

Trabajo Fin de Grado
Biología

Caracterización bioquímica de un cíbrido mitocondrial: un modelo celular del síndrome de Pearson

Paula Martín Rubio

Directoras:

Carmen Hernández Ainsa
Sonia Emperador Ortiz

Ponente:

Julio Montoya Villarroya

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Índice

1	Resumen/abstract	1
2	Introducción	2
2.1	El síndrome de Pearson	2
2.2	Características de la genética mitocondrial.....	2
2.3	La mitocondria y el sistema OXPHOS.....	3
2.4	Modelos celulares para el estudio del síndrome de Pearson.....	4
3	Objetivos	5
4	Materiales y métodos	5
4.1	Cultivos celulares	5
4.1.1	Línea celular CibPS-143B	5
4.1.2	Manipulación y mantenimiento de la línea celular CibPS-143B	6
4.1.3	Descongelación y congelación de la línea celular CibPS-143B.....	6
4.1.4	Condiciones de crecimiento de la línea celular CibPS-143B para los ensayos bioquímicos	6
4.2	Técnicas de manipulación del ADN.....	7
4.2.1	Extracción de ADN	7
4.2.2	Cuantificación de ADN.....	7
4.2.3	Cuantificación del porcentaje de delección de mtADN mediante qPCR	7
4.2.4	Cuantificación del número de copias de mtADN mediante qPCR.....	9
4.3	Técnicas de manipulación de proteínas	10
4.3.1	Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford	10
4.3.2	Preparación de muestras para la medida de la actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial.....	11
4.3.3	Medida de la actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial.....	11
4.3.4	Análisis de resultados de actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial.....	12
4.3.5	Medida de la actividad de la citrato sintasa.....	12
4.4	Medida de ATP mitocondrial	13
4.5	Análisis estadístico	14

5	Resultados y discusión	15
5.1	Determinación del porcentaje de delección de los clones	15
5.2	Análisis de los niveles de mtADN.....	17
5.3	Análisis de actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial	18
5.4	Análisis de actividad de citrato sintasa.....	19
5.5	Estudio de los niveles de ATP mitocondrial.....	20
6	Conclusiones/conclusions	21
7	Bibliografía	23
	Anexos	26
	Anexo I: abreviaturas.....	26
	Anexo II: materiales empleados	27

1 Resumen

El Síndrome de Pearson (PS) es una enfermedad mitocondrial rara caracterizada por la aparición de fallos multisistémicos, como anemia sideroblástica refractaria y disfunción del páncreas exocrino. Está causada por deleciones grandes únicas del ADN mitocondrial (mtADN) que afectan al sistema OXPHOS de la mitocondria.

En este trabajo estudiamos el efecto en el metabolismo celular de una deleción mitocondrial de 6517 pb (6897-13414), causante del PS. Utilizamos como modelo celular cuatro clones de cíbridos mitocondriales de la línea celular CibPS-143B, con grados de heteroplasma del 0 %, 60-65 %, 70-75 % y 75-80 %.

Los parámetros analizados fueron el número de copias de mtADN, la actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial (CIV), la actividad de citrato sintasa y los niveles de ATP mitocondrial.

Observamos que al aumentar el grado de heteroplasma de las células, se incrementa el déficit del CIV y disminuye la producción de ATP mitocondrial. Por otro lado, el aumento del porcentaje de deleción supone un incremento del número de copias de mtADN, lo que seguramente se trate de un mecanismo de compensación de la célula.

Además, se ha observado que durante el crecimiento en cultivo los clones estudiados tienden a aumentar su grado de heteroplasma, evolucionando hacia la homoplasma mutante.

Abstract

Pearson syndrome (PS) is a rare mitochondrial disease characterized by the appearance of multisystemic failures, such as refractory sideroblastic anemia and exocrine pancreatic dysfunction. It is caused by single large-scale deletions of mitochondrial DNA (mtDNA) which affect the mitochondrial OXPHOS system.

We have studied the effect of a 6517 bp mitochondrial deletion (6897-13414) on cell metabolism, which causes the PS. We use four mitochondrial cybrid clones of the cell line CibPS-143B, with heteroplasmy levels of 0 %, 60-65 %, 70-75 % and 75-80 % as a cell model of PS.

We analyzed different parameters such as the amount of copies of the mtDNA, the activity and quantity of the mitochondrial complex IV (CIV), the citrate synthase activity and the mitochondrial ATP levels.

We have observed a déficit in CIV and in mitochondrial ATP production when heteroplasmy increases in cells. Besides, an increase in the deletion percentage causes a rise in the amount of copies of mtDNA, which might be a compensation mechanism of the cell for survival.

Furthermore, it has been observed that there is an increase in heteroplasmy levels during the cell culture of the studied clones, which tend to mutant homoplasmy.

2 Introducción

2.1 El síndrome de Pearson

En Síndrome de Pearson (PS) es una enfermedad mitocondrial rara caracterizada clínicamente por la aparición de fallos multisistémicos, entre los que destacan anemia sideroblástica refractaria con vacuolización de los precursores medulares y disfunción del páncreas exocrino (1,2).

La prevalencia de la enfermedad es de menos de 1/1000000, habiendo únicamente alrededor de 100 casos descritos (3,4), sin embargo, como comparte características clínicas con otras anemias congénitas, el número de afectados podría ser mayor.

El PS está causado por deleciones grandes únicas del ADN mitocondrial (mtADN), que afectan a la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE), siendo la más común de 4977 pb. La severidad de la enfermedad está relacionada con el grado de heteroplasmia de las células y con el tipo de tejido afectado. El diagnóstico de PS se realiza mediante el estudio del mtADN, determinando la presencia de deleciones características de la enfermedad (1,5).

Las deleciones suelen aparecer esporádicamente, aunque se han descrito algunos casos de transmisión materna. No se ha demostrado su origen, sin embargo se han desarrollado dos hipótesis, ambas basadas en la existencia de secuencias repetidas en los extremos de la región delecionada. Estas regiones, que se encuentran conservadas, presentan cierto grado de homología con algunas secuencias implicadas en la replicación del mtADN y el procesamiento del mtARN, por lo que una de las hipótesis especula con que pueden estar causadas por una actividad ribonucleasa defectuosa, que reconozca las secuencias presentes en el mtADN generando su rotura. La otra hipótesis propuesta afirma que las deleciones se deben a una recombinación intramolecular entre las secuencias repetidas (6,7). Sin embargo, estas teorías no explicarían la existencia de deleciones no flanqueadas por secuencias de repetición.

Actualmente solo existen tratamientos sintomáticos para los pacientes con PS, basados en transfusiones de sangre, reemplazamiento de enzimas pancreáticas o tratamiento con eritropoyetina. A pesar de ello, los pacientes suelen fallecer en la infancia, normalmente antes de los 3 años, y aquellos que sobreviven desarrollan síndrome de Kearns-Sayre (KSS) que se caracteriza por oftalmoplejía, ataxia, retinitis pigmentaria, defectos de conducción cardíaca, miopatía y con fallecimiento antes de los 20 años (3,4).

2.2 Características de la genética mitocondrial

El genoma mitocondrial humano consiste en una molécula circular, cerrada, de doble cadena, que consta de 16569 pb. Codifica para 37 genes: 13 polipéptidos estructurales que pertenecen al sistema OXPHOS de la mitocondria, dos ARNs ribosómicos (rARNs) que forman parte de los ribosomas mitocondriales (12s y 16s) y 22 ARNs de

transferencia (tARNs). Por lo tanto, las mitocondrias poseen su propia maquinaria que le permite sintetizar las proteínas codificadas en el mtADN.

El genoma mitocondrial se encuentra altamente compactado, careciendo de regiones no codificantes, a excepción de una pequeña zona (alrededor del 7%) situada cerca del origen de replicación de la cadena pesada (8).

El mtADN se hereda exclusivamente por vía materna, derivando completamente del ovocito, por lo que presenta una herencia vertical no mendeliana.

Otra característica a destacar del genoma mitocondrial es la poliplasmia, es decir, el alto número de copias de mtADN por célula. En la mayoría de los tejidos hay entre 1000 y 10000 copias en cada célula, habiendo entre 2 y 10 moléculas por mitocondria.

En situación normal, todas las células de un individuo poseen el mismo tipo de mtADN, lo que denominamos homoplasmia, sin embargo la presencia de mutaciones en el mtADN hace que coexistan distintos tipos de moléculas, dando lugar a una situación de heteroplasmia.

Por lo tanto, las células de un individuo tendrán un determinado porcentaje de moléculas de mtADN mutadas, pudiendo resultar en una situación patológica. El porcentaje a partir del cual el sistema OXPHOS no es capaz de mantener el funcionamiento normal de la célula se denomina porcentaje umbral. Este porcentaje depende de cada tejido, siendo los más afectados el muscular y el nervioso.

Las copias de mtADN se reparten al azar durante la división celular entre las células hijas, denominamos a este fenómeno segregación mitótica. Por lo tanto, el fenotipo de las células hijas dependerá del número de copias mutadas que reciban.

Además, cabe destacar que la tasa de mutaciones del mtADN es muy elevada, unas 10-20 veces superior a la del nADN. Las principales causas de esto parecen ser la alta concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en las mitocondrias, y unos mecanismos de reparación del mtADN insuficientes (5,9).

2.3 La mitocondria y el sistema OXPHOS.

La mitocondria es un orgánulo celular cuya función principal es llevar a cabo el metabolismo oxidativo para proporcionar energía a la célula. Además, participa en la biosíntesis de otros elementos como pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, urea... (8)

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) es la ruta final del metabolismo energético mitocondrial, que conduce a la síntesis de ATP. Está formado por cuatro complejos respiratorios multienzimáticos que constituyen la CTE (complejo I o NADH deshidrogenasa, complejo II o succinato deshidrogenasa, complejo III o ubiquinol-citocromo c reductasa y complejo IV o citocromo c oxidasa), y la ATP sintasa (ATPasa). Se localiza en la membrana mitocondrial interna. La CTE cataliza la reducción del oxígeno a agua mediante el paso de los electrones procedentes de los equivalentes de reducción (NADH y FADH₂) producidos en el ciclo de Krebs y la β-oxidación. De forma acoplada, se

produce una transferencia de protones a través de la membrana hacia el espacio intermembrana, generándose un gradiente electroquímico que la enzima ATPasa aprovecha para sintetizar ATP. Además el sistema OXPHOS participa en otros procesos, como la producción de ROS, el transporte de proteínas y otros metabolitos como el calcio al interior de la mitocondria, la regulación de la apoptosis o la generación de calor.

A pesar de que en el mtADN únicamente están codificadas 13 (11 de la CTE y 2 subunidades de la ATPasa) de los 87 polipéptidos que forman parte del sistema OXPHOS (estando el resto codificados en el nADN), su integridad es esencial para su función. Además, en el sistema genético mitocondrial también están codificados tARNs y rARNs, que participan en la síntesis de proteínas mitocondriales (*figura 1*). Por esta razón, deleciones en el mtADN impiden el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS, dando lugar a defectos en la producción de ATP y en el resto de procesos en los que este participa, lo que implica la aparición de enfermedades mitocondriales, entre las que se encuentra el PS (5,10).

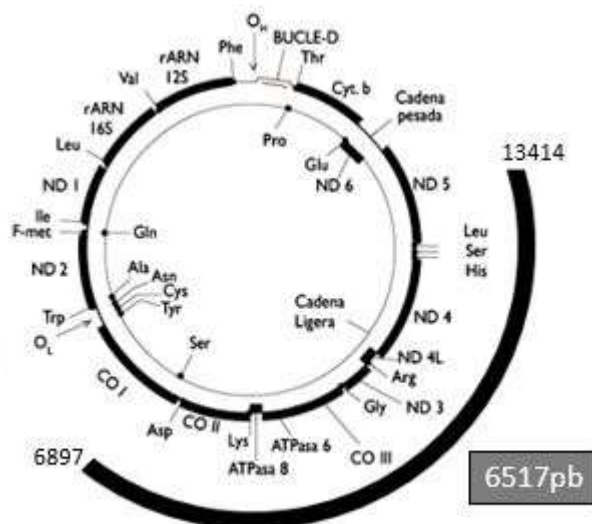


Figura 1. Mapa del genoma mitocondrial humano con la región delecionada marcada mediante una banda negra. Se especifican los límites de la delección (en los extremos de la banda) y su tamaño (encuadrado).

2.4 Modelos celulares para el estudio del síndrome de Pearson.

El desarrollo de modelos celulares ha supuesto una herramienta esencial para el estudio de las enfermedades mitocondriales, entre las que se encuentra el PS.

Entre estos modelos destacamos los cíbridos (híbridos transmitocondriales), que permiten mantener constante el fondo nuclear de las células con el objetivo de estudiar la influencia del mtADN en la función celular. Esto ha permitido obtener información muy valiosa sobre diversos parámetros bioquímicos, como la actividad de la CTE.

Para facilitar la generación de cíbridos se utilizan células desprovistas de su mtADN, denominadas rho0 (ρ0), que son fusionadas con fibroblastos enucleados llamados citoplastos, que aportarán las mitocondrias. El proceso puede simplificarse mediante el

uso de plaquetas, ya que son células carentes de núcleo, por lo que no se requiere la realización de una enucleación previa (10,11).

Otro modelo muy útil para el estudio de PS son las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), capaces de diferenciarse a cualquier célula específica del tejido en el que se desee estudiar el efecto de la enfermedad. Además, se ha observado que el grado de heteroplasmia de las iPSC varía durante su cultivo, permitiendo obtener células con diversos porcentajes de delección en el mtADN y facilitando el estudio de la enfermedad (12,13).

Para el desarrollo de este TFG hemos trabajado con cíbridos transmitocondriales como modelo celular del PS. Estos cíbridos poseen una delección de 6517 pb en el genoma mitocondrial, entre la posición 6897 y 13414, afectando a varios genes que codifican para subunidades del complejo IV (CIV) (parte de *MT-CO1*, *MT-CO2* y *MT-CO3*) y del complejo I (*MT-ND3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4* y parte de *MT-ND5*) de la CTE, tARNs (de Asp, Lys, Gly, Arg, His, Ser y Leu) y dos subunidades de la ATP sintasa (*MT-ATP6* y *MT-ATP8*) (figura 1) (14).

3 Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es iniciar la caracterización bioquímica de un cíbrido transmitocondrial con una delección única en el mtADN. Esta caracterización permitirá observar el efecto de la delección sobre el metabolismo celular y por tanto, ayudará a aumentar el conocimiento sobre el PS. Se analizarán los siguientes aspectos:

1. Número de copias de mtADN
2. Actividad del complejo IV del sistema OXPHOS.
3. Cantidad del complejo IV del sistema OXPHOS
4. Actividad de citrato sintasa
5. Producción de ATP mitocondrial

Otro objetivo es determinar el porcentaje umbral de heteroplasmia a partir del cual la delección causa patología. Para ello se compararán cuatro clones que poseen el mismo fondo nuclear y mtADN, pero con distinto porcentaje de heteroplasmia, por lo que esta será la única causa de las diferencias observadas.

4 Materiales y métodos

4.1 Cultivos celulares

4.1.1 Línea celular CibPS-143B

Para la realización de este estudio se ha utilizado la línea celular de cíbridos transmitocondriales CibPS-143B. Esta línea se había generado mediante la fusión de

células de osteosarcoma 143B ρ^0 (sin mtADN), que proporcionan el fondo nuclear, y fibroblastos enucleados de un paciente con PS, que aportan las mitocondrias. El genoma mitocondrial de esta línea posee una delección de 6517 pb, situadas entre las posiciones 6897 y 13414 del mtADN.

4.1.2 Manipulación y mantenimiento de la línea celular CibPS-143B

Para garantizar la esterilidad de los cultivos, las células se manipularon en campanas de flujo laminar modelos *LaminAir HB 22448* de *Holten* y *NU-437-400E* de *Nuair*. No se hizo uso de antibióticos para evitar la proliferación de microorganismos, ya que las mitocondrias podrían verse afectadas debido a su origen bacteriano.

El mantenimiento y crecimiento de las células se realizó en un incubador modelo *DHD AutoFlow Incubator* de *Nuair*, a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera enriquecida en CO₂ al 5 % y saturada de humedad.

Se realizaron cultivos de cuatro clones de la línea celular CibPS-143B en medio comercial DMEM alta glucosa (25 mM) y suplementado al 5 % con suero fetal bovino (SFB) de *Invitrogen* y uridina a 50 µg/ml.

Regularmente, se reemplazó el medio para asegurar la correcta conservación de las células. Para realizar un seguimiento del crecimiento y la morfología de los híbridos, se utilizó un microscopio invertido modelo *DMIL* de *Leica*.

4.1.3 Descongelación y congelación de la línea celular CibPS-143B

La descongelación de los híbridos se realizó trasvasando el contenido del criotubo a un tubo falcon con 5 ml de medio DMEM utilizando una pipeta pasteur. Este paso se realizó con rapidez para evitar el contacto prolongado de las células con el DMSO presente en el criotubo, ya que este resulta tóxico. Tras centrifugar a 1400 rpm durante 5 min en una centrífuga *Allegra X-22* de *Beckman Coulter (rotor S x 4250)* se resuspendió el precipitado obtenido y se sembraron las células en placas de 100 mm de diámetro con DMEM de alta glucosa (25 mM).

Durante el proceso se congelaron varios criotubos a partir de la placa de mantenimiento con el objetivo de utilizar las células en posteriores experimentos. Tras seguir el protocolo de tripsinización y recogida de células, se congelaron $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$ células en cada criotubo en medio DMEM 25 mM con 10 % de DMSO y 20 % SFB. Los criotubos se conservaron a -80 °C.

4.1.4 Condiciones de crecimiento de la línea celular CibPS-143B para los ensayos bioquímicos

Los híbridos se mantuvieron en medio DMEM de alta glucosa (25 mM) hasta alcanzar una densidad de alrededor del 80 % de la placa. Tras este tiempo, se cambiaron a medio DMEM de baja glucosa (5 mM), cercana a la concentración fisiológica, para simular condiciones análogas a las del organismo. Para esto, tras realizar un lavado con tampón

fosfato salino (PBS), se añadieron 2 ml de *TrypLE* con el objetivo de disgregar las células, posteriormente se recogieron en un falcon de 15 ml con 5 ml de DMEM con SFB para neutralizar la acción de la tripsina, y tras una centrifugación a 1400 rpm durante 5 min se resuspendió el precipitado obtenido en medio DMEM de baja glucosa (5 mM). A continuación se obtuvo la densidad y viabilidad de las células haciendo uso del contador celular *Countess™ Automated Cell Counter* de *Invitrogen* realizando una dilución 1:1 con azul tripán, y se sembraron entre 300000 y 400000 células en cada placa de 100 mm. Se sembraron 6 placas en medio DMEM de baja glucosa (5 mM) y una en alta glucosa (25 mM) para mantenimiento. Los híbridos permanecieron tres días en medio de baja glucosa.

Posteriormente se procedió a recoger las células. Tras tripsinizar con 2 ml de *TrypLE*, neutralizar la acción de la tripsina con 5 ml de medio con SFB y centrifugar en un tubo falcon para concentrar las células, el precipitado obtenido se resuspendió en 1ml de PBS y se traspasó a tubos eppendorf de 1,5 ml. Tras centrifugar haciendo uso de una centrifuga *Eppendorf MiniSpin® plus (rotor F-45-12-11)* se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet a -80 °C.

4.2 Técnicas de manipulación del ADN

4.2.1 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de uno de los dos pellets conservados de cada clon. Se hizo uso del kit de *Norgen Cells and Tissue DNA Isolation Kit*. Seguimos el protocolo del fabricante para *lisado de células que crecen en monocapa*, y posteriormente el de *purificación de ADN genómico para todos los tipos de lisado*. Finalmente se eluyó el ADN en 40 µl de H₂O pura.

4.2.2 Cuantificación de ADN

El ADN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro *ND-1000* de *Nanodrop*. Se realizó la medición de la concentración a $\lambda=260\text{nm}$. También se evaluó el grado de pureza respecto a proteínas, obteniendo el valor A_{260}/A_{280} , y el de pureza respecto a fenol y sales, mediante el ratio A_{260}/A_{230} . Los valores de estos parámetros deben encontrarse entre 1,8-2 y 2-2,2 respectivamente para descartar la presencia de contaminantes.

4.2.3 Cuantificación del porcentaje de delección de mtADN mediante qPCR

Para cuantificar el porcentaje de moléculas de mtADN que poseen la delección a estudiar, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) a partir del ADN total extraído. Se utilizó como control el ADN de una línea de fibroblastos carente de delección y H₂O pura como blanco. Se emplearon tres sondas de la casa comercial *ThermoFisher*:

- Mt-RNR1 (*HSO2596859_g1 MT-RNR1 VIC*): hibrida con el gen *12S*, situado en una zona del genoma mitocondrial muy conservada, por lo que se usó como referencia. Está marcada con el fluoróforo VIC.
- Mt-ND1 (*HSO2596873_S1 Mt-ND1 FAM*): hibrida con el gen mitocondrial *MT-ND1*. Se encuentra fuera de la delección objeto de estudio. Está marcada con el fluoróforo FAM.
- Mt-ND4 (*HSO2596876_g1 ZNF232, HN, Mt-ND4 FAM*): hibrida con el gen mitocondrial *MT-ND4*, situado dentro de la delección. Se encuentra marcada con el fluoróforo FAM.

La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de la casa *ThermoFisher*. Se prepararon las dos mezclas de reacción (una con la sonda Mt-ND4 y otra con la Mt-ND1) según las proporciones de la *tabla 1*:

Tabla 1. Mezcla de reacción para cuantificación del porcentaje de delección.

Reactivo	Volumen para un pocillo (μl)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
Sonda Mt-RNR1 + cebadores	1
Sonda Mt-ND1/Mt-ND4 + cebadores	1
H ₂ O pura	3

Se prepararon diluciones de las muestras de ADN, de manera que todas quedaron a una concentración similar (2-3 ng/μl). En cada uno de los pocillos se añadieron 15 μl de la mezcla de reacción y 5 μl de la dilución de la muestra de ADN.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador *StepOne Plus* de *Applied Biosystems*, siguiendo el programa detallado a continuación:

50 °C 2 min	} X40
95 °C 10 min	
95 °C 15 s	
60 °C 1 min	

Una vez terminada la reacción, se procedió a analizar los resultados obtenidos. Se visualizaron las curvas de amplificación con el programa *StepOne Software v2.3.*, se comprobó que no se producía amplificación en el blanco, y se descartaron los valores del triplicado con mucha variabilidad. Se tuvo en cuenta el valor del Ct, que hace referencia al número de ciclos necesarios para que el que el nivel de fluorescencia emitido supere cierto umbral y pueda ser detectado.

El valor de Ct obtenido para cada una de las sondas problemas (Mt-ND1 y Mt-ND4) se relativizó al obtenido para la sonda Mt-RNR1 en cada triplicado. Posteriormente, este valor obtenido para cada clon fue relativizado al hallado para el fibroblasto control. Se realizaron los siguientes cálculos:

$$Ct_{R1} - Ct_{sonda\ problema} = A$$

$$A_{clon} - A_{control} = B$$

$$2^B = C$$

$$Cx100 = D$$

$$100 - D = \% \text{ de deleción}$$

4.2.4 Cuantificación del número de copias de mtADN mediante qPCR

Con el objetivo de obtener los niveles de mtADN se realizó una qPCR a partir del ADN total extraído de cada uno de los clones. Se utilizó el ADN de una línea de fibroblastos sin deleción en su mtADN como control y H₂O pura como blanco.

Se emplearon dos sondas:

- 12S-FAM: hibrida con el gen mitocondrial 12S, y está marcada con el fluoróforo FAM. Su secuencia queda especificada en la *tabla 3*.
- RNAsa P-VIC: hibrida con el gen nuclear de la RNAsa P. Esta sonda se encuentra marcada con el fluoróforo VIC.

La reacción tuvo lugar en una placa de 96 pocillos de la casa comercial *ThermoFisher*.

Para cuantificar los niveles de mtADN, se hizo uso de una recta patrón, preparada mediante diluciones seriadas 1:3 en tampón Tris-HCl 10 mM pH=8,5 de la mezcla standard N, que contiene 9.10⁶ copias del gen mitocondrial 12S por cada 9.10⁴ copias del gen nuclear de la RNAsa P.

La mezcla de reacción se preparó para el número de pocillos necesario según los volúmenes de la *tabla 2*.

Tabla 2. Mezcla de reacción para cuantificación de los niveles de mtADN.

Reactivo	Volumen para un pocillo (μl)
TaqMan® Gen Expression Master Mix	10
Sonda RNAsa P-VIC	1
Sonda 12S-FAM	0,5
Cebador Mt-L (5μM)	0,5
Cebador Mt-H (5μM)	0,5
H ₂ O pura	2,5

Tabla 3. Secuencias y temperaturas de hibridación de la sonda 12S-FAM y los cebadores Mt-L y Mt-H, diseñados por el grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Universidad de Zaragoza.

Sonda/ Cebadores	Secuencia	Tm (°C)
Sonda 12S-FAM	5'-TGCCAGCCACCGCG-3'	69.3 °C
Cebador Mt-L	5'-CCACGGGAAACAGCATGTATT-3'	58.4 °C
Cebador Mt-H	5'-CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA-3'	58.2 °C

Se realizaron diluciones de las muestras de ADN para situarlas a una concentración similar (2-3 ng/μl). En cada pocillo se adicionaron 5μl de la dilución de la muestra o del punto de la recta patrón y 15 μl de la mezcla de reacción. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *StepOne Plus* de *Applied Biosystems*. Se utilizó el siguiente programa:

50 °C 2 min
 95 °C 10 min
 95 °C 15 s
 60 °C 1 min } X40

Una vez finalizó la reacción se analizaron los resultados. Se utilizó el programa *StepOne Software v2.3*. para visualizar las curvas de amplificación, y se comprobó que no existía amplificación en los pocillos del blanco. También se eliminaron los valores que diferían del triplicado.

El programa calcula mediante interpolación de los valores de Ct en la recta patrón el número de copias de gen mitocondrial y nuclear presentes en cada muestra. Los resultados obtenidos se expresaron mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{Q_{gen\ mitocondrial}}{Q_{gen\ nuclear}}$$

Para realizar la representación gráfica se calculó el valor del porcentaje respecto al híbrido sin delección.

4.3 Técnicas de manipulación de proteínas

4.3.1 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford

Para determinar la concentración proteica de las muestras se utilizó una recta patrón compuesta por soluciones de BSA a las siguientes concentraciones: 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 μg/μl. Se diluyeron las muestras a 1:30 con el objetivo de que su concentración se situara dentro del rango que abarca la recta preparada. Cada una de estas diluciones y de los puntos de la recta se cargó por triplicado en una placa de 96 pocillos de la casa comercial *SARSTEDT*. En cada pocillo se añadieron 10 μl de la muestra y 200 μl de reactivo Bradford, previamente preparado a dilución 1:5 en agua. A continuación se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, evitando la exposición a la luz.

La medición de la absorbancia se realizó a $\lambda=595$ nm en el lector de placas *NOVOstar* de *BMG-Labtech*, y se obtuvo la concentración proteica de cada muestra por interpolación en la recta y teniendo en cuenta la dilución realizada.

4.3.2 Preparación de muestras para la medida de la actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial

Para determinar la actividad y la cantidad del complejo IV mitocondrial (CIV), se utilizó el kit comercial *Complex IV Human Specific Activity Microplate Assay kit*, de la casa *Abcam*.

Las determinaciones se realizaron a partir de los tres pellets de células de cada uno de los cuatro clones guardados a -80 °C.

En primer lugar se siguieron las indicaciones del fabricante del apartado *Preparación de Muestras*. Se resuspendieron las muestras en Solución 1 (S1), y a continuación, para conseguir una correcta extracción con el detergente, se ajustó la concentración proteica a 5 mg/ml, para lo que se realizó un ensayo Bradford. En función de los datos obtenidos, se añadió a cada muestra el volumen de S1 necesario para lograr la concentración deseada.

A continuación se añadió a las muestras un volumen 1/10 del detergente proporcionado por el kit, se centrifugó a máxima potencia durante 20 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante en un tubo eppendorf.

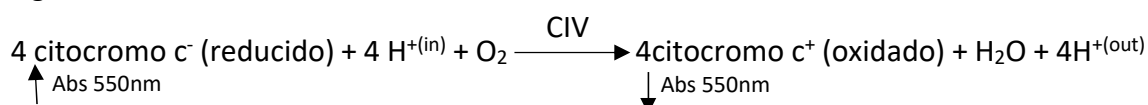
Finalmente se guardó una alícuota de 30 μ l de la solución de las proteínas extraídas de cada muestra con el objetivo de medir posteriormente la actividad de la enzima citrato sintasa (apartado 4.3.5). Además, fue necesario determinar de nuevo la concentración proteica mediante el método Bradford para preparar una alícuota de 700 μ l a una concentración de 0,05 μ g/ μ l.

Las alícuotas se guardaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

4.3.3 Medida de la actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial

Para determinar la cantidad y la actividad de CIV se siguieron las indicaciones del apartado *Método de Ensayo* del protocolo del kit.

El CIV fue inmunocapturado en la placa de 96 pocillos suministrada por el kit, y su actividad se determinó mediante el estudio de la cinética enzimática, midiendo colorimétricamente el descenso de absorbancia a $\lambda=550$ nm como consecuencia de la siguiente reacción:



En estado reducido el citocromo c absorbe a 550 nm, pero al ser oxidado por el CIV pasa a estado oxidado, incapaz de absorber a esta longitud de onda, por lo que se detecta un descenso de la absorbancia.

La placa se conservó durante la noche a 4 °C con el objetivo de medir posteriormente la cantidad de CIV sobre este mismo soporte. Para este ensayo se hizo uso de un anticuerpo específico para CIV conjugado con fosfatasa alcalina. Esta enzima transforma un sustrato incoloro a un producto amarillo que absorbe a $\lambda=405$ nm.

Ambas mediciones se realizaron en el lector de placas *NOVOstar* de *BMG-Labtech*.

4.3.4 Análisis de resultados de actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial.

Para calcular la actividad del CIV se obtuvo la pendiente de la absorbancia frente al tiempo. Dado que la absorbancia disminuía como resultado de la oxidación del citocromo c, la pendiente resultó negativa. El valor se calculó a partir de los datos del inicio de la reacción, cuando el descenso de absorbancia se producía de forma lineal, y se expresó en mOD/min.

En el caso de la cantidad, los datos también se obtuvieron a partir de la pendiente, que en este caso resultó positiva, produciéndose un incremento de absorbancia al aumentar la cantidad de producto con el transcurso de la reacción. Del mismo modo, los datos utilizados serán los correspondientes a la región lineal.

El valor obtenido en ambas determinaciones se relativizó a la cantidad total de proteína añadida al pocillo (10 μ g) y a la actividad de la citrato sintasa de cada muestra (protocolo descrito en el apartado 4.3.5).

Para realizar la representación gráfica los valores se expresaron en porcentaje respecto al clon del híbrido sin delección.

4.3.5 Medida de la actividad de la citrato sintasa

La citrato sintasa (CS) es una enzima nuclear, cuya actividad se obtuvo siguiendo el protocolo proporcionado por el grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Universidad de Zaragoza. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos mediante el seguimiento de la variación de la absorbancia a $\lambda=412$ nm, producida por el incremento de TNB, producto de las siguientes reacciones:



En primer lugar se prepararon los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, y se mezclaron en la proporción adecuada y teniendo en cuenta el volumen a utilizar, según la *tabla 4*.

Tabla 4. Mezcla de reacción para el cálculo de la actividad de CS.

Compuesto	Concentración en stock	Volumen para un pocillo (μ l)	Concentración en el pocillo
Tampón Tris-HCl pH=8	1M	15	75mM
DTNB ($M_m=396,35\text{g/mol}$) en Tris HCl pH=8 10mM	1mM	20	0,1mM
Tritón X-100	10%	2	0,10%
AcetilCoA ($M_m=809,57\text{g/mol}$)	8mM	2	0,08mM
H ₂ O		146	

También se preparó una disolución 10 mM de oxalacetato (OAA) en H₂O, que no se añadió a la mezcla de reacción para evitar el comienzo de la reacción.

Se distribuyeron en cada pocillo 185 μ l de la mezcla de reacción, y 5 μ l de la alícuota de la disolución de proteínas obtenida durante la preparación de las muestras. Cada medida se realizó por triplicado.

En el lector de placas *NOVOstar* de *BMG-Labtech* se programó la adición automática de 10 μ l de la solución de OAA preparada a cada pocillo. La reacción se desencadenó en el momento en el que el OAA fue añadido, teniendo lugar a 30 °C en un volumen final de 200 μ l. Se siguió la variación de la absorbancia a 412 nm durante 2 minutos.

El valor de actividad obtenido se relativizó a la proteína total cargada en cada pocillo.

La representación gráfica se realizó con los datos de porcentaje respecto al cíbrido sin delección.

4.4 Medida de ATP mitocondrial

Esta determinación se llevó a cabo según las indicaciones del protocolo proporcionado por el Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Universidad de Zaragoza.

En primer lugar se sembraron células de los cuatro clones objeto de estudio en placas de 100mm de diámetro, en medio DMEM con alta glucosa (25 mM) y suplementado al 5 % con SFB de *Invitrogen* y uridina a 50 μ g/ml. Tras aproximadamente 24 h se reemplazó el medio por DMEM con baja glucosa (5 mM), también suplementado al 5 % con SFB y uridina a 50 μ g/ml. Se mantuvo este cultivo durante tres días, tras los cuales se obtuvo el porcentaje de viabilidad y densidad celular.

Teniendo en cuenta estos datos, se sembraron $2 \cdot 10^4$ células por pocillo en una placa de 96 con fondo blanco de la casa comercial *NUNC*, siendo el volumen final en cada pocillo 200 μ l. Se sembraron 24 pocillos de cada uno de los clones (12 se utilizaron para medir número de células y 12 para ATP mitocondrial). Además, se guardó un pellet de células a -80 °C con el objetivo de calcular posteriormente el porcentaje de delección de los clones. La placa se mantuvo en la incubadora a 37 °C durante 10-14 h.

Pasado este tiempo, se procedió a preparar los medios y los reactivos necesarios para realizar las mediciones de número de células y ATP mitocondrial.

La preparación de los medios se realizó en condiciones de esterilidad.

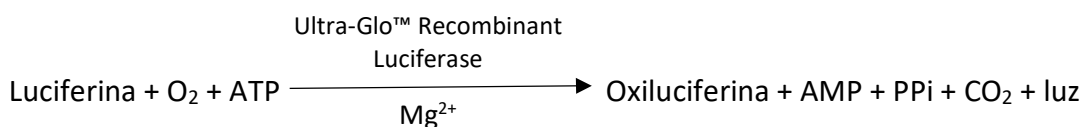
Para medir el número de células se utilizó DMEM free, que se enriqueció con piruvato a concentración 1 mM. También se añadió el reactivo *CellTiter-Blue® Reagent* en la proporción adecuada, teniendo en cuenta que cada pocillo debe contener 100 µl de medio y 20 µl del reactivo. Este reactivo contiene resazurina, un colorante azul que es reducido por las células viables a resorufina, que tiene color rosa y es altamente fluorescente ($\lambda=560_{Ex}/590_{Em}$), por lo que la fluorescencia emitida será proporcional al número de células viables.

Para medir el ATP mitocondrial, se utilizó medio DMEM sin glucosa, enriquecido con piruvato a 1 mM y 2-Desoxiglucosa a 5 mM. Esta molécula se usó con el objetivo de inhibir la producción de ATP glucolítico, de modo que todo el ATP producido por las células sea de origen mitocondrial.

Se realizaron dos lavados de los pocillos con PBS (importante para eliminar la glucosa), y a continuación se añadió el medio correspondiente a cada pocillo según la medida a realizar, adicionando un volumen de 120 µl a los pocillos destinados a la medida del número de células y 100 µl a aquellos en los que se midió el ATP mitocondrial.

La placa se guardó durante 2 horas en la incubadora a 37 °C, y pasado este tiempo se procedió a determinar el número de células con el lector de placas *NOVOstar* de *BMG-Labtech*, midiendo la fluorescencia a $\lambda=560_{Ex}/590_{Em}$.

Para medir el ATP mitocondrial se utilizó el método de ensayo *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*, basado en la acción de una luciferasa termoestable que cataliza la siguiente reacción:



Para realizar este ensayo se añadieron 100 µl del reactivo *CellTiter-Glo® Reagent* (preparado anteriormente mediante la mezcla de *CellTiter-Glo® Buffer* y *CellTiter-Glo® Substrate*) a los pocillos asignados a la medición de ATP mitocondrial.

Tras incubar durante 10 minutos, se midió la luminiscencia con el lector de placas *NOVOstar* de *BMG-Labtech*.

4.5 Análisis estadístico

Se comprobó si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los cuatro clones estudiados en los ensayos de porcentaje de delección, niveles de mtADN, actividad y cantidad de CIV, actividad de CS y medida de ATP mitocondrial. Para esto, se

realizó el test U de Mann-Whitney utilizando el programa *StatView*, y tomando valor $p < 0,05$ como criterio de significancia.

Para representar gráficamente las medias y las desviaciones estándar (DE) obtenidas, se empleó el programa *GraphPad Prism 5*.

5 Resultados y discusión

5.1 Determinación del porcentaje de deleción de los clones

Para evaluar el grado de heteroplasmia de los cuatro clones de la línea CibPS-143B se extrajo el ADN de las células en cultivo (*Imagen 1*).

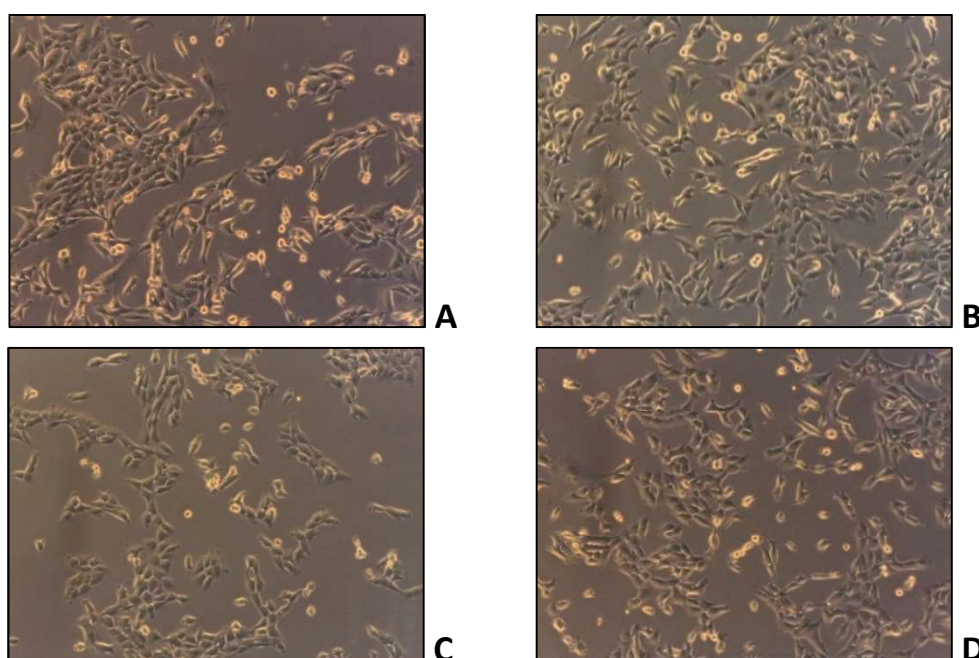


Imagen 1. Fotografía de los clones A, B, C y D de la línea celular CibPS-143B obtenida con microscopio invertido (10X).

Los cuatro clones presentaban la misma morfología, y sus ritmos de crecimiento también fueron similares, por lo que el crecimiento en cultivo no parece verse afectado por el porcentaje de deleción de las células.

Con el objetivo de mantener el grado de heteroplasmia constante a lo largo del tiempo, el cultivo de las células se realizó en medio suplementado con uridina. Esto permitió el crecimiento de los híbridos con porcentajes de deleción elevados, que carecen de una CTE funcional, necesaria para la síntesis de uridina (15).

Mediante la realización de una qPCR determinamos que los porcentajes de deleción que presentan los clones A, B, C y D se encuentran entre los rangos 0, 60-65, 70-75 y 75-80 respectivamente (*tabla 5, figura 2*).

Tabla 5. Rangos de los grados de heteroplasmia de cuatro clones de la línea celular CibPS-143B obtenidos mediante qPCR.

CLON	PORCENTAJE DE DELECIÓN (%)
A	0
B	60-65
C	70-75
D	75-80

Se observó que el clon A es homoplásmico, sin delección en el mtADN, mientras que los clones B, C y D son heteroplásmicos, existiendo diferencias significativas en su porcentaje de delección respecto a A. También son significativamente diferentes los grados de heteroplasmia de los clones C y D respecto a B, sin embargo no existen diferencias significativas entre los porcentajes de delección de C y D (figura 2).

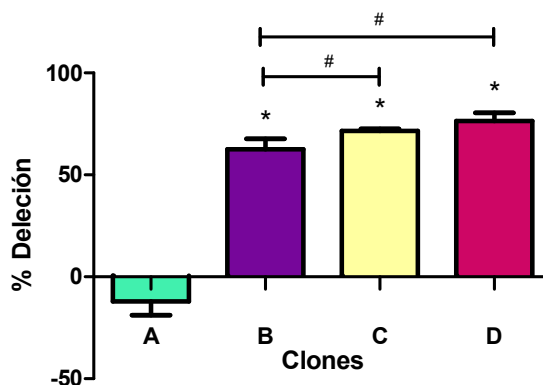


Figura 2. Grado de heteroplasmia de los clones A (azul), B (morado), C (amarillo) y D (rosa). Se representa gráficamente la media \pm DE. Si existen diferencias significativas respecto al clon control (A) se indica con el símbolo (*), y las diferencias significativas entre los clones heteroplásmicos se indican mediante el símbolo (#). Se toma como criterio de significancia $p < 0,05$.

El objetivo era estudiar clones con porcentajes de delección diferenciados, de aproximadamente 0 %, 40 %, 60 % y 80 %, para poder analizar la influencia del grado de heteroplasmia en la pérdida de funcionalidad de las mitocondrias y encontrar el umbral a partir del cual la delección tiene efecto fenotípico. Sin embargo, no fue posible obtener porcentajes intermedios inferiores 50 %, ya que los clones con mtADN mutante aumentaban su grado de heteroplasmia al mantenerlos en cultivo celular.

En estudios anteriores se observó una tendencia de evolución hacia la homoplasmia mutante en los híbridos cuyo núcleo procede de la línea tumoral 143B. Esto parece indicar que existe una ventaja replicativa del mtADN delecionado respecto al mtADN sin delección (16).

Algunas teorías justifican el aumento del grado de heteroplasmia con que el proceso de replicación es más rápido en las moléculas de mtADN con delección que en las no delecionadas, ya que tienen un menor tamaño. El factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA) y la mtARN polimerasa mitocondrial son factores implicados en la replicación

del mtADN, que podrían encontrarse en condiciones limitantes, por lo que su disponibilidad aumentaría al concluir en menos tiempo el ciclo de replicación, pudiendo replicar antes una nueva molécula (17).

Sin embargo, en otros modelos celulares se produce un descenso en el grado de heteroplasma durante su cultivo, como ocurre en el caso de los fibroblastos (18). El mecanismo mediante el cual las células discriminan entre el mantenimiento de mtADN deleciónado o mutado sigue siendo desconocido.

5.2 Análisis de los niveles de mtADN

El número de copias de mtADN es un parámetro que a menudo se ve afectado por la presencia de deleciones mitocondriales en las células, por lo que se analizaron los niveles de mtADN de los cuatro clones.

Se observó un aumento del número de copias de mtADN en los clones mutados respecto al control, siendo mayor el aumento en aquellos con un grado de heteroplasma superior (figura 3).

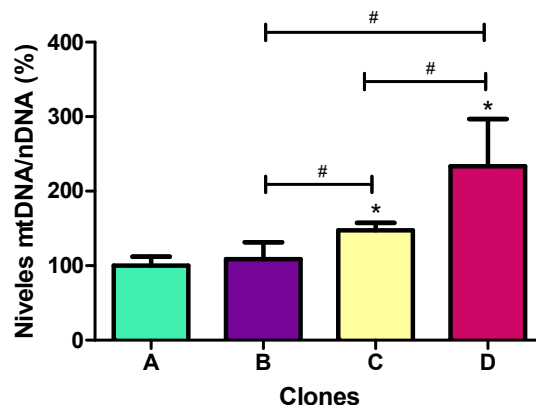


Figura 3. Copias de mtADN frente a nADN en valor de porcentaje respecto al clon control (A). Se representa gráficamente la media \pm DE. Si existen diferencias significativas respecto al clon control se indica mediante el símbolo (*) y las diferencias significativas entre los clones heteroplásmicos se indican mediante el símbolo (#). Se toma como criterio de significancia $p < 0,05$.

El aumento de los niveles de mtADN es significativo en los clones C y D respecto al clon control (A), siguiendo el criterio de p -valor $< 0,05$. Sin embargo, la variación no es significativa en el caso del clon B. Este hecho puede ser indicativo del porcentaje umbral, por debajo del cual la mutación carecería de efectos patológicos. En estudios anteriores se determinó que el porcentaje umbral podría encontrarse entre el 50 y 65%, lo que se ajusta a lo obtenido en este ensayo (18,19).

El número de copias de mtADN es frecuentemente utilizado como marcador de biogénesis mitocondrial. El aumento de los niveles de mtADN, y por tanto de la cantidad de mitocondrias, parece intentar ser un mecanismo de compensación de la célula (20).

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente (apartado 5.1), se ha demostrado que existe una ventaja replicativa del mtADN con delección respecto al no delecionado en células heteroplásmicas (17), por lo que a pesar de que se produce un incremento de los niveles de mtADN, no se logra revertir el efecto de la delección.

Otros estudios afirman que las células tienden a mantener constante la masa del genoma mitocondrial, no el número de copias de mtADN, por lo que al aumentar el porcentaje delección se produciría un incremento de los niveles de mtADN (21).

5.3 Análisis de actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial

Se estudió la actividad y cantidad del CIV con el objetivo de evaluar cuantitativamente el estado de la CTE.

Al analizar cómo queda afectado el CIV debido a la delección, se evidencia la existencia de un déficit en el complejo. Comprobamos que en los tres clones heteroplásmicos (B, C y D) se produce un descenso significativo tanto de la actividad como de la cantidad de CIV respecto al clon A (figura 4).

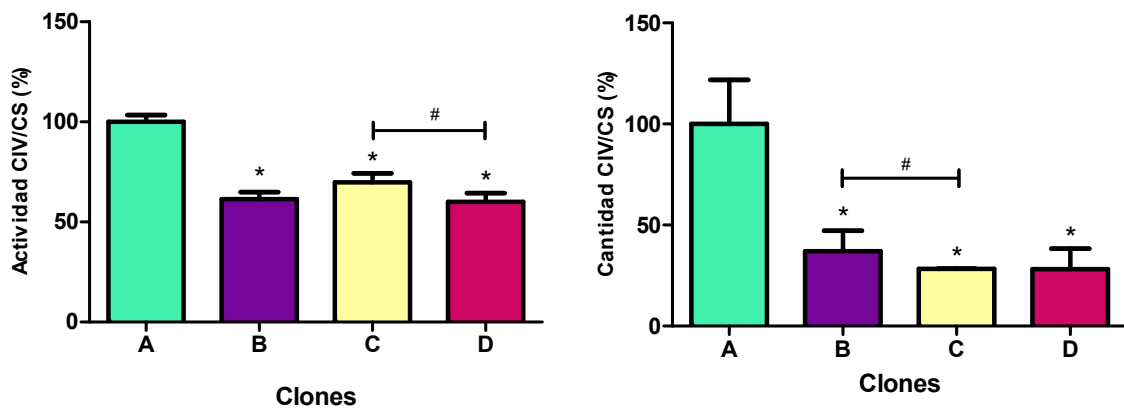


Figura 4. Actividad y cantidad de CIV frente a CS en los clones A, B, C y D. Se representa gráficamente la media \pm DE. Se expresa en porcentaje respecto al clon control. Las diferencias significativas respecto al clon control (A) se indican mediante el símbolo (*) y las diferencias significativas entre los clones heteroplásmicos se indican mediante el símbolo (#). Se toma como criterio de significancia $p < 0,05$.

Esto se debe a que 3 de las 13 subunidades que conforman el CIV están codificadas por genes mitocondriales incluidos en la delección (*MT-CO1*, *MT-CO2* y *MT-CO3*). Por lo tanto las células con delección sintetizan menor número de estas subunidades y disminuyen los niveles de CIV, siendo insuficientes para mantener la actividad proteica normal. Además, también se encuentran dentro de la región delecionada 7 tARNs (de Asp, Lys, Gly, Arg, His, Ser y Leu), que participan en la traducción de los péptidos codificados en la mitocondria, lo que también afectará a la síntesis de las subunidades del CIV.

Los resultados de este ensayo evidencian que en el clon B la actividad y la cantidad de CIV quedan afectadas por la delección, lo que parece indicar que su grado de heteroplasmia (60-65 %) es superior al porcentaje umbral.

A pesar de que durante este trabajo únicamente se ha estudiado el CIV, otros estudios revelan que es común la existencia un déficit en los complejos I y III de la CTE como consecuencia de deleciones en el mtADN, ya que algunas de sus subunidades también están codificadas en el genoma mitocondrial, y pueden quedar afectadas por la deleción (22).

Además, la disminución de la actividad y la cantidad de los complejos de la CTE, no solo es característica de células con deleción en el mtADN, sino que también es común en mutantes de tARNs mitocondriales, ya que se producen defectos en la traducción de proteínas mitocondriales (23). Por esta razón, el fenotipo de pacientes que poseen deleciones en su mtADN es a menudo similar al de aquellos con mutaciones puntuales en tARNs mitocondriales, por lo que es necesario tener en cuenta ambas opciones cuando se desea realizar un diagnóstico.

5.4 Análisis de actividad de citrato sintasa

La citrato sintasa (CS) es una enzima del ciclo de Krebs que se sitúa en la matriz mitocondrial a pesar de estar codificada por el nADN, por lo que la utilizamos como marcador de contenido mitocondrial. Hemos obtenido su actividad con el objetivo de relativizar los resultados obtenidos en el ensayo de CIV.

Tras su análisis podemos observar un ligero aumento de la actividad de CS en los tres clones con mutación en el mtADN (B, C y D) respecto al clon control (A), sin embargo, esta diferencia no es significativa (*figura 5*).

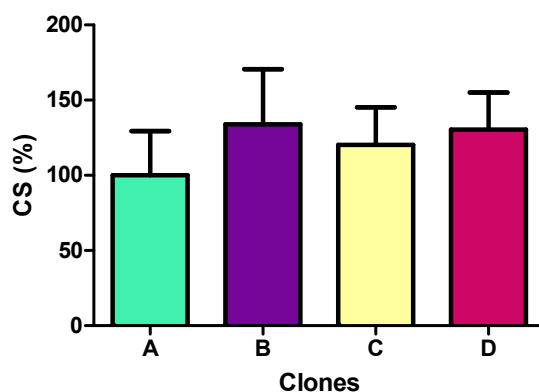


Figura 5. Actividad enzimática de CS. Se representa la media \pm DE. Se expresa el porcentaje respecto al clon control. Se toma como criterio de significancia $p < 0,05$.

A pesar de que en este trabajo no se haya percibido un incremento significativo de la actividad CS, anteriores estudios en pacientes PS sí que han podido determinar un aumento en la actividad de esta enzima (24,25).

Se ha propuesto que este incremento de actividad enzimática podría ser un intento de la célula para compensar la deficiencia causada por la deleción, ya que la CS cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs, ruta metabólica que genera ATP y equivalentes de reducción. Esta enzima es inhibida por el ATP, indicador de niveles altos de energía en la célula, mientras que es el ADP es un activador alostérico de la CS.

La producción de ATP se verá comprometida en las células que contengan la delección en su mtADN (apartado 5.5), aumentando la relación ADP/ATP, lo que podría dar lugar a un incremento de la actividad enzimática de la CS (26,27).

Además, otro mecanismo observado por el que la célula intenta paliar los efectos de la delección es el incremento de la biogénesis mitocondrial, común en enfermedades mitocondriales, lo que también supone un aumento de la actividad de CS (24,25).

5.5 Estudio de los niveles de ATP mitocondrial

La producción de ATP mitocondrial se analizó con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la mitocondria bajo los distintos porcentajes de heteroplasmia.

Para este estudio fue necesario realizar un nuevo cultivo de las células, por lo que volvimos a determinar el porcentaje de delección de los cuatro clones, ya que podrían producirse variaciones. Los porcentajes de delección obtenidos se reflejan en la *tabla 6*.

Tabla 6. Grado de heteroplasmia de los cuatro clones obtenido tras el cultivo realizado para el ensayo de niveles de ATP.

CLON	PORCENTAJE DE DELECCIÓN (%)
A	0
B	ND
C	75
D	82

ND: no se ha podido determinar.

La producción de ATP mitocondrial disminuye significativamente respecto al clon control (A) en los clones C y D, pero no en el clon B. (*figura 6*)

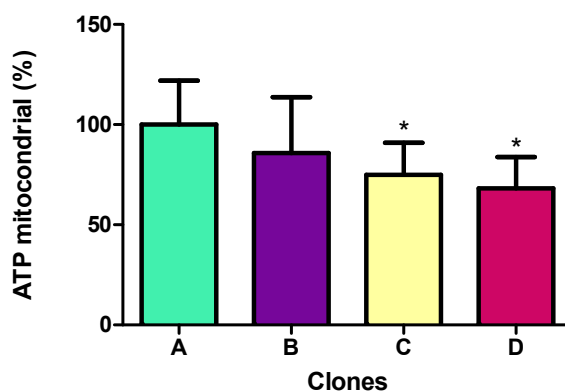


Figura 6. Niveles de ATP mitocondrial de los clones A, B, C y D. Se representa gráficamente la media \pm DE. Se expresan en porcentaje respecto al clon control. Las diferencias significativas se expresan mediante el símbolo (*). Se toma como criterio de significancia $p < 0,05$.

Como se ha comentado anteriormente, la delección afecta a varios genes mitocondriales, causando un déficit en el sistema OXPHOS y disminuyendo la producción de ATP (28). Además, cabe destacar que dos subunidades de la ATPasa (la 6 y la 8), están incluidas dentro de la delección, lo que afectaría especialmente a la síntesis de la molécula.

Este fenotipo también puede observarse en híbridos con deleciones mitocondriales diferentes a la estudiada en este trabajo, y en mutantes de tARNs mitocondriales (23,29).

El descenso significativo en la producción de ATP mitocondrial en los clones C y D, pero no en el caso del clon B, puede ser un indicativo del efecto umbral, sin embargo el desconocimiento del grado de heteroplasmia del clon B nos impide realizar hipótesis sobre cuál es el porcentaje de deleción a partir del cual aparece el fenotipo patológico.

Por lo tanto, aunque algunos de los datos obtenidos durante este trabajo, como los niveles de mtADN, parecen indicar que el porcentaje umbral se encuentra cercano al 60-65%, sería necesario realizar más ensayos para poder confirmarlo, ya que otros resultados, como los obtenidos en el análisis de CIV, evidencian que en este porcentaje la deleción aún causa efectos negativos sobre el metabolismo celular. La determinación de este porcentaje es de gran importancia para la búsqueda de nuevos tratamientos, que tratarían de reducir el grado de heteroplasmia de las células hasta hacerlo inferior al umbral, eliminando así los efectos patológicos de la deleción.

6 Conclusiones

1. Los híbridos son un buen modelo para el estudio del PS, ya que nos han permitido analizar algunos de los efectos que causa la deleción mitocondrial en el metabolismo celular, siendo el grado de heteroplasmia la única fuente de variación entre los cuatro clones estudiados.
2. Las células estudiadas tienden a evolucionar hacia la homoplasmia mutante durante su mantenimiento en cultivo, lo que ha dificultado la obtención de modelos con porcentajes de deleción inferiores al 60 %.
3. Se ha observado que el incremento del porcentaje de deleción tiene como consecuencia un descenso en la producción de ATP mitocondrial y en la actividad y cantidad del CIV, lo que supone una pérdida de la funcionalidad de la mitocondria.
4. Existen mecanismos de compensación en las células que intentan paliar los efectos de la deleción, entre los que destaca el incremento del número de copias de mtADN al aumentar el grado de heteroplasmia. Sin embargo, estos mecanismos no son eficaces y no consiguen revertir los déficits que causa la deleción.
5. Se han obtenidos datos que sostienen que el porcentaje umbral podría estar cerca del 60-65 %. Esto tendría especial interés en la búsqueda de nuevos tratamientos para el PS, ya que la reducción del grado de heteroplasmia a un porcentaje inferior al umbral lograría eliminar los efectos patológicos de la deleción.

Conclusions

1. *Cybrids are a good model for the study of PS, since they have permitted the analysis of some of the effects caused by the mitochondrial deletion in the cellular metabolism, being the level of heteroplasmy the only variation among the four studied clones.*
2. *The studied cells tend to evolve towards mutant homoplasmy during cell culture, so it has been difficult to obtain models with a percentage of mtDNA deletion lower than 60 %.*
3. *It has been observed that an increase in the percentage of deletion results in a decrease in the production of mitochondrial ATP and in the activity and quantity of the CIV, which means a loss of the mitochondrial functionality.*
4. *Cells have mechanisms to try to mitigate the effects of the deletion, such as the increase of mtDNA copy number when the level of heteroplasmy is increased. However, these mechanisms are not effective enough, and they are unable to reverse the deficits caused by the deletion.*
5. *The obtained data show that the pathological threshold could be around 60-65 %. This could be interesting to search for new treatments for PS, since reducing the level of heteroplasmy to a percentage below this threshold would eliminate the pathological effects of the deletion.*

7 Bibliografía

1. Farruggia P, Di Marco F, Dufour C. Pearson syndrome. *Expert Rev Hematol*. 4 de marzo de 2018;11(3):239-46.
2. Pearson Syndrome: Background, Pathophysiology, Epidemiology [Internet]. Medscape. 2017 [citado 22 de junio de 2018]. Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/957186-overview#a4>
3. Orphanet: Síndrome de Pearson [Internet]. [citado 5 de abril de 2018]. Disponible en: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=699
4. Khasawneh R, Alsokhni H, Alzghoul B, Momani A, Abualsheikh N, Kamal N, et al. A Novel Mitochondrial DNA Deletion in Patient with Pearson Syndrome. *Med Arch*. 2018;72(2):148-50.
5. Montoya J, López-Gallardo E. Enfermedades del ADN mitocondrial. En: *Sistema genético mitocondrial: un reto en la medicina humana*. p. 129-54.
6. Rötig A, Cormier V, Koll F, Mize CE, Saudubray J-M, Veerman A, et al. Site-specific deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Genomics*. junio de 1991;10(2):502-4.
7. Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Fabrizi GM, et al. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(3):561-7.
8. López Perez MJ, Montoya J. Sistema genético mitocondrial humano. En: *Sistema mitocondrial: un reto en la medicina humana*. p. 31-46.
9. DiMauro S. Mitochondrial DNA Medicine. *Biosci Rep*. 13 de junio de 2007;27(1-3):5-9.
10. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol*. 2014;2:619-31.
11. Bayona-Bafaluy MP. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to cells. *Nucleic Acids Res*. 15 de agosto de 2003;31(16):98- 101.
12. Cherry ABC, Gagne KE, Mcloughlin EM, Baccei A, Gorman B, Hartung O, et al. Induced Pluripotent Stem Cells with a Mitochondrial DNA Deletion. *Stem Cells*. julio de 2013;31(7):1287-97.
13. Hämäläinen RH. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Models for mtDNA Diseases. En: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 22 de junio de 2018]. p. 399-415. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128014158000199>

14. PolymorphismsCoding < MITOMAP < Foswiki [Internet]. [citado 10 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/PolymorphismsCoding>
15. King MP, Attardi G. Human Cells Lacking mtDNA: Repopulation with Exogenous Mitochondria by Complementation. *Science*. 27 de octubre de 1989;Vol. 246(4929):500-3.
16. Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ. Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci*. 3 de julio de 1995;92(14):6562-6.
17. Diaz F. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res*. 1 de noviembre de 2002;30(21):4626-33.
18. van den Ouweland J, de Klerk J, van de Corput M, Dirks R, Raap A, Scholte H, et al. Characterization of a novel mitochondrial DNA deletion in a patient with a variant of the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Eur J Hum Genet*. marzo de 2000;8(3):195-203.
19. Rötig A, Bourgeron T, Chretien D, Rustin P, Munnich A. Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Hum Mol Genet*. 1995;4(8):1327-30.
20. Caporali L, Maresca A, Capristo M, Del Dotto V, Tagliavini F, Valentino ML, et al. Incomplete penetrance in mitochondrial optic neuropathies. *Mitochondrion*. septiembre de 2017;36:130-7.
21. Tang Y, Schon EA, Wilichowski E, Vazquez-Memije ME, Davidson E, King MP. Rearrangements of Human Mitochondrial DNA (mtDNA): New Insights into the Regulation of mtDNA Copy Number and Gene Expression. Gall J, editor. *Mol Biol Cell*. abril de 2000;11(4):1471-85.
22. Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Iwano R, Asakura Y, Tanaka Y, et al. Clinical manifestations and enzymatic activities of mitochondrial respiratory chain complexes in Pearson marrow-pancreas syndrome with 3-methylglutaconic aciduria: a case report and literature review. *Eur J Pediatr*. diciembre de 2015;174(12):1593-602.
23. Wang M, Peng Y, Zheng J, Zheng B, Jin X, Liu H, et al. A deafness-associated tRNA^{Asp} mutation alters the m¹G37 modification, aminoacylation and stability of tRNA^{Asp} and mitochondrial function. *Nucleic Acids Res*. 15 de diciembre de 2016;44(22):10974-85.
24. Haller RG, Lewis SF, Estabrook RW, DiMauro S, Servidei S, Foster DW. Exercise intolerance, lactic acidosis, and abnormal cardiopulmonary regulation in exercise associated with adult skeletal muscle cytochrome c oxidase deficiency. *J Clin Invest*. 1 de julio de 1989;84(1):155-61.

25. Krähenbühl S, Kleinle S, Henz S, Leibundgut K, Liechti S, Zimmermann A, et al. Microvesicular steatosis, hemosiderosis and rapid development of liver cirrhosis in a patient with Pearson's syndrome. *J Hepatol.* septiembre de 1999;31(3):550-5.
26. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principios de Bioquímica.* 5ª. Omega; 2005.
27. Harford S, Weitzman PD. Evidence of isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies. *Biochem J.* noviembre de 1975;151(2):455-8.
28. Santorelli FM, Barmada MA, Pons R, Zhang LL, DiMauro S. Leigh-type neuropathology in Pearson syndrome associated with impaired ATP production and a novel mtDNA deletion. *Neurology.* 1 de noviembre de 1996;47(5):1320-3.
29. Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, et al. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Eur J Biochem.* octubre de 1998;257(1):192-201.

Anexos

Anexo I: **abreviaturas**

ATPasa	ATP sintasa
BSA	albúmina sérica bovina
CIV	complejo IV mitocondrial
CS	Citrato sintasa
CTE	cadena de transporte de electrones
DE	desviación estándar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DTNB	Reactivo de Ellman's/5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
KSS	Kearns-Sayre
mtADN	ADN mitocondrial
mtARN	ARN mitocondrial
mtTFA	Factor de transcripción mitocondrial A
nADN	ADN nuclear
OXPPOS	Sistema de fosforilación oxidativa
PBS	tampón fosfato salino
PS	Síndrome de Pearson
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
rARN	ARN ribosómico
Rho⁰	ρ^0
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S1	Solución 1
SFB	Suero Fetal Bovino
tARN	ARN de transferencia
TNB	tionitrobenzoato

Anexo II: materiales empleados

Tabla 1A. Composición de los medios utilizados para el cultivo de la línea celular CibPS-143B.

Función	Composición del medio de cultivo
Mantenimiento	DMEM glucosa alta (25 mM) + 5%SFB + uridina 50 µg/ml
Pre-ensayos bioquímicos	DMEM glucosa baja (5 mM) + 5%SFB + uridina 50 µg/ml
Cuantificación N° de Células	DMEM free + piruvato 1 mM + 2-Desoxiglucosa 5 mM
Medida ATP mitocondrial	DMEM free + piruvato 1 mM

Tabla 2A. Reactivos.

Reactivo	Referencia	Casa comercial
DMEM 4,5 g/L D-Glucosa, L-Glutamina y piruvato	41966029	ThermoFisher
DMEM 1 g/L D-Glucosa, L-Glutamina y piruvato	21885025	ThermoFisher
SFB	10270106	ThermoFisher
Uridina	U3750	Sigma
Dimetilsulfóxido (DMSO)	D2650	Sigma
PBS pH=7,4 (1x)	10010015	ThermoFisher
<i>TrypLE™ Express Enzyme (1X)</i>	12604013	ThermoFisher
<i>Cells and Tissue DNA Isolation Kit</i>	53100	Norgen
<i>Gen Expression Master Mix</i>	4369016	ThermoFisher
<i>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Reactivo de Bradford)</i>	5000006	BIO-RAD
<i>Complex IV Human Specific Activity Microplate Assay kit</i>	ab109910	Abcam
Tampón Tris-HCl pH=8		
5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	D8130	Sigma
Tritón X-100	T9284	Sigma
AcetilCoA	10101907001	Roche
Oxalacetato	O4126	Sigma
<i>CellTiter-Blue® Reagent</i>	G8080	Promega
<i>CellTiter-Glo® Lu Luminescent Cell Viability Assay</i>	G7571	Promega