

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Grado en Ciencias Ambientales

Facultad de Ciencias Experimentales

ALTERACIONES TRANSCRIPTÓMICAS INDUCIDAS POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN UN MODELO DE CÉLULA GLIAL HUMANA

Trabajo de Fin de Grado

Alejandro Coves García

Elche, julio de 2018

Curso académico 2017-2018

Directores: Héctor Candela Antón (Área de Genética)
Miguel Ángel Sogorb Sánchez (Área de Toxicología)

Instituto de Bioingeniería y Departamento de Biología Aplicada

D. Héctor Candela Antón y D. Miguel Ángel Sogorb Sánchez, profesores del Área de Genética y Toxicología del Departamento de Biología Aplicada e investigadores del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

que don Alejandro Coves García, estudiante del Grado en Ciencias Ambientales por la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado **“Alteraciones transcriptómicas inducidas por nanopartículas de plata en un modelo de célula glial humana”** incluido en la memoria de este Trabajo de Fin de Grado.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente certificación,

En Elche, junio de 2018

Profesor Héctor Candela Antón

Profesor Miguel Ángel Sogorb Sánchez

ABREVIATURAS

Ag-NPs = Nanopartículas de plata

AOPs = Rutas de efecto adverso (por *Adverse Outcome Pathways*)

GO = Ontología génica (por *Gene Ontology*)

NMs = Nanomateriales

RIN = Número de integridad del RNA (por *RNA Integrity Number*)

PANTHER = Análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas (por *Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships*)

SNC = Sistema nervioso central

TFG = Trabajo de Fin de Grado

FUENTE DE FINANCIACIÓN

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha desarrollado dentro del proyecto de investigación titulado: *“Hacia un nuevo paradigma en la identificación de peligros y evaluación de la seguridad y el riesgo de neurotoxicidad asociado la exposición a nanomateriales con aplicaciones biotecnológicas”* (referencia CIVP18A3939) financiado por la Fundación Ramón Areces en el marco del XVIII Concurso Nacional de Investigación en Ciencias de la Vida y la Materia y cuyo investigador principal es el profesor Miguel Ángel Sogorb Sánchez.

ÍNDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. El proyecto de investigación en que se enmarca este trabajo	8
1.2. Elección de un sistema diana de toxicidad para este trabajo	8
1.3. Elección de un modelo celular <i>in vitro</i> para este trabajo	9
1.4. Elección de un nanomaterial modelo para este trabajo	11
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	12
2.1. Antecedentes	12
2.1.1. Caracterización física y comportamiento en el medio de Ag-NPs utilizados	12
2.2. Citotoxicidad de Ag-NPs en células T98G de glioblastoma humano.....	14
2.2.1. Incorporación a Ag-NPs a células T98G de glioblastoma humano	14
2.2.2. Extracción del ARN de células expuestas de 40 µg Ag-NPs/ml durante 72 horas..	15
2.2.3. Envío del ARN a un proveedor externo para secuenciación masiva.....	15
2.3. Objetivos	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Calidad de ARN.....	16
3.2. Secuenciación masivamente paralela de ARN	16
3.3. Análisis bioinformático.....	17
3.3.1. Procesamiento previo de las lecturas	17
3.3.2. Alineamiento de las lecturas al genoma humano	17
3.3.3. Cuantificación de los niveles de expresión	18
3.3.4. Análisis ontológico	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Evaluación de la calidad del ARN.....	20
4.2. Secuenciación masivamente paralela de ARN	21
4.2.1. Caracterización inicial de las secuencias obtenidas	21
4.2.2. Alineamiento de las secuencias al genoma de referencia	22
4.2.3. Genes expresados diferencialmente	24
4.3. Anotación de los genes expresados diferencialmente	27
4.3.1. Rutas metabólicas.....	32
5. DISCUSIÓN	33
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	36
6.1. Conclusiones.....	36
6.2. Proyección futura.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA	38
8. ANEXOS	41

8.1. Anexo 1. Resultados obtenidos al reanalizar los datos tras eliminar las lecturas duplicadas	41
8.2. Agradecimientos.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rango de tamaños de diferentes materiales naturales y artificiales.....	7
Figura 2. Respuestas celulares debidas a nanomateriales	10
Figura 3. Caracterización y comportamiento de cultivo de Ag-NPs.....	13
Figura 4. Etapas de una secuenciación masivamente paralela mediante la plataforma Illumina.....	17
Figura 5. Electroferogramas obtenidos mediante un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer.	21
Figura 6. Características de las lecturas evaluadas por el programa FastQC.....	23
Figura 7. Mapa de calor de los niveles de expresión.	28
Figura 8. Modelo generalizado de pasos secuenciales implicados en la respuesta inflamatoria en un tejido.	35
Figura 9. Mapa de calor de los niveles de expresión sin duplicados.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Valores RIN de las muestras sometidas a secuenciación masivamente paralela ..	20
Tabla 2.- Datos brutos de la secuenciación masivamente paralela.	22
Tabla 3.- Alineamiento de las lecturas al genoma de referencia.	23
Tabla 4.- Genes expresados diferencialmente.	24
Tabla 5.- Denominación de los productos de los genes expresados diferencialmente.	26
Tabla 6.- Términos de la ontología de función molecular sobrerrepresentados entre los genes expresados diferencialmente	29
Tabla 7.- Términos de la ontología de procesos biológicos sobrerrepresentados entre los genes expresados diferencialmente	29
Tabla 8.- Términos de la ontología génica asociados a los genes expresados diferencialmente	30
Tabla 9.- Alteraciones en las rutas metabólicas causadas por la exposición a Ag-NPs.....	32
Tabla 10.- Genes expresados diferencialmente según el análisis realizado tras eliminar las lecturas duplicadas.....	41
Tabla 11.- Denominación de los productos de los genes expresados diferencialmente según el análisis realizado tras eliminar las lecturas duplicadas	43
Tabla 12.- Tabla donde se muestran los genes sobrerrepresentados. Datos obtenidos del análisis con Pantherdb GO-Slim.....	45

RESUMEN

La nanotecnología presenta una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas y biomédicas, que ofrecen la posibilidad de conseguir grandes mejoras en el bienestar social y otros muchos campos. No obstante, cualquier aplicación de nanomateriales (NMs) tiene que demostrar su seguridad para con la salud humana y el medio ambiente antes de ser aprobada para su uso. El tamaño de los NMs, que tienen en alguna de sus dimensiones una longitud inferior a 100 nm, hace que sus propiedades no puedan ser extrapoladas a partir de sus equivalentes a escala no nanométrica y, por ello, se requiere un estudio de seguridad caso por caso. Dado el gran número de NMs existentes y potencialmente utilizables, esto supone un obstáculo para su implementación inmediata. Se ha comprobado que los NMs pueden causar citotoxicidad, genotoxicidad y estrés oxidativo, procesos que podrían conducir a neurodegeneración. Este proyecto busca analizar los efectos en el transcriptoma de las células de glioblastoma humano T98G de nanopartículas de plata. La exposición de células T98G a nanopartículas de plata a una concentración no citotóxica causó alteraciones estadísticamente significativas en la expresión de 43 genes que pertenecieron a diferentes términos de cada una de las tres subcategorías de la ontología génica. También se alteraron 12 diferentes rutas metabólicas, siendo la neuroinflamación y la ruta de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos aquellas con una relevancia fisiológica más evidente.

Palabras clave: transcriptoma, nanopartículas de plata, glioblastoma, análisis bioinformático, nanotecnología, nanotoxicología.

ABSTRACT

Nanotechnology presents a wide range of biotechnological and biomedical applications which offer the possibility to achieve great improvements in social welfare and other fields. However, any application of nanomaterials (NMs) must demonstrate its safety for human health and the environment before their applications receive approval for use. Due to the size of NMs, which have at least one dimension smaller than 100 nm, their properties cannot be extrapolated from equivalent materials in non-nanometric scale. For this reason, a case-by-case safety study is needed. Indeed, the large amount of NMs currently available and potentially usable is an obstacle to their immediate implementation. NMs are known to produce cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress, processes that might lead to neurodegeneration. This project seeks to analyse the effects in the transcriptome of human glioblastoma T98G cells of silver nanoparticles. The exposure of T98G cells to silver nanoparticles at a non-cytotoxic concentration caused statistically significant alterations in the expression of 43 genes, which belonged to different terms of each of the three subcategories of the gene ontology. Twelve different metabolic pathways were also altered with these 42 genes, being neuroinflammation and the signalling pathway of fibroblast growth factor those with a more evident physiological relevance.

Keywords: transcriptome, silver nanoparticles, glioblastoma, bioinformatics analysis, nanotechnology, nanotoxicology.

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología implica el uso de materiales particulados que tienen, en al menos en una de sus dimensiones, un tamaño inferior a 100 nanómetros (Hoyt y Mason, 2009) (Figura 1). La nanotecnología es uno de los desarrollos tecnológicos más importantes en los inicios del siglo XXI y ha permitido la identificación de propiedades únicas en nanomateriales (NMs) que han conducido al desarrollo de aplicaciones comerciales en muchos campos, incluyendo la alimentación, la cosmética (Katz et al., 2015) o la biomedicina. Dos ejemplos son su aplicación a la administración de medicamentos dirigida específicamente hacia el tejido lesionado o que se pretenda tratar y a los diagnósticos mediante imagen (Parveen et al., 2012).

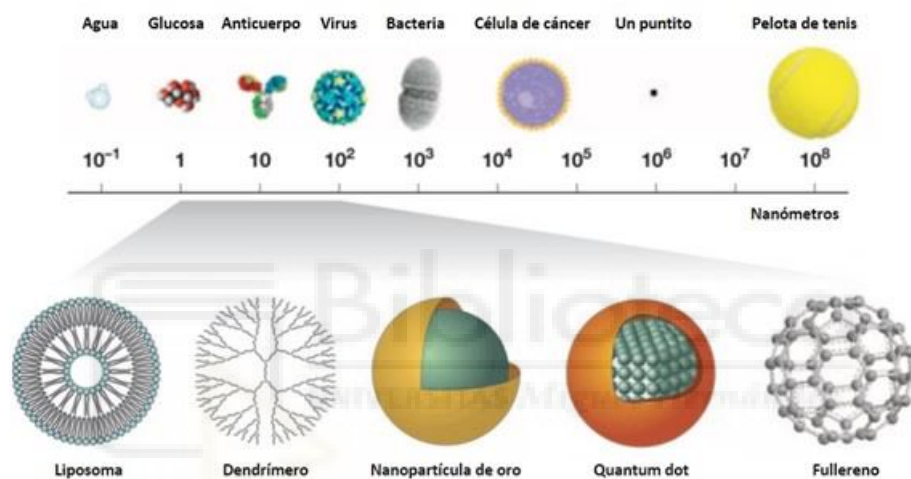


Figura 1. Rango de tamaños de diferentes materiales naturales y artificiales. Los NMs manufacturados se sitúan en el rango entre 1 y 100 nm.

Las aplicaciones nanotecnológicas deben demostrar su seguridad para la salud y el medio ambiente antes de su autorización e implementación en la sociedad. Un problema importante en el caso de los NMs es que, debido a su tamaño de partícula, las propiedades toxicológicas no pueden ser inferidas a partir de las de sus correspondientes materiales a escala no nanométrica y por lo tanto los modelos actuales para evaluación de toxicidad podrían no ser necesariamente apropiados (EFSA, 2011). Así pues, el paradigma actual de evaluación de toxicidad de NMs requiere la realización de un estudio caso por caso (EC, 2012), al menos para los NMs no inhalables (Gebel et al., 2014).

Por lo tanto, una barrera crítica para el desarrollo de la nanotecnología es la necesidad de evaluar la toxicidad de NMs individualmente, lo cual supone un reto muy serio dada la enorme variedad de NMs cuya seguridad se debería evaluar si tenemos en cuenta diferentes composiciones, tamaños, recubrimientos, etc. Esta dificultad impide por el

momento una transición rápida entre las aplicaciones biotecnológicas basadas en NMs ya desarrolladas en los laboratorios de nanotecnología y su aplicación práctica, ya que la identificación de peligros (de los efectos adversos que los NMs son intrínsecamente capaces de causar) es un claro lastre que frena su implementación.

1.1. El proyecto de investigación en que se enmarca este trabajo

El presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) se enmarca en un proyecto de investigación que se está desarrollando en el Grupo de Investigación UMH de Toxicología y Salud Medioambiental y que cuenta con el apoyo del profesor Héctor Candela Antón, del Área de Genética del Departamento de Biología Aplicada de la UMH. Este proyecto pretende romper el modelo de estudio caso por caso analizando los mecanismos moleculares de neurotoxicidad, lo que posibilitaría establecer una serie de biomarcadores de efecto adverso, los cuales permitirían agrupar la evaluación de la seguridad de NMs según el efecto tóxico que induzcan, reduciendo así el coste y tiempo necesarios para una correcta valoración de su seguridad.

El citado proyecto de investigación caracterizará rutas moleculares de efecto adverso (AOPs, por *Adverse Outcome Pathways*) de neurotoxicidad mediante aproximaciones basadas en el análisis de transcriptomas. La dilucidación de estas AOPs moleculares debería permitir elaborar firmas transcriptómicas que podrían actuar como biomarcadores de efecto a NMs neurotóxicos. El uso de AOPs está considerado actualmente como una de las áreas más importantes y de vanguardia en el campo de la Toxicología. La OCDE lanzó en 2012 un programa para el desarrollo de AOPs (OCDE, 2013) que siguió con el lanzamiento, en abril de 2014, de la AOP-wiki (www.aopwiki.org) que está actualmente en construcción con el objetivo de facilitar el desarrollo de AOPs en diferentes tejidos diana. También da una idea clara de la relevancia presente y futura del uso de AOPs el hecho de que la OECD lanzó en 2017 un documento guía para la homogeneización de criterios para el desarrollo y la evaluación de AOPs (OECD, 2017). El objetivo de este proyecto no es el desarrollo de AOPs *per se*. No obstante, el concepto de AOP es considerado como una herramienta que facilita el uso del conocimiento mecanicista con finalidades reguladoras en Toxicología (Leist et al., 2017).

En resumen, este proyecto propone un enfoque integrador de minería de datos para identificar firmas ómicas de AOPs de neurotoxicidad, siendo éste un abordaje que también ha sido propuesto para productos químicos no nanométricos (Oki and Edwards, 2016).

1.2. Elección de un sistema diana de toxicidad para este trabajo

El sistema diana de toxicidad elegido en el proyecto al que se adscribe el presente TFG es el sistema nervioso central (SNC). En la elección de este sistema ha influido,

además de la experiencia previa en este campo del Grupo de Investigación UMH de Toxicología y Salud Medioambiental de la UMH, los siguientes motivos:

1. Costa y Fadeel (2016) han revisado los estudios ómicos disponibles en el campo de la nanotoxicología, sin encontrar estudios *in vivo* o *in vitro* dirigidos a evaluar su neurotoxicidad. Esta carencia realza la necesidad de estudiar el SNC como diana de neurotoxicidad de NMs con el abordaje propuesto.
2. En la actualidad ya existen estudios que han demostrado que los NMs pueden causar genotoxicidad, citotoxicidad y estrés oxidativo (Figura 2A), y es bien conocido que estos efectos pueden provocar neurodegeneración en el SNC (Feng, et al., 2015a). Otros efectos adversos descritos como consecuencia de la exposición del sistema nervioso a NMs son: autofagia (Figura 2B), disfunción lisosomal, incrementos en el calcio citoplasmático o activación descoordinada de los canales de señalización (Feng, y otros, 2015b).
3. El SNC es conocido por presentar poca capacidad de defensa frente a agresiones por xenobióticos y también poca capacidad de regeneración y/o reparación; pero también por haberse descrito efectos adversos inducidos por NMs en él, ya que ciertos NMs han probado su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica para inducir neurotoxicidad. Por lo tanto, podría aparecer neurotoxicidad como consecuencia de la exposición a NMs en individuos que entren en contacto con éstos ya sea a nivel laboral o como consumidores en aplicaciones nanotecnológicas en campos como por ejemplo la industria de la alimentación (Cushen et al., 2012).

1.3. Elección de un modelo celular *in vitro* para este trabajo

Los efectos neurotóxicos de sustancias químicas se estudian normalmente con cultivos celulares de tipo neuronal, no teniendo en consideración que en el sistema nervioso central también existen otras líneas celulares que pueden ser dianas de toxicidad y que por lo tanto han de ser consideradas. El proyecto al que se adscribe este TFG utiliza glioblastoma humano T98G (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (<https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>) (número del catálogo 920902213) como modelo de célula glial. Todos los efectos inducidos por NMs descritos anteriormente para sistema nervioso han sido también específicamente descritos para glía (Feng et al., 2015a y b). Por lo tanto, considerando que la glía está implicada en la regulación de la funcionalidad de la barrera hematoencefálica y que son las primeras células en responder a la disrupción de la homeostasis del cerebro y a la entrada de agentes infecciosos (Feng et al., 2015b) (de tamaño en el mismo orden de magnitud que los NMs (Figura 1)), se consideró que la glía podría ser un sistema modelo más interesante para estudiar la neurotoxicidad de NMs, ya que de la protección de las neuronas frente a la

exposición a las propias NMs va a depender en parte de la integridad y funcionamiento de la glía que forma la barrera hematoencefálica.

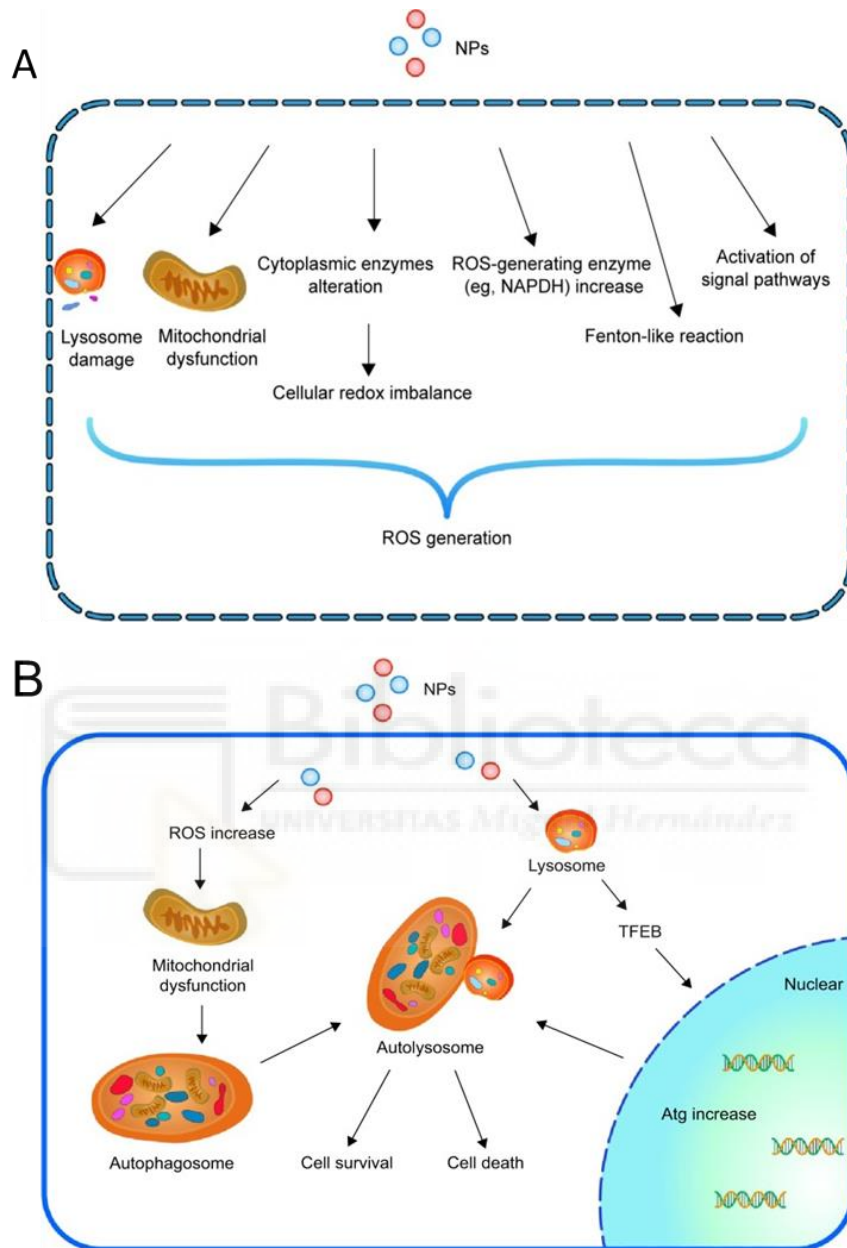


Figura 2. Respuestas celulares debidas a nanomateriales. (A) Mecanismos de inducción de estrés oxidativo. (B) Mecanismos de inducción de autofagia. Imágenes reproducidas de Feng et al. (2015a)

Un valor añadido de este proyecto es la utilización de líneas celulares humanas, lo que es muy conveniente y científicamente relevante al estar estudiando los efectos en la misma especie que se desea proteger, evitando así evitar la posterior extrapolación de resultados desde otra especie, cosa que siempre es fuente de incertidumbre.

1.4. Elección de un nanomaterial modelo para este trabajo

El NM seleccionado como modelo para la realización de este TFG ha sido las nanopartículas de plata (Ag-NPs). Las Ag-NPs han demostrado ser capaces de inducir citotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo, lo que en el SNC puede traducirse en el comienzo de enfermedades neurodegenerativas (Migliore et al., 2015). La exposición del ser humano a Ag-NPs es muy alta porque debido a sus propiedades bacteriostáticas es comúnmente utilizada como biocida, con aplicaciones biomédicas (ya que por ejemplo también acelera la cicatrización de heridas), en productos de higiene personal, sistemas de purificación de agua, textiles, materiales de construcción (Ahamed et al., 2010; Bakshi, 2017; SCENIHR, 2013), etc.

Ciertos estudios *in vitro* e *in vivo* han confirmado la capacidad de inducir neurotoxicidad de las Ag-NPs haciendo hincapié en su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, acumularse en el tejido cerebral y producir toxicidad dañando células neuronales, gliales, axones y endoteliales. (Ahamed et al., 2010).

Así, las Ag-NPs causaron estrés oxidativo, aumento de concentraciones de Ca^{2+} , inhibición del crecimiento de neuritas, reducción de la expresión del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) o del marcador neuronal MAP2 (proteína 2 asociada a microtúbulos) en neuronas glutaminérgicas derivadas de células madre embrionarias humanas (Begum et al., 2016).

También se ha demostrado en neuronas y astrocitos diferenciados a partir de células madre embrionarias de humano que la exposición a Ag-NPs es capaz de inducir un incremento de la relación astrocitos/neuronas, un cambio en morfología de los astrocitos, una reducción de la extensión de neuritas y neurodegeneración (Repar et al., 2018).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes

El laboratorio receptor había iniciado en el momento de mi incorporación al mismo un proyecto denominado: *“Hacia un nuevo paradigma en la identificación de peligros y evaluación de la seguridad y el riesgo de neurotoxicidad asociado la exposición a nanomateriales con aplicaciones biotecnológicas”* financiado por la Fundación Ramón Areces. Dentro de este proyecto se había realizado ya un trabajo experimental consistente en: i) una caracterización preliminar de las propiedades físicas de las Ag-NPs que se estaban estudiando; ii) un análisis de la citotoxicidad de las mismas sobre células T98G de glioblastoma humano; iii) un análisis de internalización de las Ag-NPs por citometría de flujo y microscopía electrónica; iv) la extracción del ARN de células expuestas a una concentración de Ag-NPs que indujo una disminución de viabilidad inferior al 10%; y iv) el envío del citado ARN a un proveedor externo para la secuenciación masivamente paralela (ARNseq) del ARN mensajero de las células expuestas.

A continuación, se resumen los resultados previos de los experimentos arriba descritos que, si bien estrictamente hablando no forman parte de este TFG, es necesario conocer para poner en un contexto apropiado y entender los resultados que si pertenecen a este TFG.

2.1.1. Caracterización física y comportamiento en el medio de Ag-NPs utilizados

Las Ag-NPs que se utilizaron en este TFG fueron adquiridas a SCHARLAB (<http://www.scharlab.com>) (referencia AG-00, lote 16002). Las Ag-NPs estaban recubiertas de citrato y se presentaron en suspensión en agua mili-Q a la concentración de 1 mg/ml y de acuerdo al proveedor presentaron un máximo de absorción de radiación electromagnética visible alrededor de 400 nm (Figura 3A) y un tamaño medio de 10 nm.

Muchas revistas de Toxicología no aceptan trabajos de nanomateriales sobre la base de caracterizaciones físicas realizadas por los proveedores porque éstas no son siempre totalmente fiables. Es por eso que el laboratorio donde se realizó este TFG encargó una caracterización a un proveedor externo (Nanoimmunotech SL; <http://nanoimmunotech.eu>). Esta caracterización ya estaba realizada en el momento del inicio de este TFG y dado que la toxicidad de los NMs es fuertemente dependiente de sus propiedades físicas y de su comportamiento en medios biológicos a continuación se ofrecen los datos básicos de la caracterización física realizada:

1. El tamaño medio de partícula en una suspensión acuosa de 1 mg/ml fue caracterizado por dispersión dinámica de luz y resultó ser de $15,96 \pm 8,98$ nm. Sin embargo, la distribución de

tamaños fue muy amplia, lo que sugiere la existencia de diferentes poblaciones de diferente tamaño de partícula y una falta de estabilidad coloidal en agua (Figura 3B).

2. El potencial Z (la carga superficial a 25 °C en agua de 18 MΩ.cm) fue de $-35,2 \pm 1,52$ mV.

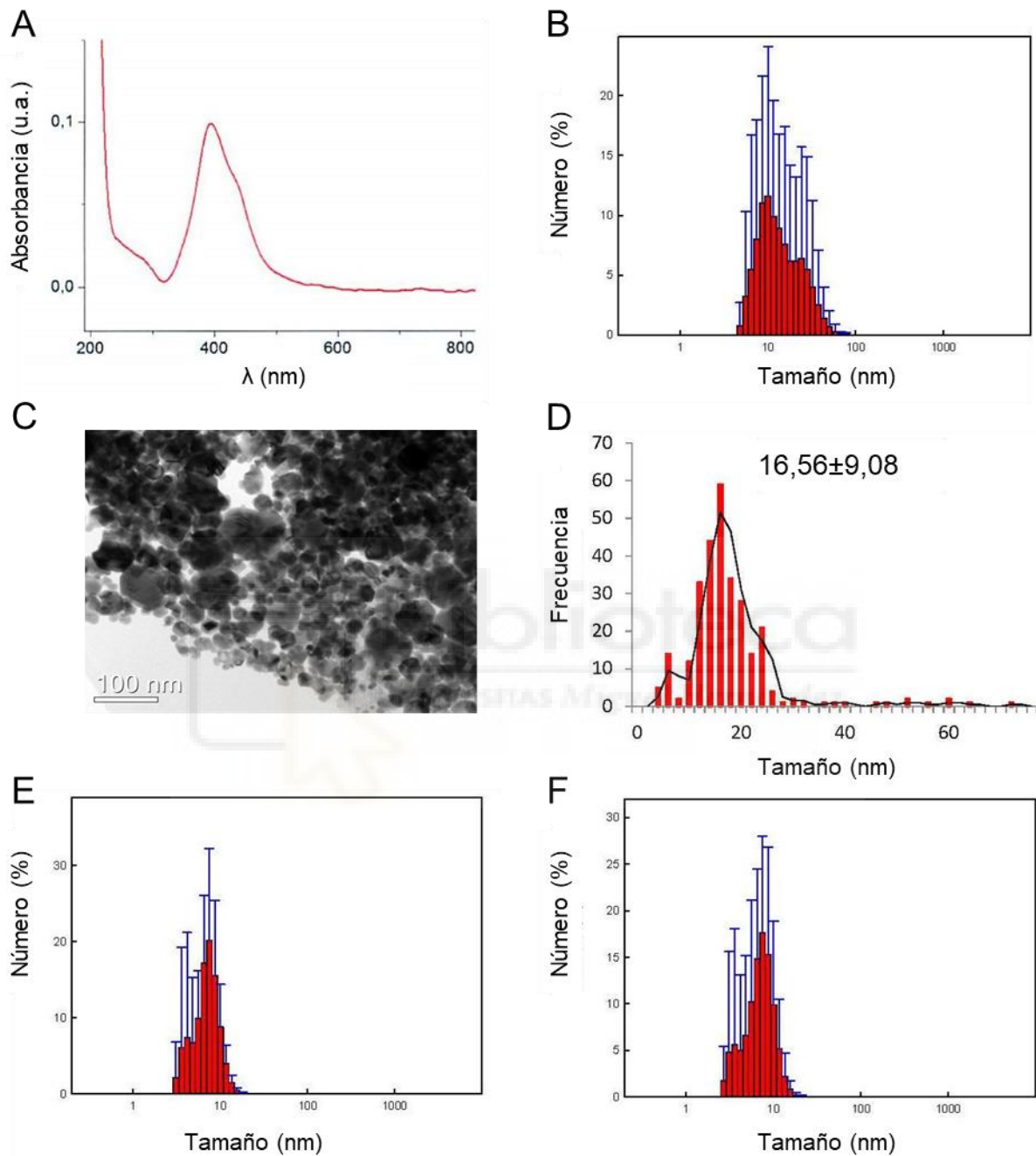


Figura 3. Caracterización y comportamiento de cultivo de Ag-NPs utilizadas en este TFG. Panel A: Espectro de absorción de radiación electromagnética ultravioleta-visible. Panel B: Distribución de tamaño de partícula en suspensión acuosa determinado según dispersión dinámica de luz. Panel C: Imagen de microscopía electrónica de barrido. Panel D: Distribución de tamaño de partícula en suspensión acuosa determinado según microscopía electrónica de barrido. Paneles E y F: Distribución de tamaño de partícula estimado por dispersión dinámica de luz tras 0 (E) y 72 (F) horas en medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino.

3. El análisis del tamaño de partícula por microscopía electrónica de barrido (Figura 3C) mostró un diámetro de $16,56 \pm 9,08$ nm. La dispersión de tamaños también fue elevada (Figura 4D), como era previsible a la vista de los resultados de dispersión dinámica de luz.

4. No se detectaron variaciones significativas en el tamaño de partícula y su distribución tras incubación de las Ag-NPs durante 72 horas en medio de cultivo celular (Figura 3E y 4F). Tampoco se detectaron diferencias significativas en el tamaño de partícula de las Ag-NPs suspendidas en agua o el medio de cultivo celular. Este resultado aseguraba que durante los experimentos de exposición de cultivos celulares a Ag-NPs durante 72 horas éstas no precipitaban o agregaban y se mantenían siempre (como era deseable por otra parte) en el rango nanométrico de tamaño.

2.2. Citotoxicidad de Ag-NPs en células T98G de glioblastoma humano

Se estudió la citotoxicidad de las Ag-NPs a fin de determinar qué concentración de éstas era la máxima utilizable en el experimento de transcriptómica. Para ello las células se expusieron durante 72 horas a las Ag-NPs en condiciones de cultivo estándar recomendadas por el suministrador de la línea celular T98G en presencia y ausencia de Ag-NPs. Tras este tiempo se determinó la viabilidad celular de los cultivos mediante el método de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (método MTT), encontrándose que dicha viabilidad fue de $95 \pm 5\%$ del control en las células expuestas a $40 \mu\text{g Ag-NPs/ml}$ ($n=9$ experimentos independientes cada uno de ellos realizados con 6 replicados biológicos pertenecientes al mismo cultivo) y del $92 \pm 5\%$ del control en las células expuestas a $30 \mu\text{g Ag-NPs/ml}$ ($n=3$ experimentos independientes cada uno de ellos realizados con 6 replicados biológicos pertenecientes al mismo cultivo).

Estos resultados sugieren que la concentración máxima tolerable de Ag-NPs que induce una reducción en la viabilidad celular no superior al 10% fue de $40 \mu\text{g/ml}$, y ésta fue la concentración que se empleó en el experimento de transcriptómica. Nótese que esta concentración está muy cerca de la que es técnicamente posible mantener en suspensión sin que las Ag-NPs agreguen o precipiten.

2.2.1. Incorporación a Ag-NPs a células T98G de glioblastoma humano

Experimentos de citometría de flujo por dispersión de luz y de microscopía electrónica de barrido y de transmisión determinaron que las Ag-NPs no son internalizadas en células T98G de glioblastoma humano tras exposición durante 72 horas a $40 \mu\text{g/ml}$ ni permanecen adheridas a la superficie de la membrana plasmática.

2.2.2. Extracción del ARN de células expuestas de 40 µg Ag-NPs/ml durante 72 horas

Se expusieron células T98G de glioblastoma humano a 40 µg/ml de Ag-NPs durante 72 horas. Trascurrido este tiempo el ARN celular se extrajo empleando el reactivo TRIzol™, cloroformo y etanol según procedimientos estándar.

2.2.3. Envío del ARN a un proveedor externo para secuenciación masiva

El ARN purificado según lo descrito en el párrafo anterior se envió a la compañía coreana MacroGen Inc. (<http://dna.macrogen.com/eng/>) para que lo sometiera a un proceso de ARNseq.

2.3. Objetivos

La incorporación al laboratorio para realizar el TFG se corresponde con el momento en que las muestras de RNA se enviaron a secuenciar. En este contexto, **el objetivo general de TFG fue analizar mediante herramientas bioinformáticas las alteraciones inducidas en el transcriptoma de células T98G de glioblastoma humano por la exposición a Ag-NPs para entender los mecanismos moleculares de toxicidad de estas nanopartículas.**

Para alcanzar el citado objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1 Alinear las secuencias de ARN mensajero de células control y expuestas a Ag-NPs frente un genoma de referencia humano.
- 2 Cuantificar las alteraciones en la expresión génica de células T98G de glioblastoma humano derivadas de la exposición a Ag-NPs.
- 3 Determinar mediante análisis de ontología génica qué funciones moleculares, procesos biológicos y componentes celulares se alteraron en células T98G de glioblastoma humano como consecuencia de su exposición a Ag-NPs.
- 4 Determinar mediante análisis de ontología génica qué rutas metabólicas se alteraron en células T98G de glioblastoma humano como consecuencia de su exposición a Ag-NPs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Calidad de ARN

La calidad de las muestras de ARN purificado se determinó mediante análisis electroforético con bioanalizador. El bioanalizador es una plataforma basada en la tecnología de microfluidos diseñada para la determinación del tamaño, la cuantificación y el control de calidad de ADN, ARN y proteínas en un único instrumento mediante electroforesis en pequeños chips. Los resultados se obtienen en un corto espacio de tiempo de forma automatizada y directamente en formato digital. Se utilizó el Agilent 2100 Bioanalyzer siguiendo kits e instrucciones del proveedor. El parámetro utilizado para analizar la calidad del ARN contenido en las muestras fue el RIN (*RNA Integrity Number*; Schroeder et al., 2006), que es un algoritmo que produce un número entre 1 y 10, siendo 10 la máxima calidad posible.

3.2. Secuenciación masivamente paralela de ARN

Macrogen realizó la secuenciación de las muestras utilizando la plataforma Illumina que incluye 4 diferentes etapas (Figura 4):

- a) *Preparación de la muestra.* Para la preparación de las librerías el ARN se extrae de las muestras y se realiza un control de calidad basado en el RIN según lo descrito en la sección 3.1. Solamente aquellas muestras que superan un umbral son retrotranscritas a cDNA y pasan a la segunda etapa (la construcción de las librerías).
- b) *Construcción de las librerías.* Las librerías para la secuenciación se preparan por fragmentación aleatoria del cDNA seguido de la ligación de un adaptador 5'→3'. Los fragmentos ligados con los adaptadores son a continuación amplificados por PCR.
- c) *Secuenciación.* Para la generación de un clúster la librería generada se carga en una celda de flujo donde los fragmentos son capturados en una superficie que tiene adheridos oligonucleótidos complementarios a los de la librería generada. A continuación, cada fragmento es amplificado y entonces la plantilla estará lista para secuenciación. La tecnología Illumina SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles que detectan cada base incorporada a cada hebra de cDNA. Dado que los 4 terminadores reversibles están presentes durante cada ciclo de secuenciación la competición natural minimiza las tasas de error en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base a base altamente fiable, incluso en secuencias repetitivas y homopolímeros.
- d) *Obtención de datos brutos.* Los datos de la secuenciación se convierten en archivos de texto con los datos brutos para su posterior análisis bioinformático.



Figura 4. Etapas de una secuenciación masivamente paralela mediante la plataforma Illumina.

3.3. Análisis bioinformático

3.3.1. Procesamiento previo de las lecturas

El ARN total fue purificado a partir de las muestras utilizando TriPure Isolation Reagent, siguiendo las instrucciones del proveedor (Roche). La preparación de las librerías (*libraries*) fue llevada a cabo por MacroGen (Corea del Sur) siguiendo las instrucciones del kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep (Illumina) a partir de ARN purificado de 3 cultivos control y 3 tratados con nanopartículas de plata. La secuenciación de las librerías fue realizada por MacroGen utilizando un equipo de secuenciación por síntesis HiSeq de Illumina. A partir de cada fragmento se obtuvieron dos lecturas (*paired-end reads*) de 101 nucleótidos.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se procesaron con diferentes programas de ordenador. En primer lugar, las lecturas, que se encontraban en formato FASTQ (Cock et al. 2009), fueron filtradas para eliminar las lecturas de menor calidad y cualquier secuencia derivada de los adaptadores. Para ello, se ejecutó el programa Trimmomatic versión 0.36 (Bolger et al. 2014), con las siguientes opciones: PE (indica que se trata de lecturas emparejadas), --phred33 (indica que los valores de calidad de las lecturas se representan mediante los caracteres cuyo código ASCII es igual a la puntuación Phred+33), ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 (elimina de las lecturas cualquier secuencia derivada de los adaptadores utilizados en la preparación de las librerías), LEADING:3 (elimina los nucleótidos del principio de las lecturas si su puntuación Phred es inferior a 3), TRAILING:3 (elimina los nucleótidos del final de la lectura si su puntuación Phred es inferior a 3), SLIDINGWINDOW:4:15 (recorta la lectura al encontrar un grupo de 4 nucleótidos consecutivos cuya puntuación Phred media es inferior a 15), y MINLEN:36 (descarta las lecturas cuya longitud mínima es inferior a 36 nucleótidos).

3.3.2. Alineamiento de las lecturas al genoma humano

Tras filtrar las lecturas, se procedió a alinearlas al genoma de referencia con el programa hisat2 v.2.1.0 (Kim et al. 2015). Como genoma de referencia se utilizó la versión GRCh38 del genoma humano (Guo et al. 2017). Se preparó un índice del genoma de referencia, basado en la transformación de Burrows-Wheeler, mediante la herramienta

hisat2-build. Dicho índice incorpora también información sobre la posición de los exones e intrones, lo que facilita el alineamiento de las lecturas al genoma. Para alinear las lecturas, se utilizó el programa hisat2 con las siguientes opciones: -1 y -2 (permiten seleccionar los archivos correspondientes a las parejas de lecturas), -x (permite especificar el nombre del índice del genoma de referencia, GRCh38_tran), -p 32 (número de procesadores disponibles), --no-una1 (el archivo de resultados sólo incluye datos de las lecturas que pueden alinearse al genoma de referencia), --no-discordant (se descartan los alineamientos discordantes, en los que la orientación y/o la distancia de las lecturas *forward* y *reverse* no se corresponde con el diseño del experimento), y --rna-strandness RF (especifica que la lectura *reverse* deriva del transcrito y la lectura *forward* deriva de la secuencia complementaria del mismo).

El archivo SAM (Sequence Alignment/Map) generado por hisat2 fue convertido a formato BAM (Binary Alignment/Map, la versión binaria del formato SAM) utilizando el programa samtools view v.0.1.19 (Li et al. 2009). El contenido del archivo BAM fue ordenado con el programa samtools sort según la posición de cada lectura en el genoma humano. Este procedimiento es un paso previo necesario para la visualización de los alineamientos de las lecturas y la cuantificación de los niveles de expresión génica en las distintas muestras.

3.3.3. Cuantificación de los niveles de expresión

Los niveles de expresión fueron cuantificados mediante el programa cuffdiff del paquete Cufflinks v.2.2.1 (Trapnell et al. 2010; 2012). Los niveles de expresión de las muestras se expresaron como FPKM (número de fragmentos secuenciados por kilobase de gen y millón de fragmentos). El mismo programa se utilizó para realizar la comparación estadística de los niveles de expresión de cada gen entre las dos condiciones experimentales. Con los resultados de la cuantificación, se elaboró un mapa de calor Figura 7 (*heatmap*) utilizando el programa Gene Cluster v.3.0 (Eisen et al. 1998; <http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/>), que se visualizó mediante el programa Java Tree View (Saldana, 2004; <http://treeview.sourceforge.net/>).

3.3.4. Análisis ontológico

Para estudiar los procesos en los que participan los genes expresados diferencialmente como consecuencia de la exposición a Ag-NPs, se estudiaron los términos de la ontología génica (Gene Ontology; Ashburner et al. 2000; GO Consortium, 2017; <http://www.geneontology.org/>) asignados a los mismos. El proyecto GO comprende definiciones para más de 40.000 términos diferentes seleccionados a partir de 140.000 publicaciones científicas que operan con el criterio de revisión por pares. Los términos de la

GO se clasifican en 3 subontologías: función molecular (*molecular function*); función de la proteína por sí misma o con proteínas que interactúan directamente a un nivel bioquímico, proceso biológico (*biological process*); la función de la proteína en el contexto de una red más grande de proteínas que interactúan para lograr un proceso a nivel de la célula u organismo y componente celular (*cellular component*); términos que hacen referencia a la localización subcelular del producto de un gen así como a los complejos y estructuras macromoleculares de los que forma parte. Concretamente se usó la función GO-Slim, la cual es una versión reducida que contiene un subconjunto de términos de toda la GO. Esta herramienta da una visión global del contenido de la ontogenia sin los detalles de términos específicos.

Los genes expresados diferencialmente se anotaron utilizando la aplicación PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) v. 13.1 Classification System (<http://pantherdb.org/>). Se utilizó PANTHER para asignar términos GO a los genes expresados diferencialmente, así como para determinar la naturaleza de sus productos y las rutas en las que participan.



4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la calidad del ARN

La Tabla 1 muestra los valores RIN determinados en nuestro laboratorio y en MacroGen. Los valores RIN determinados en la UMH mediante un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument oscilaron entre 9,60 y 9,80 (Tabla 1), por lo que la calidad de las muestras de ARN preparadas en el laboratorio se consideró suficientemente alta para su utilización en un experimento de ARNseq (Schroeder et al. 2006).

MacroGen también efectuó un control de calidad tras la recepción de las muestras. Los valores RIN determinados por MacroGen fueron ligeramente inferiores a los obtenidos en la UMH, ya que oscilaron entre 7,0 y 8,3. Desconocemos los motivos de esta discrepancia, que podría deberse a diferencias experimentales en la estimación del RIN, la degradación del ARN durante el transporte a Corea, o a una combinación de ambos factores.

Tabla 1.- Valores RIN de las muestras sometidas a secuenciación masivamente paralela

Muestra	RIN determinado por:	
	UMH	MacroGen
Control 1	9,7	8,3
Control 2	9,6	7,6
Control 3	9,7	7,0
Ag-NPs 1	9,6	8,1
Ag-NPs 2	9,8	7,0
Ag-NPs 3	9,7	8,0

En cualquier caso, MacroGen requiere que las muestras tengan un valor de 7 para proceder a su secuenciación, por lo que todas las muestras se consideraron aptas. La Figura 5 muestra los electroferogramas obtenidos para las 6 muestras utilizadas en este trabajo (3 muestras control y 3 muestras tratadas). Se aprecia claramente la presencia de tres picos en cada electroferograma, correspondientes a las moléculas de ARN ribosómico 5S, 18S y 28S, cuya integridad se traduce en los elevados valores de RIN de todas las muestras.

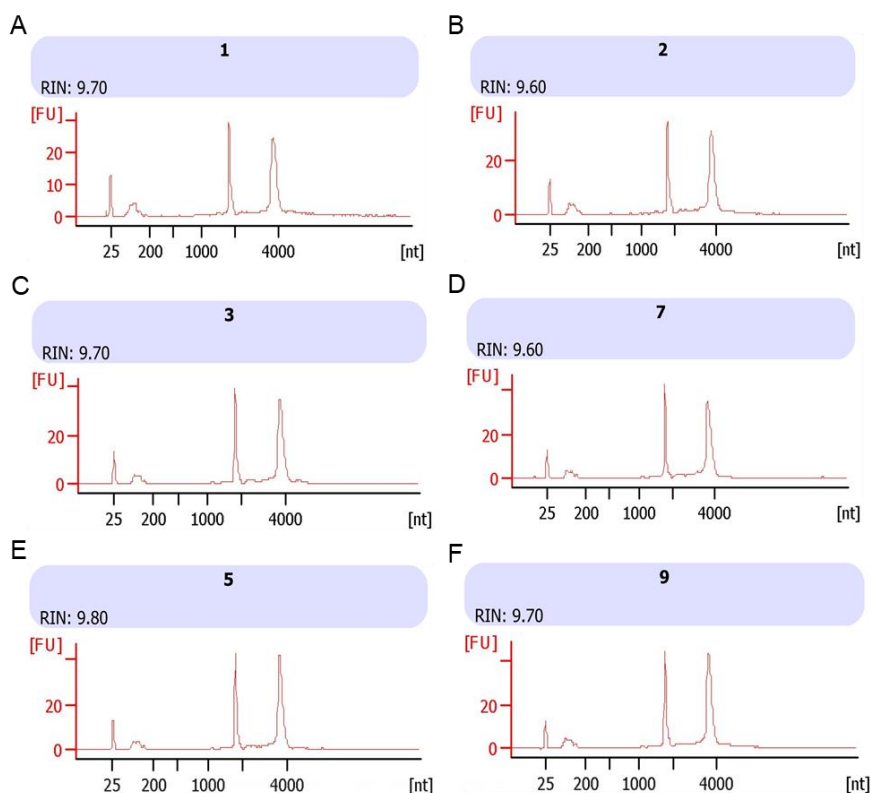


Figura 5. Electroferogramas obtenidos mediante un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer. Los paneles A, B y C corresponden a los replicados 1, 2 y 3 de las muestras control. Los paneles D, E y F corresponden a los replicados 1, 2 y 3 de las muestras expuestas a Ag-NPs.

4.2. Secuenciación masivamente paralela de ARN

4.2.1. Caracterización inicial de las secuencias obtenidas

La Tabla 2 muestra el número total de lecturas obtenidas en cada una de las muestras analizadas, la longitud acumulada de las mismas (cantidad de secuencia, expresada en número en nucleótidos), su contenido en GC, y la proporción de lecturas cuya puntuación Phred media es igual o superior a 20 (Q20) o igual o superior a 30 (Q30). La calidad Phred se calcula como $-10 \times \log_{10} P$, donde P es la probabilidad de que un base haya sido determinada erróneamente. Una puntuación Phred de 30 (Q30) se corresponde con una probabilidad de error de 1 en 1000 (en otras palabras, con una probabilidad del 99,9%; de que la secuencia sea correcta). Por su parte, una puntuación de 20 (Q20) implica una probabilidad de error de 1 en 100 (o una corrección del 99%). En todos los casos, los porcentajes de bases Q20 y Q30 fueron superiores al 98 y 95%, respectivamente. Como era de esperar, el contenido en GC fue equivalente en todas las muestras estudiadas.

Tabla 2.- Datos brutos de la secuenciación masivamente paralela.

Muestra	Número de lecturas	Número de nucleótidos	%GC	%Q20	%Q30
Control 1	31.016.624	3.132.679.024	50,1	98,5	95,6
Control 2	30.419.346	3.072.353.946	50,3	98,6	95,7
Control 3	32.022.288	3.234.251.088	49,8	98,5	95,6
Ag-NPs 1	37.267.912	3.764.059.112	49,6	98,3	95,1
Ag-NPs 2	34.912.942	3.526.207.142	50,0	98,4	95,2
Ag-NPs 3	31.894.022	3.221.296.222	50,0	98,5	95,5

La calidad de las lecturas obtenidas fue evaluada también mediante el programa FASTQC (véase Materiales y Métodos). Dicha calidad fue muy elevada en todas las muestras analizadas. La Figura 6 ilustra los resultados obtenidos para una muestra representativa. Se aprecia que la calidad (puntuación Phred) decae ligeramente hacia el extremo 3' de las lecturas (Figura 6A), si bien sigue siendo muy buena. Las frecuencias de las distintas bases se desviaron de los valores medios en el extremo 5' de las lecturas (Figura 6B). Dichas desviaciones se consideran, sin embargo, normales en los experimentos de ARNseq. La distribución de las lecturas según su contenido en GC (Figura 6C) coincide con la distribución teórica esperada, como cabe esperar si la muestra no contiene cantidades importantes de moléculas de ARN ribosómico (que distorsionarían dicha distribución). Por último, se calculó la puntuación Phred media y en la Figura 6D se representa la frecuencia absoluta con que se dieron cada una de las puntuaciones medias.

4.2.2. Alineamiento de las secuencias al genoma de referencia

Para determinar los niveles de expresión de cada gen en las distintas muestras, se alinearon las lecturas al genoma de referencia mediante el programa hisat2 (véase el apartado 3.3.2, de la página 17). La inmensa mayoría de las lecturas de cada muestra se alineó correctamente al genoma de referencia (con más del 98% de las lecturas alineadas en cada muestra; Tabla 3). Se utilizó el programa samtools rmdup para determinar la frecuencia con que ocurren lecturas duplicadas en cada una de las muestras. Esta frecuencia osciló entre el 26,88% y el 33,09%. Si bien estos valores no son particularmente elevados, se optó por realizar el análisis bioinformático de dos maneras diferentes. El primer análisis de los resultados, que se presenta en esta sección, se realizó cuantificando los niveles de expresión considerando todas las lecturas (incluyendo las marcadas por samtools rmdup como duplicadas). El segundo análisis se realizó cuantificando las lecturas tras la

eliminación de los duplicados. La eliminación de las lecturas aparentemente duplicadas es discutida por algunos autores, por lo que los resultados obtenidos en este segundo análisis están incluidos en el apartado ANEXOS para su comparación.

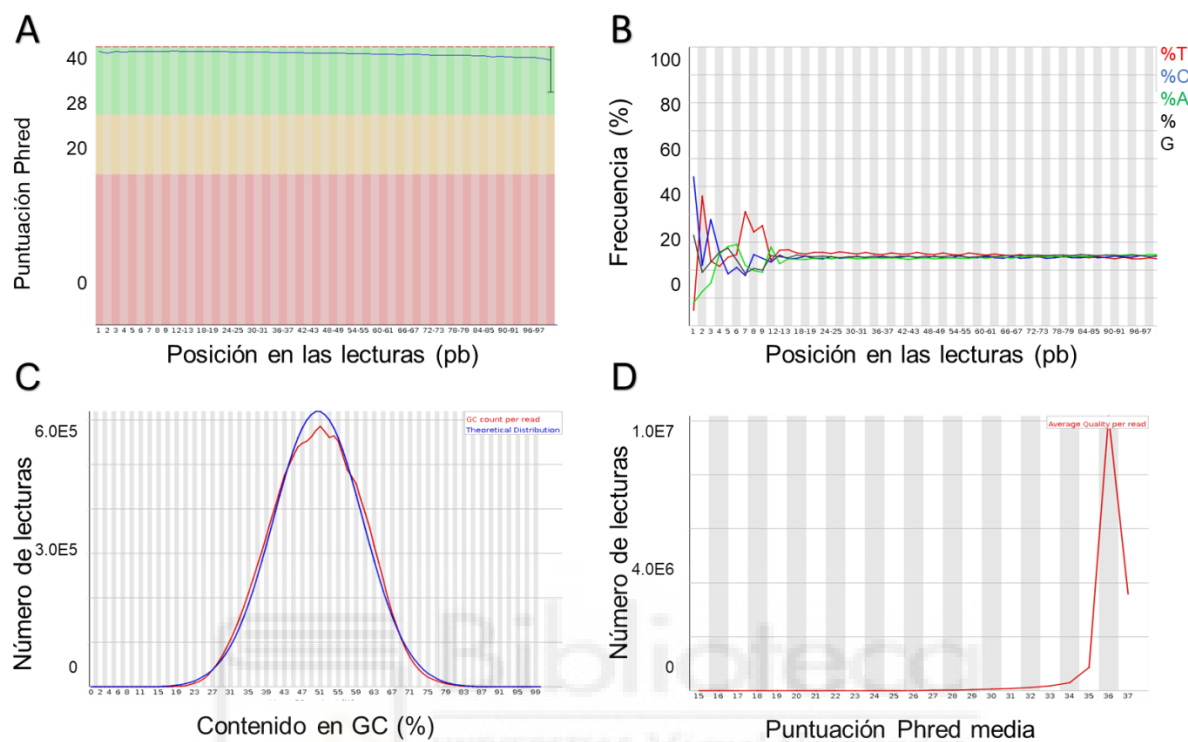


Figura 6. Características de las lecturas evaluadas por el programa FastQC. (A) Puntuación Phred de las bases según su posición en las lecturas. (B) Frecuencia de cada una de las bases según su posición en las lecturas. (C) Distribución de las lecturas según su posición en las lecturas. (C) Distribución de las lecturas según su contenido medio en GC. (D) Distribución de las lecturas según su puntuación Phred media.

Tabla 3.- Alineamiento de las lecturas al genoma de referencia.

Lecturas	Control			Plata		
	1	2	3	1	2	3
Iniciales	31.016.624	30.419.346	32.022.288	37.267.912	34.912.942	31.894.022
Filtradas	26.681.128	26.192.232	26.451.976	32.773.468	31.186.266	25.943.390
Alineadas (%)	26.342.795 (98,73)	25.793.274 (98,48)	26.083.336 (98,61)	32.379.051 (98,80)	30.810.044 (98,79)	25.661.862 (98,91)
Duplicadas (%)	28,12	28,09	26,88	33,09	28,61	27,98

4.2.3. Genes expresados diferencialmente

El análisis estadístico, realizado mediante el programa cuffdiff, permitió identificar 43 genes expresados a niveles diferentes en las muestras tratadas y sin tratar al utilizar un FDR (*false discovery rate*) del 5% (Tabla 4 y Tabla 5). De estos genes, 13 presentaron niveles de expresión más elevados en las muestras tratadas con nanomateriales que en las muestras no tratadas, con niveles de expresión incrementados entre 1,26 ($2^{0,34}$) y 8 (2^3) veces los de las correspondientes muestras control (Tabla 4). Los restantes 30 genes presentaron niveles de expresión inferiores al control en las muestras tratadas, observándose reducciones comprendidas entre 1,28 y 13,5 veces respecto a los de las muestras control (Tabla 4). El gen más sobreexpresado fue ENSG00000114857, que codifica para la proteína *natural killer cell triggering receptor*, que es un receptor que promueve la muerte celular (Tabla 4 y Tabla 5). El gen más reprimido, por su parte, fue el gen ENSG00000120738, que codifica la proteína *early growth response 1*, un factor de transcripción de numerosos genes (Tabla 4 y Tabla 5).

Tabla 4.- Genes expresados diferencialmente.

Gen	FPKM (control)	FPKM (AgNM)	log ₂ FC	p-valor	q-valor
ENSG00000023516	5,88	7,88	0,42	5,00E-05	0,0159676
ENSG00000058056	3,61	6,36	0,82	5,00E-05	0,0159676
ENSG00000072657	0,32	1,63	2,36	0,00015	0,0412186
ENSG00000105926	10,89	25,85	1,25	5,00E-05	0,0159676
ENSG00000108691	152,76	71,75	-1,09	5,00E-05	0,0159676
ENSG00000111678	76,33	52,81	-0,53	5,00E-05	0,0159676
ENSG00000114315	6,33	2,41	-1,39	5,00E-05	0,0159676
ENSG00000114857	0,15	1,23	3,00	0,0001	0,0288195
ENSG00000118515	8,06	4,74	-0,77	0,0001	0,0288195
ENSG00000118523	11,78	4,93	-1,26	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000120738	29,27	2,16	-3,76	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000120875	34,88	22,43	-0,64	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000125746	0,25	1,12	2,16	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000128016	11,01	6,40	-0,78	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000130513	205,23	117,18	-0,81	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000133048	5,85	3,44	-0,77	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000134352	136,14	214,17	0,65	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676
ENSG00000136158	9,92	6,15	-0,69	$5 \cdot 10^{-5}$	0,0159676

Gen	FPKM (control)	FPKM (AgNM)	log ₂ FC	p-value	q-value
ENSG00000136244	48,29	25,79	-0,90	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000137331	36,42	21,68	-0,75	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000138166	15,58	8,59	-0,86	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000142871	76,78	46,78	-0,71	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000143507	8,57	5,14	-0,74	1,5·10 ⁻⁴	0,0412186
ENSG00000144724	5,15	7,65	0,57	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000146281	1,32	2,07	0,65	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000146648	32,02	40,48	0,34	1·10 ⁻⁴	0,0288195
ENSG00000162783	17,56	12,28	-0,52	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000165655	4,44	2,84	-0,64	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000166292	13,32	8,45	-0,66	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000171222	78,35	55,44	-0,50	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000171223	12,92	6,21	-1,06	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000171940	8,97	12,43	0,47	1·10 ⁻⁴	0,0288195
ENSG00000173275	5,22	7,61	0,54	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000180730	7,24	4,94	-0,55	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000185022	19,10	11,47	-0,74	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000187134	1091,33	788,42	-0,47	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000187678	2,37	0,74	-1,68	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000197355	31,69	23,99	-0,40	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000214022	49,99	39,01	-0,36	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000221869	43,06	30,40	-0,50	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000233276	98,35	72,28	-0,44	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000234665	5,88	2,29	-1,36	5·10 ⁻⁵	0,0159676
ENSG00000273301	2,64	4,00	0,60	5·10 ⁻⁵	0,0159676

Tabla 5.- Denominación de los productos de los genes expresados diferencialmente.

Gen	Símbolo	Producto del gen
ENSG00000023516	AKAP11	A-kinase anchoring protein 11
ENSG00000058056	USP13	ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3)
ENSG00000072657	TRHDE	thyrotropin releasing hormone degrading enzyme
ENSG00000105926	MPP6	membrane palmitoylated protein 6
ENSG00000108691	CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
ENSG00000111678	C12orf57	chromosome 12 open reading frame 57
ENSG00000114315	HES1	hes family bHLH transcription factor 1
ENSG00000114857	NKTR	natural killer cell triggering receptor
ENSG00000118515	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
ENSG00000118523	CTGF	connective tissue growth factor
ENSG00000120738	EGR1	early growth response 1
ENSG00000120875	DUSP4	dual specificity phosphatase 4
ENSG00000125746	EML2	echinoderm microtubule associated protein like 2
ENSG00000128016	ZFP36	ZFP36 ring finger protein
ENSG00000130513	GDF15	growth differentiation factor 15
ENSG00000133048	CHI3L1	chitinase 3 like 1
ENSG00000134352	IL6ST	interleukin 6 signal transducer
ENSG00000136158	SPRY2	sprouty RTK signaling antagonist 2
ENSG00000136244	IL6	interleukin 6
ENSG00000137331	IER3	immediate early response 3
ENSG00000138166	DUSP5	dual specificity phosphatase 5
ENSG00000142871	CYR61	cysteine rich angiogenic inducer 61
ENSG00000143507	DUSP10	dual specificity phosphatase 10(DUSP10)
ENSG00000144724	PTPRG	protein tyrosine phosphatase, receptor type G
ENSG00000146281	PM20D2	peptidase M20 domain containing 2
ENSG00000146648	EGFR	epidermal growth factor receptor
ENSG00000162783	IER5	immediate early response 5
ENSG00000165655	ZNF503	zinc finger protein 503
ENSG00000166292	TMEM100	transmembrane protein 100
ENSG00000171222	SCAND1	SCAN domain containing 1
ENSG00000171223	JUNB	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
ENSG00000171940	ZNF217	zinc finger protein 217

Gen	Símbolo	Producto del gen
ENSG00000173275	ZNF449	zinc finger protein 449
ENSG00000180730	SHISA2	shisa family member 2
ENSG00000185022	MAFF	MAF bZIP transcription factor F
ENSG00000187134	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1 member C1
ENSG00000187678	SPRY4	sprouty RTK signaling antagonist 4
ENSG00000197355	UAP1L1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 like 1
ENSG00000214022	REPIN1	replication initiator 1
ENSG00000221869	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein delta
ENSG00000233276	GPX1	glutathione peroxidase 1
ENSG00000234665	AL512625.3	-
ENSG00000273301	AC016717.2	-

Para visualizar gráficamente los resultados obtenidos, se preparó un mapa de calor (*heatmap*; Figura 7 en el que se representan los valores de expresión normalizados de cada muestra. Se presentan también los dendrogramas obtenidos al aplicar un algoritmo de agrupamiento a las muestras y a los diferentes genes. Como era de esperar, las muestras control y las muestras problema definen grupos claramente separados.

4.3. Anotación de los genes expresados diferencialmente

Para comprender mejor las funciones afectadas por el tratamiento con nanopartículas de plata, se analizaron los términos de la ontología génica (*GO terms*) asociados al conjunto de genes expresados diferencialmente. Se utilizó la aplicación *Panther Classification System* (<http://www.pantherdb.org>) con contrastes exactos de Fisher para identificar términos de la ontología sobrerrepresentados en el conjunto de los genes expresados diferencialmente con respecto a la frecuencia con que aparecen asociados a los genes de un grupo control, utilizando el FDR para controlar el exceso de falsos positivos. Como grupo control se utilizó la lista de 11.816 genes expresados en las muestras estudiadas, que se seleccionaron a partir de los resultados de nuestro estudio y sustituimos por la lista por defecto que incluye el análisis GO-Slim de Panther. Sólo 11.144 de los 11.816 genes expresados por células T98G tenían asignados términos de la ontología en PANTHER. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 6 y en la Tabla 7.

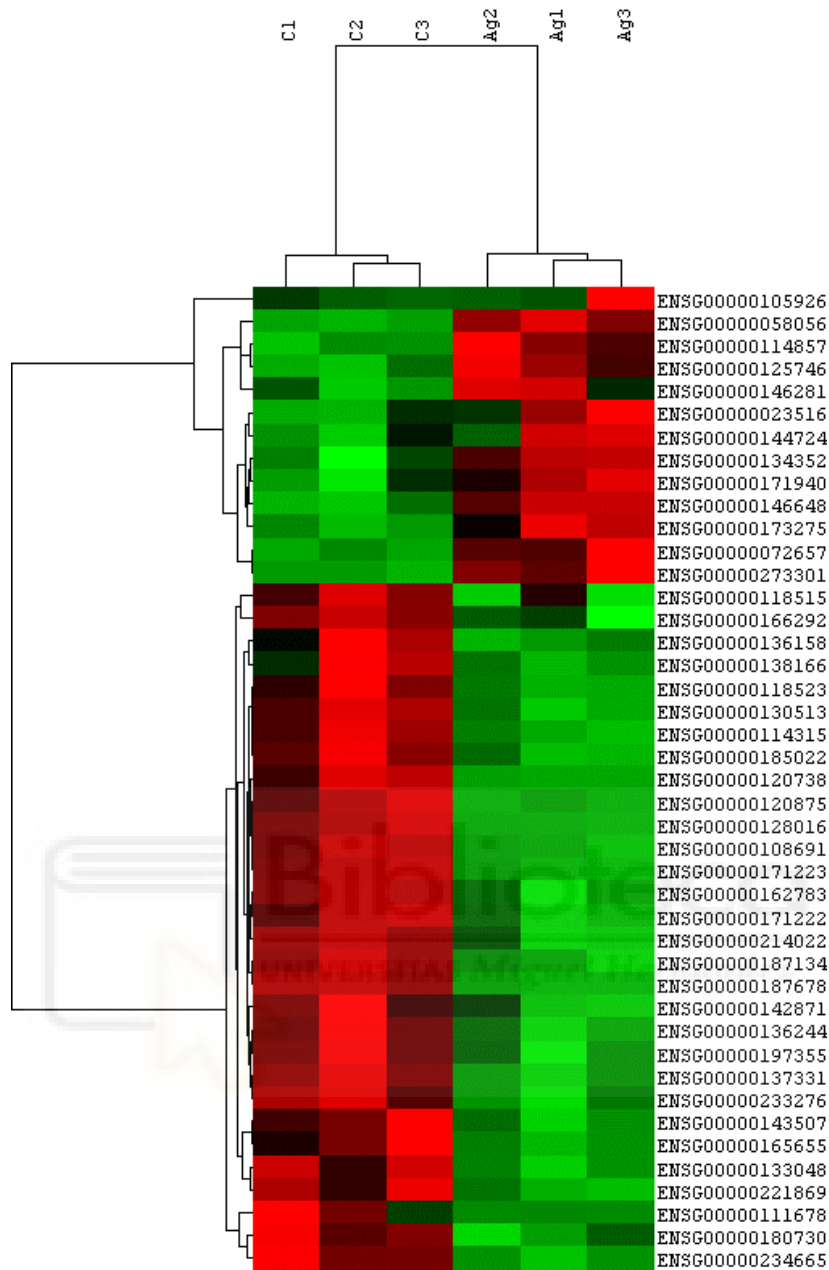


Figura 7. Mapa de calor de los niveles de expresión de los genes expresados en las muestras control y las muestras tratadas con Ag-NPs determinados mediante ARNseq. Este mapa fue generado con el programa Gene Cluster 3.0 seleccionando la opción Agrupamiento jerárquico para los genes del estudio. El color rojo representa niveles de expresión más elevados que el color verde.

Tabla 6.- Términos de la ontología de función molecular sobrerrepresentados entre los genes expresados diferencialmente

Proceso biológico	Genes de referencia	Genes expresados	Genes esperados	Factor de enriquecimiento	P valor	FDR
Actividad de la señal transductora	223	6	0,82	7,31	$1,71 \cdot 10^{-4}$	$3,22 \cdot 10^{-2}$
Actividad de la fosfoproteína fosfatasa	90	4	0,33	12,07	$3,75 \cdot 10^{-4}$	$3,72 \cdot 10^{-2}$

Tabla 7.- Términos de la ontología de procesos biológicos sobrerrepresentados entre los genes expresados diferencialmente

Proceso biológico	Genes de referencia	Genes expresados	Genes esperados	Factor de enriquecimiento	P valor	FDR
Señal de transducción	1010	11	3,72	2,96	$3,29 \cdot 10^{-6}$	$3,89 \cdot 10^{-4}$
Señal de transducción intracelular	561	9	2,07	4,36	$1,77 \cdot 10^{-4}$	$6,97 \cdot 10^{-3}$
Cascada MAPK	171	7	0,63	11,12	$8,51 \cdot 10^{-4}$	$2,51 \cdot 10^{-2}$
Regulación biológica	1243	13	4,58	2,84	$4,25 \cdot 10^{-5}$	$3,34 \cdot 10^{-3}$
Regulación de la función molecular	219	6	0,81	7,44	$1,55 \cdot 10^{-4}$	$7,34 \cdot 10^{-3}$
Regulación de la actividad catalítica	172	6	0,63	9,47	$3,68 \cdot 10^{-4}$	$1,24 \cdot 10^{-2}$
Regulación del proceso metabólico del fosfato	290	7	1,07	6,55	$9,03 \cdot 10^{-5}$	$5,33 \cdot 10^{-3}$
Respuesta a estímulos	1096	16	4,04	3,96	$7,72 \cdot 10^{-7}$	$1,82 \cdot 10^{-4}$
Procesos de desarrollo	705	9	2,60	3,47	$9,29 \cdot 10^{-4}$	$2,44 \cdot 10^{-2}$

Tabla 8.- Términos de la ontología génica asociados a los genes expresados diferencialmente

Componente celular	Proceso biológico											Función molecular															
	Orgánulos	Membrana macromolecular	Complejo macromolecular	Región extracelular	Matriz extracelular	Parte celular	Union celular	Respuesta a estímulos	Proceso de organismo pluricelular	Proceso metabólico	Locomoción	Localización inmune	Proceso de desarrollo	Proceso celular	Biogénesis	Regulación Biológica		Adhesión biológica	transportadora	Actividad transdutora	Actividad de receptores	Actividad reguladora de canales	Actividad Catalítica	Unión	Actividad antioxidante		
																										ENSG00000023516	
																											ENSG00000058056
																											ENSG00000072657
																											ENSG00000105926
																											ENSG00000108691
																											ENSG00000111678
																											ENSG00000114315
																											ENSG00000114857
																											ENSG00000118515
																											ENSG00000118523
																											ENSG00000120738
																											ENSG00000120875
																											ENSG00000125746
																											ENSG00000128016
																											ENSG00000130513
																											ENSG00000133048
																											ENSG00000134352
																											ENSG00000136158
																											ENSG00000136244
																											ENSG00000137331
																											ENSG00000138166
																											ENSG00000142871
																											ENSG00000143507
																											ENSG00000144724
																											ENSG00000146281
																											ENSG00000146648
																											ENSG00000162783
																											ENSG00000165655
																											ENSG00000166292
																											ENSG00000171222
																											ENSG00000171223
																											ENSG00000171940
																											ENSG00000173275
																											ENSG00000180730
																											ENSG00000185022
																											ENSG00000187134
																											ENSG00000187678
																											ENSG00000197355
																											ENSG00000214022
																											ENSG00000221869
																											ENSG00000233276

Con los datos obtenidos con el análisis con PANTHER se obtuvieron tres tablas con los términos más globales de la GO (molecular function, biological process y cellular component) éstas se combinaron para formar la Tabla 8 y tener, así, una forma más sencilla de la visualización de los resultados del análisis. En esta tabla se puede observar qué proceso está afectado y qué gen es el causante de esa alteración indicándose con un símbolo +.

La Tabla 8 muestra los procesos afectados en la función molecular de las células de glía y los productos de los genes alterados por la exposición a Ag-NPs. Los datos han sido obtenidos al analizar con PANTHER la lista de los 43 genes expresados. Se puede observar que los procesos con mayor número de productos génicos alterados son las funciones de unión y de actividad catalítica, con 13 genes expresados diferencialmente en cada una de estas funciones celulares. El resto de las funciones celulares anotadas por PANTHER (actividad antioxidante, actividad reguladora de canales, actividad reguladora de canales, actividad de receptores, actividad de la señal transductora y actividad transportadora) mostró entre 1 y 5 genes con expresión alterada.

Unión celular y parte celular fueron los componentes celulares con un mayor número de genes con expresión alterada (11 en cada una de estas categorías). El resto de componentes celulares anotados por PANTHER (matriz extracelular, región extracelular, complejo macromolecular, membrana y orgánulos) presentaron un número de genes con expresión alterada que osciló entre 2 y 4.

Once diferentes procesos biológicos fueron identificados por PANTHER como afectados por genes expresados diferencialmente. Los procesos más afectados fueron: regulación biológica (13 genes alterados), proceso celular (16 genes alterados), proceso metabólico (19 genes alterados) y respuesta a estímulos (16 genes alterados). El resto de procesos biológicos anotados por PANTHER presentaron entre 1 y 8 genes con expresión alterada.

4.3.1. Rutas metabólicas

La Tabla 9 muestra las rutas metabólicas con genes con expresión alterada por exposición de células T98G a Ag-NPs. Se encontraron alteradas un total de 12 rutas diferentes de las cuales, tres de ellas aparecieron con solamente un gen con expresión alterada, cuatro (mapa de señalización CCKR, ruta de señalización de FGF, ruta de señalización de interleucinas y ruta de señalización de TGF-beta) lo hicieron con 2 genes con expresión alterada, Finalmente, las restantes cuatro rutas (ruta del receptor de señalización FGF, ruta del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, ruta de señalización de la inflamación mediada por quimiocinas y citoquinas y respuesta al estrés oxidativo) presentaron 3 genes con expresión alterada.

Tabla 9.- Alteraciones en las rutas metabólicas causadas por la exposición a Ag-NPs

Proceso	Genes con expresión alterada implicados
Estimulación de la señalización de Angiotensina II mediante proteínas G y beta arrestin	Early growth response protein 1
Mapa de señalización CCKR	Early growth response protein 1 Radiation-inducible immediate-early gene IEX-1
Ruta de señalización de caderina	Epidermal growth factor receptor Protein sprouty homolog 4
Ruta del receptor de señalización EGF	Protein sprouty homolog 2 Epidermal growth factor receptor Protein sprouty homolog 4
Ruta de señalización de FGF	Protein sprouty homolog 2 Transcription factor jun-B
Ruta del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina	Early growth response protein 1 Epidermal growth factor receptor Transcription factor jun-B
Ruta de señalización de la inflamación mediada por quimiocinas y citoquinas	C-C motif chemokine 2 Interlukin-6
Ruta de señalización de interleucinas	Interlukin-6 Interlukin-6 receptor subunit beta
Ruta de señalización de NOTCH	Transcription factor HES-1
Respuesta al estrés oxidativo	Dual specificity protein phosphatase 10 Dual specificity protein phosphatase 5 Dual specificity protein phosphatase 4
Ruta de señalización de TGF-beta	Transcription factor jun-B Growth/differentiation factor 15
Ruta P38 MAPK	Dual specificity protein phosphatase 10

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se han estudiado las alteraciones transcriptómicas inducidas en células T98G de glioblastoma humano por exposición a una concentración de Ag-NPs que no causa toxicidad significativa con el objetivo de determinar los mecanismos moleculares de neurotoxicidad de este NM.

Genes expresados diferencialmente y su asignación a términos GO

Se encontró que la exposición a Ag-NPs alteraba de manera estadísticamente significativa la expresión de 42 diferentes genes expresados por estas células. El análisis de GO de los genes con expresión alterada mostró un importante número de componentes celulares, procesos biológicos y funciones moleculares alteradas (Tabla 8).

Los genes que mostraron implicación en un mayor número términos GO fueron (Tabla 8): sprouty RTK signaling antagonist 4 (10 diferentes términos ontológicos), JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (10 diferentes términos ontológicos), epidermal growth factor receptor (11 diferentes términos ontológicos) y C-C motif chemokine ligand 2 (11 diferentes términos ontológicos). Es decir, un factor de transcripción regulador de la expresión génica (jun B), un inhibidor de un receptor implicado en regulación quinasas (sprouty 4), un receptor de membrana y un ligando de receptor de membrana (C-C motif).

El hecho de que todos estos genes estén alterando un alto número de términos de la ontología no es sorprendente porque todos los productos de estos genes están implicados con la captación de señales por parte de la célula y en la generación de una respuesta apropiada a través de segundos mensajeros y otras rutas metabólicas de señalización. De hecho, los términos de la ontología de procesos biológicos sobrerrepresentados entre los genes expresados diferencialmente incluyen alteraciones en la transducción de señales, en la respuesta a estímulos y en la regulación de las MAPK quinasas, que regulan la transcripción modificando la actividad de proteínas (incluyendo factores de transcripción) (Tablas 6 y 7).

Rutas metabólicas alteradas por exposición a Ag-NPs

Los genes con expresión alterada como consecuencia de exposición de células T98G a Ag-NPs se asociaron a alteraciones en la expresión de genes de un total de 12 diferentes rutas metabólicas (Tabla 9). La relevancia fisiológica de algunas de las rutas metabólicas alteradas en células de glía está todavía por ser analizada y evaluada en el laboratorio, por ejemplo la estimulación de la señalización de angiotensina II mediante proteínas G y beta arrestin o el mapa de señalización CCKR (entre otras). No obstante, la

relevancia fisiológica de algunas otras rutas alteradas es, como se comenta a continuación, bastante más clara.

Ruta de señalización de factores de crecimiento fibroblastos

Sin embargo, otras rutas metabólicas mostradas en la Tabla 9 tienen un significado mucho más claro en célula glial. Este es el caso de las alteraciones en ruta de señalización FGF. Los factores de crecimiento fibroblásticos o FGF (del inglés “*fibroblast growth factors*”) son un grupo de polipéptidos que actúan en las etapas tempranas del desarrollo embrionario y durante la organogénesis. FGF también juega un papel en los tejidos adultos donde median las funciones metabólicas, de reparación y regeneración, a menudo mediante la reactivación de las vías de señalización del desarrollo (Ornitz and Itoh, 2015). Los FGF se encuentran distribuidos en un gran número de tejidos adultos, pero existe un FGF específico de glía (FGF 9) que se requiere para la migración neuronal y para la translocación de células astrogliales (Ornitz and Itoh, 2015). Nótese que T98G es un glioblastoma multiforme, es decir que incluye astrocitos, y que por lo tanto éstos pueden estar viendo alterado su papel como consecuencia de la desregulación de la ruta de señalización de los FGF derivada de la exposición a Ag-NPs.

Rutas relacionadas con inflamación

Además de la ruta de señalización FGF también aparecen otras dos rutas que estarían íntimamente relacionadas ambas con procesos de inflamación. Nos referimos a la ruta de señalización de la inflamación mediada por quimiocinas y citoquinas (con tres genes con expresión alterada) y a la ruta de señalización de interleucinas (con dos genes con expresión alterada) (Tabla 9).

Existe una AOP bien establecida que relaciona la secuencia de eventos que acontece en la respuesta inflamatoria de un tejido (Figura 8) (Villeneuve et al., 2018). Independientemente del tejido, el proceso inflamatorio se puede organizar en la serie de etapas secuenciales que se muestran en la Figura 8. La interacción de tejidos sanos con un factor de estrés, como pudieran ser las Ag-NPs, puede evocar la liberación de mediadores que inician la inflamación. En el caso de las células T98G los mediadores que inician la inflamación son quimiocinas, citoquinas e interleucinas (Tabla 9).

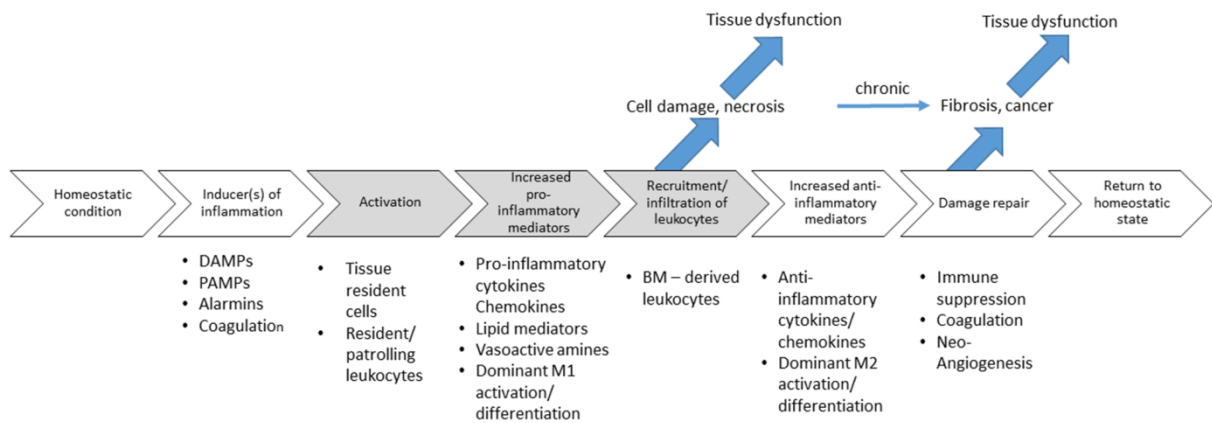


Figura 8. Modelo generalizado de pasos secuenciales implicados en la respuesta inflamatoria en un tejido. La secuencia de galones indica anticipado de adaptación / protección respuesta a una señal de daño. Las flechas indican una trayectoria divergente desde un estado homeostático adaptativo a una respuesta desadaptativa / adversa. DAMP, asociado a daños patrones moleculares; PAMP, patrones moleculares asociados a patógenos; BM, médula ósea. (Tomado de Villeneuve et al., 2018)

La neuroinflamación es un fenómeno con efectos potencialmente nocivos, como es la neurodegeneración y el daño en las funciones cognitivas. Así, la AOP que explica la neurodegeneración y el daño en el aprendizaje y la memoria inducida por los antagonistas de los receptores del ácido N-metil-D- aspartato incluye en una de sus etapas finales la neuroinflamación (Villeneuve et al., 2018). Por lo tanto, si la exposición a Ag-NPs induce inflamación, como parece indicar la alteración de las rutas de señalización de la inflamación mediada por quimiocinas, citoquinas e interleucinas cabe pensar que la exposición crónica a Ag-NPs podría igualmente desencadenar neurodegeneración y alteraciones en aprendizaje.

La inflamación como consecuencia de la exposición a NMs es un efecto adverso que ya había sido publicada por otros autores tanto *in vitro* como *in vivo*. Así por ejemplo, la secreción de citoquinas proinflamatorias ha sido también detectada en cultivos primarios de microglía de rata expuestos a NMs de dióxido de silicio (Migliore et al., 2015). La sobreexpresión de genes de respuesta del sistema inmune e inflamatorio en cerebro de ratón también es un efecto inducido por la exposición a nanopartículas de Ag (Amiri et al., 2018) como las empleadas en este TFG. La inflamación de la barrera hematoencefálica (formada por entre otros tipos celulares por glía como las células T98G empleadas en este TFG) en ratas dosificadas *in vivo* con dióxido de silicio también ha sido descrita por Migliore y colaboradores (2015).

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

6.1. Conclusiones

1 La exposición de células de glioblastoma humano T98G durante 72 horas a concentraciones no citotóxicas de nanopartículas de plata indujo alteraciones en el transcriptoma de esta línea celular aumentando la expresión de 12 genes y disminuyendo la de otros 29.

2 Las alteraciones en el transcriptoma de células T98G de glioblastoma humano expuestas a nanopartículas de plata a concentraciones no citotóxicas afectaron a las tres diferentes subcategorías de la ontología génica; siendo el proceso biológico la más afectada con 11 diferentes términos alterados, y estando el componente celular y la función molecular afectados en menor medida con 7 diferentes términos cada una de ellas.

3 La exposición de células de glioblastoma humano T98G durante 72 horas a concentraciones no citotóxicas de nanopartículas de plata alteró un total de 12 diferentes rutas metabólicas, siendo el proceso de inflamación y la de factores de crecimiento de fibroblastos las que presentan una significación biológica más clara.

4 De entre los genes de células de glioblastoma humano T98G con expresión alterada por exposición durante 72 horas a concentraciones no citotóxicas de nanopartículas de plata se encontró una sobrerrepresentación de genes implicados en la detección de señales por parte de la célula y en la generación de una respuesta apropiada a través de segundos mensajeros y otras rutas metabólicas de señalización.

5 Los resultados de este TFG serán de utilidad para interpretar los mecanismos moleculares de neurotoxicidad inducidos por nanopartículas de plata en glía.

6.2. Proyección futura

El análisis de las alteraciones inducidas por nanopartículas de plata en el transcriptoma de células T98G de glioblastoma humano permitirá interpretar los mecanismos moleculares de neurotoxicidad de estas nanopartículas. Para ello sería necesario:

1 Correlacionar las alteraciones transcriptómicas descritas en este TFG con alteraciones proteómicas.

2 Verificar los mecanismos de toxicidad propuestos observando si la alteración de la expresión de genes mediante herramientas de biología molecular (por ejemplo el

silenciamiento mediante ARNs de interferencia o la sobreexpresión mediante transfección con plásmidos apropiados) es capaz de producir aguas abajo efectos proteómicos y transcriptómicos similares a los producidos por exposición a nanopartículas de plata.

Además, este TFG se enmarca en un proyecto que se está desarrollando en el laboratorio receptor cuyo objetivo último es desarrollar herramientas que permitan agrupar nanomateriales para evaluar el riesgo asociado a su uso reduciendo así costes y tiempo. Para ello sería necesario, además de lo descrito en párrafos anteriores:

3 Aplicar metodologías similares a las empleadas en este TFG con otros nanomateriales modelo.

4 Buscar rutas de efecto adverso comunes a los diferentes nanomateriales estudiados para proponer biomarcadores moleculares de efecto para la identificación de peligros asociados a la exposición a nanomateriales.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahamed M, Alsahhi MS, Siddiqui MK. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1841-1848.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25(1):25-29.
- Bakshi MS. Nanotoxicity in Systemic Circulation and Wound Healing. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(6):1253-1274.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;2114-2120
- Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*. 2009;38:1767-1771
- Costa PM, Fadeel B. Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;299:101-111.
- Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, Cummins E. Nanotechnologies in the food industry-Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology*. 2012;24:30-46
- Eisen M, Spellman P, Brown P, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998;95:14863-14864
- European Commission. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee. Second Regulatory Review on Nanomaterials. 2012; Disponible en: [http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/second_regulatory_review_on_nanomaterials_-_com\(2012\)_572.pdf](http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/second_regulatory_review_on_nanomaterials_-_com(2012)_572.pdf)
- European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee. Scientific Opinion: Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal*. 2011;9(5):2140. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2140.pdf>
- Feng X, Chen A, Zhang Y, Wang J, Shao L, Wei L. Application of dental nanomaterials: potential toxicity to the central nervous system. *Int J Nanomedicine*. 2015b;10:3547-3565.

- Feng X, Chen A, Zhang Y, Wang J, Shao L, Wei L. Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2015a;10:4321-4340.
- Gebel T, Foth H, Damm G, Freyberger A, Kramer PJ, Lilienblum W, Röhl C, Schupp T, Weiss C, Wollin KM, Hengstler JG. Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment. *Arch Toxicol*. 2014;88(12):2191-2211.
- Guo Y, Dai Y, Zhao S, Samuels DC, Shyr Y. Improvements and impacts of GRCh38 human reference on high throughput sequencing data analysis. *Genomics*. 109;93-90
- Hoyt BW, Mason E. Nanotechnology Emerging health issues. *Journal of Chemical Health & Safety*. 2009;15(2):10-15.
- Katz L, Dewan K, Bronaugh R. Nanotechnology in cosmetics. Elsevier, 2015; 127-137.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*. 2015;(12)357-360
- Leist M, Ghallab A, Graepel R, Marchan R, Hassan R, Bennekou SH, Limonciel A, Vinken M, Schildknecht S, Waldmann T, Danen E, van Ravenzwaay B, Kamp H, Gardner I, Godoy P, Bois FY, Braeuning A, Reif R, Oesch F, Drasdo D, Höhme S, Schwarz M, Hartung T, Braunbeck T, Beltman J, Vrieling H, Sanz F, Forsby A, Gadaleta D, Fisher C, Kelm J, Fluri D, Ecker G, Zdrzil B, Terron A, Jennings P, van der Burg B, Dooley S, Meijer AH, Willighagen E, Martens M, Evelo C, Mombelli E, Taboureau O, Mantovani A, Hardy B, Koch B, Escher S, van Thriel C, Cadenas C, Kroese D, van de Water B, Hengstler JG. Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. *Arch Toxicol*. 2017;91(11):3477-3505.
- Li. H, Handsaker B, Wysoker A, Fennel T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Drubin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools *Bioinformatics*. 2009; 25:2078-2079
- Migliore L, Uboldi C, Di Bucchianico S, Coppedè F. Nanomaterials and neurodegeneration. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(2):149-170.
- Oki NO, Edwards SW. An integrative data mining approach to identifying adverse outcome pathway signatures. *Toxicology*. 2016;350-352:49-61.
- Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) Guidance document on developing and assessing Adverse Outcome Pathways. In: OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 184. 2013. Disponible en: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2013\)6&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2013)6&doclanguage=en)
- Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. In: OECD Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and the working party on

- chemicals, pesticides and biotechnology. Series on Testing and Assessment No. 184. 2017.
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2013\)6&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2013)6&doclanguage=en)
- Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015;4(3):215-266.
- Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. Nanomedicine. 2012;8(2):147-66.
- Repar N, Li H, Aguilar JS, Li QQ, Drobne D, Hong Y. Silver nanoparticles induce neurotoxicity in a human embryonic stem cell-derived neuron and astrocyte network. Nanotoxicology. 2011;12(2):104-116.
- Saldanha A. Java Treeview-extensible visualization of microarray data. Bioinformatics. 2004;17:3246-3248
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol. 7:3.
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) of the European Commission. Final opinion on: Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. 2013. ISBN: 978-92-79-30132-2. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_039.pdf
- The Gene Ontology Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. Nucleic Acids Res. 2017;45(D1):D331-D338.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nat. Protoc. 2012;7:562-578
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat. Biotechnol. 2010;28:511-515.
- Villeneuve DL, Landesmann B, Allavena P, Ashley N, Bal-Price A, Corsini E, Halappanavar S, Hussell T, Laskin D, Lawrence T, Nikolic-Paterson D, Pallardy M, Paini A, Pieters R, Roth R, Tschudi-Monnet F. Representing the Process of Inflammation as Key Events in Adverse Outcome Pathways. Toxicol Sci. 2018;163(2):346-352.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Resultados obtenidos al reanalizar los datos tras eliminar las lecturas duplicadas

Tabla 10.- Genes expresados diferencialmente según el análisis realizado tras eliminar las lecturas duplicadas

Gen	FPKM (control)	FPKM (AgNM)	log ₂ FC	p-valor	q-valor
ENSG00000023516	6,54	8,98	0,46	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000058056	4,24	6,54	0,62	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000092470	3,70	6,19	0,74	2,5·10 ⁻⁴	0,045
ENSG00000108691	160,91	76,17	-1,08	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000110367	13,65	20,01	0,55	0,0002	0,039
ENSG00000111678	82,27	59,16	-0,48	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000114030	18,25	25,47	0,48	0,0002	0,039
ENSG00000114315	7,26	2,75	-1,40	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000118193	3,21	4,23	0,40	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000118515	9,05	5,37	-0,75	2,5·10 ⁻⁴	0,045
ENSG00000118523	13,27	5,51	-1,27	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000120738	32,36	2,43	-3,73	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000120875	38,18	24,97	-0,61	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000125968	36,97	26,24	-0,49	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000128016	12,59	7,52	-0,74	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000130513	215,57	127,78	-0,75	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000133773	37,86	27,29	-0,47	0,00015	0,031
ENSG00000134070	5,94	4,51	-0,40	0,00015	0,031
ENSG00000134352	147,80	234,52	0,67	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000136158	10,83	6,99	-0,63	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000136244	53,27	28,81	-0,89	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000137331	41,15	24,26	-0,76	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000138166	17,09	9,80	-0,80	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000142684	64,00	48,79	-0,39	0,0001	0,024
ENSG00000142871	82,94	51,88	-0,68	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000144724	5,84	8,72	0,58	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000146247	2,01	2,74	0,45	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000146281	1,55	2,31	0,58	0,0002	0,039

Gen	FPKM (control)	FPKM (AgNM)	log ₂ FC	p-valor	q-valor
ENSG00000151632	1675,32	1274,83	-0,39	2·10 ⁻⁴	0,039
ENSG00000152601	33,51	45,49	0,44	1·10 ⁻⁴	0,024
ENSG00000154229	22,23	28,41	0,35	1·10 ⁻⁴	0,024
ENSG00000160888	11,79	8,60	-0,45	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000162783	19,43	13,73	-0,50	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000165655	4,89	3,35	-0,55	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000166292	14,79	9,68	-0,61	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000171159	50,23	39,00	-0,37	2,5·10 ⁻⁴	0,045
ENSG00000171222	85,67	59,24	-0,53	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000171223	14,07	6,84	-1,04	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000173275	5,81	8,44	0,54	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000174109	29,83	22,86	-0,38	1·10 ⁻⁴	0,024
ENSG00000176018	12,62	16,90	0,42	1,5·10 ⁻⁴	0,031
ENSG00000176476	28,37	21,37	-0,41	2,5·10 ⁻⁴	0,045
ENSG00000177888	3,30	4,69	0,51	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000179941	5,69	7,50	0,40	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000180730	8,15	5,72	-0,51	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000181649	39,78	29,90	-0,41	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000183597	21,95	34,93	0,67	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000183779	8,63	6,65	-0,38	1,5·10 ⁻⁴	0,031
ENSG00000183864	9,53	12,72	0,42	1,5·10 ⁻⁴	0,031
ENSG00000185022	20,70	13,16	-0,65	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000185112	9,93	7,16	-0,47	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000187134	981,35	720,68	-0,45	1·10 ⁻⁴	0,024
ENSG00000187189	5,01	6,62	0,40	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000187678	2,61	0,91	-1,52	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000196139	569,44	447,38	-0,35	1,5·10 ⁻⁴	0,031
ENSG00000197355	35,14	26,78	-0,39	1,5·10 ⁻⁴	0,031
ENSG00000198542	36,29	48,40	0,42	1·10 ⁻⁴	0,024
ENSG00000204186	2,31	3,07	0,41	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000221869	45,18	33,40	-0,44	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000233276	104,66	79,07	-0,40	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000233608	21,62	16,63	-0,38	1·10 ⁻⁴	0,024

Gen	FPKM (control)	FPKM (AgNM)	log ₂ FC	p-valor	q-valor
ENSG00000234665	6,48	2,68	-1,27	1·10 ⁻⁴	0,024
ENSG00000268043	2,90	4,03	0,47	5·10 ⁻⁵	0,014
ENSG00000273301	2,91	4,47	0,62	5·10 ⁻⁵	0,014

Tabla 11.- Denominación de los productos de los genes expresados diferencialmente según el análisis realizado tras eliminar las lecturas duplicadas

Gen	Producto del gen
ENSG00000180730	Protein shisha-2 homolog
ENSG00000185112	Protein FAM43A
ENSG00000197355	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1
ENSG00000171223	Transcription factor jun-B
ENSG00000128016	mRNA decay activator protein ZFP36
ENSG00000130513	Growth/differentiation factor 15
ENSG00000120738	Early growth response protein 1
ENSG00000125968	DNA-binding protein inhibitor ID-1
ENSG00000233276	Glutathione peroxidase 1
ENSG00000136244	Interleukin-6
ENSG00000185022	Transcription factor MafF
ENSG00000133773	Thyroid transcription factor 1-associated protein 26
ENSG00000142871	Protein CYR61
ENSG00000144724	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma
ENSG00000198542	Integrin beta-like protein 1
ENSG00000173275	Zinc finger protein 449
ENSG00000114315	Transcription factor HES-1
ENSG00000187678	Protein sprouty homolog 4
ENSG00000154229	Protein kinase C alpha type
ENSG00000177888	Zinc finger and BTB domain-containing protein 41
ENSG00000136158	Protein sprouty homolog 2
ENSG00000118193	Kinesin-like protein
ENSG00000138166	Dual specificity protein phosphatase 5
ENSG00000181649	Pleckstrin homology-like domain family A member 2
ENSG00000196139	Aldo-keto reductase family 1 member C3
ENSG00000111678	Protein C10
ENSG00000152601	Muscleblind-like protein 1

Gen	Producto del gen
ENSG00000108691	C-C motif chemokine 2
ENSG00000118523	Connective tissue growth factor
ENSG00000092470	WD repeat-containing protein 76
ENSG00000120875	Dual specificity protein phosphatase 4
ENSG00000171159	UPF0184 protein C9orf16
ENSG00000183597	Transport and Golgi organization protein 2 homolog
ENSG00000142684	Zinc finger protein 593
ENSG00000166292	Transmembrane protein 100
ENSG00000134070	Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2
ENSG00000165655	Zinc finger protein 503
ENSG00000221869	CCAAT/enhancer-binding protein delta
ENSG00000183779	Zinc finger protein 703
ENSG00000176018	LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 3
ENSG00000183864	Protein Tob2
ENSG00000023516	A-kinase anchor protein 11
ENSG00000204186	DBF4-type zinc finger-containing protein 2
ENSG00000187189	Testis-specific Y-encoded-like protein 4
ENSG00000118515	Serine/threonine-protein kinase Sgk1
ENSG00000137331	Radiation-inducible immediate-early gene IEX-1
ENSG00000176476	SAGA-associated factor 29
ENSG00000162783	Immediate early response gene 5 protein
ENSG00000151632	Aldo-keto reductase family 1 member C2
ENSG00000110367	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6
ENSG00000160888	Immediate early response gene 2 protein
ENSG00000187134	Aldo-keto reductase family 1 member C1
ENSG00000179941	Bardet-Biedl syndrome 10 protein
ENSG00000058056	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13
ENSG00000233608	Twist-related protein 2
ENSG00000146247	PH-interacting protein
ENSG00000134352	Interleukin-6 receptor subunit beta
ENSG00000171222	SCAN domain-containing protein 1
ENSG00000114030	Importin subunit alpha-5
ENSG00000146281	Peptidase M20 domain-containing protein 2

Gen	Producto del gen
ENSG00000174109	Protein CCSMST1

Tabla 12.- Tabla donde se muestran los genes sobrerrepresentados tras eliminar las lecturas duplicadas. Datos obtenidos del análisis con Pantherdb GO-Slim

Proceso biológico	Genes de referencia	Genes expresados	Genes esperados	Factor de enriquecimiento	P valor	FDR
Señal de transducción	994	14	5,53	2,53	$9,87 \cdot 10^{-4}$	$2,59 \cdot 10^{-2}$
Señal de transducción intracelular	556	11	3,09	3,55	$2,43 \cdot 10^{-4}$	$1,43 \cdot 10^{-2}$
Cascada MAPK	171	7	0,95	7,35	$5,33 \cdot 10^{-5}$	$6,29 \cdot 10^{-3}$
Regulación biológica	1213	17	6,75	2,52	$2,59 \cdot 10^{-4}$	$1,22 \cdot 10^{-2}$
Regulación de la función molecular	215	7	1,20	5,85	$2,12 \cdot 10^{-4}$	$1,67 \cdot 10^{-2}$
Procesos de desarrollo	688	12	3,83	3,13	$3,83 \cdot 10^{-4}$	$1,51 \cdot 10^{-2}$
Muerte	201	6	1,12	5,36	$9,60 \cdot 10^{-4}$	$3,24 \cdot 10^{-2}$
Muerte celular	201	6	1,12	5,36	$9,60 \cdot 10^{-4}$	$2,83 \cdot 10^{-2}$
Respuestas a estímulos	1080	19	6,01	3,16	$4,09 \cdot 10^{-6}$	$9,64 \cdot 10^{-4}$



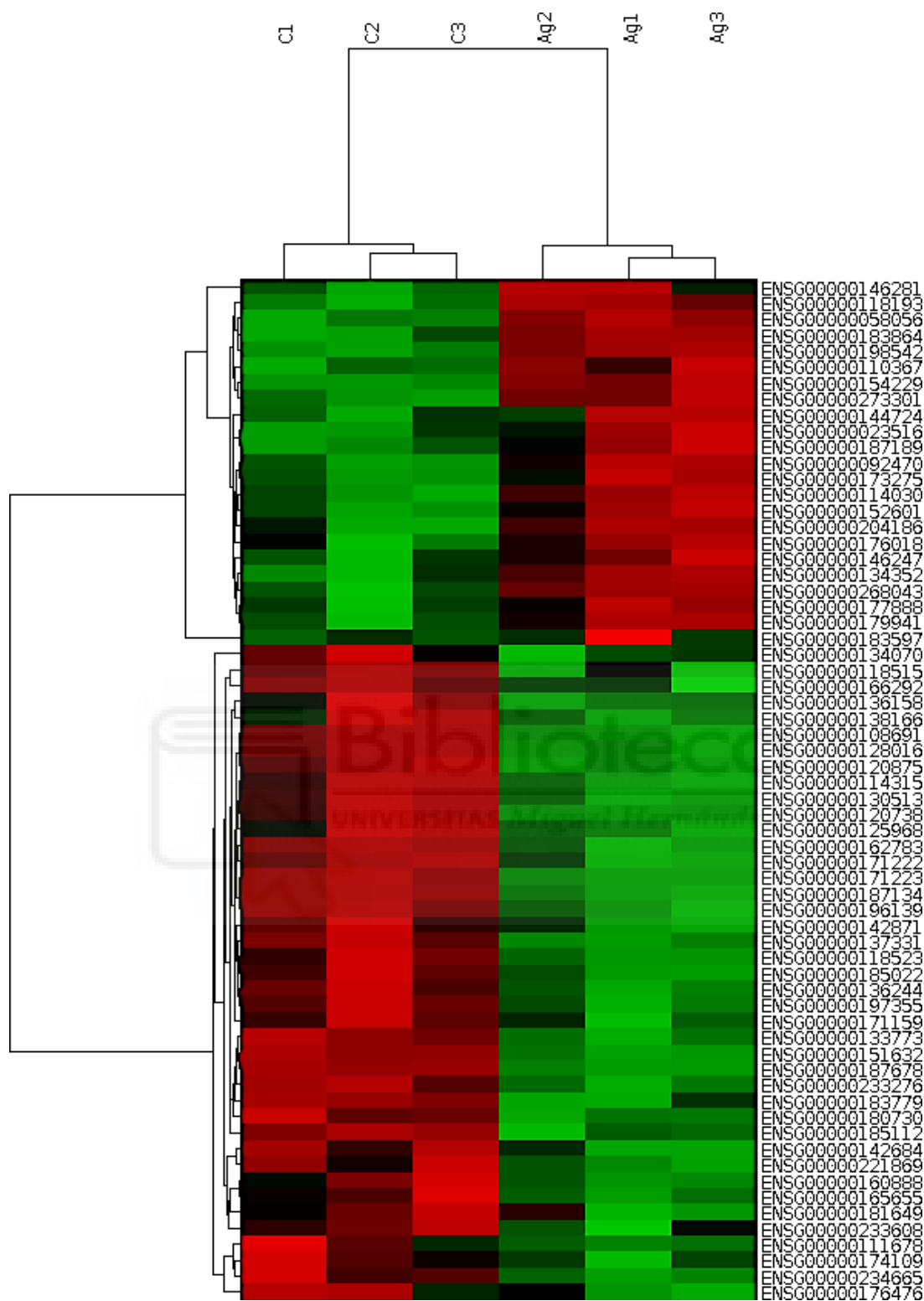


Figura 9. Mapa de calor de los niveles de expresión determinados mediante ARN-seq de los genes expresados en las muestras control y las muestras tratadas con Ag-NPs una vez eliminados los duplicados. Este mapa fue generado con el programa Gene Cluster 3.0 seleccionando la opción Agrupamiento jerárquico para los genes del estudio. El color rojo representa niveles de expresión más elevados que el color verde.

8.2. Agradecimientos

A mis profesores Miguel Ángel y Héctor, cuya ayuda ha sido indispensable para la realización de este trabajo.

A mi familia por ser mis cimientos estos años y vigilarme para que estudiara.

A todos mis amigos y compañeros, en especial a JoséRu, sin el cual no estaría presentando este TFG, gracias por los apuntes, las horas de estudio juntos y por aguantarme.

Sin vuestro apoyo no habría llegado hasta aquí.

A todos vosotros, muchas gracias,

