApoD directamente al cultivo celular ya que esta se adhiere a la cara extracelular de la membrana, mediante una captación mediada por un receptor de superficie celular específico (Najyb *et al.*, 2015).

### **3.2.6. Tinción con el anticuerpo anti-4-HNE**

El nivel de peroxidación lipídica fue analizado inicialmente empleando el anticuerpo monoclonal anti-4-HNE sobre las células previamente permeabilizadas y bloqueadas. Se retiró el contenido previo de los pocillos y, para permeabilizar, se añadió una disolución con el detergente Tween 20, diluido al 0,1% en PBS y a esa misma disolución, se le adicionó el bloqueante (1% FBS inactivado por calor). Se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente con agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se añadió el anticuerpo primario anti-4-Hidroxi-2-nonenal o anti-4-HNE, disuelto en 0,1% Tween 20/PBS a la concentración deseada, y se dejó actuar durante aproximadamente 2 h 30 min a temperatura ambiente y sin agitar. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS con incubaciones de 5 min entre lavados, y se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG-Alexa488 diluido 1:2.000 en 0,1% Tween 20/PBS; se dejó actuar durante 90 min a temperatura ambiente, protegido de la luz.

### **3.2.7. Cuantificación relativa de lípidos peroxidados con BODIPY-C11**

La solución stock de BODIPY-C11 es de 2 mM en DMSO, y se mantuvo congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El reactivo se descongeló y se diluyó a las concentraciones deseadas en medio DMEM suplementado con los antibióticos P/S y la glutamina. Se retiró el medio contenido en los pocillos, y se realizaron dos lavados con PBS atemperado. Se retira el PBS y se añadió a cada pocillo la concentración deseada de BODIPY-C11 (las concentraciones varían en un rango de 0,25-4  $\mu$ M), se incubó durante 30 min (tiempo variable, aunque se establece como óptimo, ver resultados del experimento 4, apartado 4.4.). Una vez transcurrido el tiempo de actuación, se retiró el medio con BODIPY-C11, se realizaron dos lavados de PBS (para retirar exceso de BODIPY-C11 que no se hubiese unido específicamente), y se le añadió nuevo medio de tratamiento. La sonda y células teñidas con esta debían estar resguardados de la luz en la medida de lo posible.

### **3.2.8. Procedimientos de medida en el equipo Cytation5**

El aparato Cytation5 es un sistema de microscopía que combina las capacidades de un microscopio de fluorescencia automatizado, con un lector de placas de microtitulación, lo que permite la adquisición de imágenes y la medida de diversos parámetros en células y muestras en placas. Ofrece técnicas de fluorescencia, luminiscencia y absorbancia; además de la captura de imágenes a tiempo real, utilizando múltiples canales de fluorescencia y diferentes filtros ópticos. Adicionalmente, incorpora un sistema de procesamiento de imágenes y generación de informes.

### 3.2.8.1. Visualización de imágenes

Una vez inicializado el sistema, se seleccionó la modalidad de imagen que se deseaba tomar: para fotos a microscopio se utilizó la modalidad ‘*High contrast*’, para las imágenes con la tinción de Hoechst se utilizó la opción ‘*DAPI*’ (su filtro con una ventana de excitación de 350-400 nm, de emisión de 415-480 nm y un dicroico a 400 nm), y para las imágenes de 4-HNE, la opción ‘*GFP*’ (su filtro con una ventana de excitación de 440-490 nm, ventana de emisión de 500-550 nm y un dicroico a 490 nm). Los ajustes del *focus* y *exposure* se usaron normalmente mediante el modo automático del sistema (*autofocus* y *autoexposure*), aunque en alguna ocasión se tuvo que hacer algún ajuste manual. Para adquirir el mayor número posible de imágenes dentro de un pocillo, se seleccionó dentro de las opciones de modalidades de imagen la del ‘*Montage*’, en el que toma una matriz de imágenes en una superficie determinada manualmente por el usuario o por el número de imágenes (el tamaño de esta matriz). El *software* ofrece posteriormente la opción de realizar un postprocesado; en la opción de montaje permite unir todas las imágenes para crear una única; permite someterla a la operación de convolución (es un método de filtrado que en estos casos permite realizar un suavizado en la imagen y un realce de bordes, facilitando la posterior detección de características) y un preprocesado. En el experimento utilizando el anticuerpo frente 4-HNE fue especialmente relevante la opción del preprocesado, que permitió eliminar el *background* de la imagen. Las imágenes se exportaron manualmente en una hoja de Excel junto a los resultados de los contajes.

### 3.2.8.2. Contaje de células

Esta opción aparece en la pestaña de *Analyze*, en la opción de *Cellular analysis*. Si se han tomado las imágenes en modo montaje, se debe acudir a una de las imágenes, aplicar el análisis, se obtiene una tabla con los parámetros calculados (número de objetos detectados, su tamaño...), y mediante la opción *Add step* se calculan todos los parámetros en todo el conjunto de imágenes. Se han obtenido los mejores rendimientos de esta función para las imágenes de Hoechst tomadas a magnificación 4x.

### 3.2.8.3. Detección y toma de medida de lípidos peroxidados con BODIPY-C11

Las medidas de BODIPY-C11 se deben realizar desde la modalidad que ofrece el sistema de ‘*Lecturas*’. El Cytation5 cuenta con un sistema monocromador, que ofrece la posibilidad de excitar y obtener la energía de emisión a longitudes de onda muy específicas, en un rango de 250 a 700 nm. En la opción de fluoróforos permite seleccionar las diferentes longitudes de onda a las que se desea excitar y a las que se emiten las señales. La fluorescencia derivada de la oxidación de BODIPY-C11 se obtiene con una excitación de 488 nm y una ventana de emisión de 530 nm (Figura 6). En el caso de la fluorescencia derivada del BODIPY-C11 no oxidado, esta se excita en una ventana de 568 nm y una ventana de emisión de 590 nm (Figura 6). En el caso de los excímeros, en una ventana de excitación de 488 y de emisión de 600 nm.

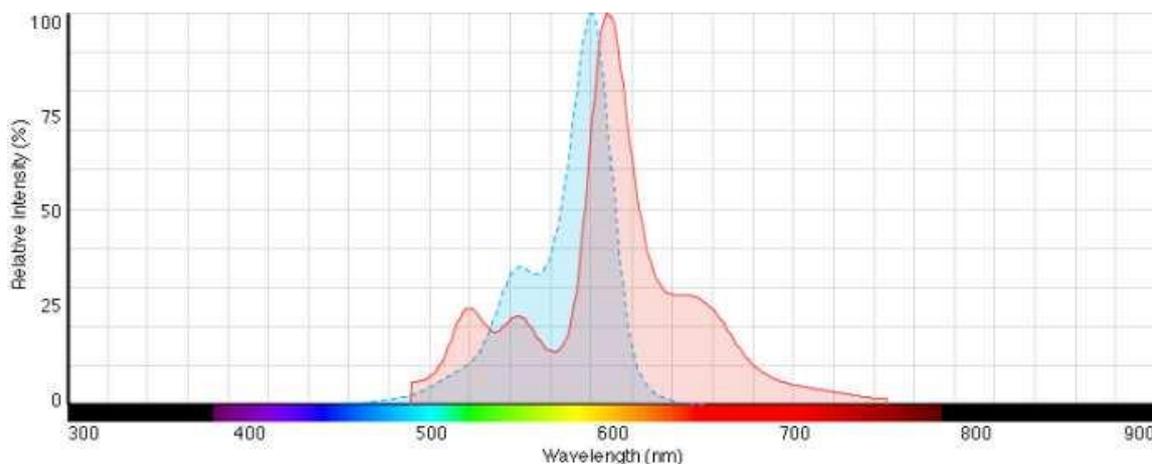


Fig. 6: Espectros de excitación y emisión de las señales de BODIPY-C11 en su estado oxidado y no oxidado. Obtenida de su referencia en ThermoFisher.

Para tomar las señales se estableció un protocolo en el que existe un paso de calentado del sistema (las medidas se toman en células vivas, por lo que debemos mantener las condiciones lo más parecidas a las de cultivo posibles). Este consiste en establecer la temperatura del ambiente interno del Cytation5 a una temperatura de 37 °C. Finalmente, el sistema iba recorriendo los pocillos indicados previamente manualmente por el usuario y va tomando las tres lecturas. Una vez realizadas las lecturas, los resultados fueron exportados a hojas de Excel. El sistema proporciona un esquema de intensidad de la señal en nueve regiones del pocillo y resultados estadísticos (cuantitativos) de las medidas tomadas en todo el pocillo.

### 3.2.9. Análisis de la imagen de inmunocitoquímica de 4-HNE en Matlab

En primer lugar, se realizó un descarte manual de aquellas imágenes ya preprocesadas en el Cytation5 (con reducción de fondo) que no servirían para el proceso (aquellas con alguna anomalía en la imagen, mucho ruido o con algún defecto en su toma). Posteriormente, se importan en el programa de Matlab, y se transforman a sus correspondientes matrices de valores. La señal del anticuerpo 4-HNE es verde, por lo que, teniendo en cuenta que las imágenes digitales están formadas por tres canales de color (rojo, verde y azul) superpuestos, se toma la matriz de valores correspondiente al segundo canal, el del verde. Esta matriz toma valores de 0 a 1. Se obtuvo la suma de intensidad de verde en cada uno de los pocillos sumando todos los valores de la matriz, y se dividió entre el número de células en cada imagen. De esta manera se obtuvo la intensidad de verde normalizada por el número de células.

## 4. Resultados

### 4.1. Experimento 1: primeras pruebas con el sistema de imagen Cytation5 y células HeLa.

El objetivo de este experimento fue diseñar el protocolo de cultivos celulares y con el sistema Cytation5 para establecer tanto la densidad celular que proporcionase la mejor resolución de las imágenes obtenidas, como la precisión de los contajes celulares automáticos en función de las densidades. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos de 0,32 cm<sup>2</sup> a 6 densidades distintas: 1.000, 2.000, 5.000, 20.000, 50.000 y 100.000 células/cm<sup>2</sup>. Cada densidad se replicó en 5 pocillos.

Pasadas 24 h en la incubadora tras la siembra, las células se fijaron (ver el apartado de metodología 3.3) y guardaron a 4°C. Inicialmente se propuso seguir la metodología descrita en el estudio (Held *et al.*, 2016), en el que se propone la combinación de las opciones “*High contrast-Brightfield*” y un *offset* en el enfoque, obteniendo un buen contaje automatizado de células, ya que el cuerpo de las células se volvería más brillante y el algoritmo del Cytation5 podría detectarlo como objeto y contarlo. Sin embargo, el *hardware* necesario del equipo para poder llevar a cabo esta técnica no estaba disponible. En su lugar, para identificar las células se realizó una tinción nuclear de Hoechst de todos los pocillos.

Las células se marcaron con Hoechst a una dilución 1:20.000 en PBS (apartado 3.2.4 de metodología), y los resultados mostraron que a mayor densidad de siembra se obtenía una menor uniformidad del marcaje de Hoechst. Además, a altas densidades, las células formaban agrupaciones tridimensionales (se apilaban unas sobre otras) y se evidenciaban ‘corrillos’ o agregados con marcaje más intenso, así como otras zonas sin marcaje. Se tomaron nuevas imágenes a varias alturas del pocillo, variando el plano focal en el eje z, y se observó que las células más superficiales eran aquellas que se habían marcado y por tanto daban señal de Hoechst, mientras que en las zonas más internas no se visualizaban núcleos teñidos, aunque se comprobó que había células mediante una prueba de visualización en *High Contrast*.

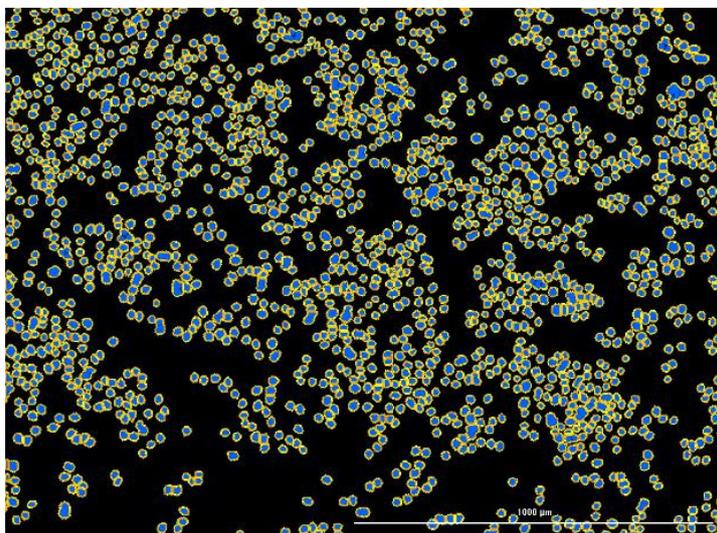


Fig. 7: Imagen de células teñidas con Hoechst, sobre la que está actuando el algoritmo de reconocimiento de bordes del Cytation5. Para realizar los contajes, el *software* realiza un reconocimiento de objetos en la imagen, y rodea los cuerpos identificados de color amarillo. Escala: 1.000 µm.

La figura anterior muestra la efectividad del algoritmo en la detección de objetos bajo las condiciones adecuadas. El algoritmo es muy sensible a posibles ruidos y artefactos en la imagen, por lo que se realizaron ajustes manuales mediante la elección del tamaño del objeto que iba a detectar y que incluye los objetos presentes en los bordes de la imagen. Además, se incluyó una etapa previa de preprocesado para eliminar todo lo posible el ruido de fondo.

## 4.2. Experimento 2: evaluación del estrés oxidativo provocado por el PQ mediante el marcaje inmunocitoquímico de 4-HNE

El objetivo de este experimento fue establecer el tratamiento para inducir estrés oxidativo experimental con el generador de especies reactivas Paraquat (PQ). La peroxidación lipídica producida por el tratamiento con PQ se evaluó con un anticuerpo anti-4-HNE. Para ello, se sembraron células HeLa en 8 pocillos a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup> en una placa de 24 pocillos; 4 de ellos se utilizaron como controles y otros 4 se trataron al día siguiente con una

misma concentración de PQ (0,25 mM, siguiendo lo indicado en el apartado de metodología 3.2.5). Para la determinación de 4-HNE en las células, se realizó una titulación del anticuerpo para definir la concentración óptima de trabajo con la que se obtuviera menor ruido de fondo, pero con una máxima señal específica del anticuerpo por las células.

Se probaron las diluciones de 1:1.000, 1:2.000 y 1:4.000 (el anticuerpo disuelto en 0,1% Tween 20/PBS); cada una de estas diluciones se aplicó a dos pocillos: uno sin tratamiento con PQ y otro tratado.

Adicionalmente, se añadió Hoechst a una dilución 1:15.000 para marcar los núcleos celulares; se redujo la dilución con respecto al experimento en (4.1) para probar si a menores concentraciones de Hoechst se seguían obteniendo buenos marcajes y contajes.

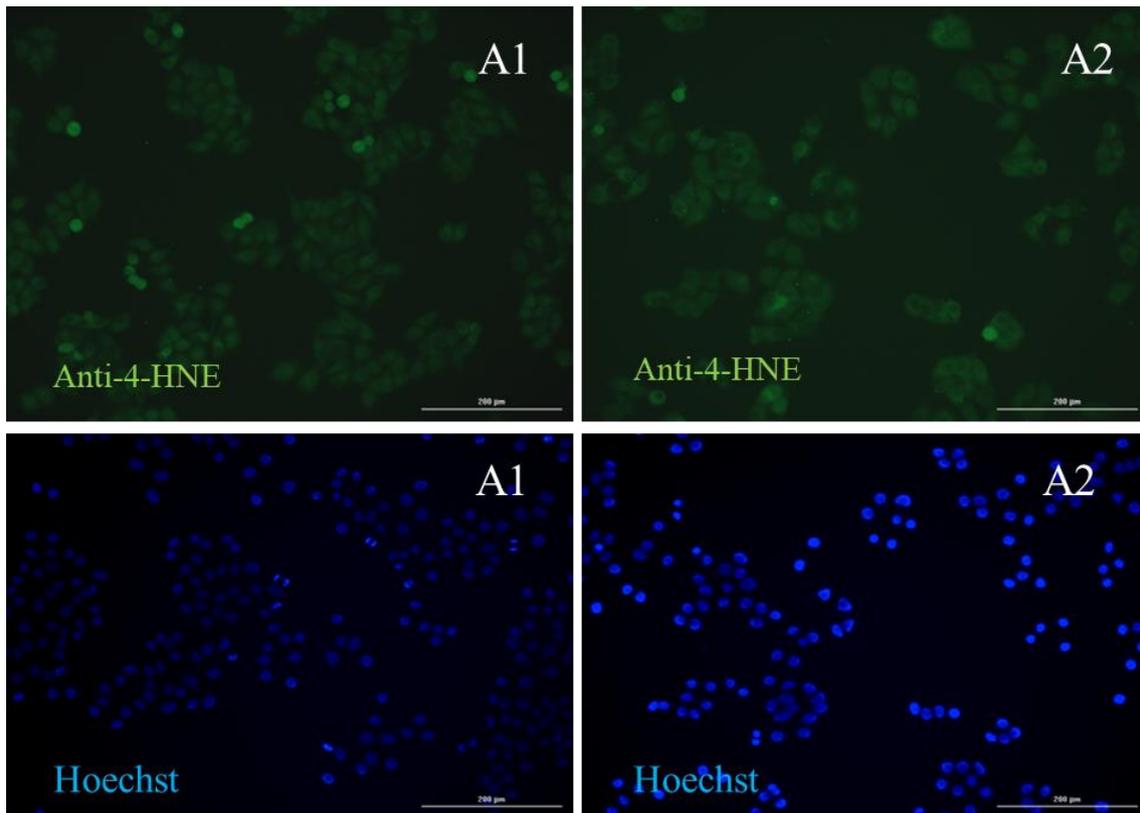


Fig. 8: Evaluación de las células mediante inmunocitoquímica por anti-4-HNE a dilución 1:1.000. Imágenes de los mismos campos y pocillos de: tinción de anticuerpo anti-4-HNE en la fila de arriba y marcaje con Hoechst en la fila de abajo. Las imágenes de los pocillos A1 y A2 se corresponden con: control y tratado con PQ, respectivamente. Marcaje realizado a dilución del anticuerpo 1:1.000. Escala: 200 µm.

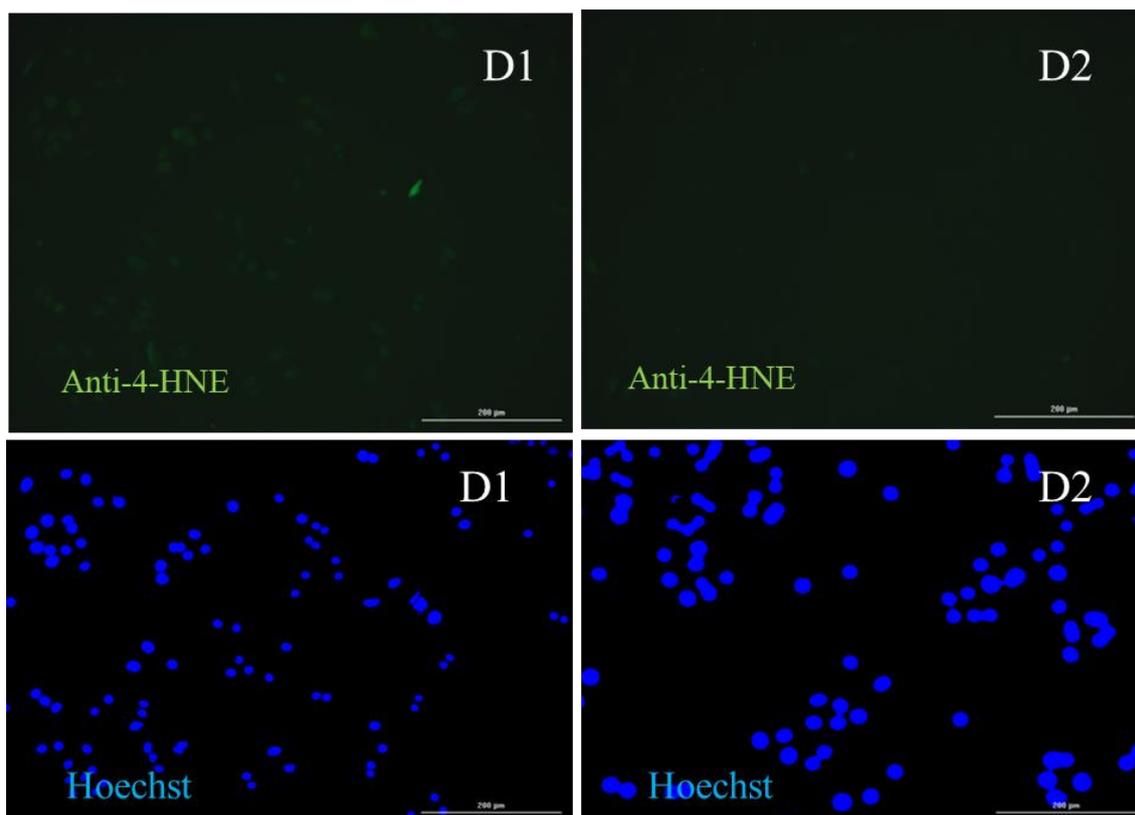


Fig. 9: Evaluación de las células controles mediante inmunocitoquímica por anti-4-HNE. Imágenes de los mismos campos y pocillos de: tinción de anticuerpo anti-4-HNE en la fila de arriba y marcaje con Hoechst en la fila de abajo. Las imágenes de los pocillos D1 y D2 se corresponden con: control y tratado con PQ, respectivamente. Sin marcaje con el anticuerpo. Escala: 200 µm.

Se observó que a la dilución de 1:4.000 no se apreciaba ninguna célula en la imagen de ningún pocillo. Para la dilución de 1:2.000 se apreciaban muy levemente, eran casi imperceptibles. Como se puede apreciar en la Figura 8, a la dilución de 1:1.000 la señal de 4-HNE de las células es muy leve, aunque sí se aprecia el efecto del PQ: el citoplasma de las células tratadas con PQ se marca de forma más intensa. A la vista de estos resultados, se propuso entonces:

- Una posible nueva titulación de PQ; puede que el efecto de PQ no fuera lo suficientemente intenso y por tanto el marcaje fuera ineficiente.
- Como segunda opción, se habría considerado una nueva titulación del anticuerpo utilizando concentraciones superiores.

### 4.3. Experimento 3: titulación de PQ para la inducción de estrés oxidativo.

En este experimento se buscó establecer la condición óptima de exposición a PQ que generase estrés oxidativo sin causar mucha muerte celular. La titulación de PQ se realizó variando las concentraciones a las que se administraba y el tiempo de exposición a este.

Para la titulación de PQ, se probaron seis concentraciones de PQ (0,15; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 y 0,5 mM) que se aplicaron durante 24 y 48 h.

Se realizó en primer lugar el estudio a 48 h siguiendo la metodología del punto 3.2.5. Tras una inspección visual de los pocillos al microscopio, se observó que la única concentración para la que quedaban células vivas era 0,15 mM, por lo que se obtuvieron imágenes marcadas con anti-

4-HNE a una dilución de 1:15.000 tanto del control como del cultivo tratado con dicha concentración de PQ (Figura 10):

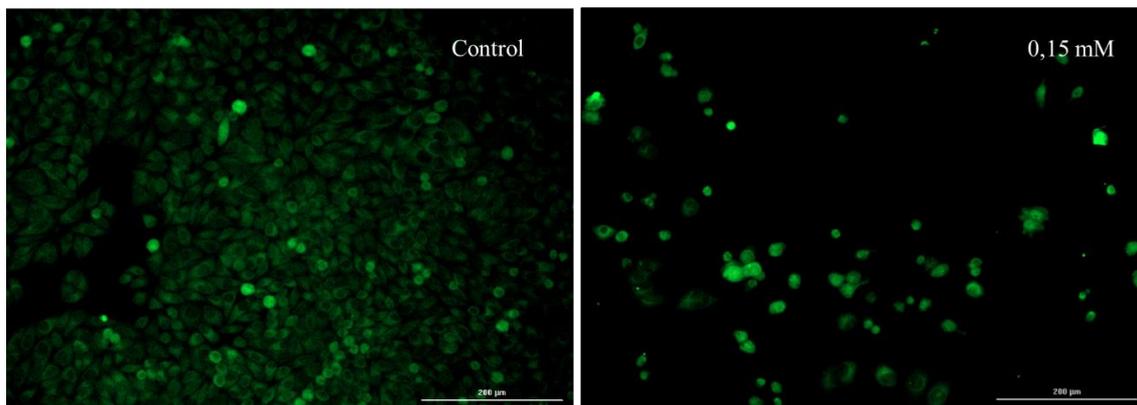


Fig. 10: Imágenes de fluorescencia del anticuerpo anti-4-HNE para el tratamiento de PQ a 48 h. Imagen izquierda: cultivo control. Imagen derecha: PQ 0,15 mM. Se observa la gran pérdida de células que ocurre como consecuencia de la exposición al prooxidante. Escala: 200 µm.

Posteriormente, se realizó además un marcaje nuclear por Hoechst para obtener los contajes celulares de cada pocillo. Para cuantificar el efecto de la formación de 4-HNE, se estudiaron los niveles de fluorescencia medios de una muestra (n=5) de las imágenes obtenidas para cada pocillo en Matlab (consultar el apartado de *Código* en el *Apéndice*). Se normalizan por el número de células en cada imagen y se calculó el valor de intensidad medio de cada pocillo, ya normalizado al número de células. Finalmente, se obtuvo la desviación estándar de los valores medios, ya que de esta manera se obtiene una medida de la variabilidad técnica y se pudo valorar la fiabilidad de esos resultados. Se representan los valores obtenidos:

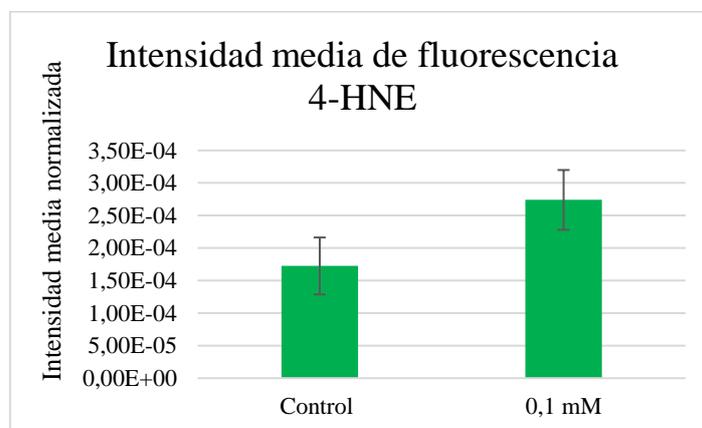


Fig. 11: Gráfica de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la tinción con el anticuerpo anti-4-HNE tras 48 h de exposición a PQ 0,15 mM. La barra de la izquierda se corresponde con el control de PQ, y a la derecha para la concentración 0,15 mM. Se observa que, a pesar de existir una diferencia significativa en el número de células entre cada condición, dado que las células han sufrido un mayor daño de peroxidación lipídica, poseen una mayor proporción de 4-HNE por célula, lo que se traduce en un nivel de verde mayor.

Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento salvo por el tiempo de exposición al PQ, que pasó a ser 24 h. Se volvió a realizar una inspección visual al microscopio, y se decidió obtener las imágenes del control y de cultivos tratados con concentraciones PQ 0,3 mM y 0,5 mM. A continuación, se incluyen imágenes obtenidas para cada pocillo (Figura 12):

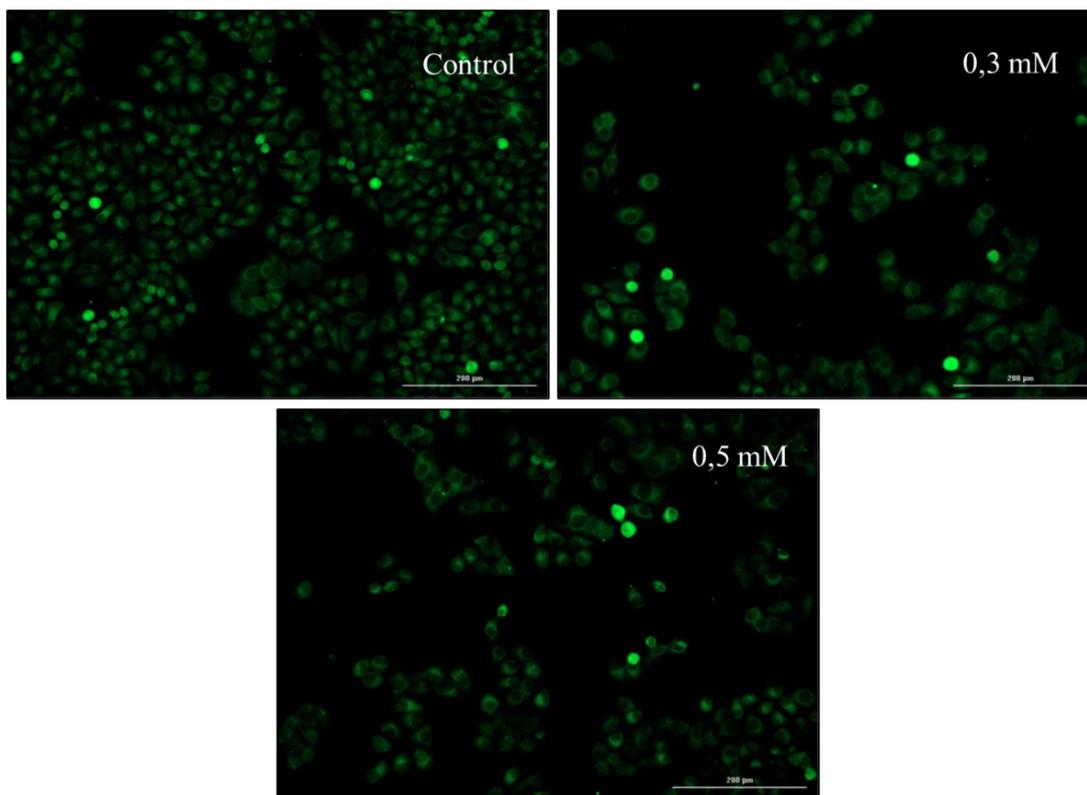


Fig. 12: Imágenes de tinción con el anticuerpo anti-4-HNE de cultivos tratados durante 24 h. Imagen superior izquierda: Control. Imagen superior derecha: PQ 0,3 mM. Imagen inferior: PQ 0,5 mM. Se observa que a medida que aumenta la concentración de PQ se produce una mayor muerte celular; sin embargo, para el tratamiento a 24 h no es tan clara la diferencia en intensidad de fluorescencia al comparar las diferentes condiciones. Escala: 200  $\mu$ m.

En vista de los resultados, se determinó como concentración y tiempo de exposición óptimos el tratamiento con PQ 0,3 mM durante 24 h, ya que bajo estas condiciones se observan los efectos del PQ sin sufrir grandes pérdidas en el número de células en el pocillo.

#### 4.4. Experimento 4: titulación de BODIPY-C11 en células control y tratadas con PQ.

Una vez definidas la concentración y el tiempo de exposición óptima de PQ, se pasó a la exposición y medida de BODIPY-C11, con el objetivo de determinar la concentración y el tiempo de exposición óptimos para obtener medidas fiables de los niveles de peroxidación lipídica con el Cytation5. Para ello, se sembraron 6 pocillos en una placa de 24 pocillos; 3 de ellos se dejaron sin tratar y los otros 3 se trataron con PQ, a una concentración de 0,3 mM. Posteriormente, se trataron seis pocillos con BODIPY-C11:

- a. Concentración de 1  $\mu$ M (B1 y B2).
- b. Concentración de 2  $\mu$ M (C1 y C2).
- c. Concentración de 4  $\mu$ M (D1 y D2).

Una vez adquiridas las medidas, se realizó una tinción con Hoechst *in vivo* (a una dilución 1:15.000) para posteriormente tomar imágenes para el contaje.

Se tomaron tres medidas en diferentes instantes de tiempo tras la aplicación de BODIPY-C11: a los 25 min, a los 40 min, y a las 24 h. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 13, normalizados con respecto al número de células:

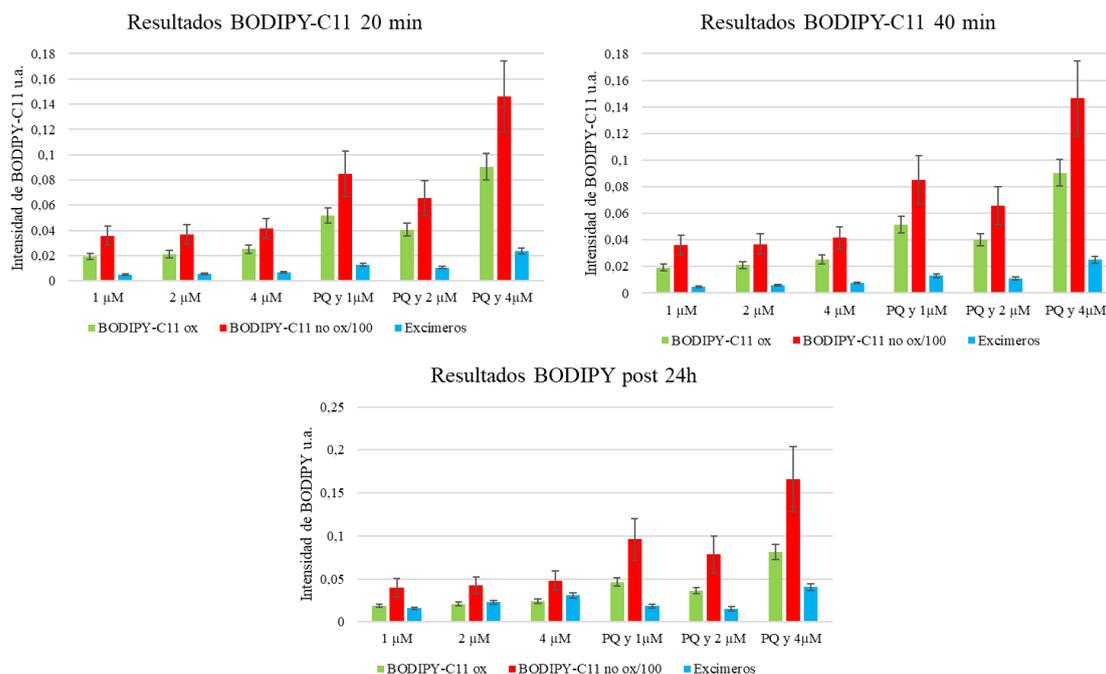
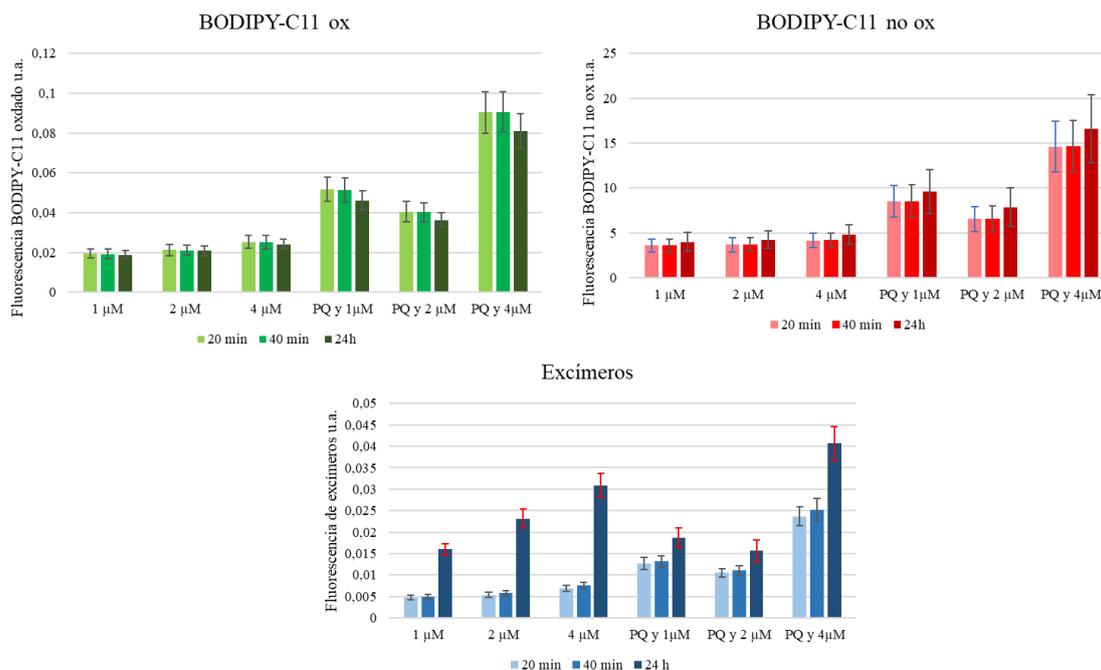


Fig. 13: Gráficas de los resultados de las tres medidas para los tres instantes de tiempo. Se muestran tres gráficas (una para cada tiempo analizado) en las que se representan las fluorescencias registradas para cada pocillo: BODIPY-C11 oxidado en verde, BODIPY-C11 no oxidado en rojo y excímeros en azul. La señal de BODIPY-C11 no oxidada es de una magnitud 100 veces mayor con respecto al resto de señales, por lo que para poder representarlo en una misma gráfica se realiza un escalado. Las barras de error representan la variabilidad técnica del sistema.

En los pocillos tratados con PQ se observa un aumento en la intensidad de señal para las tres medidas (BODIPY-C11 oxidado, no oxidado y excímeros). En el pocillo C2 se observa una disminución de la señal debido a que se contaron un mayor número de células para un mismo nivel de señal. Se aprecia que a mayor concentración de BODIPY-C11 más se intensifican las señales registradas. Esto no es necesariamente positivo, una señal muy intensa de excímeros supone ruido para poder detectar adecuadamente la peroxidación lipídica de las membranas. Mediante el análisis de estas gráficas se observa que entre aquella de 20 min y de 40 min no se aprecian aparentemente muchas diferencias.



**Fig. 14:** Gráficas de la comparativa del efecto temporal sobre la señal de BODIPY-C11. Se representan tres gráficas (una para cada señal) en las que, para cada pocillo, se comparan las señales tomadas en los diferentes instantes de tiempo. Para esta gráfica, se ha revertido el escalado aplicado en la representación anterior del BODIPY-C11 no oxidado (muestra sus valores en crudo). Las barras de error simbolizan la variabilidad técnica en la medida.

En las gráficas anteriores (Figura 14) se puede observar que la fluorescencia de la molécula de BODIPY-C11 es flexible en su registro de señal tras su aplicación al cultivo en un intervalo de tiempo de entre 20 y 40 min, aunque a mayor tiempo transcurrido aumenta la señal de excímeros (Figura 14). El efecto sobre las señales pasadas 24 horas tras la aplicación en cultivo implica una pérdida leve de señal de BODIPY-C11 oxidado, a costa de un gran aumento en la señal de excímeros. La señal de BODIPY-C11 no oxidado aumenta también levemente.

El objetivo de evaluar la concentración de BODIPY-C11 es reducir la señal de excímeros lo máximo posible. Para obtener una mejor noción acerca de los efectos que el estrés oxidativo han tenido sobre las moléculas de BODIPY, se calculó una ratio que ilustrase la proporción que hay de señal de BODIPY oxidado con respecto al total (Figura 15).

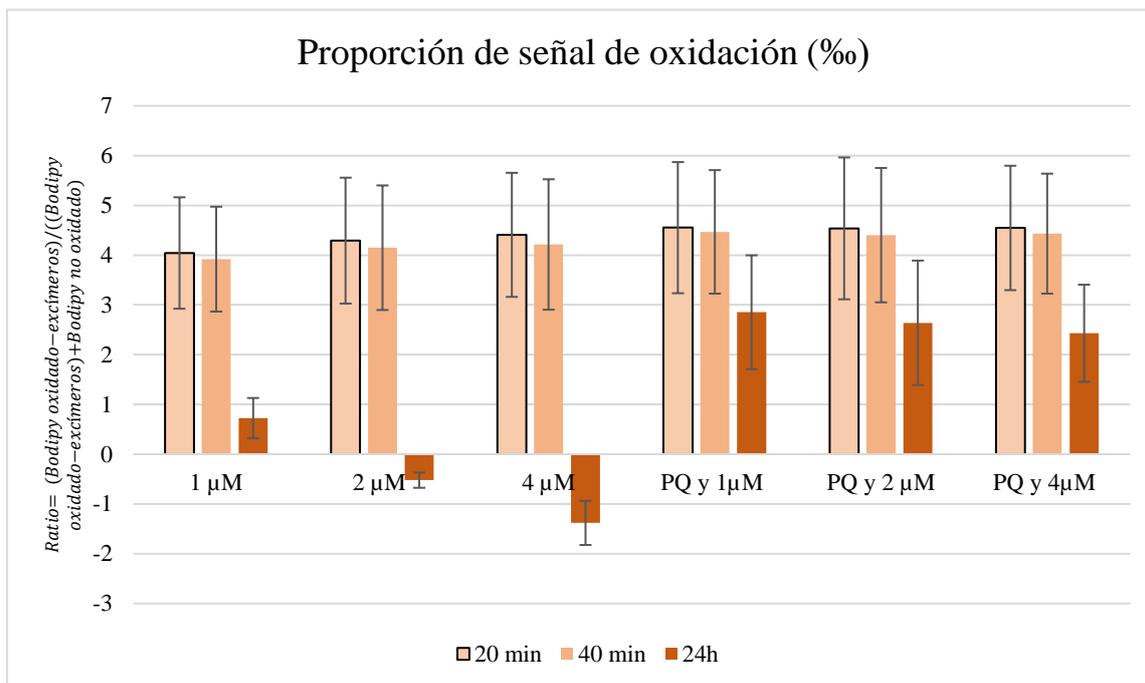


Fig. 15: Gráficas de la proporción de BODIPY-C11 oxidado en cada pocillo, a cada uno de los 3 tiempos evaluados. Cada columna representando cada instante de tiempo, y representándolas por cada pocillo.

La ratio se ha calculado siguiendo la fórmula:

$$Ratio = \frac{Bodipy\ oxidado - excimeros}{(Bodipy\ oxidado - excimeros) + Bodipy\ no\ oxidado}$$

La ratio se expresa en tanto por mil. Se observa en la gráfica que la señal tomada tras las 24 h de la aplicación de BODIPY-C11 sufre claramente una distorsión en sus resultados. Sin embargo, se distingue el efecto del PQ si se comparan los valores de los pocillos tratados (serie 2) con respecto con aquellos correspondientes a los controles (serie 1), ya que poseen una mayor proporción de señal de BODIPY-C11 oxidado. Se observa que la diferencia en la proporción de señal de BODIPY-C11 oxidado se aprecia más claramente con la concentración 1 μM de BODIPY-C11.

#### 4.5. Experimento 5: reajuste de titulación en pruebas con BODIPY-C11.

Tras los resultados obtenidos en el experimento anterior, se decidió bajar la concentración de BODIPY-C11, y tratar con diferentes concentraciones de PQ, en vista de que los excimeros daban valores altos.

Se trataron las células con tres concentraciones de PQ (0,1 mM, 0,2 mM y 0,3 mM), que se compararon a cultivos control no tratados. Se añadió BODIPY-C11 a concentraciones de 0,25 μM y 0,5 μM.

Se vuelven a representar las ratios de BODIPY-C11 oxidado (siguiendo la fórmula expuesta en la sección anterior) (Figura 16) y se obtienen los siguientes resultados:

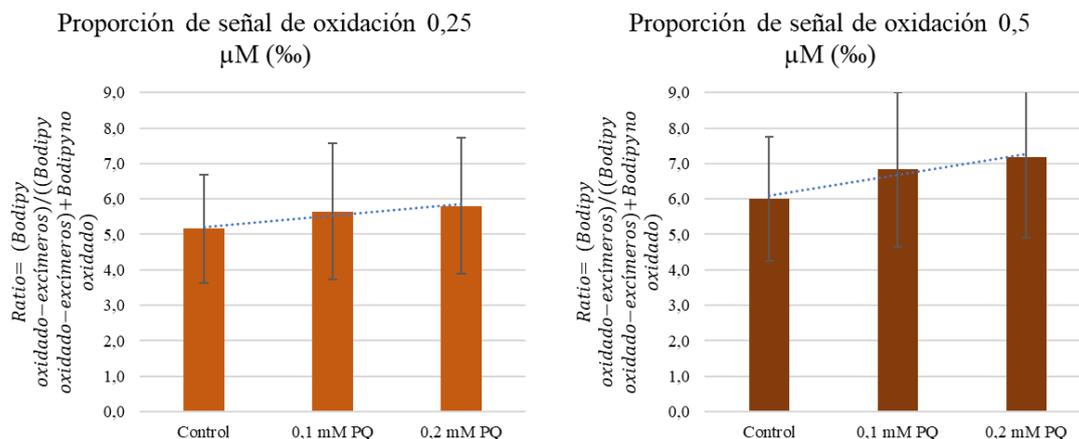


Fig. 16: Gráficas de la ratio de BODIPY-C11 oxidado para cada concentración de BODIPY-C11. Cada columna en las gráficas representa la ratio de oxidación en cada concentración de PQ.

En este caso, el efecto del PQ queda muy claro, salvo el caso de la concentración de PQ 0,3 mM, que no parece indicar diferencias con respecto al control por lo que no se representa en la gráfica. Entre ambas concentraciones de BODIPY-C11, se escoge la menos concentrada por los resultados obtenidos en las medidas de los excímeros, que se exponen a continuación:

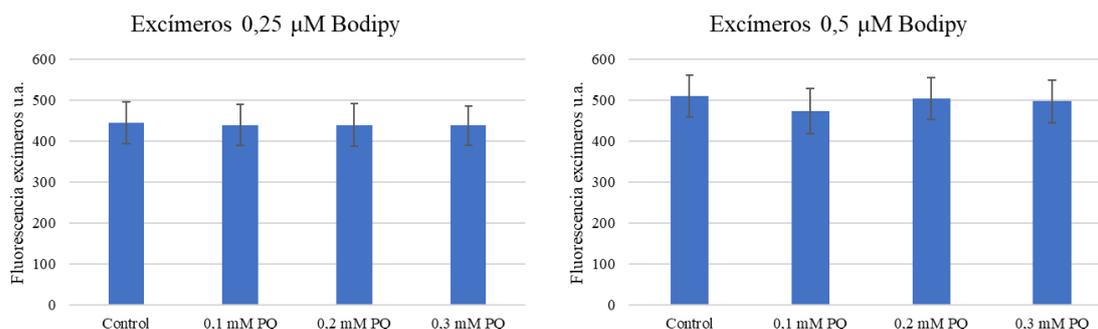


Fig. 17: Gráficas de los valores de la medida de excímeros para cada concentración de BODIPY-C11. Cada columna en las gráficas representa los valores de excímeros para cada concentración de PQ, de izquierda a derecha: control, 0,1; 0,2 y 0,3 mM. Se representan también los valores de la concentración 0,3 mM de PQ ya que en este caso se evalúa la estabilidad de BODIPY-C11 en términos de excímeros.

Para la concentración 0,25 mM, se obtienen valores de excímeros muy constantes y de valores menos intensos, por lo que se escoge como la concentración determinada para próximos experimentos (Figura 17).

#### 4.6. Experimento 6: adición de ApoD a diferentes concentraciones.

Una vez establecida la concentración de BODIPY-C11 para la que los valores de la señal de excímeros se mantienen constantes con respecto a la concentración de PQ, se pasó a realizar el primer estudio de la actividad de la proteína ApoD.

Se emplearon tres columnas de pocillos: una sin ApoD, otra con ApoD a concentración 10 nM y una última tratada con ApoD a concentración 20 nM.

Por otro lado, las filas de la placa se trataron a diferentes concentraciones de PQ: controles de PQ (no se les adicionó), concentración 0,05 mM, concentración 0,1 mM y concentración 0,2 mM.

Se realizaron ambos tratamientos siguiendo el procedimiento indicado en el punto 3.2.5. de la metodología, usando una concentración de BODIPY-C11 de 0,25 μM, se tomaron las nuevas

medidas y se volvió a representar las ratios tal y como se hizo en los experimentos pasados. Los resultados obtenidos son los siguientes (Figura 18):

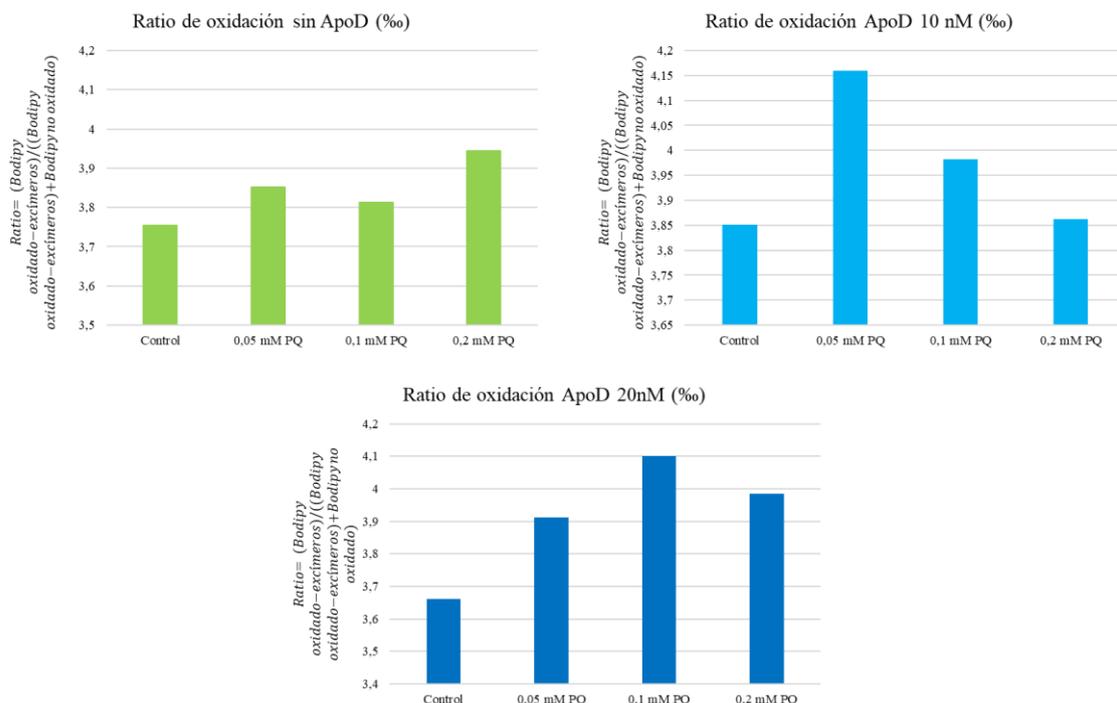


Fig. 18: Gráficas de las ratios de BODIPY -C11 oxidado obtenidas para cada una de las condiciones. La gráfica cuyas barras se representan en verde se corresponde a los valores para cada condición de PQ sin adición de la proteína. En azul más claro, los valores de las ratios para la concentración de ApoD de 10 nM, y en azul más oscuro, para la concentración de 20 nM. Las barras se corresponden con, de izquierda a derecha: el control y concentraciones crecientes de PQ. Los valores están expresados en tanto por mil.

Se observa un comportamiento coherente en el caso de los controles de ApoD en comparación con los resultados de experimentos anteriores (Figura 18). Para la concentración de ApoD 10 nM, a mayor concentración de PQ más baja es la señal de BODIPY-C11 oxidado, lo que podría ser indicativo de la actividad protectora de ApoD. Este posible efecto de ApoD no se aprecia a concentraciones 20 nM de la proteína.

## 5. Discusión

### 5.1. Análisis y discusión

ApoD es una proteína que se ha reportado como neuroprotectora, ya que actúa como antioxidante frente al estrés oxidativo, siendo este una característica común a las distintas enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, estas enfermedades están muy presentes en la sociedad, y se estima que su incidencia aumente en paralelo a una mayor esperanza de vida, por lo que parece clara la necesidad de desarrollar nuevos métodos diagnósticos y tratamientos. Tras una revisión de diferentes métodos de detección del estrés oxidativo y, concretamente, de la peroxidación lipídica, se decide testar la utilidad del método de tinción BODIPY-C11 utilizando para ello el dispositivo Cytation5. Los objetivos de este proyecto incluyen: la titulación de PQ y BODIPY-C11 utilizando cultivos de células HeLa, la comparativa entre diferentes métodos de detección de peroxidación lipídica, la adquisición de conocimientos generales con respecto a las actividades del laboratorio y la aplicación de los conocimientos adquiridos durante la carrera y durante la realización del proyecto.

Para comprobar la hipótesis, se han seguido una secuencia de procedimientos que se expondrán a continuación. En primer lugar, se estableció un primer contacto tanto con la línea celular y como con el Cytation5, realizando múltiples pases celulares, tinciones con Hoechst y tomando imágenes utilizando dicho equipo. Se observó que las mejores imágenes y contaje celular se obtienen a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup>. De esta manera, las células se encuentran dispuestas en una monocapa con una confluencia menor a la del 100%, que permite la distribución homogénea de Hoechst sobre la superficie de estas. Así, el algoritmo de contaje incorporado al Cytation5 puede realizar un contaje más fidedigno. Se comprobó que tras el correspondiente ajuste de los parámetros utilizados para el reconocimiento de objetos (tamaño medio, mínimo y máximo, fuerza en la discriminación, intensidad media de los objetos, entre otros), este algoritmo es muy eficiente y robusto para llevar a cabo dicha tarea. Además, se comprobó que la dilución óptima del Hoechst es de 1:15.000 en PBS.

A continuación, se realizaron los primeros experimentos relacionados con la peroxidación lipídica. Como agente prooxidante se utilizó el PQ, y como primer método de detección se utilizó el marcaje con anticuerpo anti-4-HNE, que interacciona con el aducto de la peroxidación 4-HNE. Se probaron tres concentraciones de anticuerpo, determinándose como el rango óptimo entre 1:1.000 y 1:2.000. Posteriormente, se realizó la titulación de PQ, en la que se aplicaron diferentes concentraciones (desde 0,15 mM a 0,5 mM) durante diferentes tiempos de exposición (24 y 48 h). Los resultados obtenidos indicaron que para la determinación del estrés oxidativo mediante el anticuerpo anti-4-HNE la concentración óptima era 0,3 mM de PQ a 24 h de exposición, ya que no se evidenciaba demasiada muerte celular en el pocillo. Cabe destacar que, tras la inspección visual de las imágenes, se observaba mayor intensidad en la célula viva siguiendo una distribución perinuclear; esto se podría justificar como una consecuencia de la activación de las rutas metabólicas de protección frente al 4-HNE, mediada por orgánulos perinucleares, o que simplemente este aducto tenga más afinidad por dichos orgánulos (Li *et al.*, 2022).

Posteriormente, se procedió a realizar los primeros experimentos con BODIPY-C11. El primer experimento consistió en la titulación de BODIPY-C11, probando con varias concentraciones de la sonda (1, 2 y 4  $\mu$ M), aplicando a una sola concentración de PQ (0,3 mM durante 24 h de exposición). Se realizó además un análisis del efecto del tiempo sobre la misma señal. Como conclusiones se determinó que BODIPY-C11 es estable en la toma de sus medidas en un rango de tiempo de entre 20 min y 40 min tras su adición al cultivo (con unos resultados ligeramente mejores a los 20 min). Sin embargo, a mayor tiempo se produce una mayor formación de excímeros, lo que introduce una cierta inestabilidad temporal (los excímeros añaden ruido a la señal de BODIPY-C11 oxidado, sobreestimando su valor). Las concentraciones utilizadas para este experimento daban valores de excímeros muy altos. Se determinó que el efecto de PQ se registraba más claramente cuando se aplicaba BODIPY-C11 a una concentración 1  $\mu$ M.

A continuación, se diseñaron nuevos experimentos en los que se variaba la concentración tanto del PQ como de BODIPY-C11 para estudiar el comportamiento de la sonda y, además, caracterizar los excímeros. Se fueron reduciendo los valores de la concentración de BODIPY-C11 hasta alcanzar 0,25 y 0,5  $\mu$ M. Se determinó la concentración 0,25  $\mu$ M como aquella para la que los excímeros no varían en su valor independientemente de la concentración de PQ. De esta manera, se obtiene un valor aproximadamente constante para cada pocillo, que es restado al valor de BODIPY-C11 oxidado, y así se elimina ese ruido adicional de la señal; esta es la concentración máxima de BODIPY-C11 con la que no se producen artefactos (0,5  $\mu$ M). Por otro lado, calculando la ratio de concentración de la señal de BODIPY-C11 oxidado frente al total, se observa que la sonda posee una relación proporcional relativamente lineal con la concentración de PQ en un rango de 0 a 0,2 mM (para la concentración de 0,25  $\mu$ M se obtiene una  $R^2 = 0,9212$ , y para 0,5  $\mu$ M una  $R^2 = 0,9463$ ).

Se observó que BODIPY-C11 detectaba el efecto de concentraciones de PQ menores con respecto a las utilizadas en los experimentos de tinción con anticuerpo anti-4-HNE. BODIPY-C11 es sensible hasta para concentraciones de PQ de 0,05 mM (nuevamente, a 24 h de exposición), por lo que en esos términos se concluye una mayor eficiencia en la toma de medidas de estrés oxidativo. Por otro lado, cabe mencionar otra de las ventajas que supuso el uso de BODIPY-C11 frente al anticuerpo anti-4-HNE: la inmunocitoquímica se realizó sobre células fijadas, lo cual no permite el estudio de células vivas y la medida que se obtiene es una medida de producto final de estrés oxidativo. BODIPY-C11, sin embargo, permite la obtención de medidas *in vivo*, proporcionando la medida de daño oxidativo en un instante de tiempo determinado, pudiendo incluso dar señales dinámicas de la evolución en un determinado rango de tiempo (en el que BODIPY-C11 es estable, dada la escasa formación de excímeros).

Una vez determinada la concentración óptima de BODIPY-C11, se planteó realizar el primer experimento añadiendo ApoD. Como primera prueba se propuso añadir la proteína y PQ simultáneamente, dejar el tratamiento durante 24 h, y realizar la medida de BODIPY-C11. Se añadió ApoD a dos concentraciones distintas: 10 y 20 nM, utilizando 0,25  $\mu$ M BODIPY-C11 y diferentes concentraciones de PQ. Calculando la ratio de señal de BODIPY como se hizo en los experimentos anteriores, se obtienen unos buenos resultados tanto para los pocillos sin tratamiento de ApoD como para la concentración de ApoD de 10 nM, en los que se evidencia que sin ApoD el daño oxidativo (que se deduce de un aumento de señal de BODIPY-C11 oxidado) aumenta proporcionalmente a la concentración de PQ. En los cultivos con ApoD se observa que el daño oxidativo es inversamente proporcional a dicha concentración y además se ven mayores niveles de BODIPY-C11 oxidado para concentraciones de 0,05 y 0,1 mM de PQ comparado con el control. Cuando se añade una concentración 0,2 mM de PQ sí que se observa una clara disminución de BODIPY-C11 oxidado en los cultivos tratados con 10 nM ApoD. Sin embargo, para la concentración de ApoD 20 nM, no se observa un claro patrón de respuesta al tratamiento con PQ. Es cierto que se sabe que una alta concentración de ApoD en la célula puede inducir el efecto contrario al esperado de la proteína (Ganformina *et al.*, 2008).

## 5.2. Limitaciones

A lo largo de la realización de este proyecto se han presentado una serie de limitaciones que se deberían tener en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos.

- La primera puede resultar la más evidente: si se deseaba evaluar el efecto neuroprotector de ApoD utilizando para ello BODIPY-C11, ¿por qué no se han utilizado para ello células derivadas del sistema nervioso que, según la bibliografía consultada, expresan naturalmente esta proteína? Esta pregunta se contesta con varias razones, aunque principalmente se resume en la idoneidad de la línea celular HeLa para este proyecto en concreto. La primera es la escasa formación de la autora con respecto a las destrezas del laboratorio, y más aún en cultivos celulares. La línea celular HeLa es una línea celular de proliferación rápida y robusta frente a una mala praxis debida a una poca experiencia en el trabajo de laboratorio, lo cual facilita la puesta a punto de las técnicas sin perder una gran cantidad de valiosos recursos.

Por otro lado, es una línea celular de características muy conocidas y estandarizadas en el ámbito científico, lo que reduce considerablemente variables incontrolables y no conocidas que pudieran aparecer a lo largo de la realización de este trabajo, dando resultados más concretos y de un menor sesgo. Además, son unas células fácilmente transfectables, y los planes futuros de este proyecto pasan por estudiar el efecto de la sobreexpresión de ApoD en la célula realizando la medida con BODIPY-C11, por lo que

cabe estandarizar la práctica con esta técnica en esta línea celular anteriormente. Si bien es cierto que, para obtener resultados más fiables para la prueba de la hipótesis propuesta, se debería utilizar una línea celular cuyo origen sea el sistema nervioso (como pudiera ser por ejemplo las SH-SY5Y). Los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto son un primer paso en la dirección propuesta.

- Otra limitación que cabe destacar recae en la obtención de las medidas de BODIPY-C11 durante este proyecto. Si una de sus ventajas con respecto a las demás técnicas de medida del estrés oxidativo es que éste ofrece información de la localización subcelular del daño oxidativo, ¿por qué se han obtenido exclusivamente medidas numéricas de la media de cada pocillo para cada tipo de señal? El equipo de Cytation5 del que se disponía en el laboratorio no contaba con la opción de realizar estudios de microscopía confocal, que es el tipo de técnica necesaria para realizar estudios a nivel subcelular. El uso del equipo Cytation5 en la realización de este proyecto era imprescindible: captura imágenes (requisito necesario para realizar contajes celulares según lo propuesto en la planificación) y señal de manera automatizada, lo que permite rapidez en su obtención. Además, permite la selección aleatoria del marco en el que se tomará la señal o imagen, por lo que se elimina un posible sesgo de muestreo en el confocal. Por último, cabe resaltar que Cytation5 posibilita la obtención de medidas e imágenes en células vivas. Si bien, de cara a proyectos futuros, el estudio de la localización subcelular de la señal de BODIPY-C11 es un objetivo a perseguir, según la bibliografía consultada, las sondas de BODIPY-C11 se distribuyen a lo largo de la membrana de manera heterogénea y no se ha identificado un patrón claro en dicha distribución. Paralelamente, ApoD también se distribuye de manera heterogénea a lo largo de la membrana, concentrándose en zonas de alta densidad de ácidos grasos saturados, por lo que debido a una posible distribución de BODIPY-C11 a lo largo de la membrana distinta a la de ApoD, este podría no señalar su efecto protector adecuadamente. Además, se ha evidenciado que ApoD tiene poder de unión a orgánulos como los lisosomas, al contrario de BODIPY-C11 que no muestra preferencia por ningún orgánulo, por lo que nuevamente podría infraestimar el poder de protección de ApoD.
- La siguiente limitación se ha mencionado anteriormente de forma indirecta. La autora no poseía la suficiente experiencia con respecto a las técnicas de un laboratorio en biología molecular. Esto ha dado pie a varios errores en la consecución de los diferentes experimentos que se propusieron en la planificación inicial del proyecto, lo cual provocó que algunos resultados se vieran alterados con respecto a lo esperado, y que el desarrollo en general del proyecto se ralentizara, y no se tuviera tiempo para realizar un último experimento necesario para obtener unos resultados más robustos.
- Con respecto al experimento en el que se añadió ApoD en el cultivo celular simultáneamente al tratamiento de estrés oxidativo, esto puede dar pie a unos resultados sesgados, ya que la línea celular HeLa, al ser derivadas de un adenocarcinoma cervicouterino, no expresa naturalmente la proteína ApoD, por lo que, al añadirla simultáneamente al agente pro-oxidante, puede que las células no incorporaran la proteína y esta no ejerció correctamente su función antioxidante. Por ello se propone un experimento que probablemente proporcionara resultados más precisos, en el que la proteína se añada previamente (con un margen de 2 h) al PQ, y así las células puedan incorporar el antioxidante endocitándolo.

### 5.3. Consecución de los objetivos

Tras la realización del proyecto, cabe realizar una última revisión acerca de los objetivos propuestos para la planificación y un análisis de su consecución. Se subdividieron los objetivos específicos refiriéndose al proyecto desde dos puntos de vista: como un trabajo de investigación y desde un enfoque formativo de la autora. Por lo que la discusión de estos se hará nuevamente de manera aislada.

Por un lado, desde el punto de vista de un proyecto de investigación, se propusieron cinco objetivos específicos, de los que se concluye que generalmente todos fueron alcanzados. En primer lugar, se estableció la titulación de PQ, en la que se describieron los efectos de diferentes concentraciones de PQ a diferentes tiempos de exposición y para diferentes densidades de siembra en el cultivo celular de HeLa. Además, se estandarizaron las concentraciones óptimas tanto de PQ como de densidad celular para cada técnica de medida de estrés oxidativo: por debajo de la concentración de PQ de 0,3 mM (a 24 h de exposición) se obtenían imágenes de baja calidad para la detección y caracterización del daño oxidativo usando un anticuerpo anti-4-HNE. En el caso de BODIPY-C11, es sensible hasta las mínimas concentraciones de PQ (la concentración mínima probada es de 0,05 mM a 24 h). Cabe recordar que ambas medidas se toman utilizando el equipo de Cytation5; probablemente las concentraciones determinadas puedan variar en función del dispositivo de medida (y sobre todo de la técnica) con la que se obtengan los datos.

Con relación del uso del Cytation5 en la realización de este proyecto, se especificaron con éxito los ajustes y parámetros necesarios para la toma de medidas de calidad para cada uno de los experimentos. Se establecieron las concentraciones mínimas de marcaje con Hoechst para estimar la densidad celular óptima y así obtener los mejores resultados posibles de conteo, se automatizaron los procesos de toma de imagen y procesado para cada uno de los tipos de imagen que se han obtenido (de fluorescencia de Hoechst y de inmunocitoquímica), y se establecieron protocolos además para la medida de señal de BODIPY-C11 de manera automática. Todo esto permitió la dinamización de la toma de datos cuantificables de los cultivos celulares.

En términos de la titulación de reactivos, era imprescindible como objetivo para este proyecto la de BODIPY-C11. Para ello se han realizado varios experimentos partiendo de una concentración de BODIPY-C11 de hasta 4  $\mu\text{M}$ , y se fue reduciendo su concentración hasta alcanzar el valor de 0,25  $\mu\text{M}$  (esto fue así para evitar la formación de excímeros). De manera que se adquirió un rango de concentraciones óptimo de BODIPY-C11 (entre 0,25 y 0,5  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente a esto, se pudo cumplir el siguiente objetivo propuesto en el que se establece una comparativa entre ambas técnicas de medida del estrés oxidativo utilizadas.

El último objetivo específico propuesto para la realización del proyecto de investigación supone la observación de los efectos de ApoD mediante los efectos que acusa BODIPY-C11. Este puede ser el objetivo más incompleto, ya que, si bien sí se observaron efectos coherentes para la concentración de ApoD 10 nM, para 20 nM difirieron de lo esperado. El objetivo no se cumple del todo porque no se realizaron nuevas experiencias tanto como para respaldar lo obtenido como para probar nuevas alternativas para obtener más información de la actividad de la proteína.

Por otro lado, con respecto a los objetivos específicos de formación en el TFG, se cumplieron todos con éxito. Se lograron los conocimientos en las técnicas generales de cultivos celulares, inmuncitoquímica, comparativa y comprensión de los diferentes métodos para la medida de peroxidación lipídica, y la adquisición e interpretación de la información que se obtuvo a lo largo del proyecto, tanto a nivel bibliográfico como a nivel experimental. Además, se pudieron aplicar muchos conocimientos adquiridos a lo largo del Grado para el tratamiento de imágenes: tanto en

el momento de la adquisición, escogiendo los preprocesados más adecuados para cada tarea, como tras la captura de imágenes, para la extracción de información cuantitativa.

Por último, con respecto al objetivo principal, se concluye que no se cumple en su totalidad; si bien sí se alcanza parcialmente, ya que sólo se alcanzan las bases esenciales del proyecto, quedan por probar su finalidad principal: el de estandarizar el uso de BODIPY para la caracterización de ApoD. Quedan muchos aspectos por comprobar, sin embargo, este proyecto ha abierto nuevas incógnitas y ha dado los primeros pasos en la línea propuesta.

## 6. Conclusiones

Las enfermedades neurodegenerativas son un problema de gran impacto social y económico, del que se estima que crecerá en importancia durante las próximas décadas. Son de difícil diagnóstico y tratamiento, por ello es crucial la búsqueda y estudio de sus mecanismos biomoleculares. Su relación con el estrés oxidativo con las células del SNC está bien establecida, por lo que durante este proyecto se pone el foco en la proteína ApoD, quien tiene un poder antioxidante de defensa frente al estrés oxidativo. Dado que se ha observado que la función de protección de ApoD se establece especialmente entorno a las membranas, se ha propuesto el uso de una sonda que reaccione frente a la peroxidación lipídica de las membranas como consecuencia del estrés oxidativo para comprobar la actividad de ApoD: BODIPY-C11.

Se ha utilizado el equipo que combina técnicas de microscopía automatizada y detección convencional en microplaca Cytation5. Se ha obtenido que para los mejores resultados de conteo automático en la línea celular HeLa, se deben sembrar a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup> y teñir con Hoechst a una concentración de 1:15.000. Se probaron dos métodos de detección de estrés oxidativo: inmunocitoquímica con anticuerpo anti-4-HNE y tinción con BODIPY-C11. Para observar el efecto de estrés oxidativo a través de la inmunocitoquímica con respecto de BODIPY-C11: necesitaba concentraciones más altas de PQ, requiere más tiempo en general para obtener las medidas, la cuantificación del daño oxidativo es más compleja y no permite el estudio de células vivas (mide el efecto final). BODIPY-C11 posee un comportamiento predecible, de relación aproximadamente lineal con el daño de peroxidación lipídica (cuando se encuentre a las concentraciones adecuadas para que no se formen excímeros), sensible a bajas concentraciones de agente prooxidante y relativamente estable a lo largo de un determinado rango de tiempo, por lo que es de gran utilidad para medir el estado de las membranas celulares bajo estrés oxidativo. Aunque no se posee la suficiente evidencia como para realizar afirmaciones sobre la utilidad de BODIPY-C11 para la medida de la acción de ApoD, este estudio resulta como preliminar para ahondar en esta línea de investigación, ya que se observa que para determinadas concentraciones de ApoD en cultivos celulares de HeLa, BODIPY-C11 detecta correctamente su acción. Se proponen repetir experimentos, variando los tiempos de exposición de ApoD, obtención de la información de localización subcelular tanto de BODIPY-C11 como de ApoD, y diferentes concentraciones de BODIPY-C11 (dentro del rango que se ha establecido a lo largo del proyecto en el que no se producen excímeros). Más adelante, sería interesante además realizar el mismo tipo de estudio sobre una línea celular de procedencia o de características del SNC.

## BIBLIOGRAFÍA

Ahmad S.I., editor. Neurodegenerative Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US; New York, NY, USA: 2012.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.

Ayrault Jarrier M, Levy G, Polonovsky J. Study of human serum Alpha-Lipoproteins by Immunoelectrophoresis. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 1963;45:703–13.

Bhatia S, Knoch B, Wong J, Kim WS, Else PL, Oakley AJ, *et al.* Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. *Biochem J* 2012a;442:713–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20111166>.

Bhatia S, Knoch B, Wong J, Kim WS, Else PL, Oakley AJ, *et al.* Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. *Biochem J* 2012b;442:713–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20111166>.

BODIPY Lipid Probes. Molecular Probes. ThermoFisher 2003. [cited 2023 Jul 2]. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp03792.pdf>

Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, *et al.* A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *Journal of Clinical Investigation* 1989;83:1015. <https://doi.org/10.1172/JCI113943>.

Checkoway H, Lundin JI, Kelada SN. Neurodegenerative diseases. *IARC Sci Publ* 2011;407–19. <https://doi.org/10.1071/rdv24n1ab251>.

Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging* 2014;35:1632. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2014.01.148>.

Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2005;1703:93–109. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2004.08.007>.

Domínguez-Rebolledo Á, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Del Olmo E, Bisbal A, Ros-Santaella JL, *et al.* Comparison of the TBARS Assay and BODIPY C11 Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 2010;45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01578.x>.

Drummen GPC, Gadella BM, Post JA, Brouwers JF. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY581/591. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1635–44. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.03.014>.

Drummen GPC, Van Liebergen LCM, Op den Kamp JAF, Post JA. C11-BODIPY581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med* 2002;33:473–90. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00848-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00848-1).

Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol 2017;9. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A028035>.

Eichinger A, Nasreen A, Hyun JK, Skerra A. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. Journal of Biological Chemistry 2007;282:31068–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703552200>.

Elliott DA, Weickert CS, Garner B. Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders 2010. <https://doi.org/10.2217/CLP.10.37>.

Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol 2018;10. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A033118>.

Finkel L, Arroyo M, Crespo C, Garcés M. Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social. Universidad Complutense y Neuroalianza; 2016 Mar.

Calidad DG de la A de C del SO de PS y. Mejorar atención pacientes [Internet]. [www.sanidad.gob.es](http://www.sanidad.gob.es). 2006 [cited 2023 Jul 2]. Available from: <https://www.sanidad.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/enfermedadesNeurodegenerativas.htm>

Flower DR. The lipocalin protein family : structure and function. vol. 318. 1996.

Fyfe-Desmarais G, Desmarais F, Rassart É, Mounier C. Apolipoprotein D in Oxidative Stress and Inflammation. Antioxidants 2023;12. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12051027>.

Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, *et al.* Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. Aging Cell 2008;7:506–15. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00395.x>.

García-Mateo N, Ganfornina MD, Montero O, Gijón MA, Murphy RC, Sanchez D. Schwann cell-derived Apolipoprotein D controls the dynamics of post-injury myelin recognition and degradation. Front Cell Neurosci 2014;8. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00374/ABSTRACT>.

Geddes JW, Sullivan PG. Special Issue: Mitochondria and neurodegeneration. Exp Neurol 2009;218:169–70. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.011>.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol 2004;142:231. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0705776>.

Hansson O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. Nat Med 2021;27:954–63. <https://doi.org/10.1038/S41591-021-01382-X>.

Haywood RM, Wardman P, Gault DT, Linge C. Ruby Laser Irradiation (694 nm) of Human Skin Biopsies: Assessment by Electron Spin Resonance Spectroscopy of Free Radical Production and Oxidative Stress during Laser Depilation. Photochem Photobiol 1999;70:348–52. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1999.TB08147.X>.

Held, P.G., Clayton, J., & Banks, P. High Contrast Brightfield Enabling microplate-based automated label-free cell counting. Technical Overview. Agilent. 2016.

Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, *et al.* Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2019;15:565–81.

<https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>.

INEbase / Demografía y población /Cifras de población y Censos demográficos /Cifras de población / Últimos datos [Internet]. INE. Available from:

[https://ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C&cid=1254736176951&menu=ultiDatos&idp=1254735572981](https://ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176951&menu=ultiDatos&idp=1254735572981) (accessed July 2, 2023).

Kaur H, Halliwell B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem Biol Interact* 1990;73:235–47. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(90\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0009-2797(90)90006-9).

Lewis PA, Spillane JE. An Introduction to Neurodegeneration. *The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease* 2019:1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811069-0.00001-X>.

Li H, Ruberu K, Karl T, Garner B. Cerebral Apolipoprotein-D Is Hypoglycosylated Compared to Peripheral Tissues and Is Variably Expressed in Mouse and Human Brain Regions. *PLoS One* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0148238>.

Li Yanling, Zhao T, Li J, Xia M, Li Yuling, Wang X, *et al.* Oxidative Stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the Pathogenesis and Treatment of Aging-related Diseases. *J Immunol Res* 2022;2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2233906>.

Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2009;674:137–47. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2008.09.015>.

Liu CL, Zhur O, Yan XT, Yin TT, Rao HL, Xiao X, *et al.* A Method for Detecting Antioxidant Activity of Antioxidants by Utilizing Oxidative Damage of Pigment Protein. *Appl Biochem Biotechnol* 2022;194:5522–36. <https://doi.org/10.1007/S12010-022-04058-5/FIGURES/6>.

Loudet A, Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem Rev* 2007;107:4891–932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.

McConathy WJ, Alaupovic P. Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry* 1976;15:515–20. <https://doi.org/10.1021/BI00648A010>.

Mendonça J da S, Guimarães R de CA, Zorretto-Pinheiro VA, Fernandes CD Pietro, Marcelino G, Bogo D, *et al.* Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 3563 2022;27:3563. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27113563>.

Najyb O, Brissette L, Rassart E. Apolipoprotein D internalization is a basigin-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290:16077–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644302>.

Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, *et al.* Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* 2015 53:6 2015;53:4094–125. <https://doi.org/10.1007/S12035-015-9337-5>.

Pap EHW, Drummen GPC, Winter VJ, Kooij TWA, Rijken P, Wirtz KWA, *et al.* Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY581/591. *FEBS Lett* 1999;453:278–82. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00696-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00696-1).

Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 2006;52:201–43. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2006.02.002>.

Rassart E, Desmarais F, Najyb O, Bergeron KF, Mounier C. Apolipoprotein D. *Gene* 2020;756:144874. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.144874>.

Ruiz M, Sanchez D, Correnti C, Strong RK, Ganfornina MD. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J* 2013;280:3928–43. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12394>.

Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-045037> 2017;86:715–48. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-045037>.

Stockert JC. Lipid peroxidation assay using bodipy-phenylbutadiene probes: A methodological overview. *Methods in Molecular Biology* 2021;2202:199–214. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0896-8\\_16/FIGURES/4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0896-8_16/FIGURES/4).

Themann C, Teismann P, Kuschinsky K, Fergert B. Comparison of two independent aromatic hydroxylation assays in combination with intracerebral microdialysis to determine hydroxyl free radicals. *J Neurosci Methods* 2001;108:57–64. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(01\)00370-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00370-3).

Treibs A, Kreuzer F -H. Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann Chem* 1968;718:208–23. <https://doi.org/10.1002/JLAC.19687180119>.

Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003;42:318–43. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00014-6).

Ulrich G, Ziessel R, Harriman A. The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed. *Angewandte Chemie International Edition* 2008;47:1184–201. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200702070>.

Wafa Mazi. Near-Infrared fluorescent probes for sensitive determination of lysosomal & mitochondrial pH in live cells 2019. [https://www.researchgate.net/publication/335756650\\_NEAR-INFRARED\\_FLUORESCENT\\_PROBES\\_FOR\\_SENSITIVE\\_DETERMINATION\\_OF\\_LYSOSOMAL\\_MITOCHONDRIAL\\_pH\\_IN\\_LIVE\\_CELLS/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/335756650_NEAR-INFRARED_FLUORESCENT_PROBES_FOR_SENSITIVE_DETERMINATION_OF_LYSOSOMAL_MITOCHONDRIAL_pH_IN_LIVE_CELLS/figures?lo=1) (accessed June 27, 2023).

## APÉNDICE

### GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **EA:** enfermedad de alzheimer
- **EP:** enfermedad de Parkinson.
- **ELA:** Esclerosis lateral múltiple.
- **ER:** Especies Reactivas
- **Redox:** reducción-oxidación
- **4-HNE:** 4-Hidroxi-2-nonenal
- **ApoD:** Apolipoproteína ApoD
- **BODIPY-C11:** 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-ácido-s-indaceno-3-undecanoico
- **PBS:** Tampón Fosfato Salino
- **FBS:** Suero Fetal Bovino
- **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- **P/S:** Penicilina-estreptomicina
- **Anti-4-HNE:** Anticuerpo anti-4-Hidroxi-2-nonenal
- **PQ:** Paraquat (Metil viologen hidrato de dicloruro)
- **DMSO:** dimetil sulfóxido
- **h:** horas
- **min:** minutos
- **°C:** grados centígrados
- **cé/cm<sup>2</sup>:** células por centímetro cuadrado
- **g/L:** gramos por litro
- **mL:** mililitros
- **µL:** microlitros
- **mM:** milimolar
- **µM:** micromolar
- **nM:** nanomolar
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **nm:** nanómetros

## CÓDIGO

```
path_tfg='C:\Users\iarig\Documents\MATLAB\tfg\foticos\'; %dirección en la que
se encuentran las fotos correspondientes a un pocillo
reg_tfg=dir([path_tfg '*.png']); %buscar los archivos .png en esa dirección

val=0;
sumed=zeros(1,length(reg_tfg(:))); %inicializar las variables

for i=1:(length(reg_tfg(:)))
    I=imread([path_tfg reg_tfg(i).name]); %definir como imagen todos esos
archivos
    IM=im2double(I); %convertir cada imagen a matriz de números
    G=IM(:, :,2); % extraer el canal correspondiente al verde (el segundo)
    val=val+sum(G, 'all'); % un contador en el que se va sumando la intensidad
de fluorescencia total
    sumed(1,i)=mean(G, 'all'); %intensidad media de cada imagen
end

cont=[20, 40, 60, 20, 57]; %lista de contajes para cada una de las imágenes
sumednorm=sumed./cont; %normalizar por el número de células la intensidad
media
med= mean(sumednorm); %intensidad media del pocillo
desv=std(sumednorm); %desviación estándar de la media del pocillo
int=val/sum(cont); %intensidad total del pocillo normalizado por el número de
células
```