

# Creación y caracterización de un cíbrido transmitocondrial portador de una nueva mutación con fenotipo de LHON

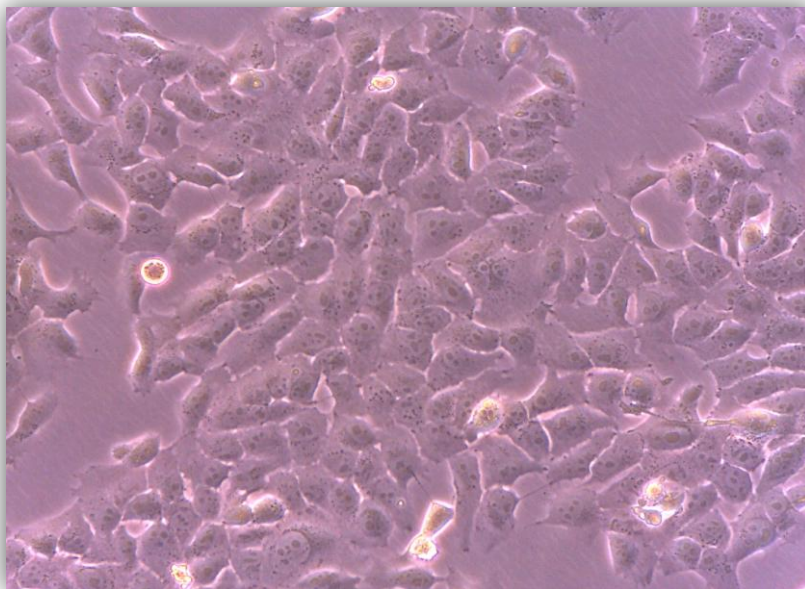
*Creation and characterization of a transmitochondrial  
cybrid harbouring a new mutation with LHON phenotype*

---

Trabajo de Fin de Máster. Máster en Biología Molecular y Celular.

**Autora: Ana Vela Sebastián**

**Directora: Ester López Gallardo**



Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial. Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1. EL SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL Y LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES .....	3
1.2. LA NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER (LHON) .....	4
1.2.1. Fenotipo de pacientes afectados .....	4
1.2.2. Factores que desencadenan la enfermedad .....	5
1.2.3. Incógnitas actuales por resolver .....	7
1.2.4. Perspectivas terapéuticas en pacientes afectados por LHON .....	8
1.3. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	10
1.4. MODELOS CÍBRIDOS PARA EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES .....	10
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>13</b>
3.1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	13
3.1.1. Material biológico y líneas celulares .....	13
3.1.2. Aparatos e instrumentos .....	13
3.1.3. Reactivos .....	14
3.1.3.1. Reactivos generales .....	14
3.1.3.2. Medios de cultivo y material estéril .....	15
3.1.3.3. Reactivos para PCR .....	15
3.1.3.4. Kits comerciales .....	15
3.1.3.5. Geles, membranas y autorradiografías .....	15
3.1.3.6. Anticuerpos .....	16
3.2. MÉTODOS .....	16
3.2.1. Técnicas de cultivo celular .....	16
3.2.1.1. Mantenimiento de los cultivos celulares .....	16
3.2.1.2. Tripsinización de los cultivos celulares .....	16
3.2.1.3. Recuento celular .....	17
3.2.1.4. Congelación y descongelación de células .....	17
3.2.1.5. Generación de cíbridos transmitocondriales .....	17
3.2.1.5.1. Aislamiento de plaquetas .....	18
3.2.1.5.2. Preparación de células $\rho^0$ .....	18
3.2.1.5.3. Fusión celular .....	18
3.2.1.5.4. Tratamiento post-fusión y selección de cíbridos .....	19
3.2.1.6. Estudio de la tasa de crecimiento celular .....	19
3.2.2. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos .....	20
3.2.2.1. Extracción de DNA a partir de lisados celulares .....	20
3.2.2.2. Cuantificación de DNA .....	20
3.2.2.3. Secuenciación completa del mtDNA .....	20
3.2.2.4. PCR-RFLP .....	22
3.2.2.4.1. Proceso de amplificación: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	22
3.2.2.4.2. Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción .....	23

3.2.2.4.3. Separación electroforética de ácidos nucleicos .....	23
3.2.2.5. Determinación del haplogrupo mitocondrial mediante qPCR .....	24
3.2.2.6. Cuantificación del número de copias de mtDNA mediante qPCR .....	25
3.2.3. <i>Técnicas de manipulación de proteínas</i> .....	26
3.2.3.1. Extracción y fraccionamiento de los lisados celulares totales .....	26
3.2.3.2. Cuantificación de proteínas totales por espectrofotometría (Método de Bradford) .....	27
3.2.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS .....	27
3.2.3.4. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF .....	28
3.2.3.5. Inmunodetección de proteínas mediante Western-Blot.....	28
3.2.3.5.1. Incubación con los anticuerpos primario y secundario.....	28
3.2.3.5.2. Detección de proteínas .....	29
3.2.3.5.3. Reutilización de membranas.....	29
3.2.4. <i>Técnicas de análisis de la función mitocondrial</i> .....	29
3.2.4.1. Medida de síntesis de ATP mitocondrial.....	29
3.2.4.2. Determinaciones enzimáticas .....	30
3.2.4.2.1. Preparación de muestras para las determinaciones enzimáticas.....	30
3.2.4.2.2. Puesta a punto del kit <i>Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay</i> (Biovision).....	31
3.2.4.2.3. Determinación de la actividad enzimática del complejo respiratorio IV.....	32
3.2.4.2.4. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa (CS) .....	32
3.2.5. <i>Análisis estadístico</i> .....	33
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
4.1. REVISIÓN DIAGNÓSTICA DE PACIENTES CON POSIBLE HISTORIAL DE LHON.....	34
4.2. CASO CLÍNICO: PACIENTE 3346.....	34
4.2.1. <i>Estudio genético del paciente</i> .....	34
4.2.2. <i>Determinación de la patogenicidad de la mutación m.15950G&gt;A</i> .....	36
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS CÍBRIDOS TRANSMITOCONDRIALES CONSTRUIDOS .....	38
4.3.1. <i>Comprobación de la incorporación de la mutación m.15950G&gt;A</i> .....	38
4.3.2. <i>Comprobación del haplogrupo mitocondrial</i> .....	40
4.3.3. <i>Análisis de los niveles de mtDNA</i> .....	41
4.4. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL CICLO CELULAR Y DE LA TASA DE SÍNTESIS PROTEICA MITOCONDRIAL DEL CÍBRIDO TRANSMITOCONDRIAL PORTADOR DE LA MUTACIÓN M.15950G>A FRENTE AL CÍBRIDO CONTROL.....	42
4.4.1. <i>Estudio de la tasa de crecimiento celular</i> .....	42
4.4.2. <i>Cuantificación de la cantidad de COI mediante Western-Blot</i> .....	44
4.5. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL ENTRE EL CÍBRIDO TRANSMITOCONDRIAL PORTADOR DE LA MUTACIÓN M.15950G>A Y EL CÍBRIDO CONTROL .....	47
4.5.1. <i>Puesta a punto del kit Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay</i> .....	47
4.5.2. <i>Análisis de la actividad del C.IV mitocondrial</i> .....	48
4.5.3. <i>Análisis de la actividad de la citrato sintasa</i> .....	49
4.5.4. <i>Relación entre la actividad del complejo IV mitocondrial y la actividad CS</i> .....	51
4.5.5. <i>Estudio de los niveles de síntesis de ATP mitocondrial</i> .....	51
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>55</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## ABREVIATURAS

<b>Acetil-CoA</b>	Acetil Coenzima A	<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G	<b>PD</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>AD</b>	Enfermedad de Alzhéimer	<b>INF-gamma</b>	Interferón gamma	<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato	<b>iPSCs</b>	Células madre pluripotentes inducidas	<b>PM</b>	Peso molecular
<b>A.E.</b>	Actividad específica	<b>IR</b>	Infrarrojo	<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato	<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo	<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>ATPasa</b>	ATP sintasa	<b>LHON</b>	Neuropatía óptica hereditaria de Leber	<b>RFLP</b>	Restriction fragment length polymorphism
<b>BrEt</b>	Bromuro de etidio	<b>LIMM</b>	Miopatía mitocondrial infantil letal	<b>RGCs</b>	Células ganglionares de la retina
<b>5-BrdU</b>	5-Bromo-2-desoxiuridina	<b>Mc</b>	Monoclonal	<b>RIPA</b>	Radioimmunoprecipitation assay buffer
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina	<b>mitoTALEN</b>	Mitochondrial transcription activator-like effector nuclease	<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>COI</b>	Subunidad I del C.IV (citocromo c oxidasa)	<b>MM</b>	Miopatía mitocondrial	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>CoQ</b>	Coenzima Q	<b>mRNA</b>	RNA mensajero	<b>RNAasa P</b>	Ribonucleasa P
<b>COX</b>	Citocromo oxidasa	<b>MS</b>	Esclerosis múltiple	<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>CRISPR</b>	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial	<b>rRNA</b>	RNA ribosómico
<b>CS</b>	Citrato sintasa	<b>mtZNF</b>	Mitochondrially targeted Zinc finger nuclease	<b>SDHA</b>	Subunidad A del C.II (succinato deshidrogenasa)
<b>Ct</b>	Cycle threshold	<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido	<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium	<b>NaDOC</b>	Desoxicolato de sodio	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>DMSO</b>	Dimeltisulfóxido	<b>ND</b>	NADH deshidrogenasa	<b>TBE</b>	Tampón Tris-Borato-EDTA
<b>DNA</b>	Ácido dexosirribonucleico	<b>nDNA</b>	DNA nuclear	<b>Thr</b>	Treonina
<b>dNTPs</b>	Dexosirribonucleótidos trifosfato	<b>NMO</b>	Neuromielitis óptica	<b>TK</b>	Timidina Kinasa
<b>DT</b>	Tiempo de duplicación	<b>NO</b>	Óxido nítrico	<b>Tm</b>	Temperatura de hibridación
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico	<b>OAA</b>	Oxalacetato	<b>TNB</b>	Anión tionitrobenzoato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	<b>OD</b>	Densidad óptica	<b>TRIS</b>	2-Amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina	<b>OXPHOS</b>	Sistema de fosforilación oxidativa	<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino	<b>3'-UTR</b>	3'-Untranslated region
<b>FAM</b>	6-Carbozifluoresceína	<b>PBS-T</b>	PBS-Tween	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino	<b>Pc</b>	Policlonal	<b>VIC</b>	2-Cloro-7-fenil-1,4-Dicloro-6-carboxifluoresceína
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<b>p<sup>0</sup></b>	Células carentes de mtDNA

## RESUMEN

La Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) es una enfermedad rara, caracterizada por ceguera, desmielinización axonal y pérdida de células ganglionares de la retina, consecuencia, entre otros factores, de mutaciones a nivel del mtDNA. No obstante, a pesar de la gran cantidad de avances recientes en esa área de estudio, a día de hoy, se trata de una patología cuyos mecanismos todavía no están dilucidados por completo, y por consiguiente, que carece de tratamiento eficaz, debido, principalmente, a la carencia de modelos adecuados para su estudio.

Una posibilidad que permite superar dichas limitaciones es el desarrollo de cíbridos transmitocondriales, metodología que se decidió seguir en este trabajo mediante la fusión de células  $\rho^0$  143B y plaquetas de una paciente con aparente fenotipo de LHON con el objetivo de estudiar el defecto molecular provocado por la mutación m.15950G>A del mtDNA, afectando a nivel del tRNA<sup>Thr</sup>, que únicamente había sido descrita con anterioridad en una ocasión, en un caso clínico completamente diferente al actual.

Se llevaron a cabo estudios comparativos respecto a un cíbrido control que permitieron confirmar el carácter patogénico de la mutación puntual bajo estudio tras la observación, entre otros aspectos, de una menor expresión y actividad COX en los cíbridos mutantes que conducía a una inferior tasa de síntesis de ATP con posibles consecuencias negativas sobre la viabilidad celular del tejido afectado. Por tanto, estos estudios representan una primera comparación de los defectos en el sistema OXPHOS provocados en presencia de la mutación m.15950G>A, permitiendo una aproximación en el conocimiento del mecanismo fisiopatológico subyacente a la enfermedad.

## ABSTRACT

Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is a rare disease characterized by blindness, axonal demyelization and loss of retinal ganglion cells as a consequence of mutations in mtDNA, among other factors. Nevertheless, despite the recent advances in this field, to date, the mechanisms of the disease are not completely understood, and consequently, there is no effective treatment, mainly due to the lack of good models for its study.

A possibility which allows overcome these limitations is the generation of transmitochondrial cybrids. This methodology was followed in this project by the fusion of  $\rho^0$  143B cells and platelets from a patient with LHON-like phenotype with the aim of studying the molecular defect caused by m.15950G>A mutation in mtDNA, affecting at tRNA<sup>Thr</sup> level, which had been described only once before in a completely different case.

The comparative experiments with a control cybrid line allowed us to confirm the pathogenicity of the point mutation. A lower COX expression and activity were observed in the mutant cybrid, leading to a decrease in ATP synthesis rate with possible negative consequences on the cellular viability in the affected tissue. Therefore, these studies represent a first comparison of OXPHOS defects in presence of m.15950G>A mutation, which approach us to understand the underlying pathophysiological mechanism of the disease.

# 1. ANTECEDENTES

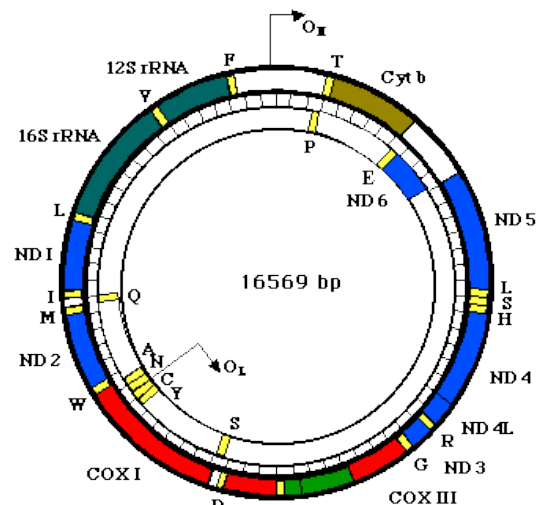
## 1.1. El sistema genético mitocondrial y las enfermedades mitocondriales

Las mitocondrias constituyen un orgánulo fundamental para el funcionamiento de las células, siendo especialmente relevante su papel en la producción de energía, singularmente a nivel de la membrana interna, donde se localiza el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), desenlace final del metabolismo energético mitocondrial que conduce a la síntesis de ATP.

Adicionalmente a la generación del gradiente electroquímico para la producción de energía, dicho sistema también está involucrado en la generación de calor, la homeostasis del calcio celular, la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el importe de proteínas, y la regulación de la apoptosis, entre otros.

Sin embargo, a pesar de la diversidad de funciones en que participa el orgánulo, el término de *enfermedad mitocondrial* se asigna a aquellos trastornos causados por defectos en el sistema OXPHOS, y por consiguiente, caracterizados por una carencia en el suministro de ATP, con afectación generalmente multi-sistémica y manifestaciones clínicas muy variadas. Una particularidad de dicho sistema es su biosíntesis por mediación sinérgica de los dos sistemas genéticos celulares (nuclear y mitocondrial), dotando a mencionadas afecciones de una gran variedad de posibilidades de mutaciones causales y patrones de herencia.

De manera más detallada, el sistema genético mitocondrial, constituido por múltiples moléculas de DNA circular de doble hebra, de unas 16.500 pares de bases (pb) aproximadamente, contiene información para un total de 37 genes, 24 de los cuales codifican RNAs implicados en la maquinaria de síntesis proteica a nivel del propio orgánulo (rRNAs 12S y 16S y 22 tRNAs); y los 13 restantes, codifican distintos polipéptidos componentes de complejos multi-enzimáticos del sistema OXPHOS, quedando complementado a su vez por péptidos codificados a nivel del DNA nuclear. Dicha característica refleja la estrecha relación necesaria entre los genes derivados de los genomas nuclear y mitocondrial para la correcta función organular.



**Figura 1. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano.** Los genes codificantes para rRNAs se muestran en azul-grisáceo; los de tRNA, en color amarillo; y los genes estructurales que codifican para distintas subunidades aparecen en azul (para el complejo I), marrón (citocromo b), rojo (complejo IV) y verde (complejo V).

Debido a la labor central de la mitocondria en la fisiología celular, las enfermedades mitocondriales constituyen un problema sanitario y social relevante. Bien es cierto que de manera individual son patologías raras, pero en conjunto, albergan una amplia variedad de trastornos genéticos, constituyendo uno de los errores congénitos actuales más comunes del metabolismo, con una prevalencia de 1 de cada 6.000 casos que en general, carecen de una terapia eficaz aplicable.<sup>1,2,3</sup>

## 1.2. La Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON)

En concreto, las neuropatías ópticas mitocondriales, un grupo genéticamente heterogéneo de trastornos consecuencia, principalmente, de mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA), constituyen una causa importante de morbilidad visual y ceguera tanto en la población pediátrica como en la adulta en nuestro tiempo.<sup>4</sup> De hecho, ya en el año 1871, Theodor Leber publicó la primera descripción detallada de un caso de ceguera con herencia materna. Se trataba del pionero descubrimiento de una enfermedad asociada con mutaciones puntuales en el mtDNA, la cual pasó a conocerse con el nombre de Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON).<sup>5</sup>

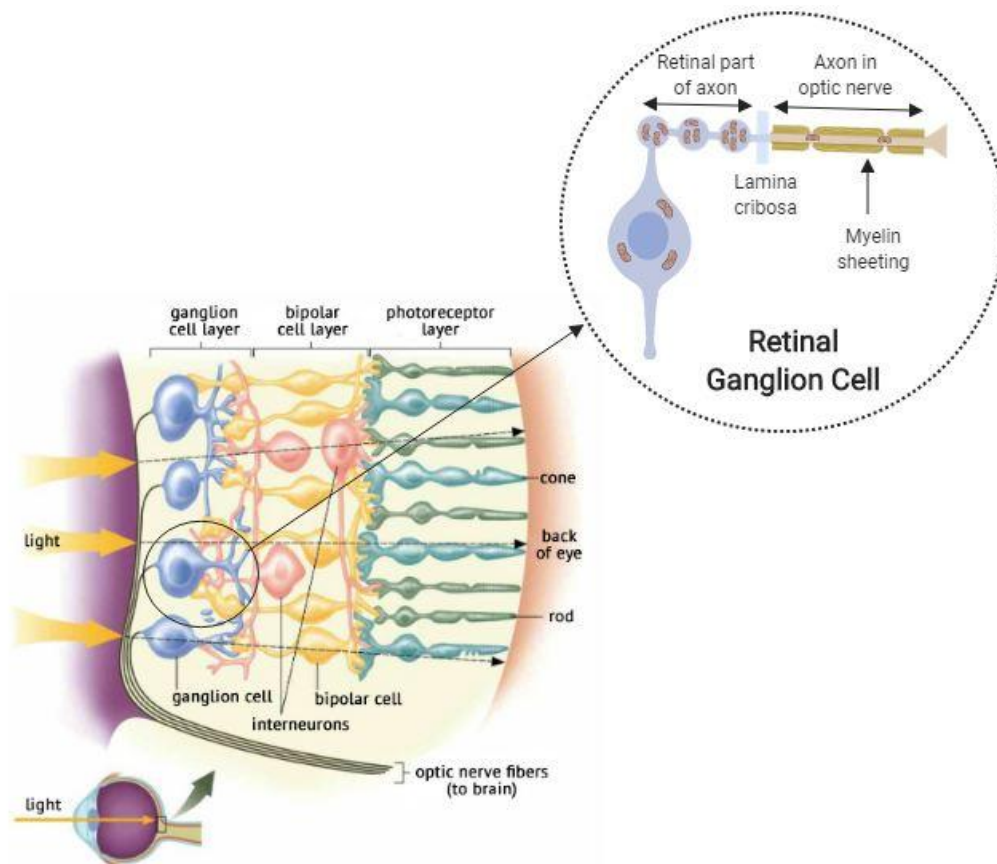
En la actualidad, LHON es considerada la enfermedad mitocondrial más prevalente, con una incidencia en Europa del orden de 1/30.000 - 40.000 personas.<sup>6,7</sup> Se caracteriza por una pérdida selectiva de las células ganglionares de la retina que termina desembocando en pérdida de visión y atrofia del nervio óptico.<sup>8</sup>

### 1.2.1. Fenotipo de pacientes afectados

Los pacientes afectados de LHON sufren una rápida e indolora pérdida de la visión central, habitualmente primero en uno de los ojos y, en un plazo de tiempo de pocas semanas o meses, en el otro, generalmente de manera permanente. La edad promedio de incidencia de la enfermedad oscila en torno a la segunda o tercera década de vida, aunque de manera individual, el rango de pacientes afectados abarca desde niños menores de 10 años hasta adultos superiores a 70.<sup>5,9,10</sup> Así mismo, una particularidad de esta enfermedad es que presenta una mayor prevalencia en el sexo masculino que en el femenino con un ratio de afectación de 5/1.<sup>8</sup> Dicha incidencia diferencial se relacionó inicialmente con una susceptibilidad genética ligada al cromosoma X que actuaba sinérgicamente con las mutaciones del mtDNA.<sup>9</sup> Sin embargo, con posterioridad se hipotetizó la mediación de ciertos factores hormonales.<sup>7</sup> Ello se basó en la observación de que los derivados de los estrógenos eran capaces de reducir los niveles de ROS, rescatando la viabilidad de las líneas celulares portadoras de LHON como consecuencia de una regulación positiva de la biogénesis mitocondrial, aumentando el número de copias del mtDNA con un efecto neuroprotector.<sup>7,11</sup>

A nivel histopatológico, la dolencia se manifiesta con una notable pérdida de células ganglionares de la retina (RGCs) y atrofia del nervio óptico acompañada de desmielinización axonal difusa severa, que en conjunto, pueden terminar desembocando en ceguera total.<sup>5,8</sup> Las RGCs son neuronas atípicas caracterizadas por poseer un largo segmento axonal no mielinizado intrarretiniano, con el objetivo de mantener la retina transparente a la luz, suponiendo una distribución asimétrica de mitocondrias en dicha región, y por consiguiente, un punto de estrangulamiento metabólico que potencia su vulnerabilidad.<sup>11</sup> La imposibilidad de la conducción saltatoria requiere un mayor consumo de ATP para mantener la excitabilidad del axolema en contraposición con las fibras mielinizadas.<sup>12</sup> Por ello, la base de esa flaqueza anatómica se ha modelado considerando el área superficial (relacionada con la demanda energética) y el volumen (suministro de energía) de los axones RGCs, encargados de conectar la retina neural con el cerebro<sup>13</sup>, en relación con la cantidad de ATP necesaria para mantener la conducción sináptica. Se considera que un mayor ratio en superficie/volumen en las fibras más pequeñas resulta en una capacidad bioenergética más limitada y una mayor producción de ROS<sup>4</sup>, generando como consecuencia un ambiente de estrés oxidativo que potencia el daño en las

membranas, proteínas y DNA mitocondriales, desencadenando muerte celular con la consiguiente pérdida de la agudeza visual.<sup>14</sup>



**Figura 2. Localización y estructura de las células ganglionares de la retina.** Distribución diferencial de mitocondrias (marrón) entre los axones de RGC en la retina (pre-laminar) y el nervio óptico (post-laminar).

Así mismo, en numerosas familias afectadas, además de la neuropatía óptica, los pacientes manifiestan otras anomalías no oftalmológicas, incluyendo signos en el sistema nervioso central (SNC), afectación muscular y/o alteraciones en la conducción cardíaca.<sup>4,5,9</sup>

### 1.2.2. Factores que desencadenan la enfermedad

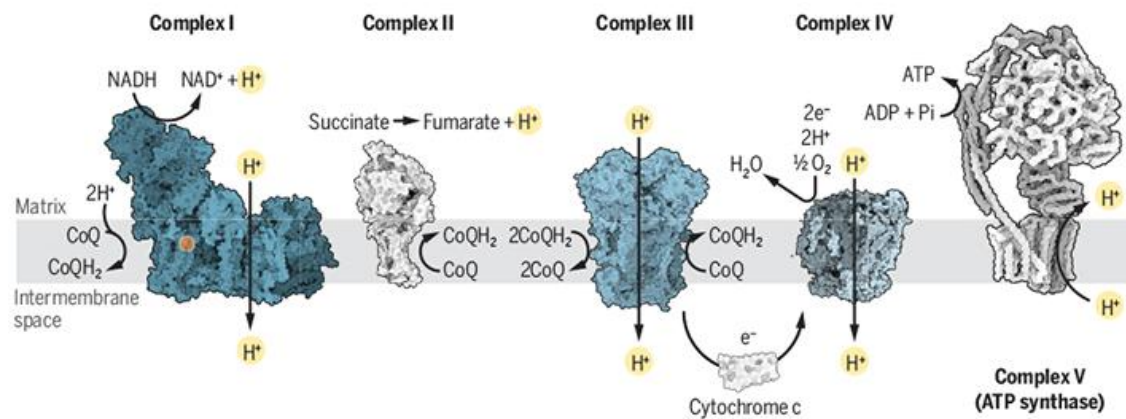
Se ha documentado que el desarrollo de LHON está afectado por la interacción entre las mutaciones del mtDNA, genes nucleares, el haplogrupo mitocondrial, factores medioambientales e influencia epigenética.<sup>9,10</sup>

Principalmente, la enfermedad de LHON se desencadena como consecuencia de la presencia de mutaciones en el mtDNA. Concretamente, los cambios puntuales en las posiciones de los nucleótidos 3460, 11778 y 14484 son los más comunes en todo el mundo<sup>8</sup>, estando presentes en torno al 90% de los casos de pacientes portadores de LHON<sup>4,7</sup>, afectando a un 22.6%, un 56.6% y un 20.8% respectivamente de pacientes europeos.<sup>10</sup> Dichas mutaciones, resultan en sustituciones de aminoácidos en los genes ND1, ND4 y ND6 respectivamente, todos los cuales codifican para diferentes subunidades constituyentes del complejo I del sistema OXPHOS.<sup>5</sup>

El sistema OXPHOS, localizado en la membrana mitocondrial interna, está constituido por la cadena de transporte electrónico, formada a su vez por cuatro complejos multi-enzimáticos respiratorios y la ATP sintasa, a través de los cuales pasan los equivalentes de reducción derivados de la beta-



oxidación y del ciclo de los ácidos tri-carboxílicos, promoviendo simultáneamente un bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana, generando un gradiente que finalmente es utilizado por el complejo V para producir ATP.<sup>1</sup>



**Figura 3. El sistema de fosforilación oxidativa.** Representación de la cadena respiratoria humana, mostrando los complejos I-IV y la ATP sintasa (o complejo V) y el flujo de protones y electrones que tiene lugar a su través.

En dicha organización, el complejo I constituye el punto de entrada de los electrones a la cadena respiratoria, acoplado a la transferencia de electrones a la traslocación de protones. Se trata de un complejo constituido por la expresión y ensamblaje de un total de 46 subunidades proteicas diferentes, 39 de las cuales están codificadas por el DNA nuclear, y las 7 restantes por el mtDNA, más susceptibles a padecer mutaciones que, de manera general, acaban conduciendo bien a un descenso en los niveles de síntesis de ATP, bien a un aumento del estrés oxidativo, bien a una activación de la muerte apoptótica.<sup>8,11,15</sup>

Sin embargo, los efectos bioquímicos derivados de dichas mutaciones todavía son controvertidos. A excepción del cambio en la posición 3460, que conlleva un descenso en la actividad transportadora del complejo I, la afección del resto de mutaciones es más sutil, aunque en ambos casos conducen a un defecto en la respiración mitocondrial a nivel del complejo I. De hecho, estudios posteriores demostraron que dichos cambios genéticos derivaban en una inferior sensibilidad a rotenona, un compuesto inhibidor del complejo I que actúa a modo de antagonista de los intermediarios semiquinona originados en el sistema OXPHOS.<sup>8,9</sup> Dichas observaciones, por consiguiente, parecían sugerir que las principales mutaciones de LHON realmente afectaban a la interacción del sustrato Q con el complejo I.<sup>5</sup>

Cabe destacar que en la mayoría de los pacientes de LHON, la mutación primaria es homoplásmica (todas las moléculas de mtDNA portan el alelo mutante), mientras que solo una pequeña proporción de afectados resulta ser heteroplásmica (poseen dos poblaciones de mtDNA, una portadora del alelo normal y otra del alelo mutante).<sup>5,10</sup> No obstante, en el contexto de la enfermedad de LHON, se han registrado casos de familias en que a pesar de que todos los individuos de la línea materna presentan las mutaciones patogénicas en homoplasmia, no en todos ellos se desencadena el trastorno, fenómeno que se conoce con el nombre de penetrancia incompleta. Por consiguiente, las mutaciones en el mtDNA parecen ser necesarias pero no suficientes para determinar la patología.<sup>8</sup>

En ese contexto, se ha hipotetizado la existencia de otros determinantes genéticos, tales como modificaciones mitocondriales o en genes nucleares adicionales.<sup>8</sup> En cualquier caso, se trataría de mutaciones que estarían presentes en controles normales pero con una frecuencia menor que con la

que aparecen en pacientes con LHON, generando cambios más conservativos o afectando a residuos menos conservados.<sup>5,9</sup> Así mismo, se ha evidenciado una relación entre LHON y los haplogrupos J y K del mtDNA<sup>10,11,12</sup>, un conjunto de polimorfismos poblacionales que *a priori* se consideraban inocuos.<sup>16,17</sup>

Por último, la penetrancia incompleta de la enfermedad también ha llevado a la proposición de la influencia de determinados factores medioambientales y epigenéticos. Entre ellos, el padecimiento de otras alteraciones sistémicas, deficiencias nutricionales y el contacto con ciertas toxinas (humo de tabaco, alcohol, hexano, determinados medicamentos) que estresen o inhiban la capacidad respiratoria mitocondrial, podrían incrementar la expresión fenotípica de la enfermedad.<sup>9,18,19</sup>

Todas las variables implicadas han conducido a la propuesta de dos modelos generales diferentes para el desarrollo de la neuropatía óptica. Un primer modelo *umbral* se basa en una continua tasa de degeneración de RGCs resultado del producto acumulativo de dichos factores, de manera que únicamente al exceder un determinado umbral, desencadenaría la fase aguda de la enfermedad. Alternativamente, un modelo *desencadenante* apuesta por las mutaciones de LHON como factor causante del fallo metabólico, que únicamente en presencia de otros factores aberrantes, desencadenan un ola de neurodegeneración.<sup>5</sup>

### 1.2.3. Incógnitas actuales por resolver

A pesar del gran conocimiento de que se dispone actualmente acerca de la enfermedad en cuestión, todavía prevalece una serie de incógnitas por resolver. Entre ellas, se desconoce el motivo de la penetrancia incompleta, así como el hecho de que a pesar de que la mutación se encuentre en estado homoplásmico en todas las células del organismo, se manifieste fenotípicamente con mecanismos patogénicos con una gran especificidad de tejido, únicamente a nivel de las RGCs.<sup>10,11</sup>

Bien es cierto que el efecto umbral es tejido-específico, por lo que aquellos que dependen en gran medida del ATP, como el nervio óptico, entre otros, podrían tener un menor efecto umbral para mutaciones del mtDNA que otros tejidos menos activos metabólicamente.<sup>20</sup> En ese contexto, la afección particular de estas células puede entenderse debido a sus propiedades anatómicas y fisiológicas altamente especializadas, así como a sus elevados requisitos metabólicos necesarios para conservar su tasa idónea de actividad, requiriendo un óptimo grado de funcionamiento mitocondrial para mantener una eficiente conducción sináptica.<sup>4,21</sup> Concretamente, en torno al 90% de las señales sensoriales integradas en el cerebro son de origen visual, siendo transmitidas por mediación de las RGCs.<sup>12</sup> En dichas circunstancias, evidentemente, un impacto en la función mitocondrial, conllevando una depleción de energía neuronal, constituye el mediador responsable de la muerte neuronal. En vista a las consecuencias derivadas, se ha hipotetizado que las mutaciones provocan un defecto relativamente leve a nivel del complejo I que únicamente parece inducir muerte celular en las RGCs debido a una vulnerabilidad selectiva todavía desconocida.<sup>13</sup>

Una posible explicación para la especificidad del fenotipo de LHON es que dichas mutaciones únicamente expresan su patogenicidad en el contexto de una célula neuronal, debido a diferencias estructurales o funcionales en esas mitocondrias. En este contexto, un estudio llevado a cabo por Wong A. et al., se demostró que las células neuronales tenían un ratio mtDNA/nDNA significativamente más bajo que en otras células de referencia. Dicho contenido disminuido de

mitocondrias en las neuronas diferenciadas podría poner de manifiesto la sensibilidad aumentada de este tipo celular a los defectos mitocondriales.<sup>15</sup>

De hecho, estudios posteriores revelaron que el número de copias de mtDNA era significativamente más alto en portadores de LHON no afectados en comparación con pacientes enfermos. Por tanto, probablemente una mejor biogénesis mitocondrial sí podría constituir un mecanismo compensatorio que protegiera a algunos portadores de la pérdida de la visión.<sup>22,23,24</sup>

#### 1.2.4. Perspectivas terapéuticas en pacientes afectados por LHON

A día de hoy, no existe ningún tratamiento eficaz para la cura de esta enfermedad, únicamente medidas dirigidas a aliviar la sintomatología, pero se ha estudiado una gran variedad de posibilidades, entre ellas:

- El uso de agentes farmacológicos como la coenzima Q (CoQ) o su cadena corta, la idebenona o el EPI-743, ambos análogos de la ubiquinona, un transportador esencial de electrones a lo largo de la cadena respiratoria desde los complejos I y II al complejo III, se cree pueden mejorar el flujo axonal y prevenir el estrés oxidativo. Sin embargo, ensayos llevados a cabo han concluido que la eficacia de estos tratamientos es controvertida, pudiendo ser únicamente efectivos a modo de terapia preventiva. La CoQ presentaba dificultades para atravesar la barrera hematoencefálica que parecían ser superadas con el suministro de idebenona, lo cual llevó a su aprobación por parte de la Agencia Europea del Medicamento en el año 2015.<sup>4,6,20,25</sup> Sin embargo, estos tratamientos simplemente están diseñados para atenuar la probable consecuencia bioquímica derivada de las mutaciones de LHON y no para curar el defecto primario.<sup>13</sup>
- El empleo de suplementos nutricionales, incluyendo combinaciones de vitaminas (B2, B3, B12, C, E, ácido fólico), coenzima y otros compuestos tales como ácido alfa-lipoico, carnitina, L-arginina y dicloroacetato, también se han propuesto con el objetivo de potenciar la tasa respiratoria mitocondrial y actuar a modo de *scavengers* de radicales libres, aunque bien es cierto, que con un beneficio actual variable y limitado.<sup>26</sup>
- Además de la administración de compuestos antioxidantes, el aumento de la biogénesis mitocondrial y la síntesis de ATP constituyen una estrategia atractiva que podría ayudar a rescatar a las células neuronales fallidas de la muerte celular apoptótica. En relación con este aspecto, se han testado varias moléculas análogas a los estrógenos, tales como los fitoestrógenos, a modo de inductores eficaces de proliferación mitocondrial, siendo capaces de unirse selectivamente a receptores de estrógenos de tipo beta, mediando efectos neuroprotectores.<sup>4,25</sup> Bien es cierto que la hipótesis de incrementar la producción de ATP en momentos de estrés a través del aumento de masa mitocondrial no se ha demostrado clínicamente, pero constituye una línea de investigación interesante para aquellos pacientes portadores de LHON, ya que la posibilidad de tomar un medicamento simple para prevenir la aparición de síntomas es una perspectiva agradable.<sup>10,24</sup>
- Con objetivos relacionados surgió la propuesta de la terapia con luz roja lejana/infrarroja cercana, cuya metodología consiste en alterar la función mitocondrial de manera no invasiva mediante la exposición a la luz. Su fundamento parte de la hipótesis de que el complejo IV puede actuar como aceptor de fotones, conllevando el subsecuente aumento de su actividad, que se reflejaría en un incremento de producción energética mitocondrial.<sup>14</sup>

- Una característica destacable es que el ojo posee una posición estratégica ideal para el desarrollo de aproximaciones basadas en terapia génica mediante el uso de sistemas virales, seguros y efectivos, que únicamente requerirían una accesible inyección intravítrea.<sup>20,25</sup> Sin embargo, esta metodología se ha visto dificultada por el elevado grado de impermeabilidad de la doble membrana estructural mitocondrial.<sup>27</sup> Para superar dichos impedimentos, se ha propuesto un procedimiento mediante sistemas de expresión alotópica en que el gen de reemplazo de interés se integra en el genoma nuclear mediante vectores derivados de adenovirus, donde codificará para una proteína portadora de una secuencia de direccionamiento mitocondrial que permitirá su posterior importación en el compartimento específico.<sup>4,7,11</sup> Sin embargo, la eficiencia de este método se ha cuestionado en muchos estudios, fundamentalmente con argumento en base a la elevada hidrofobicidad de las proteínas codificadas por el mtDNA. Para solucionarlo, con posterioridad, Kaltimbacher et al.<sup>28</sup> optimizaron el sistema de expresión alotópica, de manera que el RNA mensajero (mRNA), marcado con una secuencia 3'-UTR, era dirigido a la superficie mitocondrial, localización en que la traducción proteica estaba acoplada con la traslocación al interior del orgánulo.<sup>10,20,29</sup>
- Otra posibilidad aborda el ámbito de la terapia de reemplazamiento mitocondrial, con el principal objetivo de prevenir la transmisión del mtDNA patogénico de la madre al hijo. Ello sería plausible recurriendo a técnicas de fecundación *in vitro* en que se transferiría el material nuclear parental a un cigoto enucleado donador del mtDNA normal. No obstante, esta técnica involucraría la modificación de la línea germinal, pudiendo derivar en devastadoras consecuencias de aparición impredecible, lo que ha derivado en un gran debate ético acerca de su implantación en la clínica, al tratarse, en este caso, de un trastorno compatible con la vida del paciente afectado.<sup>7,25</sup>  
 Esta aproximación únicamente se aprobó en el año 2015 en Reino Unido en centros regulados y con un robusto programa de seguimiento infantil a largo plazo<sup>7</sup>, aunque bien es cierto que este enfoque reproductivo continúa resultando controvertido a pesar de que únicamente suponga la herencia de un total de 37 genes de una tercera persona, una ínfima cantidad en comparación con los cerca de 20.000 genes constituyentes del material genético nuclear.<sup>22</sup>  
 Dicha polémica incluso se intensificó a finales de 2016 cuando repercutió en los medios el nacimiento del primer niño vivo con técnicas de reemplazo mitocondrial. Se trataba del caso de una madre heteroplásmica para síndrome neuropático, que a pesar de ser asintomática, había sufrido previos abortos y el fallecimiento de dos hijos a causa de la enfermedad. En este contexto, se informó una buena salud del niño en cuestión a los 7 meses de edad con niveles relativamente bajos de mutación.<sup>22</sup>
- Finalmente, en la actualidad están cobrando importancia las nuevas técnicas de edición del genoma a modo de potenciales tratamientos eficaces, incluyendo las técnicas de CRISPR/Cas9, el uso de mitoTALEN, mtZFN y endonucleasas de restricción con direccionamiento mitocondrial, que permitirían un desplazamiento heteroplásmico de la mutación involucrada en el paciente.<sup>11</sup> En efecto, la seguridad y eficacia de este nuevo enfoque terapéutico del mtDNA abren una nueva ventana de tratamiento para personas afectadas. No obstante, su aplicación clínica todavía requiere exceder los complejos problemas técnicos subyacentes y valorarse como herramienta de segura administración en humanos.<sup>10</sup>

### 1.3. Perspectivas futuras

A pesar de los esfuerzos invertidos, y del gran progreso en términos de caracterización molecular y correlación fenotipo/genotipo, la investigación actual sobre LHON y otras enfermedades mitocondriales se ve gravemente limitada por la latente incapacidad para estudiar los mecanismos patogénicos involucrados en la dolencia, debido entre otros factores, a la inaccesibilidad del tejido afectado y a la carencia de buenos modelos para su estudio.<sup>11,30</sup> Bien es cierto que puede inducirse un fenotipo similar a LHON en roedores mediante el uso de tóxicos de la cadena respiratoria. Sin embargo, estos modelos no permiten dilucidar las interacciones genéticas subyacentes que conducen a la penetrancia incompleta y a las características clínicas de la enfermedad. Con dicho objetivo, sería necesario recurrir a mutaciones de la línea germinal, con implicaciones negativas desde el punto de vista ético.<sup>31</sup>

Con la finalidad de sobrepasar esa barrera, resultó de gran importancia el hallazgo de que las células somáticas podían reprogramarse, dando lugar a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), con susceptibilidad a una posterior diferenciación a RGCs destinadas a manipulación experimental y búsqueda de compuestos farmacológicos de alto rendimiento. En este aspecto, a pesar de que el reemplazo de RGCs constituiría un complejo desafío debido a la necesidad de que las *nuevas* células restauraran las conexiones axonales damnificadas, podría ejercer una influencia neuroprotectora en el organismo.<sup>4,7,30,32</sup> En lo que refiere a este último aspecto, se ha visto que algunos pacientes de LHON experimentan cierta recuperación de las capacidades visuales, debido a la supervivencia de RGCs a pesar de la disfunción mitocondrial y el ambiente oxidativo. En esas condiciones, parece prometedor el uso de células madre mesenquimales, capaces de secretar factores neurotróficos y citoquinas anti-inflamatorias con efectos protectores sobre las células remanentes.<sup>32</sup>

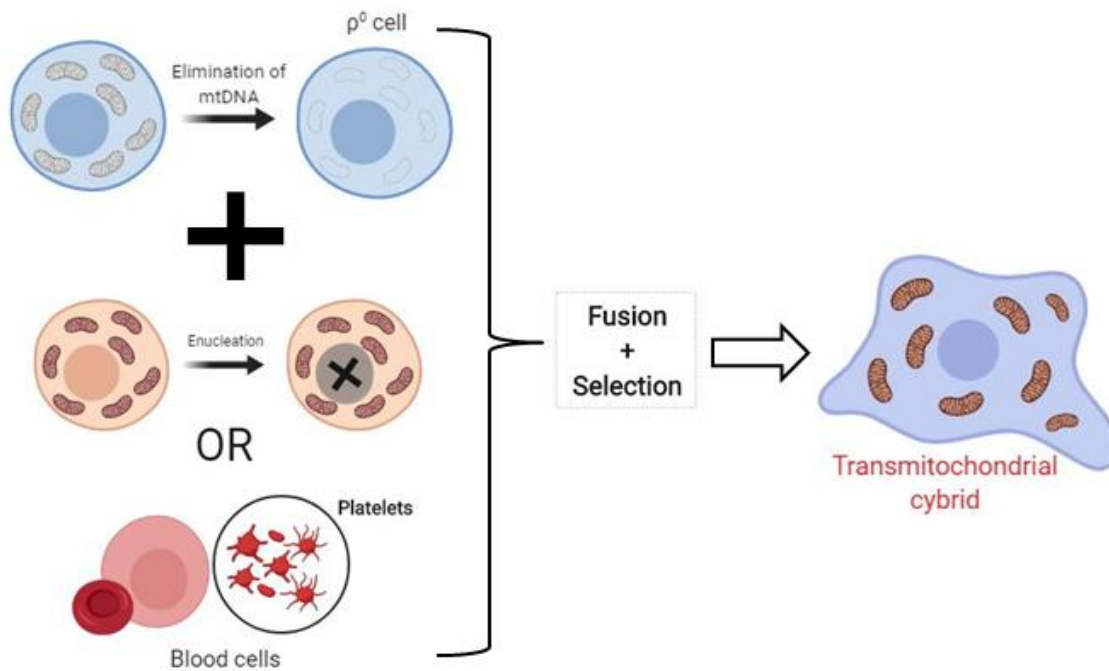
Otra posibilidad sería recurrir a cultivos de tejido en tres dimensiones o a la relativamente recién incorporada tecnología de los organoides. En cualquier caso, todo el afán en la búsqueda de óptimos modelos y potenciales tratamientos resulta trascendental, puesto que en sí mismo, el conjunto de las enfermedades raras representa un modelo clave para abordar los mecanismos patogénicos que involucran la biología mitocondrial con relevante incidencia en otros trastornos mucho más frecuentes en la población actual, tales como la diabetes, el síndrome metabólico, los trastornos neurodegenerativos e inflamatorios, el cáncer, e incluso la senescencia y el envejecimiento.<sup>11</sup>

### 1.4. Modelos híbridos para el estudio de las enfermedades mitocondriales

En este campo, ha resultado de gran relevancia la construcción de híbridos transmitocondriales mediante la transferencia de un mtDNA patogénico a líneas celulares carentes de dicho material genético (denominadas células  $\rho^0$ , obtenidas mediante un exhaustivo tratamiento a concentraciones subletales de bromuro de etidio, compuesto intercalante del DNA). Dicho procedimiento resulta de gran eficacia puesto que va acompañado de la transferencia del defecto molecular, dando lugar a un modelo celular en que el *background* nuclear y el medio ambiente derivado de las condiciones de cultivo son constantes, de manera que las particularidades observadas en los diferentes parámetros medibles constituyen un reflejo de las mutaciones portadas en el mtDNA.<sup>33</sup>

De manera más detallada, su construcción se consigue gracias a la fusión de líneas celulares humanas a las que se les ha eliminado el material genético mitocondrial ( $\rho^0$ ), con citoplastos o plaquetas sanguíneas (células carentes de núcleo) del paciente portador de la mutación de la enfermedad que

se desea estudiar en cuestión. Como resultado, la transferencia del fenotipo funcional del paciente a los cíbridos representa la mejor evidencia acerca de la implicación de las mutaciones del mtDNA en el desencadenamiento de la enfermedad.<sup>1,10,13</sup>



**Figura 4. Esquema de la generación de cíbridos transmitocondriales.** La célula  $\rho^0$  (tras previa eliminación del mtDNA) representa a la célula donadora del fondo genético nuclear. La célula roja (citoplasma) o las plaquetas, actúan a modo de células donadoras de las mitocondrias y el mtDNA, generando, como resultado de su fusión y posterior selección, un cíbrido transmitocondrial que puede ser utilizado como modelo celular objeto de estudio de una determinada enfermedad.

Bien es cierto que a pesar de su utilidad, dichas células  $\rho^0$  suele tratarse de líneas celulares tumorales, a menudo genéticamente heterogéneas, con múltiples desequilibrios cromosómicos. Por tanto, los cíbridos resultantes tienen el inconveniente de contener características genéticas nucleares variables que se seleccionan al azar, generando una importante diversificación que no permite garantizar un fondo nuclear completamente idéntico, alterando, en este caso concreto, a nivel de uno de los factores que puede influir como desencadenante de LHON.<sup>13,33</sup>

No obstante, la dificultad del desarrollo de modelos animales portadores de mutaciones mitocondriales concretas, hace que a día de hoy, los cíbridos constituyan uno de los mejores y más sencillos modelos para el estudio de esta serie de trastornos.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza está especializado, entre otras líneas de investigación, en el diagnóstico genético-molecular de enfermedades mitocondriales humanas. Por ello, numerosas muestras de pacientes bajo sospecha de padecer una determinada patología mitocondrial, en ocasiones con naturaleza infundada, son remitidas a sus instalaciones para su análisis y estudio. En ese contexto, se propuso como objetivo llevar a cabo el diagnóstico de pacientes que aparentemente mostraban un fenotipo compatible con LHON, con epicentro en aquellos en que el resultado del análisis por PCR-RFLP hubiera resultado negativo para las tres mutaciones causales primarias de la enfermedad en cuestión. Se trataría de casos en que sería interesante caracterizar las mutaciones puntuales manifiestas, susceptibles de ser patológicas, y por consiguiente, de especial atractivo para ser estudiadas en modelos adecuados, tales como cíbridos transmitocondriales portadores del defecto molecular en cuestión.

Bajo esa hipótesis, fue de interés el historial clínico de una paciente (3346) que presentaba pérdida de visión binocular y lesiones desmielinizantes, figuradamente consecuencia de la mutación puntual m.15950G>A en el mtDNA que afectaba a nivel del tRNA<sup>Thr</sup>. En dicho contexto, se propuso el estudio de la implicación de esa nueva mutación en asociación con la enfermedad de LHON, definiéndose para ello los siguientes objetivos de Trabajo de Fin de Máster:

- Construcción de cíbridos transmitocondriales con fondo genético nuclear de la línea celular 143B, y fondo genético mitocondrial procedente de las plaquetas de la paciente 3346 como modelo de estudio de la mutación puntual m.15950G>A.
- Caracterización de los cíbridos resultantes mediante PCR-RFLP y determinación del haplogrupo y cuantificación del número de copias de mtDNA por técnicas de *real time* PCR.
- Análisis de la función mitocondrial de los cíbridos generados mediante la medida de expresión y actividad del complejo IV, y el estudio del funcionamiento de la cadena de transporte electrónico a través de la determinación de la tasa de síntesis de ATP.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Materiales y Reactivos

##### 3.1.1. Material biológico y líneas celulares

Para llevar a cabo este trabajo, se han construido líneas híbridas mitocondriales (híbridos) con fondo nuclear procedente de la línea celular 143B, derivada de osteosarcoma humano mediante la fusión de su correspondiente línea  $\rho^0$ , carente de mtDNA, con plaquetas extraídas a partir de una muestra sanguínea de la paciente 3346 portadora de la mutación a nivel del tRNA<sup>Thr</sup>.

Adicionalmente, a modo de control comparativo de haplogrupo mitocondrial en los ensayos realizados, se utilizaron otros híbridos mitocondriales previamente construidos por miembros del Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial a partir de plaquetas procedentes de voluntarios sanos donantes.

##### 3.1.2. Aparatos e instrumentos

<b>Función</b>	<b>Aparato</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>	<b>Observaciones</b>
Esterilización	Estufa	S-201	P-selecta	Vidrio (160°C, <i>overnight</i> )
	Autoclave	437	P-selecta	Plástico y disoluciones (120°C, 1atm, 20min)
Balanzas	Granatario	FA-2000	AND	Precisión 0,1g
	Balanza analítica	ML204	Mettler Toledo	Precisión 0,001g
Almacenamiento	Ultracongelador	CFC Free	Sanyo	Muestras biológicas (-80°C)
	Criopreservador	ESPACE 151-331-661	Air Liquid	Células, en N <sub>2</sub> (l)
	Frigoríficos y Congeladores	Varios	Whirlpool, Bosch, Lynx...	Reactivos y disoluciones (4°C y -20°C)
Manejo de volúmenes	Micropipetas	Nichipet EX	Nichiryo	2, 20, 200 y 1000µl
	Micropipetas multicanal	Finnpipette	ThermoFisher Scientific	50 y 300µl
	Pipeteador automático	PipetBoy	Integra (Biosciences)	1-50ml
Recuento celular	Contador	Countess Automated Cell Counter	ThermoFisher Scientific	Azul tripán
Congelación de células	Criocontenedor	Mr. Frosty™	ThermoFisher Scientific	Con isopropanol y rampa de Tª de 1°C/min.
Cultivo celular	Incubador	DHD Autoflow	Nuaire	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , atmósfera húmeda



	Campanas de flujo laminar	LaminAir HB2448	Holten	
		LabGard ES NU-437 Class II, type A2 Biosafety	Nuaire	
Atemperado	Baño termostatzado	Precistern	Selecta	
	Thermoblocks	Mulplaces	Selecta	En seco
Bombas	De vacío	Vacusip	Integra	
		Laboport	Knflab	
Centrífugas	Microcentrífuga	MiniSpin®plus	Eppendorf	
		5415R	Eppendorf	Refrigerada
	A Tª ambiente	Allegra X-22	Beckman Coulter	
	Termostatzada	RC 5B PLUS	Sorvall	Rotores HS4 y SS34
PCR	Termociclador	T3 Thermocycler	Biometra®	
	Real-time PCR	StepOne™System	ThermoFisher Scientific	48 pocillos
Espectrofotómetros	Lector de microplacas	NOVOstar	BMG Labtech	Absorbancia, fluorescencia y luminiscencia
	Nano-drop	ND-1000	ThermoFisher Scientific	Ácidos nucleicos
Electroforesis	Cubetas	Sub-Cell®GT Cell	Bio-Rad	Ácidos nucleicos
		Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad	Western-Blot
	Fuentes de alimentación	PowerPac™ Universal	Bio-Rad	50-500V
Tratamiento de geles y membranas	Generador de gradiente	Hoefer SG30	Amersham	
	Sistemas de transferencia	Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad	Western-Blot
	Visualización	Gel Doc™XR+System	Bio-Rad	Ultravioleta (UV)
		ODYSSEY® CLx	LI-COR	Infrarrojo (IR)
Exposición autorradiográfica	Hypercassette™	Amersham	Western-Blot	
Microscopía	Invertido	DMIL	Leica	Cámara ICC50 HD

**Tabla 1. Listado de instrumentos y aparatos empleados.** Incluyendo marca, modelo, especificaciones y función para la se ha utilizado durante la realización del trabajo.

### 3.1.3. Reactivos

#### 3.1.3.1. Reactivos generales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico o aptos para biología molecular y cultivo celular en su caso. La mayoría de ellos proceden de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Bio-Rad, ThermoFisher Scientific, Merck, Roche y Panreac®.

### 3.1.3.2. Medios de cultivo y material estéril

Los medios utilizados en el cultivo celular, así como el suero fetal bovino (FBS), procedieron de Gibco™, Invitrogen.

El material de plástico estéril empleado en cultivo (incluyendo placas de 100mm, placas de 6, 12, 24 ó 96 pocillos, tubos Falcon, pipetas, criotubos, etc.) y los filtros de 0,22µm de tamaño de poro para la esterilización de soluciones, procedieron de TPP, Suiza.

### 3.1.3.3. Reactivos para PCR

La enzima polimerasa utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue la Taq DNA Polymerase contenida en el Multiplex PCR Master Mix de la casa comercial ThermoFisher Scientific. A su vez, los reactivos para la PCR cuantitativa (qPCR) procedieron de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific). Los oligonucleótidos para la PCR fueron sintetizados por ThermoFisher Scientific y purificados mediante el método de desalado. Los oligonucleótidos y sondas para la qPCR fueron sintetizados por ThermoFisher Scientific y purificados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

### 3.1.3.4. Kits comerciales

<b>Función</b>	<b>Nombre</b>	<b>Casa comercial</b>
Extracción de DNA	<i>Cells and Tissue DNA Isolation Kit</i>	Norgen Biotek Corp.
PCR cuantitativa a tiempo real	<i>TaqMan Gene Expression/Genotyping Master Mix</i>	Applied – Biosystems
Determinación de la actividad enzimática del C.IV	<i>Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay Kit</i>	BioVision
Determinación de niveles de ATP	<i>CellTiter-Blue® Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega
Determinación de la viabilidad celular	<i>CellTiter-Blue® Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega
Inmunodetección de proteínas	<i>SuperSignal®West Pico Mouse/Rabbit IgG Detection Kit</i>	ThermoFisher Scientific

**Tabla 2. Listado de kits comerciales empleados.** Incluyendo casa suministradora y área de aplicación.

### 3.1.3.5. Geles, membranas y autorradiografías

Para la electroforesis de proteínas y su posterior inmunodetección por Western-Blot se utilizaron los Mini-PROTEAN®TGX™ *precast gels* y los Trans-Blot® Turbo™ *Mini/midi PVDF Transfer Packs* de Bio-Rad. Las películas autorradiográficas utilizadas en la detección de proteínas por Western-Blot, mediante el método de quimioluminiscencia, fueron *Hyperfilm™ ECL* de Amersham, junto con el revelador y el fijador de la marca Kodak.

### 3.1.3.6. Anticuerpos

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
Anti-MTCOI	Mc, ratón	1:500	Abcam
Anti-SDHA	Mc, ratón	1:1000	Invitrogen
Anti-ratónIgGDyLight™680	Pc, Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti-ratónIgGDyLight™800	Pc, Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti-ratón (H+L) peroxidasa conjugada	Pc, Cabra	1:5000	Thermo Scientific

**Tabla 3. Tabla resumen de anticuerpos primarios y secundarios empleados para la inmunodetección de proteínas por Western-blot.** Incluyendo sus diluciones adecuadas para el ensayo. Mc: monoclonal; Pc: policlonal.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Técnicas de cultivo celular

#### 3.2.1.1. Mantenimiento de los cultivos celulares

Generalmente, los cultivos celulares se llevaron a cabo utilizando concentraciones elevadas de glucosa, condiciones en que las células portadoras de mutaciones patológicas en el mtDNA pueden crecer sin limitaciones.<sup>34</sup> No obstante, en función de las características celulares concretas y de los propósitos experimentales, se emplearon distintos medios de cultivo a los que se adicionaron diferentes suplementos: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) glucosa 4,5g/L (25mM), DMEM libre de glucosa, tampón fosfato (PBS), suero fetal bovino (FBS), uridina, galactosa y piruvato, entre otros.

Con el objetivo de salvaguardar la esterilidad de los cultivos celulares, todas las manipulaciones se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar vertical en condiciones de ausencia de antibióticos para evitar efectos fenotípicos derivados no deseados por inhibición a nivel mitocondrial.<sup>35</sup>

Las líneas celulares se cultivaron de manera rutinaria en placas de 100 o 150mm en el medio adecuado, que fue renovado con una frecuencia de 2-3 días. En caso de las células p<sup>0</sup> 143B, se utilizó medio DMEM alta glucosa (25mM), suplementado con 10% FBS y uridina a concentración final 50µg/ml. En el caso de los híbridos transmitocondriales, no fue requerido el suplemento con uridina.

En ambos casos, su cultivo se llevó a cabo en un incubador termostatzado a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y enriquecida al 5% en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

#### 3.2.1.2. Tripsinización de los cultivos celulares

Para la disociación de las células adherentes se utilizó tripsina *TrypLE™ Express* de Gibco™, Invitrogen. Cuando las células en cultivo alcanzaron un grado de confluencia próximo o superior al 80%, se retiró el medio de cultivo restante, se lavaron con PBS para eliminar proteínas del suero remanentes, inhibidoras del efecto de la tripsina, y se incubaron con tripsina durante 2-3 minutos a 37°C, pretendiendo así eliminar las uniones adherentes celulares establecidas con la placa. Transcurrido dicho tiempo, se comprobó bajo microscopio invertido que las células se hubieran despegado de la superficie y en ese caso, se recogieron con un volumen de medio de cultivo 2-3 veces superior que el de tripsina utilizado. Posteriormente, se centrifugaron a 1400rpm durante 5

minutos a temperatura ambiente y el pellet celular resultante se procesó en función del uso posterior deseado.

### ***3.2.1.3. Recuento celular***

El recuento celular y el análisis de su viabilidad se realizaron utilizando un contador automático con capacidad para detectar densidades desde  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^7$  células/ml. Para el estudio de la viabilidad celular, se siguió la técnica del Azul Tripán, un colorante capaz de penetrar en las células que poseen la membrana plasmática dañada o desestructurada, quedando así, las células viables sin colorear y las no viables teñidas de azul. Para ello, se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l de la suspensión celular, sobre la que se añadió un volumen análogo de azul tripán y tras homogeneización, se estudiaron en el interior de cámaras desechables por duplicado, de manera que las células fueron contadas de forma automática por el aparato en un tiempo de unos 30 segundos.

### ***3.2.1.4. Congelación y descongelación de células***

Para la congelación de los cultivos, las células se despegaron de la superficie de la placa mediante tripsinización, y el pellet resultante se resuspendió, dando una densidad final de 1-2 millones de células/ml, en medio de congelación, constituido por DMEM suplementado con 20% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a modo de compuesto crioprotector. Tras homogeneización se almacenaron en criotubos resistentes al nitrógeno ( $N_2$ ) líquido que se introdujeron en el interior del Mr. Frosty en el congelador de  $-80^\circ\text{C}$ . El sistema de congelación Mr. Frosty consiste en un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isoamílico, de manera que al ser sometido a congelación, permite un descenso gradual de la temperatura, siguiendo una rampa de  $1^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , favoreciendo así una óptima congelación celular.

Para la descongelación, se partió de un criotubo procedente, bien del tanque de  $N_2$  líquido, bien del congelador a  $-80^\circ\text{C}$ , y su contenido se traspasó a un tubo falcon de 15ml con 9ml medio de cultivo adecuado previamente atemperado, tratando de evitar un contacto prolongado de las células con el tóxico DMSO presente en el criotubo. La suspensión celular se centrifugó a 1400rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante, y el pellet celular resultante se resuspendió en el medio apropiado y se sembró finalmente en placas de 100mm.

### ***3.2.1.5. Generación de híbridos mitocondriales***

El desarrollo de una aproximación para la transformación de células humanas mediada por mitocondrias, utilizando células carentes de mtDNA como receptoras, fue propuesto por King y Attardi en 1989<sup>36</sup>, abriendo así el campo del análisis de la capacidad funcional del mtDNA tanto de individuos normales como de portadores de mutaciones patológicas. Con posterioridad, Chomyn et al. desarrollaron una variante que permitía utilizar directamente, como donantes de mitocondrias, células sanguíneas procedentes del propio paciente bajo investigación, aumentando así sustancialmente la utilidad del sistema de transformación de las células  $\rho^0$ .<sup>37</sup>

Por consiguiente, las líneas híbridas utilizadas en este estudio han sido generadas a partir de plaquetas sanguíneas según el protocolo de Chomyn et al., 1996.<sup>37</sup>

### 3.2.1.5.1. Aislamiento de plaquetas

Se recogen aproximadamente unos 15-20ml de sangre del paciente objeto de estudio en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a modo de anticoagulante, que posteriormente se trasvasan a un tubo falcon de 50ml, sobre el que se añade 1/9 del volumen de una solución de citrato sódico 0,1M y NaCl a 0,15M para evitar la agregación plaquetaria. Se mezcla bien por inversión y se centrifuga a 200g (1500rpm) durante 20 minutos a 12°C, utilizando para ello una centrífuga Sorvall, rotor SS34.

Como resultado de la centrifugación, es posible observar tres fracciones diferenciadas en los tubos: el plasma, de color amarillento, donde se encuentran las plaquetas de interés; una fina interfase blanquecina en que se hallan los leucocitos; y un precipitado de color rojizo en el fondo, donde se encuentran los eritrocitos. Para aislar las plaquetas, se recogen  $\frac{3}{4}$  partes del sobrenadante, dejando aproximadamente unos 3mm para la capa de células rojas, que se trasvasan a un tubo falcon de 15ml para una nueva centrifugación, esta vez a 1500g (4200rpm) durante 20 minutos a 15°C. Finalmente, el pellet celular obtenido se resuspende en 2ml de suero salino en que se homogeneiza para disgregar posibles agregados y posteriormente se lleva a un volumen total de 7ml, suspensión que se centrifuga nuevamente a 1500g (4200rpm) durante 15 minutos a 15°C, manteniendo el pellet obtenido y descartando el sobrenadante resultante.

### 3.2.1.5.2. Preparación de células $\rho^0$

Las células  $\rho^0$  se tripsinizan, cuentan y resuspenden en medio DMEM con 10% FBS libre de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), alcanzando una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml, utilizándose un volumen total de 2ml de dicha suspensión, y por tanto,  $2 \times 10^6$  células totales para la posterior etapa de fusión.

### 3.2.1.5.3. Fusión celular

Sobre el pellet de plaquetas previamente extraído, se añade un volumen total de 2ml de la solución de células  $\rho^0$  a la densidad deseada con sumo cuidado, evitando alterarlas. La muestra resultante se centrifuga a 180g (1400rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente, sin freno, y se descarta el sobrenadante resultante. Posteriormente, sobre el pellet, se añaden 100 $\mu$ l de polietilenglicol (PEG) al 50% y se resuspende utilizando una pipeta Pasteur. Una vez resuspendida la solución, se deja estable durante un minuto aproximadamente, favoreciendo así la fusión de las membranas celulares presentes, y transcurrido dicho tiempo, se resuspende nuevamente durante 30 segundos adicionales, tras los que se añade un volumen de 10ml de medio  $\rho^0$  suplementado con FBS y uridina. Seguidamente, se centrifuga a 200g (1400rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente y el precipitado celular obtenido se siembra en una placa de 100mm en el denominado medio de fusión, constituido por DMEM con 10% FBS suplementado con uridina (50 $\mu$ g/ml) y con 5-bromo-desoxi-uridina (5-BrdU) (100 $\mu$ g/ml) para que en caso de que coexistan otras células sanguíneas indeseadas diferentes a las plaquetas, no se fusionen.

La enzima timidina kinasa (TK) es capaz de fosforilar el 5-BrdU, causando su intercalamiento en el DNA, derivando en una inhibición del crecimiento celular. La actividad TK está inhibida en las células  $\rho^0$ , mientras que se mantiene activa en otras células, de ahí que dicho suplemento inhiba el crecimiento de otras células sanguíneas ajenas (como linfocitos), causando su eliminación del medio sin afectar al crecimiento de los híbridos recién construidos.<sup>30</sup>

#### 3.2.1.5.4. Tratamiento post-fusión y selección de cíbridos

Al segundo día de la siembra, se renueva el medio de fusión, y una vez las células en cultivo alcanzan la confluencia, se doblan en dos nuevas placas de 100mm, que al llenarse nuevamente se utilizan para su congelación y para la selección de cíbridos presentes respectivamente. En el caso del proceso selectivo, se utiliza para el cultivo medio DMEM con 10% FBS dializado y 5-BrdU (100µg/ml) sin uridina ni piruvato, condición que, debido a sus características, permite eliminar las células  $\rho^0$  remanentes que no han sido fusionadas.<sup>33</sup>

El proceso de selección de los cíbridos se mantiene durante unas 3 semanas aproximadamente, periodo de tiempo en que el medio de cultivo se renueva durante 2-3 días. Una vez se da por finalizado, los cíbridos seleccionados se expanden de manera prolongada con el objetivo de favorecer la recuperación de sus nuevos niveles de mtDNA para su posterior análisis. Para ello, se cultivan en medio DMEM con 10% FBS de manera que, una vez alcanzada la confluencia, son dobladas, hasta alcanzar un número próximo a 30-35 pases, en que se confirman si los niveles de mtDNA han sido recuperados y son constantes. Durante dicho proceso, cada 5 pases, también se congelan criotubos a modo de reserva celular en caso de que fuera necesario recurrir a ellos. Así mismo, una de las placas de cultivo es tripsinizada y el pellet celular obtenido, congelado para la posterior extracción de DNA y determinación de los niveles de mtDNA.

#### 3.2.1.6. Estudio de la tasa de crecimiento celular

Para hacer curvas de crecimiento, con el fin de determinar la velocidad de crecimiento celular en un medio de cultivo determinado, se sembraron  $3 \times 10^5$  células por placa de 100mm por triplicado, por día de conteo y por línea celular cíbrida, tanto control como mutante.

Una vez adheridas las células (transcurridas entre 6 y 24 horas tras su siembra), una de las tandas de triplicados de placas de cada línea celular objeto de estudio, se recoge por tripsinización y posterior centrifugación y se toma una alícuota para proceder al conteo del número de células con el objetivo de establecer el tiempo cero de la curva de crecimiento. Posteriormente, cada 24 horas se repite el procedimiento con el fin de valorar la evolución del número de células respecto al tiempo en unas condiciones determinadas.

Durante este trabajo se estudiaron dos circunstancias diferentes de manera simultánea, el crecimiento celular en un ambiente de baja glucosa, con medio DMEM glucosa 1g/L (5mM) con 10% FBS; y en condiciones de ausencia de la misma, con medio DMEM *free*, carente de glucosa, suplementado con 10% FBS, galactosa (0,9g/L) y piruvato (0,11g/L). Dicho medio fue renovado cada 2 días de cultivo.

Para el cálculo del tiempo de duplicación (DT), se representa en una gráfica el número de células frente al tiempo transcurrido entre cada recuento, y los puntos correspondientes se ajustan a una curva exponencial del tipo  $N = a \times e^{bt}$ , siendo N el número de células y t el tiempo. De esa manera, cuanto  $t = 0$ ;  $N = a$ . Por consiguiente, si DT es el tiempo de duplicación, entonces, para dicho valor,  $N = 2a$ , que al sustituir en la ecuación anterior:

$$\text{Para DT: } 2a = a \times e^{bDT} \rightarrow e^{bDT} = 2 \rightarrow bDT = \ln 2 \rightarrow DT = \frac{\ln 2}{b}$$

### 3.2.2. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

#### 3.2.2.1. Extracción de DNA a partir de lisados celulares

El material de partida para la extracción del DNA fueron pellets celulares, congelados o frescos, obtenidos tras previa tripsinización, lavados 2 veces en PBS. Para la extracción de DNA a partir de lisados celulares durante este trabajo, se hizo uso del kit *Cells and Tissue DNA Isolation* de la casa comercial Norgen y se procedió de acuerdo con las instrucciones facilitadas por el fabricante, atendiendo al protocolo específico para la *preparación de lisados celulares a partir de células que crecen en monocapa*, seguido de la *purificación de DNA genómico para todos los tipos de lisados celulares*. Como resultado final, el DNA quedó eluído en un volumen total de 50µl de agua (H<sub>2</sub>O) pura libre de nucleasas.

#### 3.2.2.2. Cuantificación de DNA

La cantidad de ácidos nucleicos obtenidos se determinó utilizando un espectrofotómetro ND-1000 de la marca Nanodrop y su programa informático asociado, capaz de realizar una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 260 y 280nm a partir de un ínfimo volumen de muestra de trabajo (1-2µl). Tras la realización y fijación de un blanco, utilizando para ello el mismo disolvente en que está disuelta la muestra de ácidos nucleicos (agua destilada), la medida de las muestras da directamente el valor de la concentración de ácidos nucleicos en unidades de ng/µl, así como el ratio de absorbancia a 260/280nm, que permite evaluar la pureza de los ácidos nucleicos ante una posible contaminación por proteínas, considerándose un valor óptimo un ratio entre 1,8 y 2; y el ratio a 260/230nm, que permite evaluar la pureza frente a compuestos orgánicos derivados del proceso de extracción, siendo en este caso un valor óptimo un ratio en torno a 1,5-2,2. Una vez concluidas las determinaciones, para finalizar el proceso de medición, se realizaron dos medidas consecutivas con agua destilada con el objetivo de eliminar cualquier posible resto de ácido nucleico que hubiera quedado en el equipo.

#### 3.2.2.3. Secuenciación completa del mtDNA

Tomando como material de partida el DNA extraído a partir del extracto del cultivo celular, se procedió a la secuenciación de su DNA mitocondrial mediante el método de secuenciación de Sanger. Para ello, se amplificó el mtDNA en un total de diez fragmentos solapantes de entre 955 y 2811pb. Los oligonucleótidos empleados para amplificar cada uno de dichos fragmentos, así como el tamaño de los mismos, se incluyen en la siguiente tabla:

Fragmento	Oligo 5' - 3'	Hebra	Secuencia 5' - 3'	Amplicón (pb)	T <sup>º</sup> Hibridación
F1	hmtL 569	L	AACCAAACCCCAAAGACACC	2452	58°C
	hmtH 2982	H	CTGATCCAACATCGAGGTTCG		
F2	hmtL 2797	L	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	2417	58°C
	hmtH 5174	H	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG		
F3	hmtL 5061	L	AGCAGTTCTACCGTACAACC	2476	58°C
	hmtH 7497	H	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC		
F4A	hmtL 7336	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	955	62°C
	hmtH 8251	H	GCTATAGGGTAAATACGGGC		
F4B	COIL 8018	L	CCGATTGAAGCCCCCATTCG	1272	62°C

	COH 9250	H	GGGCTGGGTTTTACTATATG		
F4C	hmtL 8815	L	CTCATTACACCAACCACCC	1140	62°C
	L6H	H	CTTCGAAGCCAAAGTGAT		
F5	hmtL 9611	L	TCCCCTCTAAACACATCC	2539	58°C
	hmtH 12111	H	AAACCCGGTAATGATGTCGG		
F6	L1L	L	TACTCTCAATCAGCCACAT	2811	62°C
	hmtH 14559	H	GATTGTTAGCGGTGTGGTCG		
F7	hmtL 14130	L	TCTTCCCCTCATCCTAACC	2590	58°C
	hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG		
F8	hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1643	58°C
	hmtH 626	H	TTTATGGGGTGATGTGAGCC		

**Tabla 4. Listado de los oligonucleótidos empleados en la secuenciación completa del mtDNA.** Incluyendo su secuencia de reconocimiento, el tamaño del amplicón resultante y su temperatura idónea de hibridación.

Para la amplificación de dichos fragmentos, se preparó una mezcla de reacción con ~100ng de DNA y los siguientes componentes:

Componente	Concentración	Volumen (µl)
Tampón (Tris 100mM, MgCl <sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM, pH 8,3)	10X	5
dNTPs	10mM (cada uno)	1
Oligonucleótidos	25µM	0,5
Taq polimerasa	5U/µl	0,25
H <sub>2</sub> O	-	Completar hasta 50

**Tabla 5. Componentes de reacción necesarios para la secuenciación completa del mtDNA.** Incluyendo su concentración adecuada.

El programa térmico que se configuró en el termociclador para llevar a cabo la reacción fue el siguiente:

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	94	45 segundos	35 ciclos
Hibridación	T <sub>m</sub> (56°C)	30 segundos	
Extensión	72	3 minutos	
Elongación	72	5 minutos	1 ciclo
Enfriamiento	4	∞	

**Tabla 6. Especificaciones del programa térmico empleado para la amplificación de fragmentos del mtDNA durante la secuenciación.**

Seguidamente, se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% la correcta amplificación de cada uno de los fragmentos, incluyéndose en cada reacción un blanco con todos los reactivos necesarios pero sin DNA para cada uno de ellos con el fin de determinar ausencia de contaminación. Una vez detectada la aparición de banda correspondiente al amplificado en cuestión, se procedió a la purificación de las muestras. Para ello se mezclaron 8µl de ExoSap-It (exonucleasa I y fosfatasa alcalina) con 20µl de muestra (2µl de reactivo por cada 5µl de DNA), y se programó el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos:



Temperatura (°C)	Tiempo
37	15 minutos
80	15 minutos
4	∞

**Tabla 7. Programa térmico empleado para la purificación de fragmentos resultantes de la amplificación completa del mtDNA.**

Tras este paso, las muestras se enviaron al servicio de secuenciación automática de la Universidad Complutense de Madrid, donde los oligonucleótidos empleados para la secuenciación fueron los mismos que habían sido previamente utilizados para obtener los amplificadores.

Para analizar las secuencias recibidas se utilizó el programa informático Sequencher versión 4.1.4. Este programa permite el alineamiento de varias secuencias, siendo posible así detectar cambios en las mismas, ya sean cambios de base, deleciones o inserciones. Para ello, se alinearon todas las secuencias (solapantes entre sí) con una secuencia de referencia del mtDNA completo ([NC 012920](#))<sup>38</sup> y se vieron todos y cada uno de los polimorfismos presentes en las células de estudio. Posteriormente, las variantes en el mtDNA de la muestra se compararon con un árbol filogenético que incluye más de 20.000 secuencias (disponible en <http://www.phylotree.org/>).<sup>39</sup>

#### **3.2.2.4. PCR-RFLP**

Para comprobar que los híbridos resultantes habían incorporado adecuadamente el mtDNA de la paciente en cuestión, y por consiguiente, se trataba de un modelo celular portador de una determinada mutación, se procedió a analizar su presencia mediante una PCR de tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), basada en la amplificación de una región determinada del material genético de interés, seguida de posterior digestión con endonucleasas específicas de restricción, de manera que el patrón de corte resultante sea diferente en condiciones de ausencia o presencia de mutación, siendo así posible discernir el grado de éxito alcanzado.

##### **3.2.2.4.1. Proceso de amplificación: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de las muestras de DNA total previamente extraído y cuantificado, aislado a su vez de los lisados celulares. Las condiciones de PCR se adecuaron en función de las recomendaciones del fabricante de la enzima Taq DNA polimerasa, realizándose en tubos de 200µl y en un volumen final de 50µl que contenía:

- 25µl de Master Mix (dNTPs, Taq DNA polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, tampón Tris 100mM MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM, pH 8,3)
- 0,5µl de cada uno de los *primers* (25mM)
- ~100ng de DNA
- Volumen adecuado de H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen total de 50µl

Para comprobar la ausencia de contaminación durante la preparación de los reactivos, en cada experimento se utilizó, además de las muestras, un blanco que contenía la mezcla de reacción, pero que carecía de DNA. Todas las mezclas de reacción, una vez preparadas, se introdujeron en un termociclador, aparato en que tiene lugar el proceso de amplificación, siguiendo, de manera general, el siguiente programa, aunque estableciendo la temperatura de hibridación adecuada para cada par de oligonucleótidos empleados:

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95	45 segundos	35 ciclos
Hibridación	Tm (66°C)	45 segundos	
Extensión	72	45 segundos	
Elongación	72	5 minutos	1 ciclo
Enfriamiento	4	∞	

**Tabla 8. Especificaciones del programa térmico empleado para la amplificación del mtDNA por PCR.**

Los *primers* empleados en el proceso de PCR fueron los siguientes:

Primer 5'→3'	Hebra del mtDNA	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)
hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1138
hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG	

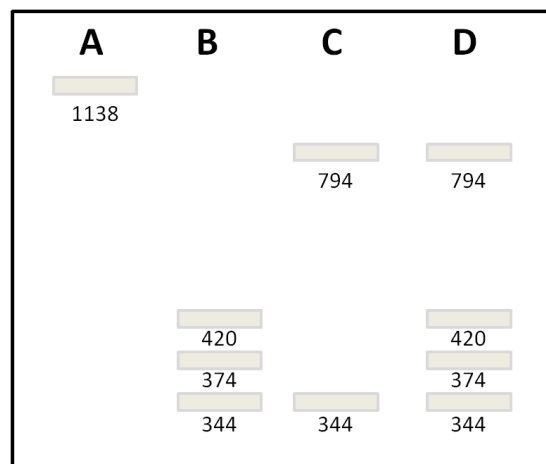
**Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR.** Incluyendo su secuencia de reconocimiento y el tamaño del amplificado resultante.

### 3.2.2.4.2. Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción

Este ensayo se utilizó para la determinación de la presencia o ausencia de la mutación puntual en la posición 15950 del mtDNA. Para ello se empleó la enzima de restricción *fast-digest* Eco130I (ThermoFisher) que en condiciones de 37°C, en su buffer adecuado, durante 20 minutos, es capaz de reconocer y escindir el siguiente sitio de restricción, 5' C<sup>^</sup>CWWGG 3', produciendo un patrón de bandas diferencial que permite identificar la presencia o no de dicho cambio puntual en el mtDNA.

Concretamente, en el caso de los pacientes sanos carentes de la mutación, la enzima es capaz de escindir el fragmento amplificado en tres regiones de 420, 374 y 344pb respectivamente. En cambio, en el caso de muestras procedentes de pacientes portadores de la mutación puntual, la enzima únicamente da lugar a dos fragmentos de 794 y 344pb respectivamente.

Los productos de PCR se digirieron tomando 5µl de la muestra amplificada llevándolos a un volumen final de 10µl, que contenían 5U del enzima de restricción, el tampón de incubación de la misma y agua destilada hasta completar el volumen total.



**Figura 5. Patrón de corte esperado tras la PCR-RFLP en gel de agarosa al 2,5%.** Siendo A: amplificado sin cortar; B: muestra normal; C: muestra mutante homoplásmica; y D: muestra mutante heteroplásmica.

### 3.2.2.4.3. Separación electroforética de ácidos nucleicos

Para verificar el éxito del proceso de amplificación mediante PCR, el producto resultante se comprobó mediante un gel de agarosa a una concentración del 1%, mientras que para determinar la

presencia de mutaciones puntuales mediante el análisis del patrón de corte derivado de la acción de la enzima de restricción, se utilizaron geles de agarosa a una concentración del 2,5%.

Para ello, la agarosa se fundió en un horno microondas en el tampón TBE 1X (50mM Tris, 50mM ácido bórico, 1mM EDTA-Na, pH 8,3), después se añadió bromuro de etidio (BrEt, 1µg/ml) y se dejó que la solución gelificara en las camas de electroforesis. Un volumen adecuado de las muestras se mezcló con 4µl de tampón de carga (0,21% (p/v) azul de bromofenol, EDTA 0,2M pH 8.0, 50% (v/v) glicerol en H<sub>2</sub>O libre pura) y una vez cargado el gel, la electroforesis se desarrolló a 50V durante diez minutos, para permitir la correcta entrada de los ácidos nucleicos al interior del mismo, y a 100-150V el tiempo restante. Las bandas resultantes se observaron tras exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta en el transiluminador Gel Doc<sup>TM</sup> XR+System (Bio-Rad), y se confirmó el tamaño de las bandas de ácidos nucleicos utilizando marcadores de peso molecular, generalmente de 1Kb (kilo base).

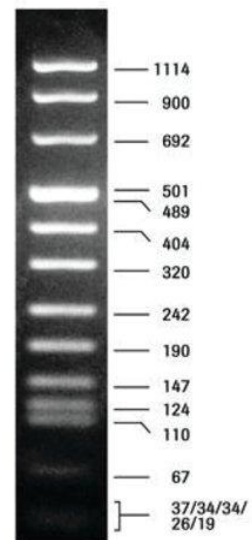


Figura 6. Patrón de bandas del marcador de peso molecular de 1Kb. Casa comercial Sigma-Aldrich.

### 3.2.2.5. Determinación del haplogrupo mitocondrial mediante qPCR

Una manera de determinar la presencia o ausencia de polimorfismos o mutaciones puntuales en el mtDNA, y por consiguiente, dilucidar el haplogrupo mitocondrial, es la utilización de la PCR cuantitativa a tiempo real, técnica que permite la detección y cuantificación de una sonda fluorescente cuya señal aumenta de manera directamente proporcional a la cantidad del producto de PCR durante la reacción.

En este contexto, es habitual recurrir a la tecnología TaqMan<sup>®</sup>, que permite medir la síntesis de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas con dos fluorocromos. Concretamente, presentan un fluoróforo en el extremo 3' y una molécula (denominada *quencher*) en el extremo 5' que bloquea su emisión de fluorescencia. Esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR que se espera obtener, de modo que cuando se lleva a cabo la amplificación (en presencia de la sonda y el par de cebadores específicos), dicha sonda hibrida en el amplicón pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se detecta emisión de fluorescencia. Únicamente cuando la DNA polimerasa se topa con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', provocando así la separación del *quencher*, y por tanto, la emisión de fluorescencia, que se relaciona a su vez con la cantidad de amplicón producido.<sup>40</sup>

En este caso en concreto, las sondas utilizadas son idénticas en secuencia excepto en la posición del polimorfismo de interés, de manera que una sonda tendrá el nucleótido complementario a la base del alelo salvaje, y la otra el complementario a la base del alelo mutante. De esta forma, solo hibrida aquella sonda que porte el nucleótido complementario al alelo presente para el polimorfismo de interés.

Para llevar a cabo el ensayo, se utilizaron placas de 48 pocillos, añadiendo a cada uno de ellos los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración Final	Volumen (μl)/pocillo
TaqMan® Genotyping MasterMix	1X	12,5
Assay Mix (sonda/oligonucleótidos)	1X	0,625
H <sub>2</sub> O estéril	-	10,875

**Tabla 10. Mezcla de reactivos empleada para la reacción de qPCR en la determinación del haplogrupo mitocondrial.**

Se realizaron diluciones previas de las muestras de DNA para situarlas todas en un orden de concentración de 10ng/μl, de manera que en cada pocillo de reacción de la placa, finalmente se adicionaron 1μl de dicha dilución de la muestra y 24μl de la mezcla de reacción, operando por duplicado. En todos los casos se utilizó un control positivo y un control negativo para el polimorfismo del haplogrupo de interés, además de un blanco sin DNA (con agua destilada) para comprobar la ausencia de contaminación en los reactivos. Una vez preparadas las mezclas adecuadas, las reacciones tuvieron lugar en el StepOne™System de Applied Biosystems con las siguientes condiciones:

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Calentamiento	60	30 segundos	1 ciclo
Desnaturalización inicial	95	10 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95	15 segundos	40 ciclos
Elongación	60	1 minuto	
Estabilización	50	30 segundos	1 ciclo

**Tabla 11. Especificaciones del programa térmico seguido en la determinación del haplogrupo mitocondrial mediante qPCR.**

### 3.2.2.6. Cuantificación del número de copias de mtDNA mediante qPCR

El estudio de determinación de niveles de mtDNA se basó en la técnica de sondas TaqMan®, que permite la cuantificación del número de copias de mtDNA mediante la cuantificación relativa de un gen mitocondrial (12S) presente en una región conservada, al que se le une una sonda fluorescente FAM, frente a un gen nuclear (RNAsa P), presente en monocopia en el genoma haploide, que se utiliza para normalizar y al que se le une una sonda fluorescente VIC.

Se realizó una curva patrón de concentración conocida, con diluciones seriadas, para interpolar los resultados derivados del ensayo. La solución inicial, obtenida por previa dilución 1:200 en Tris-HCl 10mM pH 8,5 a partir de una solución madre con una mezcla de plásmidos portadores de ambos genes, contenía  $9 \times 10^6$  copias del gen mitocondrial y  $9 \times 10^4$  copias del gen nuclear. A partir de ella, se realizaron las siguientes diluciones seriadas: 1/3, 1/9, 1/27 y 1/81, en tampón Tris-HCl 10mM pH 8,5. La cantidad de DNA para la reacción fue de 10-25ng. El volumen final de reacción fue de 20μl y se añadieron los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (μl)/pocillo
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2X	10
Sonda (MT) 12S-FAM	10X	0,5
Sonda (N) RNAsa P-VIC	20X	1
Cebador Mt-L	5μM	0,5
Cebador Mt-H	5μM	0,5
H <sub>2</sub> O estéril	-	2,5

**Tabla 12. Reactivos necesarios para la cuantificación del número de copias de mtDNA mediante qPCR.**

A continuación se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos y de la sonda mitocondrial empleadas, así como las condiciones de la misma:

Sonda/Cebadores	Secuencia 5'→3'	Temperatura (°C)
Sonda (MT) 12S-FAM	FAM - TGCCAGCCACCGCG	69,3
Cebador Mt-L	CCACGGGAAACAGCATGTATT	58,4
Cebador Mt-H	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2

**Tabla 13. Primers empleados para la determinación del número de copias de mtDNA mediante real time PCR.** Incluyendo sus secuencias específicas y temperaturas óptimas de hibridación.

Se realizaron diluciones previas de las muestras de DNA para situarlas todas en un orden de concentración similar (2-5ng/μl), de manera que en cada pocillo de reacción de la placa de 48 o 96 pocillos utilizada, se adicionaron 5μl de dicha dilución de la muestra, del punto de la recta patrón o del blanco (agua destilada) en cuestión, y 15μl de la mezcla de reacción, operando en cualquier caso por duplicado. Las reacciones de real time PCR tuvieron lugar en el termociclador StepOne™ System de Applied Biosystems con las siguientes condiciones:

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Calentamiento	50	2 minutos	1 ciclo
Desnaturalización inicial	95	10 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95	15 segundos	40 ciclos
Elongación	60	1 minuto	
Estabilización	50	30 segundos	1 ciclo

**Tabla 14. Especificaciones del programa térmico empleado en la determinación del número de copias de mtDNA mediante qPCR.**

Una vez finalizado el ensayo, los resultados derivados se analizaron mediante el programa StepOne Software v2.3., para visualizar las curvas de amplificación, la ausencia de la misma en los pocillos del blanco, la veracidad de los duplicados y la tendencia lineal de la curva patrón. Dicho programa es capaz de calcular, mediante interpolación de los valores de Ct en la recta patrón, el número de copias del gen mitocondrial y nuclear presentes en cada una de las muestras estudiadas, resultados que se expresan e interpretan finalmente tras la aplicación de la siguiente fórmula:

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

### 3.2.3. Técnicas de manipulación de proteínas

#### 3.2.3.1. Extracción y fraccionamiento de los lisados celulares totales

El material de partida para la extracción de proteínas fue pellet celular obtenido tras tripsinización y centrifugación de las distintas líneas de interés. Dicho pellet se lavó con 1ml de PBS y fue transferido al interior de un tubo eppendorf, que se centrifugó a una velocidad de 8000xgs durante 5 minutos. Una vez lavado, se desechó el sobrenadante y se mantuvo el pellet celular, sobre el que se añadió entre 50-300μl de tampón de lisis RIPA conteniendo inhibidores de proteasas a una concentración final 1:10. El tampón de lisis utilizado fue: 50mM Tris-HCl pH 7,4, 50mM NaCl, 0,5% desoxicolato de sodio (NaDOC), 5mM EDTA, 1% de Tritón X100.

Los eppendorfs se incubaron durante 15 minutos a 4°C en una rueda giratoria para permitir que el detergente adicionado a las distintas muestras rompiera las membranas celulares. Seguidamente, el homogenado se centrifugó a 13000rpm a 4°C durante 15 minutos, consiguiendo así la precipitación de los restos celulares y la recuperación del sobrenadante que contiene las proteínas. Dicho sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf que quedó finalmente almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

### ***3.2.3.2. Cuantificación de proteínas totales por espectrofotometría (Método de Bradford)***

El método de Bradford resultó de gran utilidad para el cálculo de los volúmenes de muestra necesarios en las técnicas basadas en detección de proteínas (Western-Blot) que posteriormente se utilizaron, al permitir determinar la cantidad de proteínas totales presentes en un homogenado celular. Dicho procedimiento se basa en la medida de la cantidad de proteínas totales por medio de una reacción colorimétrica. Se realizó, para ello, una recta de calibrado con albúmina sérica bovina (BSA), partiendo de un stock de 1mg/ml a partir del que se prepararon, en agua destilada, una serie de diluciones de concentración conocida, que se muestran en la siguiente tabla:

<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>Agua (µl)</b>	<b>BSA (µl)</b>
Blanco	200	-
0,05	190	10
0,1	180	20
0,2	160	40
0,3	140	60
0,4	120	80
0,5	100	100

**Tabla 15. Tabla con las cantidades para preparar las diluciones de la recta de calibrado en la determinación de proteínas totales por el método de Bradford.**

El reactivo de Bradford se diluyó en una proporción 1:5 en agua destilada, y se conservó tapado de la luz. Se utilizaron placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 595nm en el lector de placas NOVOstar de BMG-Labtech. En cada pocillo de la placa, se añadieron 10µl de muestra (previamente diluida) o patrón de la recta y 200µl de reactivo de Bradford, cada uno de ellos por triplicado.

Con los valores de absorbancia de las diluciones de BSA se construyó una recta de calibrado y se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras. La dilución se tuvo en cuenta para calcular la concentración de proteínas presente en las mismas.

### ***3.2.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS***

La separación electroforética de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida, que permiten la separación de las mismas en función de su peso molecular. Dichos geles se caracterizan por presentar dos fases diferenciales en composición y función. La fase superior o de concentración, contiene un 5% (p/v) de poliacrilamida, y su objetivo es asegurar que todas las proteínas cargadas en el pocillo queden acumuladas en un frente de migración. Por otro lado, la fase inferior o de resolución, contiene un 10% (p/v) de acrilamida-bisacrilamida, que permite la separación de las proteínas contenidas. En este caso, se emplearon geles comerciales al 10% Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels de la marca Bio-Rad.

Una vez finalizado el montaje del gel en la cubeta de electroforesis, se lavaron bien los pocillos con tampón de electroforesis y se prepararon las muestras para cargar. Las muestras preparadas y cuantificadas, de manera que se añadieron entre 20-40µg de proteínas totales, se mezclaron con tampón de carga, llevándose a un volumen final de 10µl. Dichas muestras se mantuvieron siempre en hielo durante su manipulación para evitar la acción de posibles proteasas presentes.

Una vez cargado el gel, la electroforesis se realizó con el tampón de electroforesis 1X a una potencia constante de 50V hasta que las muestras salieron de los pocillos, y a 100-150V el resto del tiempo, hasta que el frente alcanzó la parte inferior del gel.

La composición del tampón de electroforesis (10X) utilizado presentó los siguientes reactivos: Tris-HCl 25mM, glicina 192mM y SDS 0,1% pH 8,3. El tampón de carga utilizado presentó una concentración de 4X y la siguiente composición: Tris-HCl 0,16M pH 6,8, EDTA 20mM, SDS 8%, glicerol 20% (v/v), beta-mercaptoetanol 4% (v/v) y azul de bromofenol 0,4% (p/v). El marcador de pesos moleculares empleado fue *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* de la casa comercial Bio-Rad.

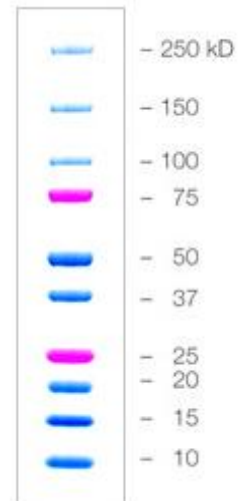


Figura 7. Patrón de bandas del marcador de peso molecular. Casa comercial Bio-Rad.

#### 3.2.3.4. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Para la transferencia de proteínas a membranas PVDF se utilizó el sistema Trans-Blot®Turbo™ siguiendo las instrucciones del equipo, utilizando el programa Mixed MW, que permite transferir proteínas con peso molecular comprendido entre 5-150KDa, requiriendo para ello un intervalo de tiempo de aproximadamente 10 minutos.

#### 3.2.3.5. Inmunodetección de proteínas mediante Western-Blot

##### 3.2.3.5.1. Incubación con los anticuerpos primario y secundario

La membrana resultante se bloqueó con PBS al 5% (p/v) de leche desnatada en polvo, condiciones en que se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Tanto para la detección de proteínas a través del sistema de imagen Odyssey como para el revelado por peroxidasa, el bloqueo se realizó con PBS al 5% (p/v) en leche desnatada sin Tween.

Después se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tween (PBS-T) para eliminar los restos de la solución de bloqueo. El anticuerpo primario se incubó en PBS-T al 1% (p/v) de leche desnatada en polvo durante toda la noche, en agitación, a una temperatura de 4°C.

Transcurrido dicho tiempo, se realizaron nuevamente tres lavados de 5 minutos con PBS-T para arrastrar posibles restos de anticuerpo primario, y posteriormente, se incubó la membrana durante 1h a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario en PBS-T al 0,1% (p/v) de leche desnatada en polvo. Seguidamente, se realizaron otros tres lavados de 5 minutos con PBS-T para eliminar las trazas de anticuerpo secundario y se procedió a la detección. En el caso del revelado de la membrana por el sistema de imagen Odyssey, el último lavado se realizó en PBS sin Tween.

Las concentraciones adecuadas de anticuerpo primario y secundario se muestran en la **Tabla nº 3**.

### 3.2.3.5.2. Detección de proteínas

En el caso de la detección de proteínas por peroxidasa, la membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente del kit SuperSignal® West Pico IgG Detection Kit y la luminiscencia de dicha reacción se detectó mediante una placa autorradiográfica y su posterior revelado. El tiempo de revelado dependió de la cantidad de muestra aplicada y de la sensibilidad del anticuerpo utilizado. Tras el revelado, las películas radiográficas se secaron al aire y digitalizaron para su posterior cuantificación mediante el programa ImageJ versión 2.0.

Por otro lado, en el caso del sistema de imágenes Odyssey® que utiliza dos canales fluorescentes infrarrojos (700 y 800nm) para la detección y análisis simultáneo de proteínas, las membranas fueron escaneadas y procesadas según los requerimientos del equipo. Una vez obtenidas, las imágenes de las bandas fueron cuantificadas con el programa Image Studio (IS) versión 2.0.

### 3.2.3.5.3. Reutilización de membranas

Cuando se quiso reutilizar una membrana tras la detección, ésta se incubó con solución de *stripping* a 58°C durante 20-30 minutos. Seguidamente, se realizaron dos lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS-T para eliminar los restos de la solución de *stripping*, y se procedió a la siguiente inmunodetección repitiendo los procedimientos anteriormente descritos. La composición de la solución de *stripping* fue la siguiente: 2-mercaptoetanol 100mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5mM pH 6,7.

## 3.2.4. Técnicas de análisis de la función mitocondrial

### 3.2.4.1. Medida de síntesis de ATP mitocondrial

Previamente a la determinación de los niveles de síntesis de ATP mitocondrial, se variaron las condiciones de las células objeto de estudio en cultivo, pasando de un medio habitual con DMEM alta glucosa (25mM) suplementado con un 10% FBS, a incubarse durante unas 48-72 horas preliminares al ensayo con medio DMEM baja glucosa (5mM), también suplementado con un 10% FBS, forzando así a las células a acostumbrarse a un ambiente más similar al existente en el interior del organismo. Transcurrido ese periodo de adaptación, las células se tripsinizaron y se determinó su densidad celular y grado de viabilidad.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se prepararon las diluciones necesarias para sembrar  $1 \times 10^4$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo blanco de la casa comercial NUNC, siendo el volumen total final en cada pocillo de 200µl. Se sembraron un total de 24 pocillos para cada una de las líneas celulares a estudiar, 12 de los cuales se utilizaron para medir el número de células, y los otros 12 restantes, para valorar la síntesis del ATP mitocondrial. Una vez sembrada, la placa se mantuvo en la incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad durante 10-14 horas.

Transcurrido dicho tiempo, se prepararon, en condiciones de esterilidad, y atemperaron los medios y reactivos necesarios para realizar las determinaciones de número de células y ATP mitocondrial. Para medir el número de células se utilizó medio DMEM *free* enriquecido con piruvato a una concentración final de 1mM. A los pocillos de células destinados a tal fin, también se les añadió el reactivo *CellTiter-Blue® Reagent* en la proporción adecuada, considerando que cada pocillo debía contener 100µl de medio y 20µl de reactivo. Dicho reactivo contiene resazurina, un colorante azul que es reducido por las células viables a resorufina, compuesto de color rosa caracterizado por ser

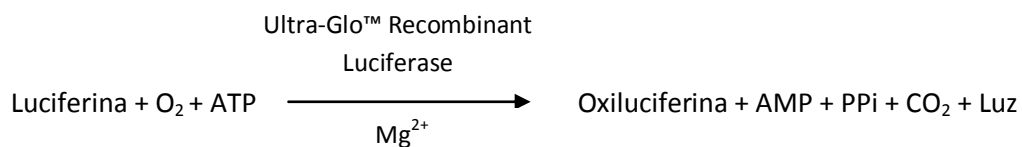


altamente fluorescente ( $\lambda=560_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ ), de manera que la fluorescencia emitida detectada resulta directamente proporcional al número de células viables presentes en el pocillo.

En el caso de la determinación de la síntesis del ATP mitocondrial, se utilizó medio DMEM *free* enriquecido con piruvato y 2-Deoxiglucosa a una concentración final de 1mM y 5mM respectivamente. El objetivo de la adición de este último compuesto era inhibir el proceso de producción de ATP glucolítico, de manera que todo el ATP detectado producido por las células fuera exclusivamente de origen mitocondrial.

Una vez preparados todos los medios necesarios, se realizaron dos lavados de los pocillos con PBS, con fines a eliminar cualquier resto de glucosa presente, y seguidamente, se añadió a cada uno de ellos el medio correspondiente en función de la medida futura que se pretendía realizar, adicionando un volumen de 120 $\mu$ l a los pocillos destinados a medir el número de células, y 100 $\mu$ l a aquellos en que se pretendía medir la síntesis de ATP mitocondrial. La placa resultante se incubó durante 2 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera saturada de humedad y finalmente, trascurrido dicho tiempo, se procedió a determinar el número de células con el lector de placas NOVostar de BMG-Labtech, evaluando la fluorescencia emitida a una longitud de onda de 560 $_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ .

En el caso de la medida de síntesis de ATP mitocondrial, se utilizó el método de ensayo *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> *Luminescent Cell Viability Assay*, basado en la acción de una enzima luciferasa termoestable que cataliza la siguiente reacción:



Para ello, se añadieron 100 $\mu$ l del reactivo *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> *Reagent* (preparado y estabilizado previamente mediante la mezcla de *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> *Buffer* y *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> *Substrate*) a los pocillos destinados a la medida del ATP mitocondrial. El reactivo se incubó durante 10 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera saturada de humedad, y transcurrido dicho tiempo, se midió la luminiscencia emitida con el lector de placas NOVostar de BMG-Labtech.

### 3.2.4.2. Determinaciones enzimáticas

#### 3.2.4.2.1. Preparación de muestras para las determinaciones enzimáticas

El material de partida para llevar a cabo los ensayos enzimáticos fueron pellets obtenidos tras previa tripsinización y centrifugación de las distintas líneas celulares objeto de estudio en cultivo, el cual fue almacenado, hasta su uso, a -80°C.

Dicho pellet, en función de su tamaño, se resuspendió en un volumen adecuado de buffer fosfato potásico 10mM pH 7,4 y el homogenado resultante se sometió a una serie de tres ultracongelaciones en N<sub>2</sub> líquido – descongelaciones a 37°C, proceso tras el cual se determinó la concentración de proteína presente en las muestras, recurriendo para ello al método de Bradford.

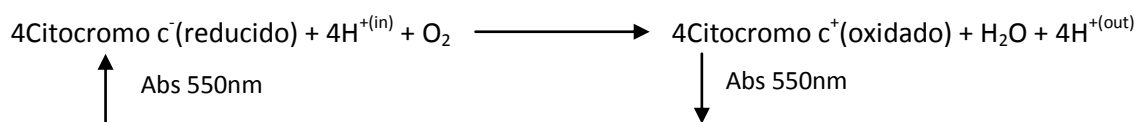
### 3.2.4.2.2. Puesta a punto del kit *Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay* (Biovision)

Para la determinación de la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria se utilizó el Kit *Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay*, de la casa comercial BioVision. Se trata de un ensayo que a pesar de estar optimizado para usarlo con mitocondrias purificadas, también se puede utilizar con homogenados derivados de tejidos y células enteras.

El ensayo está recomendado para un rango de extracto celular del orden de 1-60µg por reacción, diluidas de manera adecuada en el Enzyme Dilution Buffer suministrado en el kit, de manera que únicamente sea necesario añadir un volumen de las mismas del orden de 5-10µl. Para su puesta a punto, se testaron distintas cantidades proteicas con el objetivo de comprobar si se cumplía la linealidad, concretamente: 5, 10, 20 y 60µg, para lo cual fue necesario preparar previas diluciones de las muestras objeto de estudio. Con la finalidad de añadir únicamente 5µl de cada una de las muestras, se adicionó el volumen adecuado de Enzyme Dilution Buffer, consiguiendo concentraciones proteicas del orden de: 1µg/µl, 2µg/µl, 4µg/µl y 12µg/µl respectivamente.

Dichas muestras se añadieron por triplicado en una placa de 96 pocillos. Así mismo, se incorporó un control negativo (blanco con Enzyme Dilution Buffer sin proteína) para verificar la ausencia de contaminación en los reactivos empleados, así como un segundo control negativo con muestras de extracto celular procedentes de células  $\rho^0$ , con el objetivo de constatar la especificidad del kit para determinar exclusivamente la actividad del complejo IV mitocondrial y no de otras posibles oxidasas presentes en las muestras celulares.

Para llevar a cabo la reacción, sobre las distintas muestras se añadió un volumen de 120µl de citocromo c diluido, previamente preparado tras la adición de ditionitrito (DTT, agente reductor) y Cytochrome Oxidase Assay Buffer, siguiendo las instrucciones suministradas por el kit. La mezcla resultante se agitó y se monitorizó en el espectrofotómetro NOVostar de BMG-Labtech con el objetivo de medir el descenso de absorbancia (OD) a una longitud de onda de 550nm durante unos 30-45 minutos con intervalos de 30 segundos, como consecuencia de la siguiente reacción:



Para calcular la actividad del complejo IV (CIV) se obtuvo la pendiente de la absorbancia frente al tiempo, derivándose un valor negativo, puesto que la absorbancia disminuye como resultado de la oxidación del citocromo c. Dicho valor, y por consiguiente el de la velocidad de reacción, se calculó a partir de los datos de inicio de la misma, condiciones en que el descenso de absorbancia se producía de manera lineal, y se expresó en unidades de  $\Delta\text{mOD}/\text{min}$ . Finalmente, la actividad citocromo oxidasa (en unidades/mg) se calculó mediante la aplicación de la siguiente fórmula, siendo  $7,04\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  el coeficiente de extinción molar del citocromo c reducido a una longitud de onda de 550nm en las condiciones de ensayo empleadas y en la placa de 96 pocillos suministrada:

$$\text{Actividad citocromo oxidasa} = \frac{\frac{\Delta\text{mOD}}{\text{tiempo}(\Delta t)}}{\varepsilon(= 7,04\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times [\text{Proteína}](\text{mg})}$$

### 3.2.4.2.3. Determinación de la actividad enzimática del complejo respiratorio IV

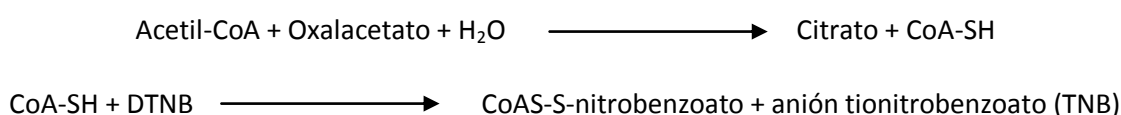
Para la medida de la actividad enzimática del complejo respiratorio IV mediante el kit *Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay*, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el kit y descritas de manera genérica en el apartado anterior de puesta a punto del mismo, se decidió finalmente cargar una cantidad próxima a 10µg de proteína total de cada una de las muestras objeto de estudio en un volumen de 5µl, preparando previamente para ello diluciones adecuadas con Enzyme Dilution Buffer del orden de 2µg/µl. Para reducir la variabilidad intrínseca del ensayo, cada una de las muestras se estudió por octuplicado (x8). Una vez cargadas en la placa de 96 pocillos, se añadió sobre las mismas el citocromo c reducido y se monitorizó la actividad enzimática, detectando el descenso de absorbancia (OD) a una longitud de onda de 550nm durante unos 30-45 minutos con intervalos de 30 segundos en el espectrofotómetro NOVOstar de BMG-Labtech.

Finalmente, para calcular la actividad del complejo IV respiratorio a partir de la señal registrada, se procedió tal y como se describe en el apartado inmediatamente anterior.

### 3.2.4.2.4. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa (CS)

La citrato sintasa (CS) es una enzima codificada por el nDNA que está presente en la matriz mitocondrial de casi todas las células, donde cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs, condensando acetato (proveniente del acetil-CoA) y oxalacetato (OAA) para formar citrato. Debido a dichas particularidades, la CS se utiliza comúnmente como marcador enzimático cuantitativo para la presencia de mitocondrias intactas.

La actividad de dicha enzima se mide, durante unos 2 minutos, como el incremento de absorbancia a 412nm, que se produce debido a la formación de la forma aniónica del ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) tras añadir OAA como iniciador de la reacción, de manera que:



Para ello, se preparó un mix de reacción con los componentes incluidos en la tabla siguiente. Tanto el DTNB como el OAA se prepararon en fresco, mientras que el Acetil-CoA se almacenó alicuotado a una temperatura de -80°C.

Compuesto	Concentración Stock	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón Tris-HCl pH 8.0	1M	15	75mM
DTNB (0,4mg/ml) en Tris-HCl 10mM	1mM	20	0,1mM
Tritón X-100	10%	2	0,10%
Acetil-CoA (7mg/ml)	8mM	2	0,08mM
H <sub>2</sub> O	-	146	-

Tabla 16. Mezcla de reacción para la medida de la actividad citrato sintasa.

Así mismo, también se preparó una disolución de OAA en H<sub>2</sub>O (1,32mg/ml; 10mM) que no se añadió a la mezcla de reacción para evitar que tuviera lugar el comienzo de la misma.

A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadieron 185µl de este mix de reacción y 5µl de cada extracto proteico objeto de estudio previamente obtenido, por triplicado en cada caso. Finalmente se añadieron 10µl de OAA de manera automática con el pipeteador programable del aparato NOVOSTAR de BMG Labtech, particularidad que permite comenzar a medir la actividad enzimática de la CS en el instante inicial en que empieza la reacción en un volumen final total de 200µl. Para ello, se midió la absorbancia a 412nm durante unos 2 minutos a 30°C.

Con los resultados obtenidos, se calculó la actividad específica (A.E) de la CS, en unidades/mg de proteína de manera análoga a la medida de la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria:

$$\text{Actividad Específica de la Citrato Sintasa} = \frac{\frac{\Delta mOD}{\text{tiempo}(\Delta t)}}{\mathcal{E}(= 5,08mM^{-1}cm^{-1}) \times [Proteína](mg)}$$

Siendo  $5,08mM^{-1}cm^{-1}$  el coeficiente de extinción molar de la forma aniónica del DTNB, es decir, del anión tionitrobenzoato (TNB), a una longitud de onda de 412nm en las condiciones de reacción empleadas, considerando tanto el volumen de reacción total, como el tamaño de la placa de 96 pocillos en que tiene lugar el ensayo.

### 3.2.5. Análisis estadístico

Para comprobar si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las líneas híbridas portadoras de la mutación y las líneas híbridas control en los ensayos de medida de síntesis del ATP mitocondrial, tasa de crecimiento celular y actividad del complejo IV, se realizó el test U de Mann Whitney, considerando un valor de  $p < 0,05$  como criterio de significancia.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Revisión diagnóstica de pacientes con posible historial de LHON

A las instalaciones del laboratorio del grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial, desde su constitución, han sido remitidos un total de 598 pacientes con sospecha médica de padecer LHON, tratándose principalmente de casos de ceguera o pérdida de visión sin causa aparente. Tras el análisis de mutaciones primarias por PCR-RFLP, únicamente un conjunto de 84 dolientes presentaban mutaciones puntuales en su genoma previamente relacionadas con casos de enfermedad. Más en detalle, 51 personas resultaban positivas para la mutación m.11778G>A; 25 para m.3460G>A; 6 para m.14484T>C; 1 para m.13513G>A; y 1 para m.13094T>C. Cabe destacar que no es de extrañar un porcentaje tan bajo de pacientes realmente positivos para una determinada enfermedad en un laboratorio diagnóstico, siendo en este caso del 14,26% y hallándose el promedio en torno al 15-20%. Se debe a que muchos de los expedientes de los enfermos son enviados únicamente para descartar la presencia de la dolencia en cuestión o bien con el objetivo de testar una cierta posibilidad ante el desconocimiento del agente desencadenante de los síntomas observados.

Adicionalmente, 31 pacientes más, tras la secuenciación completa de su mtDNA, presentaban mutaciones puntuales, descartadas de tratarse de polimorfismos conocidos asociados a haplogrupos, sino nuevas mutaciones susceptibles de presentar cierto carácter patogénico que resultara en el desarrollo de la enfermedad de LHON. Entre estos historiales clínicos, se encontraba el caso de la paciente número 3346, portadora de una mutación mitocondrial a nivel del tRNA<sup>Thr</sup> que se decidió estudiar con mayor profundidad.

### 4.2. Caso clínico: Paciente 3346

La paciente en estudio se trata de una mujer adulta de 40 años que desde hacía cinco meses previos a su asistencia a la consulta, presentaba pérdida de visión binocular con predominio derecho, cuyo estudio reveló una visión de contar dedos en el ojo derecho, manifestando unas capacidades muy reducidas, y una agudeza visual de 0,3 en el ojo izquierdo. La presencia de dichos síntomas llevó a su catalogación como un caso de neuritis óptica.

Estudios posteriores de resonancia magnética (RM) revelaron la presencia de lesiones desmielinizantes con diseminación espacial pero no temporal, indicios para considerar un diagnóstico de esclerosis múltiple (MS). El análisis de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) evidenció bandas oligoclonales positivas (anticuerpos indicativos de respuesta inmune en el SNC) pero pleocitosis (presencia de células) e hiperproteíorraquia (aumento de proteínas) con anti-NMO (anticuerpos anti neuromielitis óptica) negativos, estudio paraneoplásico negativo y ECA (enzima convertidora de angiotensina) negativo, por lo que el cuadro clínico podría ser compatible con el padecimiento de una enfermedad sistémica con afectación del SNC. Todo ello en conjunto condujo a su estudio como un posible caso emergente de atrofia óptica hereditaria de Leber.

#### 4.2.1. Estudio genético del paciente

Ante la sospecha de un nuevo fenotipo compatible con LHON se realizó un estudio genético a la paciente, quien aportó muestras tanto de orina como de sangre. Primeramente, se procedió con la búsqueda de las tres principales mutaciones puntuales involucradas en el desarrollo de la patología

de LHON, pero ante la ausencia de las mismas, se decidió secuenciar por completo el mtDNA, revelando la presencia de las siguientes mutaciones:

Mutaciones del mtDNA de la paciente 3346				
m.263 A>G	m.315. 1C	m.750 A>G	m.1438 A>G	m.4769 A>G
m.6776 T>C	m.8860 A>G	m.14053 A>G	m.15326 A>G	m.15950 G>A

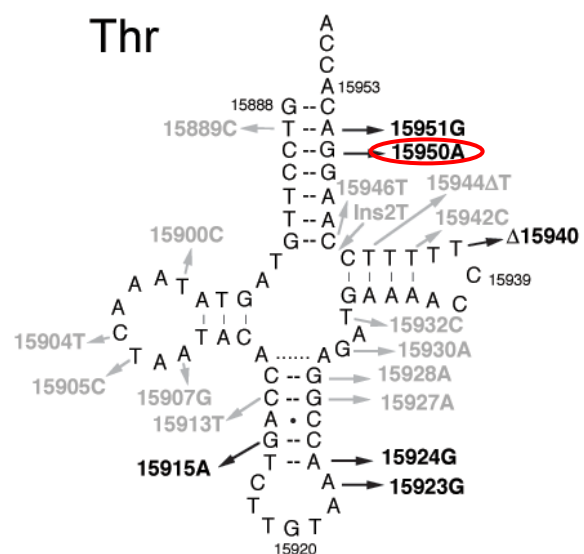
**Tabla 17. Mutaciones puntuales identificadas en el mtDNA de la paciente 3346 tras la secuenciación completa de su genoma.** En color negro, polimorfismos propios del haplogrupo mitocondrial; en gris, mutación puntual previamente reportada; y en naranja, mutación susceptible a ser patológica.

Todas ellas, excepto dos, se corresponden con polimorfismos puntuales, tanto individuales -en el caso de la inserción-, como comunes, asociados al haplogrupo mitocondrial H3. Las excepciones mencionadas se corresponden con la mutación m.14053 A>G, presente únicamente en un total de 219 secuencias completas registradas en GenBank, cuya permutación de base supone un cambio de aminoácido no sinónimo a nivel del gen MT-ND5 que codifica para la subunidad 5 del complejo I de la cadena respiratoria, implicando un cambio de Treonina, con una cadena lateral hidrófila, por Alanina, un aminoácido hidrofóbico. No obstante, ya ha sido descrita anteriormente en un espectro de pacientes con distintos haplogrupos, para algunos de los cuales sí está reportada como un polimorfismo a pesar de que en ocasiones ha sido hallada en el contexto de células asociadas con cáncer de próstata; y la mutación m.15950 A>G, también presente en homoplasmia y con afectación a nivel del tRNA<sup>Thr</sup>, sobre la que se centra este estudio.<sup>41</sup>

A pesar de la gran variedad de mutaciones en genes mitocondriales codificantes de tRNAs descritas en desórdenes neurológicos, la mutación en estudio únicamente ha sido descrita previamente en un caso asociado a Parkinson, mostrando relevancia funcional al contribuir a la muerte de células nerviosas dopaminérgicas en los pacientes afectados.

Molecularmente, dicha alteración afecta a la posición número 70 del brazo aceptor del aminoacil tRNA<sup>Thr</sup>, región implicada en el reconocimiento de la treonil-tRNA sintetasa, desconociéndose su posible afeción al

procesamiento o plegamiento de los transcritos de RNA derivados del gen mutado, con posibles implicaciones negativas agravadas por el hecho de que las mitocondrias únicamente poseen un conjunto no redundante de tRNAs, damnificando así la síntesis proteica mitocondrial y por consiguiente, la actividad enzimática del subgrupo proteico de la cadena respiratoria codificado por el mtDNA.<sup>42,43</sup>



**Figura 8. Estructura del tRNA<sup>Thr</sup>.** En color gris se indican las mutaciones asociadas a polimorfismos; en color negro, mutaciones asociadas a patologías previamente descritas; y señalada en rojo, la mutación abordada en este estudio.

tRNA <sup>Thr</sup>	
Mutación	Patología asociada
m.15915 G>A	MM
m.15923 A>G	LIMM
m.15924 A>G	LIMM
m.15940 ΔT	MM
m.15950 G>A	ADPD
m.15951 A>G	LHON

**Tabla 18. Mutaciones descritas del tRNA<sup>Thr</sup> asociadas a patologías.** Siendo MM=Miopatía Mitocondrial, LIMM=Miopatía Mitocondrial Infantil Letal; ADPD=Enfermedad de Alzheimer y Parkinson; y LHON=Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber.

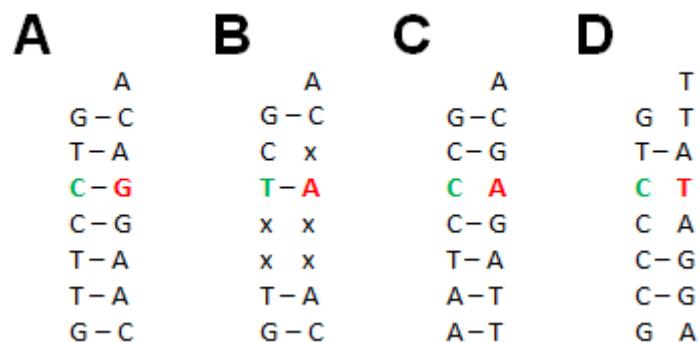
#### 4.2.2. Determinación de la patogenicidad de la mutación m.15950G>A

Para determinar si dicha mutación m.15950G>A era patogénica, se atendieron a los criterios de patogenicidad para el análisis de las mutaciones puntuales encontradas en el mtDNA, teniendo en consideración que no todas las mutaciones patológicas cumplen todos los requisitos<sup>1</sup>:

1. La mutación ha de estar presente en los pacientes y ausente en controles.
2. La mutación debe ser independiente del haplogrupo existente, es decir, se ha de poder identificar en individuos pertenecientes a familias de poblaciones étnicas distintas.
3. La mutación ha de ser la mejor variante del mtDNA candidata a ser patológica.
4. Si procede, el grado de heteroplasmia de la mutación debe correlacionar con la severidad manifiesta de la enfermedad.
5. La mutación ha de conllevar un cambio en la secuencia a nivel de un nucleótido muy conservado evolutivamente, o bien, suponer un cambio de aminoácido que en consecuencia, altere de algún modo la función de la proteína constituyente.
6. La mutación debe afectar a dominios funcionalmente importantes, ya sea a nivel de proteínas, rRNA o tRNA.
7. El fenotipo patológico debe segregar con la mutación, luego la transferencia de dicho mtDNA mutado a otra línea celular ha de ir acompañada de la transferencia del defecto molecular.

En lo que respectaba a la paciente 3346, todos los criterios se cumplían. La mutación únicamente ha sido descrita con anterioridad en una ocasión frente a un total de 47.412 secuencias de mtDNA humano con un tamaño superior a 15.500pb registradas en GenBank, incluyendo controles de origen africano, asiático y europeo. A diferencia del caso actual, su única asignación previa se relaciona con un paciente de Parkinson con haplogrupo mitocondrial F2c.<sup>44</sup> El análisis de las mutaciones derivadas tras la secuenciación completa del mtDNA de la paciente, señaló dicha mutación puntual como la única no relacionada con anterioridad con un polimorfismo, y por consiguiente, con la mayor probabilidad de ser la responsable de la patogenicidad registrada. Atendiendo al grado de conservación de la posición de la base nitrogenada afectada por la mutación en la secuencia del tRNA<sup>Thr</sup> en un total de 135 especies de mamíferos, es del 96,30%.<sup>39</sup> Sin embargo, como previamente habían documentado Kern et al. en 2004, en aquellos animales en que no se conserva la base en estudio, pueden existir cambios compensatorios.<sup>45</sup> En vistas a esta posibilidad, se decidió estudiar también la base complementaria en el tallo del tRNA<sup>Thr</sup>.

Como resultado, se identificaron seis tipos de tallos aceptores presentes en estos animales, representados genéricamente en la figura 9. El panel A representaría, entre otras, a la especie humana, donde el par de bases es C-G; el panel B representa a tres animales, donde el par de bases es T-A (el cambio G→A se compensa con un cambio C→T); el panel C y D representan un animal cada uno de ellos, donde el par de bases es C-A y C-T respectivamente. En estos últimos no se produce par de bases de Watson-Crick, sin embargo, en el caso del panel C, las posiciones inmediatas sí están muy estabilizadas con pares de bases G-C. No obstante, ello no sucede en el caso del panel D, donde a pesar de la conversión de un par de apareamientos T-A por G-C y un par G-T, permitido en las moléculas de tRNA por las reglas del balanceo o *wobble*, en comparación con la secuencia encontrada en *Homo sapiens*, se registra un elevado grado de desapareamiento de bases que, de manera desconocida, parece ser compensado sin representar una incompatibilidad con la vida de la especie portadora. Bien es cierto que gran parte de la estructura secundaria helicoidal que conforma el RNA es estable incluso en ausencia de un extenso emparejamiento de bases, debido, en cambio, a fuerzas de apilamiento de bases fuertes entre los residuos A, G y C. Por añadidura, de mayor importancia es inclusive la estructura terciaria funcional que adopta dicho tRNA, mediada no únicamente por emparejamientos de bases tradicionales Watson-Crick sino también por interacciones entre otros nucleótidos, que en conjunto, definen su capacidad de intercomunicación con proteínas.<sup>46</sup>



**Figura 9. Representación del tallo aceptor del tRNA<sup>Thr</sup>.** Señalada en color rojo la posición mutada, y en color verde, la posición complementaria a la mutada.

Para conseguir su objetivo de portar aminoácidos para la síntesis proteica, las moléculas de tRNA han de atravesar diferentes etapas de procesamiento y modificación e interactuar con una amplia diversidad de proteínas. Las mutaciones relacionadas con patología podrían afectar a la estructura primaria, secundaria o terciaria de dichos tRNAs. Un mal plegamiento o inestabilidad en su estructura puede resultar en un incremento de degradación de la molécula, y por consiguiente, conducir a unos niveles basales de tRNAs mitocondriales disminuidos.<sup>47</sup>

En este caso, el alto grado de conservación del nucleótido afectado en el mtDNA resalta su importancia funcional en el brazo aceptor del tRNA en cuestión, bien pudiendo ser importante para su procesamiento, para su estabilidad, para su conformación o para su reconocimiento por parte de su correspondiente aminoacil-tRNA sintetasa.

Adicionalmente, MitoTIP, una herramienta *in silico* capaz de predecir el grado de patogenicidad asociado a distintas variantes mitocondriales en secuencias de tRNAs en base a sus frecuencias de aparición, la naturaleza del cambio de nucleótido que suponen y el grado de conservación de la



posición a que afectan, asignaba un valor para la mutación puntual en cuestión de 12,944, que atendiendo a su rango de puntuación asociado, la clasificaba como posiblemente patogénica.<sup>48</sup>

Current Raw Scores (range: -5.9 – 21.8)	Quartile	Quartile Ranking / Score Interpretation
>16.25	>75 - 100%	likely pathogenic
12.66 – 16.25	>50 - 75%	possibly pathogenic
8.44 – 12.66	>25 - 50%	possibly benign
< 8.44	0 - 25%	likely benign

**Tabla 19. Sistema de puntuación de MitoTIP.** Rango posible de valores, percentil asociado y grado de patogenicidad predicho.

En vista a esas predicciones y a la cumplimentación de todos los criterios de patogenicidad previamente descritos, se consideró relevante continuar con el estudio de la mutación en cuestión, para lo cual se decidió construir un cíbrido transmitocondrial portador de la misma, con el objetivo de estudiar alteraciones en la función mitocondrial consecuencias del cambio puntual m.15950 G>A para dilucidar si realmente dicha variación puede estar implicada en la patología.

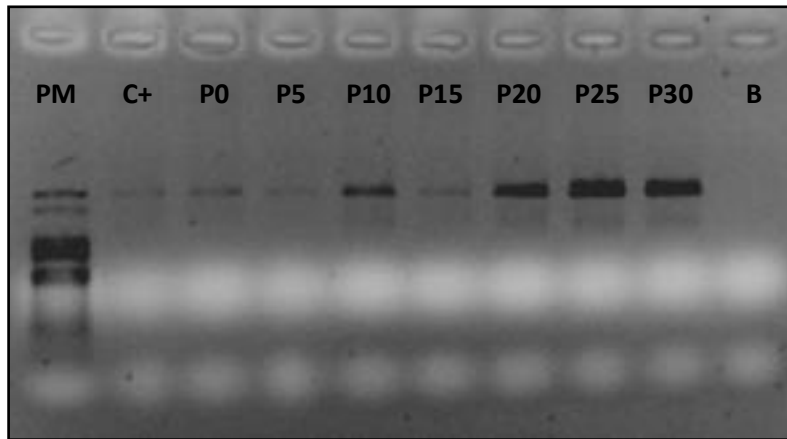
### 4.3. Caracterización de los cíbridos transmitocondriales construidos

#### 4.3.1. Comprobación de la incorporación de la mutación m.15950G>A

Para determinar la patogenicidad, y en su caso, la gravedad ésta, se tomó la decisión de construir un modelo celular para su estudio, concretamente un cíbrido transmitocondrial con fondo genético nuclear de la línea celular  $\rho^0$  143B, de osteosarcoma humano, y mtDNA procedente de las plaquetas sanguíneas de la paciente 3346, portadoras de la mutación citada en cuestión.

Una vez finalizado el proceso de construcción y selección de los cíbridos, se comprobó si el mtDNA portador de la mutación, procedente de las plaquetas de la paciente, se había transferido con éxito a la línea celular  $\rho^0$  143B. Con dicho objetivo, se extrajo DNA de los cíbridos construidos a partir de un extracto de cultivo celular (referido en posteriores figuras y tablas como CIB 3346-143B) y se realizó una PCR-RFLP con el fin de comprobar el patrón de bandas obtenido tras digestión en presencia de la enzima de restricción *Eco*130I.

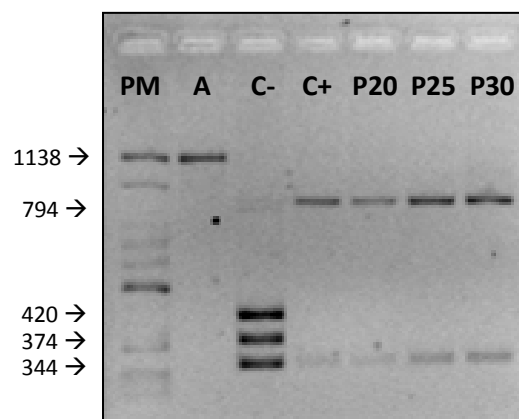
Para ello, en primer lugar se amplificó una región del mtDNA de 1138pb que incorporaba la zona en que debía encontrarse la mutación m.15950G>A y seguidamente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la existencia de amplificado, y con ello, la presencia de mtDNA en los extractos de los cíbridos transmitocondriales construidos.



**Figura 10. Amplificado de PCR en gel de agarosa 1%.** Siendo PM el marcador de peso molecular (1Kb), C+ un control positivo (muestra procedente del propio paciente), P0-P30 muestra extraída a partir del CIB 3346-143B en los sucesivos pases realizados durante su cultivo; y B el blanco (muestra con todos componentes de reacción excepto DNA).

El resultado obtenido, aunque con distinta intensidad en función del éxito de la PCR en cada una de las reacciones, reveló que la técnica de construcción de cíbridos había resultado exitosa, pues en todas las muestras extraídas en los sucesivos pases del cultivo se observaba banda amplificada, poniendo de manifiesto la presencia de mtDNA en el extracto celular, el cual está ausente en las células  $\rho^0$  de partida.

Una vez comprobada la existencia de material genético mitocondrial en las células, se procedió con la digestión del DNA extraído, empleando para ello la enzima de restricción *Eco130I*, que reconoce el alelo normal de la región de mtDNA amplificada, escindiéndola en tres fragmentos de 420, 374 y 344pb respectivamente, y en cambio, pierde uno de sus sitios de corte en el caso del alelo mutante en cuestión, dando lugar únicamente a dos fragmentos de 794 y 344pb. Por tanto, el resultado de esta digestión, por análisis posterior en electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, permitió confirmar que la mutación de la paciente 3346 se había transferido con eficacia al cíbrido transmitocondrial construido en estado homoplásmico.

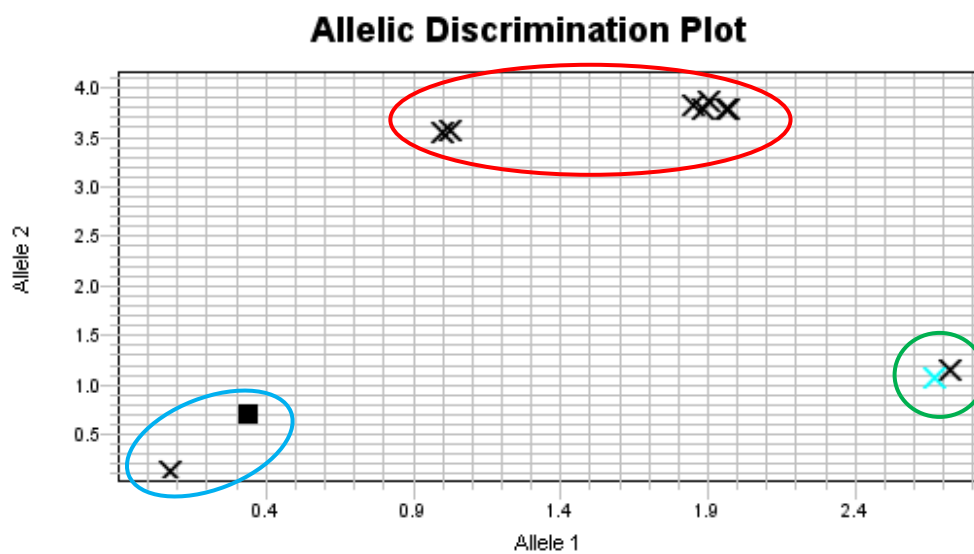


**Figura 11. Resultado de digestión con *Eco130I* en gel de agarosa 2,5%.** Siendo PM el marcador de peso molecular (1Kb), A amplificado procedente de la PCR sin digerir, C- un control negativo (muestra procedente de un paciente que carece de la mutación objeto de estudio), C+ un control positivo (muestra procedente del propio paciente) y P20-P30 muestra extraída a partir del CIB 3346-143B en sus respectivos pases.

### 4.3.2. Comprobación del haplogrupo mitocondrial

A modo de comprobación adicional de la correcta construcción de los cíbridos transmitocondriales, se decidió emplear técnicas de *real time* PCR para analizar si el mtDNA incorporado por las células se caracterizaba por corresponder al mismo haplogrupo mitocondrial que el propio material genético de la paciente. Para ello, se incluyeron en el ensayo controles negativos; controles positivos, cuya señal se utilizaría a modo de guía para determinar las características de la muestra objeto de estudio; y sondas adecuadas para los haplogrupos mitocondriales H, JT y UK.

Como resultado se obtuvo que la muestra de DNA correspondiente al cíbrido construido emitía una señal en una localización análoga a aquella generada por el control positivo para el haplogrupo H en presencia de la correspondiente sonda. Por tanto, ello ponía de manifiesto que el mtDNA incorporado por los cíbridos era efectivamente de tipo H.



**Gráfica 1. Señales resultantes del ensayo de *real time* PCR para la determinación del haplogrupo mitocondrial.** En color azul, la zona correspondiente al blanco; en color rojo, la zona correspondiente al control negativo; y en verde, la zona correspondiente al control positivo. Imagen derivada del programa StepOne™ Software v2.3.

En la gráfica resultante se pueden distinguir tres zonas con distinta ubicación. La región señalada en azul se corresponde con la señal emitida por el blanco (▪, muestra con todos reactivos de reacción excepto DNA). En dicha región también aparece una señal adicional que pertenece a una muestra en que, por error de pipeteo, no se ha cargado DNA, o bien no se ha cargado en cantidad suficiente como para emitir una señal significativa tras el proceso de amplificación. La región señalada en rojo se corresponde con la zona del control negativo, pues allí aparecen las señales de las muestras y controles que no pertenecen al haplogrupo H. Por último, la región señalada en verde atendería a la designada como zona del control positivo. En ella aparece tanto la señal correspondiente al control positivo para la sonda del haplogrupo H (cruz de color negro), como la señal emitida por la muestra con DNA perteneciente al cíbrido construido (cruz de color azul). Por consiguiente, en base a su ubicación relativa, es posible confirmar que se trata de células portadoras de mtDNA de haplogrupo H.

### 4.3.3. Análisis de los niveles de mtDNA

Para verificar que los cíbridos habían recuperado los niveles de mtDNA tras el proceso de selección y expansión, alcanzando una cantidad de genoma mitocondrial basal apropiada, se procedió a cuantificar el número de copias de mtDNA en dichos cíbridos mutantes, nuevamente, por medio de un ensayo de *real time* PCR cuantitativo, mediante interpolación en una recta estándar patrón de cantidades conocidas tanto de genoma mitocondrial como de genoma nuclear. Con las señales obtenidas, se calculó la relación entre el número de copias de mtDNA y el número de copias de genoma nuclear, resultados que se representan en la siguiente tabla:

Estado y línea celular	Número de copias de mtDNA/célula
Pase 0, CIB 3346-143B	45
Pase 5, CIB 3346-143B	37
Pase 10, CIB 3346-143B	405
Pase 15, CIB 3346-143B	724
Pase 20, CIB 3346-143B	295
Pase 25, CIB 3346-143B	319
Pase 30, CIB 3346-143B	733

**Tabla 20. Número de copias de mtDNA por célula en el CIB 3346-143B.** Variación de la cantidad del número de copias de mtDNA/genoma nuclear a lo largo de los sucesivos pases durante el cultivo de los cíbridos construidos.

En términos generales, se registró un incremento en el número de copias de mtDNA con los sucesivos pases que se realizaron durante el cultivo de los cíbridos transmitocondriales construidos, alcanzando finalmente unos niveles cercanos a 700 copias, dato que verificaría una correcta recuperación del cíbrido, pues atendiendo a experiencias previas del laboratorio, se considera que las líneas cíbridas con fondo nuclear procedente de células de osteosarcoma 143B han recuperado los niveles de material genético mitocondrial, alcanzando la estabilidad, cuando su número de copias de mtDNA es del orden de la sexta o séptima centena.

Los valores iniciales registrados, del orden de las decenas, durante los primeros pases, coincidirían con los tiempos iniciales de expansión de cultivo tras el proceso de fusión y selección de los cíbridos, de ahí que el grado de replicación mitocondrial todavía fuera ínfimo. El incremento significativo observado entre los pases 5 y 10 parece simular el fenómeno de cuello de botella que se produce de manera natural durante el desarrollo embrionario, registrándose una dramática reducción en los niveles de mtDNA durante las etapas iniciales, constituyendo así un mecanismo de eliminación de posibles mutaciones deletéreas, y produciéndose posteriormente un notorio aumento de la masa mitocondrial debido a una rápida segregación del mtDNA seleccionado.<sup>49</sup> Sin embargo, los llamativos valores calculados para el número de copias en los pases 20 y 25, únicamente se verían justificados por la inmensidad de factores condicionantes del ensayo, pues por un lado, el grado de biogénesis mitocondrial es susceptible de variar en función de las condiciones de cultivo celular, y por otro, la eficacia de la técnica empleada es dependiente del estado de conservación del DNA.

A nivel del estado de cultivo celular, podrían detectarse variaciones debido a diferencias en el medio de cultivo, tales como el pH, que tiende a acidificarse con el tiempo; el grado de confluencia celular en el momento de su tripsinización, que puede afectar a la tasa de crecimiento o a la expresión génica celular; y en relación con este último, el acceso y disponibilidad de nutrientes a las células,

pues el crecimiento en medios ricos en glucosa hace que éstas tiendan a optar por la vía glucolítica, dejando en un segundo plano metabólico la fosforilación oxidativa mediada a través de la cadena respiratoria. Así mismo, a nivel del método de análisis, un factor fundamental es el estado y grado de conservación del material genético objeto de estudio, tanto del genoma nuclear (más protegido por su asociación a histonas), como del genoma mitocondrial (más expuesto y susceptible a sufrir degradación), parámetros que pueden afectarse durante su extracción y/o almacenamiento (proceso de congelación).

Independientemente de dichas variaciones, el registro de valores en torno a 700 copias de mtDNA por célula de manera repetida, llevó a la conclusión de que los niveles de material genético mitocondrial se había recuperado con éxito en el híbrido, por lo que una vez caracterizado el mismo, se decidió realizar con él ensayos comparativos que permitieran identificar diferencias funcionales como consecuencia de la mutación m.15950G>A portada. En dichos experimentos, para el estudio comparativo, se decidió utilizar a modo de control un híbrido transmitocondrial construido a partir de plaquetas de una persona voluntaria sana de haplogrupo análogo, sobre el mismo fondo genético nuclear de la línea celular de osteosarcoma 143B (referido en adelante como CIB AIH3-143B). Ese híbrido en cuestión ya había sido previamente construido y caracterizado por miembros del grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial, y por consiguiente, parte de su mtDNA había sido secuenciado:

Mutaciones del mtDNA del CIB AIH3-143B			
m.263 A>G	m.309.1C	m.315.1C	m.16192 C>T

**Tabla 21. Mutaciones presentes en el mtDNA del híbrido AIH3-143B.** Polimorfismos registrados tras la secuenciación de la región control y la región hipervariable del genoma mitocondrial del híbrido transmitocondrial control.

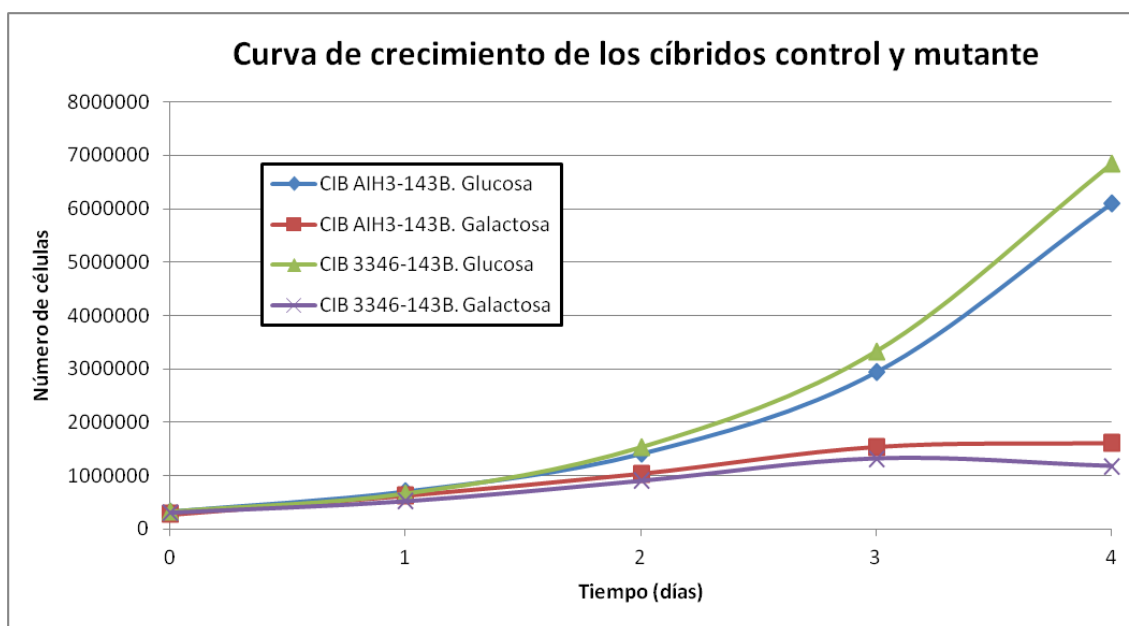
Todos los cambios de bases detectados se corresponden con polimorfismos que han sido previamente asociados con el haplogrupo mitocondrial H3, incluso algunos de ellos (la mutación puntual en la posición 263 y la inserción en la posición 315) también habían sido identificados en la secuenciación completa del genoma mitocondrial de la propia paciente objeto de estudio. Por consiguiente, ello pondría de manifiesto la adecuación de su uso como control en los estudios comparativos realizados.

#### 4.4. Análisis comparativo del ciclo celular y de la tasa de síntesis proteica mitocondrial del híbrido transmitocondrial portador de la mutación m.15950G>A frente al híbrido control

##### 4.4.1. Estudio de la tasa de crecimiento celular

La posición particular de la mutación objeto de estudio, a nivel del tRNA<sup>Thr</sup> codificado por el mtDNA, suscitó interés acerca del estudio del ciclo celular de los híbridos obtenidos en diferentes condiciones. Un crecimiento diferencial ya fue observado por Hofhaus et al. en el año 1996 al trabajar con híbridos de LHON cuando eran incubados en medios que contenían galactosa o glucosa.<sup>50</sup> Se trata de una manera conocida de inducir estrés metabólico. En condiciones de presencia de glucosa, la mayor parte del rendimiento total de ATP celular proviene de la vía glucolítica, mientras que sólo una ínfima proporción de glucosa es oxidada a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En cambio, en condiciones de presencia exclusiva de galactosa y piruvato, las células son forzadas a confiar en la cadena respiratoria mitocondrial para producir ATP y poder sobrevivir.<sup>51</sup>

Con el objetivo de observar diferencias en el crecimiento celular, se realizaron curvas de crecimiento de los cíbridos mutante y control de manera simultánea, en las dos condiciones mencionadas, obteniendo los siguientes resultados:



**Gráfica 2. Curvas de crecimiento de los cíbridos trans mitocondriales.** En azul y verde, condiciones de baja glucosa para los cíbridos control y mutante respectivamente. En rojo y morado, condiciones de ausencia de glucosa y presencia de galactosa para los cíbridos control y mutante respectivamente.

Es posible observar una diferencia de crecimiento significativa cuando las células se cultivan en medio con glucosa o en medio con galactosa, viéndose en este último dificultada su evolución. De manera individual, en el caso del medio con baja glucosa, es posible apreciar una alta tasa de división, siendo incluso ligeramente mayor para los cíbridos mutantes que control. En cambio, en ausencia de glucosa y presencia de galactosa, se observa una notoria disminución en la tasa de crecimiento celular, debido a la necesidad de la puesta en marcha del sistema OXPHOS para la producción energética. Concretamente, en dichas condiciones, a pesar de una primera correcta evolución, aunque más lenta, los cíbridos control parecen acabar estabilizando su crecimiento, mientras que los cíbridos mutantes acaban muriendo debido, probablemente, a un fallo a nivel de la cadena respiratoria consecuencia de la mutación portada.

Para un análisis más cuantitativo, se calculó el tiempo de duplicación (en días) a partir de la ecuación de la línea de tendencia en cada caso, obteniendo los siguientes resultados:

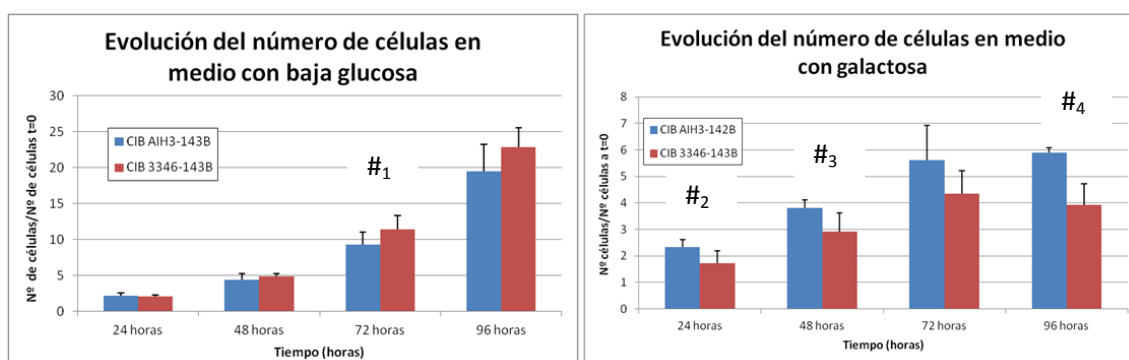
Línea celular	$DT_{Glu}$	$DT_{Gal}$	$DT_{Gal} / DT_{Glu}$
CIB AIH3-143B	0,954	1,568	1,643
CIB 3346-143B	0,895	1,946	2,174

**Tabla 22. Tiempos de duplicación (en días) de los cíbridos trans mitocondriales.** Incluyendo datos en condiciones de baja glucosa, en condiciones de galactosa y la relación entre ambas.

Como era de esperar, el ratio de duplicación en el medio de galactosa frente a glucosa fue superior a la unidad, poniendo de manifiesto que en condiciones de ausencia de glucosa, se requiere una mayor cantidad de tiempo para que se produzca la división celular, debido a la puesta en funcionamiento

del sistema OXPHOS. Así mismo, también se obtuvo un valor superior para dicha relación en el caso del híbrido mutante, manifestando las dificultades de funcionamiento de la cadena respiratoria en el modelo celular portador de la mutación. Bien es cierto que el caso del híbrido control, sin afección a nivel mitocondrial, se observa un comportamiento poco común, pues en lugar de un crecimiento ralentizado pero con tendencia exponencial equiparable al detectado en el medio con glucosa, se evidencia una estabilización en su tasa de división, la cual puede ser debida a mutaciones, de origen no necesariamente mitocondrial, que podrían afectar, por ejemplo, a procesos enzimáticos involucrados en la degradación o transporte del metabolito galactosa. No sería de extrañar, pues se trata de modelos celulares con fondo nuclear procedente de células tumorales, con mayor capacidad de mutar espontáneamente.

Independientemente de esa posibilidad, como se ha visto, sí es posible observar diferencias significativas en cuanto al crecimiento de los híbridos en las condiciones objeto de estudio, detectándose un mayor crecimiento de los híbridos mutantes en medio de baja glucosa en comparación con los híbridos control y viceversa en condiciones de medio con galactosa. Para dicho análisis se relativizó el número de células en los distintos días de estudio por el número inicial presente a tiempo cero:



**Gráfica 3. Estudio comparativo de la tasa de división de los híbridos.** Teniendo en consideración el tiempo de análisis y el número inicial de células en cada uno de los casos. La primera gráfica haría referencia al crecimiento en medio de baja glucosa y la segunda, a condiciones de ausencia de glucosa y presencia de galactosa. En color azul, datos correspondientes al híbrido control; y en rojo, al híbrido mutante. Considerando como criterio de significancia un p-valor<0,05, se observan diferencias significativas, siendo #<sub>1</sub>=0,0295; #<sub>2</sub>=0,0038; #<sub>3</sub>=0,0054 y #<sub>4</sub>=0,0003.

Nuevamente, los resultados obtenidos parecían indicar que la dificultad de crecimiento en galactosa en el caso de los híbridos mutantes se debía a la mutación portada, viéndose afectado, como consecuencia, el funcionamiento del sistema OXPHOS mitocondrial.

#### 4.4.2. Cuantificación de la cantidad de COI mediante Western-Blot

En vistas a que la mutación objeto de estudio afectaba a nivel del tRNA<sup>Thr</sup>, se esperaría que, como consecuencia, se viera afectada toda la síntesis proteica mitocondrial que requiriera la incorporación del aminoácido Treonina a la cadena polipeptídica nascente. Concretamente, el mtDNA codifica para un total de 7 subunidades del C.I, 1 subunidad del C.III, 3 subunidades del C.IV y 2 subunidades del C.V:<sup>1</sup>

Complejo respiratorio	Subunidad	Aminoácidos totales	Cantidad de Treoninas	% relativo de Treoninas
C.I	ND1	318	35	11

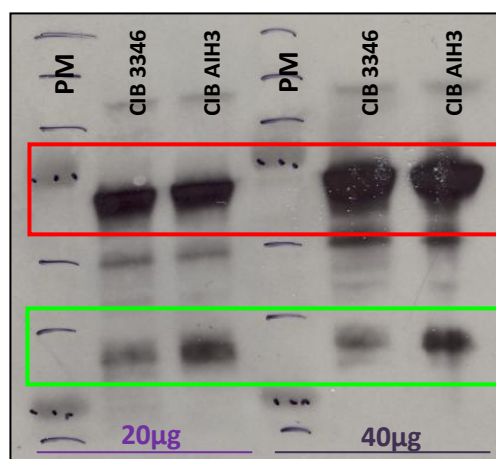
	ND2	347	43	12,4
	ND3	115	7	6,1
	ND4	459	48	10,5
	ND4L	99	5	5,1
	ND5	604	65	10,8
	ND6	175	3	1,7
<b>C.III</b>	CytB	380	30	7,9
<b>C.IV</b>	COI	514	34	6,6
	COII	225	21	9,3
	COIII	261	24	9,2
<b>C.V</b>	ATP6	227	25	11
	ATP8	69	8	11,6

**Tabla 23. Composición de Thr de las distintas subunidades de complejos del sistema OXPHOS codificados por el mtDNA.**

A pesar de no tratarse del mayor representante en cuanto a composición en Thr, para el estudio del efecto de la mutación, se decidió determinar el grado de expresión del complejo IV de la cadena respiratoria mediante Western-Blot, detección cuyas condiciones habían sido previamente optimizadas en el laboratorio.

En concreto, para alcanzar ese objetivo, se utilizó un anticuerpo monoclonal primario dirigido frente a la subunidad I del complejo IV de la cadena respiratoria o citocromo c oxidasa (COI), permitiendo la detección de una proteína caracterizada por un peso molecular próximo a 37kDa en geles desnaturalizantes; así como un anticuerpo monoclonal primario frente a la subunidad A del complejo II de la cadena respiratoria o succinato deshidrogenasa (SDHA), detectando en este caso una proteína de peso molecular cercano a 70kDa, y sirviendo a modo de control de carga para normalizar los resultados obtenidos, puesto que su antígeno diana se trata en realidad de una proteína perteneciente a un complejo que está exclusivamente codificado por el material genético nuclear.

En el ensayo, se testaron dos cantidades de proteínas diferentes tanto del híbrido mutante como del híbrido control, 20 y 40µg. En primer lugar se procedió a su revelado mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa obteniendo los siguientes resultados:



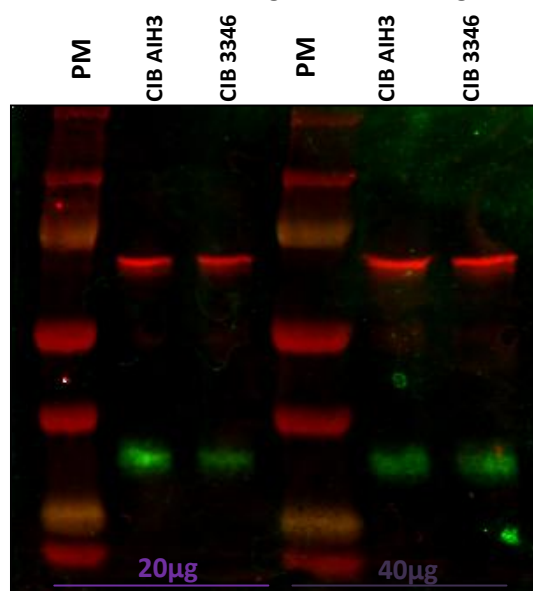
**Figura 12. Inmunodetección proteica mediante Western-Blot.** Detección de SDHA (en rojo) y COI (en verde) Revelado mediante exposición autorradiográfica. En los carriles representados en la figura, de izquierda a derecha: marcador de peso molecular (PM), muestra del CIB 3346-143B (20µg), muestra del CIB AIH3-143B (20µg), marcador PM, CIB 3346-143B (40µg) y CIB AIH3-143B (40µg).

A pesar de los intentos de cuantificación de las bandas mediante el uso del programa ImageJ, no fue posible debido a la subjetividad del método de revelado por la distinta sensibilidad de los anticuerpos empleados, requiriendo tiempos de exposición autorradiográfica diferentes que llevaban al registro de señales sobre intensificadas. A pesar de estos inconvenientes, el resultado obtenido sí permitió observar que la expresión de proteínas dependientes de los sistemas de síntesis



mitocondrial se encontraba disminuida en el caso del híbrido portador de la mutación en comparación con el híbrido control.

Para corroborar dichos resultados y obtener datos cuantitativos precisos que permitieran reflejarlos numéricamente, se optó posteriormente por el revelado proteico mediante el sistema de imágenes Odyssey®, utilizando para ello anticuerpos secundarios acoplados con fluoróforos de distinto color. Los resultados obtenidos mediante esta metodología fueron los siguientes:



**Figura 13. Inmunodetección proteica mediante Western-Blot.** Detección de SDHA (en rojo) y COI (en verde) de la cadena respiratoria. Revelado mediante fluorescencia con el sistema de imágenes Odyssey®. En los carriles representados en la figura, de izquierda a derecha: marcador de peso molecular (PM), muestra del CIB AIH3-143B (20µg), muestra del CIB 3346-143B (20µg), PM, CIB AIH3-143B (40µg) y CIB 3346-143B (40µg).

Al igual que en el caso anterior, es posible identificar una mayor expresión de COI mitocondrial en el caso del híbrido control frente al híbrido portador de la mutación, pero únicamente en las condiciones en que se estudia la señal emitida ante la carga de 20µg de proteínas totales. En el caso de carga de 40µg de proteína no se aprecia cualitativamente ninguna diferencia debido a que se ha alcanzado el grado de saturación proteica permitido por la membrana de transferencia.

Una de las ventajas del uso de fluoróforos y su detección mediante el sistema de imágenes Odyssey® es que el aparato cuenta con un propio software asociado integrado que permite cuantificar las intensidades (I, en RIU) de las señales de las bandas registradas, dando un valor cuantitativo que puede ser utilizado para conocer el grado de expresión proteica relativa. Para ello, en este caso, bastaría con dividir la señal emitida por la banda correspondiente al COI entre la señal arrojada por la banda SDHA (control de carga) para cada uno de los híbridos objeto de estudio. Para simplificar los resultados obtenidos, el cociente de señal obtenido en el caso del híbrido control se ha tomado como valor porcentual de expresión total, y en consideración, se ha calculado la expresión proteica relativa en el caso del híbrido portador de la mutación, obteniéndose los siguientes resultados:

Línea celular	I señal COI	I señal SDHA	$I_{COI} / I_{SDHA}$	I relativa (%)
CIB AIH3-143B	$4,21 \times 10^5$	$1,32 \times 10^6$	$3,19 \times 10^{-1}$	100
CIB 3346-134B	$1,73 \times 10^5$	$1,03 \times 10^6$	$1,68 \times 10^{-1}$	52,7

**Tabla 24. Intensidades cuantificadas por el sistema Odyssey® (en RIU).** Incluyendo el valor de la señal correspondiente a las subunidades COI y SDHA, su cociente, y su valor relativo tomando la señal control como máxima expresión.

Ello reflejaría que como consecuencia de la mutación a nivel del tRNA<sup>Thr</sup>, se ve afectada la tasa de síntesis de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria codificados por el mtDNA, detectándose una reducción próxima al 50% en el caso de la subunidad I del complejo IV en comparación con el grado de expresión registrada para el caso de un híbrido control carente de la mutación en cuestión.

## 4.5. Estudios comparativos de la funcionalidad mitocondrial entre el híbrido transmitocondrial portador de la mutación m.15950G>A y el híbrido control

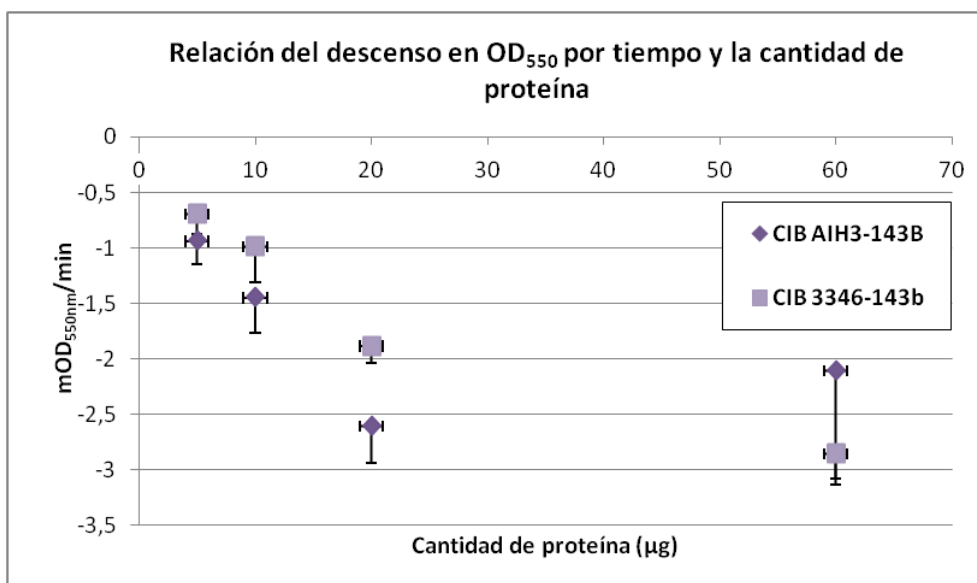
### 4.5.1. Puesta a punto del kit *Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay*

Durante este trabajo se decidió utilizar el kit *Cytochrome Oxidase Activity Colorimetric Assay* de la casa comercial BioVision para la medida de la actividad del complejo IV mitocondrial a partir de los extractos proteicos de los diferentes híbridos transmitocondriales objeto de estudio. No obstante, se trataba de un kit que todavía no había sido empleado en el propio laboratorio, por lo que se decidió realizar una prueba inicial para su puesta a punto.

Para ello, se testó cierto rango de cantidades proteicas (5, 10, 20 y 60µg) para determinar la sensibilidad del kit, así como incluir durante el ensayo un control negativo adicional, consistente en muestras extraídas a partir de la línea celular ρ<sup>0</sup> SH-SY5Y, carentes de mtDNA, con el objetivo de analizar simultáneamente la especificidad del kit, detectando así si únicamente registraba la señal de actividad correspondiente al complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, o por el contrario, también la de otras oxidasas celulares presentes en el extracto proteico.

En este último aspecto, la señal registrada para las muestras que contenían proteína procedente de células ρ<sup>0</sup> resultó ser análoga a la detectada para el blanco de reacción compuesto por Enzyme Dilution Buffer en que se hallaban diluidas las muestras, y cuya incorporación venía indicada en el protocolo del propio kit en cuestión.

En lo que respecta al resto de muestras testadas, se monitorizó el descenso de absorbancia que se producía a una longitud de onda de 550nm como consecuencia del proceso de oxidación del citocromo c ante la presencia del complejo IV. La reacción de oxidación del citocromo c por el complejo IV se trata de una reacción bifásica, con una rápida etapa inicial seguida de una menor actividad, de ahí que la velocidad de reacción haya que calcularse en el rango lineal. Dicha velocidad de reacción de corresponde con la variación en la pendiente (expresada en mOD<sub>550nm</sub>/min), en la cual se registraron diferencias respecto a la cantidad de proteína ensayada, resultados reflejados en la siguiente gráfica:



**Gráfica 4. Relación entre la pendiente de reacción y la cantidad de proteína.** Relación entre la disminución de OD a 550nm por unidad de tiempo y la cantidad de proteína total presente en la muestra. En rombos, caso del cíbrido control AIH3-143B; en cuadrados, caso del cíbrido portador de la mutación 3346-143B. Desviación estándar de los datos calculados en los distintos replicados a modo de barras de error.

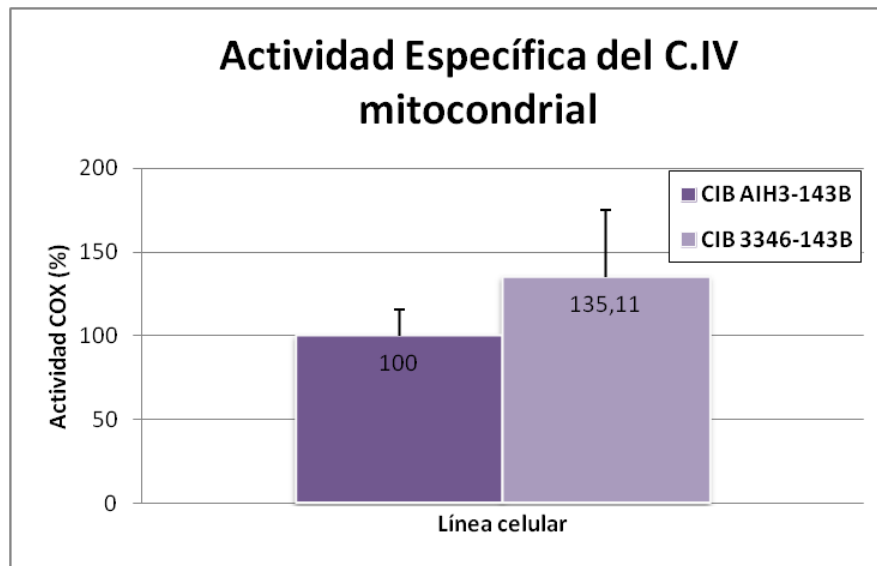
En los resultados obtenidos, se puede observar que las pendientes calculadas toman un valor negativo, lo cual se debe al descenso de absorbancia que se produce con el tiempo durante el transcurso de la reacción como consecuencia de la oxidación del citocromo c. Así mismo, es posible observar que la velocidad de reacción, como cabría esperar, es mayor (toma un valor más negativo) a medida que aumenta la cantidad de proteína objeto de estudio, manteniéndose una relación prácticamente lineal entre ellas a excepción del caso de 60µg de proteína, rango límite superior de cantidad de proteína especificado en el protocolo del kit, en que el proceso sucede de manera tan rápida que es complicado encontrar un rango de reacción lineal equiparable al del resto de condiciones testadas en el ensayo.

En vista a los resultados obtenidos y a las desviaciones estándar de los datos crudos derivados del ensayo, se decidió fijar una cantidad de proteína de trabajo para posteriores determinaciones en torno a 10µg de proteína, debido a que además de encontrarse en el rango lineal, en ambas líneas celulares objeto de estudio, la variabilidad registrada entre las distintas medidas era equiparable. Así mismo, con el objetivo de disminuir dichas variaciones, se decidió incrementar significativamente el número de replicados.

#### 4.5.2. Análisis de la actividad del C.IV mitocondrial

El análisis de la actividad del complejo IV mitocondrial de la cadena respiratoria es una de las metodologías comúnmente utilizada para el estudio de la funcionalidad del sistema OXPHOS, principalmente debido a la posición que ocupa a lo largo de la cadena de transporte electrónico, pues constituye el último complejo, encargado de catalizar la reacción de oxidación del citocromo c con la subsiguiente reducción de oxígeno molecular para dar agua. Por ello, el grado de funcionamiento del complejo IV se utiliza como un indicador de la eficiencia de la respiración mitocondrial celular.

En este caso particular, los resultados arrojados por el ensayo de medida de actividad fueron los siguientes:



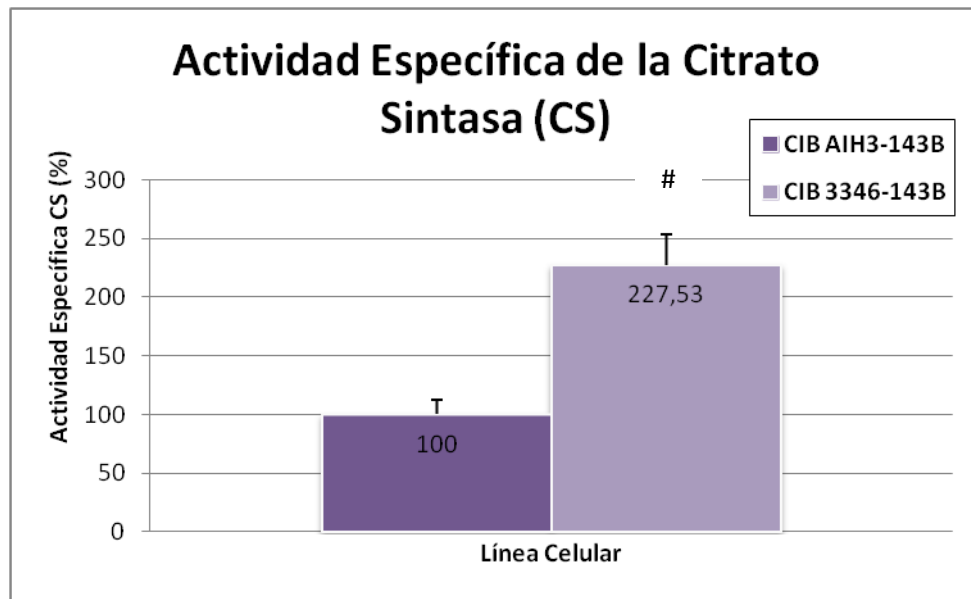
**Gráfica 5. Actividad específica del complejo IV mitocondrial.** Representado el valor promedio relativo de los replicados  $\pm$  desviación estándar para cada uno de los híbridos transmitocondriales. Resultados expresados como porcentajes respecto al híbrido control. En morado oscuro el híbrido control (13,08 mOD x U/mg), y en morado claro, el híbrido portador de la mutación (17,68 mOD x U/mg).

Se esperaría que el híbrido portador de la mutación se caracterizara por presentar una menor actividad a nivel de la cadena respiratoria, puesto que su polimorfismo genético afectaría a toda la síntesis proteica mitocondrial que requiriera la incorporación del aminoácido Treonina en su secuencia, conllevando por consiguiente, un defecto en la síntesis de los complejos del sistema OXPHOS, esperándose una menor cantidad de los mismos y por lo tanto, una menor actividad. No obstante, contradictoriamente, los resultados obtenidos reflejan una mayor actividad citocromo oxidasa en el extracto proteico del híbrido mutante en comparación con el control, aunque bien es cierto, con diferencias que no resultan significativas ( $p$ -valor = 0,0826).

#### 4.5.3. Análisis de la actividad de la citrato sintasa

De manera habitual, además del análisis individual de la actividad enzimática de los complejos respiratorios mitocondriales en el estudio de tejidos de pacientes afectados, es común realizar un subsecuente ensayo para determinar la actividad específica de la enzima citrato sintasa, que es empleada usualmente a modo de marcador de biogénesis mitocondrial celular, permitiendo así la relativización de los resultados determinados respecto a la cantidad de mitocondrias presentes en la muestra objeto de estudio.

Por ello, con el objetivo de poder determinar posteriormente la actividad del complejo IV por unidad de mitocondria, se decidió realizar el análisis de la actividad de la enzima citrato sintasa, registrándose los siguientes resultados:



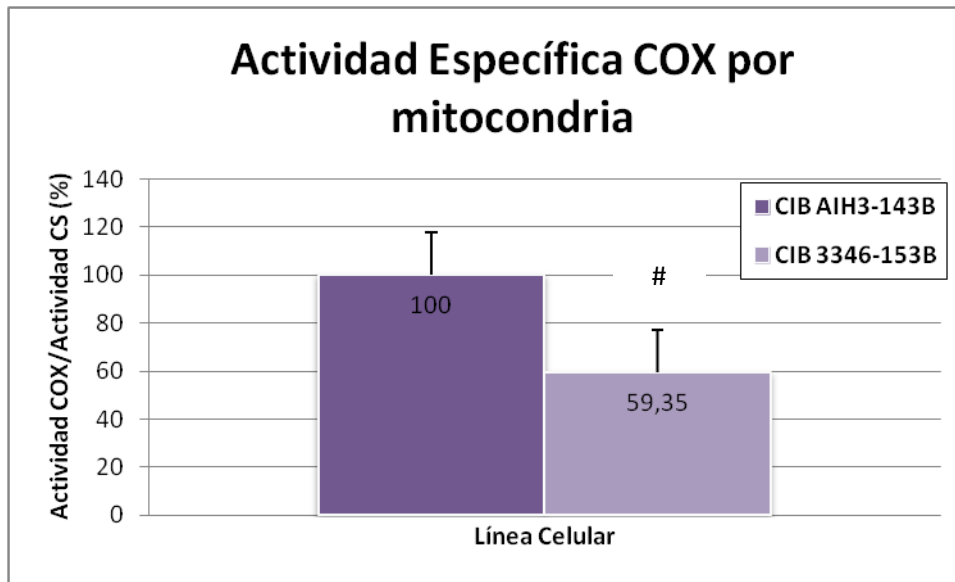
**Gráfica 6. Actividad específica de la enzima citrato sintasa.** Representado el valor promedio relativo de los replicados  $\pm$  desviación estándar para cada uno de los cíbridos transmitocondriales. Datos expresados en porcentaje respecto al control. En morado oscuro el cíbrido control (509,89 mOD x U/mg), y en morado claro, el cíbrido portador de la mutación (1160,16 mOD x U/mg). Las diferencias significativas, considerando como criterio de significancia un p-valor $<$ 0,05, se representan mediante el símbolo #. En este caso, p-valor = 0,0495.

En lo que respecta a este parámetro, fue posible detectar un aumento significativo de actividad específica de la enzima citrato sintasa en el caso de las células portadoras de la mutación en comparación con los cíbridos control. Por consiguiente, ello vendría a representar que en el caso de los cíbridos mutantes, la tasa de biogénesis mitocondrial estaba incrementada en gran medida, constituyendo un posible mecanismo para tratar de contrarrestar los efectos patológicos derivados de la presencia de la mutación.

Ello también se vería explicado por la función que cumple la CS en las células del organismo. Dicha enzima cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs, ruta metabólica que conduce a la producción de ATP y equivalentes de reducción que tras atravesar con posterioridad la cadena de transporte electrónico mitocondrial, aumentaría inclusive más la tasa de síntesis energética. Como consecuencia de su participación en ese proceso, su actividad enzimática se ve inhibida ante elevados niveles de ATP en la célula. Por el contrario, las moléculas de ADP, sinónimo de déficit energético celular, actuarían a modo de activador alostérico enzimático, potenciando su funcionalidad. En el caso particular objeto de estudio, se esperaría que como consecuencia de la mutación puntual en el tRNA<sup>Thr</sup>, los cíbridos portadores vieran dificultada la síntesis proteica mitocondrial, y por consiguiente, presentarían defectos tanto cuantitativos como funcionales a nivel de todos los complejos constituyentes de la cadena respiratoria con subunidades codificadas por el mtDNA. En esa situación, la actividad de la ATPasa o complejo V se vería disminuida, incrementándose el ratio ADP/ATP disponible en la célula, lo cual conllevaría una activación de la enzima citrato sintasa con el objetivo de tratar de paliar el defecto.<sup>52,53</sup>

#### 4.5.4. Relación entre la actividad del complejo IV mitocondrial y la actividad CS

Relacionado con el papel de la CS a modo de marcador de biogénesis mitocondrial, como se ha mencionado, su actividad registrada también se utiliza para normalizar los valores de actividad de los complejos del sistema OXPHOS por la cantidad de mitocondrias presente en las células objeto de estudio. Por tanto, para estudiar los valores de actividad COX por mitocondria, bastaría con dividir los resultados obtenidos por aquellos valores derivados de la actuación enzimática de la CS. Como resultado se obtuvo:



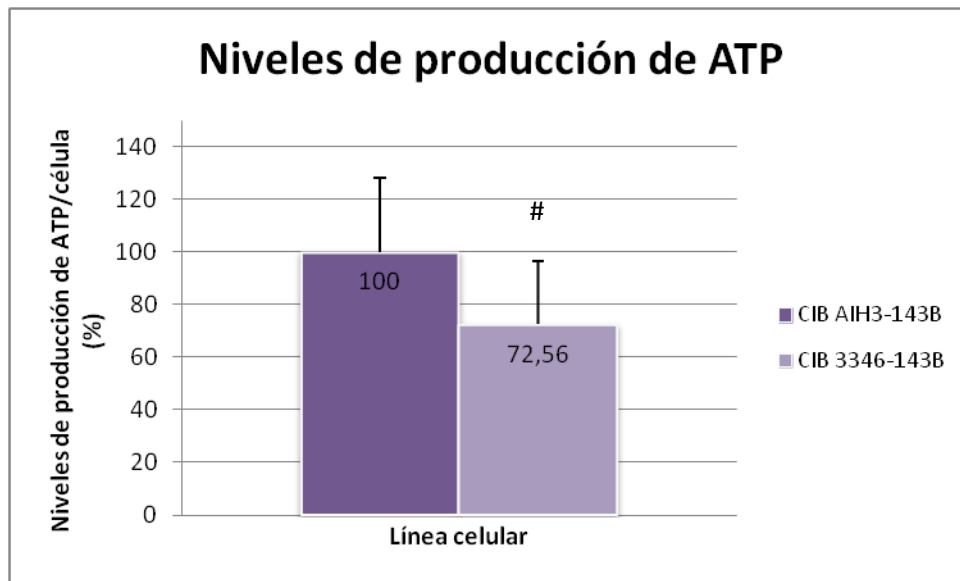
**Gráfica 7. Actividad citocromo c oxidasa (COX) frente a actividad citrato sintasa (CS).** Representado el valor promedio relativo de los replicados  $\pm$  desviación estándar para cada uno de los híbridos transmitocondriales. Datos expresados en porcentaje respecto al híbrido control. En morado oscuro el híbrido control (0,026 mOD x U/mg), y en morado claro, el híbrido portador de la mutación (0,015 mOD x U/mg). Las diferencias significativas, considerando como criterio de significancia un p-valor < 0,05, se representan mediante el símbolo #. En este caso, p-valor < 0,0001.

En este caso sí que se registró una disminución muy significativa de la actividad del complejo IV por mitocondria en el caso del híbrido portador de la mutación en comparación con el híbrido control carente de la misma. Ello ponía de manifiesto que al contrario de los aparentes resultados derivados de la medida individual de la actividad COX, que parecía estar incrementada en el caso de los híbridos mutantes, ésta se encuentra en realidad disminuida atendiendo a nivel mitocondrial particular, manifestando el defecto esperado en el funcionamiento de la cadena respiratoria como consecuencia de la mutación puntual.

#### 4.5.5. Estudio de los niveles de síntesis de ATP mitocondrial

En vista a los resultados obtenidos anteriormente, todo parecía indicar que la mutación puntual del tRNA<sup>Thr</sup> provocaba un déficit a nivel de funcionamiento del sistema OXPHOS, reflejándose como una disminución de la actividad de los complejos constituyentes de la cadena respiratoria, al menos en lo que respecta al complejo IV mitocondrial. Atendiendo al tipo de mutación, probablemente ello sea debido a fallos durante el proceso de síntesis proteica de los mismos. No obstante, los efectos patológicos derivados del perjuicio de la cadena respiratoria, por su principal función en el orgánulo, también se esperaba que condujeran a un descenso en la producción de energía celular, motivo por

el que se decidió estudiar el nivel de síntesis de ATP mitocondrial, obteniéndose los siguientes resultados:



**Gráfica 8. Nivel de producción de ATP mitocondrial por célula relativos en los híbridos transmitocondriales.** Los resultados para el híbrido portador de la mutación (en morado claro, 0,74 RLU/RFU) se han relativizado respecto a los obtenidos para el híbrido control (en morado oscuro, 1,02 RLU/RFU), considerando su tasa de síntesis de ATP mitocondrial como el total de actividad, expresado en porcentaje. A modo de barra de error, se representa la desviación estándar del promedio de los replicados obtenidos. Las diferencias significativas, considerando como criterio de significancia un p-valor < 0,05 se representan mediante el símbolo #. En este caso, p-valor = 0,0209.

Los resultados obtenidos se han calculado atendiendo a la señal luminiscente emitida por la cantidad de ATP en cada una de las muestras, normalizándola para el número promedio de células presentes en cada pocillo en cuestión, derivándose así un dato de tasa de síntesis de ATP mitocondrial por célula, que se ha utilizado para hallar los promedios porcentuales relativos para cada uno de los híbridos transmitocondriales objeto de estudio.

Es posible observar que la producción de ATP mitocondrial disminuye significativamente en los híbridos portadores de la mutación en comparación con los híbridos empleados a modo de control, reflejando un descenso próximo al 30% de actividad a nivel de la ATPasa o complejo V de la cadena respiratoria.

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de este trabajo se han estudiado algunos de los efectos derivados de la presencia de la mutación m.15950G>A, afectando a nivel del brazo aceptor del tRNA<sup>Thr</sup> codificado por el mtDNA. Dicha región parece jugar un papel esencial bien para el reconocimiento por parte de la aminoacil-tRNA sintetasa durante el proceso de unión del aminoácido específico en cuestión, o bien en la estabilidad y correcto procesamiento del transcrito generado. Independientemente del mecanismo patológico concreto, la mutación conduce a un retraso o una disfunción en la síntesis proteica mitocondrial con capacidad de reducir la actividad enzimática del sistema OXPHOS al afectar a las subunidades constituyentes codificadas por el mtDNA.<sup>42</sup>

Dicha mutación puntual únicamente había sido descrita en una ocasión en el año 1999 en el contexto de un paciente enfermo de Parkinson en que el análisis bioquímico de sus muestras biopsiadas evidenció deficiencias a nivel de los complejos I y IV de la cadena respiratoria, manifestando la posible existencia de mutaciones a nivel de genes codificantes de tRNAs como desencadenantes de la patología a pesar de que los defectos genéticos únicamente son responsables de un 15-35% de casos en pacientes afectados.<sup>42</sup>

El Parkinson constituye una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes relacionada con la edad, caracterizada, a nivel molecular, por un alto grado de estrés oxidativo que acaba desencadenando en disfunción y muerte neuronal. En ese contexto, por su papel como principal fuente de producción energética y ROS endógenos, se ha hipotetizado una importante implicación mitocondrial en el desencadenamiento de la enfermedad, justificado por las limitaciones glucolíticas de las células neuronales que las hace altamente dependientes del funcionamiento del sistema OXPHOS para obtener la energía necesaria para el desarrollo de su actividad y mantenimiento de su supervivencia. Por consiguiente, la presencia de mutaciones en el mtDNA podría conllevar un descenso en la eficiencia de la cadena respiratoria y en consecuencia, un aumento en la producción de ROS capaz de promover la generación de nuevas mutaciones, desembocando finalmente en muerte celular tejido-específica a nivel cerebral, cuya vulnerabilidad selectiva podría deberse al elevado contenido de hierro pro-oxidante y los reducidos niveles de glutatión antioxidante en las neuronas dopaminérgicas afectadas.<sup>54</sup>

No obstante, el informe clínico analizado en este trabajo mostraba sus propias particularidades, alejándose de un historial parkinsoniano y aproximándose en cambio a un posible caso de esclerosis múltiple (MS) con una sintomatología peculiar. En lo que respecta a la MS, se trata de una enfermedad autoinmune neurodegenerativa caracterizada por desmielinización y pérdida axonal a nivel del SNC.<sup>55</sup> Sin embargo, la paciente involucrada adicionalmente padece pérdida visual, asemejándose al cuadro clínico típico de la denominada enfermedad de Harding, una asociación entre MS y LHON que ya fue descrita por Mauksch et al. en el año 1926.<sup>56</sup> A diferencia del LHON clásico y de la neuritis óptica típica asociada a MS, dicha patología se caracteriza por varios eventos visuales indoloros, una pérdida visual unilateral persistente, un intervalo de tiempo de afectación inusualmente largo entre ambos ojos, una elevada probabilidad de ceguera y una mayor incidencia en el género femenino, remarcando una nueva y diferente interacción entre los mecanismos subyacentes en ambos trastornos implicados.<sup>55,57</sup>



Ante la posibilidad de que la paciente objeto de estudio pudiera padecer LHON-MS, se decidió optar por la construcción de cíbridos transmitocondriales portadores de la mutación m.15950G>A como modelo celular para estudiar el factible carácter patológico de dicha mutación puntual y como resultado de un exhaustivo estudio comparativo frente a un cíbrido control, sí se observaron diferencias significativas en lo referente a la tasa de crecimiento celular, expresión proteica mitocondrial, grado de síntesis de ATP y actividad enzimática de los complejos respiratorios mitocondriales, con implicaciones negativas en el caso del cíbrido portador de la mutación.

A día de hoy se desconoce la etiología exacta de MS, pero se cree que es el resultado de una respuesta inmunitaria anormal frente a ciertos antígenos de mielina tras la exposición a un agente causal todavía no identificado,<sup>58</sup> que induce la activación de células T, la liberación de INF-gamma y la subsecuente estimulación de macrófagos productores de óxido nítrico (NO), compuesto con efectos inhibitorios sobre la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, y por ende, con nefastas consecuencias sobre la supervivencia celular.<sup>59</sup> En este contexto, la presencia de MS o de sus factores de riesgo podrían precipitar el desarrollo de un fenotipo de LHON en pacientes portadores de mutaciones patológicas que, debido a su natural penetrancia incompleta, en condiciones diferentes, podrían haber permanecido asintomáticos.<sup>55</sup> En otras palabras, podría darse el caso de que el padecimiento de síntomas relacionados con esclerosis múltiple constituyera el factor desencadenante necesario para desarrollar el tipo de ceguera asociada a LHON. De esta forma, el conjunto de factores de riesgo más el daño mitocondrial específico causado, derivarían en la acumulación de efectos inhibitorios sobre el sistema OXPHOS con consecuencias negativas para la tasa de respiración mitocondrial y por ende, para la producción de energía. Finalmente, todo ello disminuiría el nivel umbral inicial que presentaba el paciente, potenciando el desarrollo de la enfermedad tejido-específica a nivel del nervio óptico.<sup>55</sup>

No obstante, también se ha hipotetizado la posibilidad de que se produzca la situación inversa y que la disfunción mitocondrial sea el agente causal desencadenante de la enfermedad. La homeostasis iónica del ambiente intracelular es crítica para el mantenimiento de las funciones neuronales, por lo que un desequilibrio podría constituir un mecanismo clave en la fisiopatología de la enfermedad.<sup>58</sup> En relación con este último aspecto, la presencia de una mutación a nivel del mtDNA, alteraría la síntesis energética y por consiguiente, el funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependiente de ATP. Como consecuencia, aumentaría la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular que conllevaría la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , promoviendo la expulsión del  $\text{Na}^+$  a expensas de una entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuya acumulación promovería la acción de proteasas intracelulares que conducirían a una lesión axonal y finalmente, a una neurodegeneración.<sup>55,58</sup> Alternativamente, la acumulación inicial de  $\text{Na}^+$  también impulsaría una liberación axonal excesiva de glutamato, un neurotransmisor excitatorio que al unirse a receptores post-sinápticos involucraría la apertura de canales iónicos, promoviendo la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , entre otros, propagando la activación de enzimas catalíticas intracelulares y, con ello, el daño neuronal.<sup>59</sup>

## 6. CONCLUSIONES

Los cíbridos construidos con fondo genético nuclear procedente de la línea celular 143B y fondo genético mitocondrial procedente de las plaquetas de la paciente 3346, portadora de la mutación m.15950G>A a nivel del mtDNA mostraron un comportamiento significativamente diferente respecto a los cíbridos control. Se caracterizaban por:

- Dificultad de crecimiento en medio con galactosa en lugar de glucosa, desembocando finalmente en muerte celular.
- Menor expresión de la subunidad I del C.IV de la cadena respiratoria codificada por el mtDNA.
- Menor actividad COX al relativizar por la actividad CS, manifestando una mayor tasa de biogénesis mitocondrial para tratar de paliar el defecto.
- Inferior tasa de síntesis de ATP a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

En vista a todos los resultados obtenidos, se concluyó que la mutación objeto de estudio provocaba una disfunción a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial en las células portadoras. Por consiguiente, se cumplían las sospechas iniciales de que dicha mutación presenta un carácter patológico.

## CONCLUSIONS

The cybrids generated with nuclear genetic background from 143B cell line and mitochondrial genetic background from platelets of patient 3346, harbouring the m.15950G>A mutation in mtDNA, showed a significantly different behaviour to the control cybrids. They were characterized by:

- Abnormal growing in medium with galactose instead of glucose, leading to cellular death.
- Lower expression of subunit I of respiratory chain complex IV encoded by mtDNA.
- Less COX activity normalized by CS activity, showing a higher mitochondrial biogenesis rate in order to try to overcome the defect.
- Lower ATP synthesis rate through the mitochondrial electronic transport chain.

Due to these results, we concluded that the mutation under study was causing a mitochondrial respiratory chain dysfunction in the cybrid cell lines. Therefore, we confirmed our initial hypothesis related to the pathogenicity of the mutation.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Montoya J., López-Gallardo E., Emperador S., Ruiz-Pesini E. *Capítulo VII: Enfermedades del ADN mitocondrial. Sistema Mitocondrial: un reto en la medicina humana*. 2012, Instituto de España. Real Academia de Farmacia (Monografía XXXVI). Madrid: 129-154.
2. Montoya J. *Biogénesis y patología mitocondrial*. Rev. Real Academia de Ciencias. 2005; 60: 7-28.
3. Rubio-González T., Verdecia-Jarque M. *Las enfermedades mitocondriales: un reto para las ciencias médicas*. MEDISAN. 2004; 8(1): 43-50.
4. Yu-Wai-Man P., Votruba M., Burté F., La Morgia C., Barboni P., Carelli V. *A neurodegenerative perspective on mitochondrial optic neuropathies*. Acta Neuropathol. 2016; 132: 789-806.
5. Howell N. *Leber Hereditary Optic Neuropathy: Mitochondrial Mutations and Degeneration of the Optic Nerve*. Vision Res. 1997; 37(24): 3495-3507.
6. Barreda-Gago D., Gómez-Ledesma I., Santiago-Rodríguez M.A., Hernández-Galilea E. *Neuropatía óptica hereditaria de Leber por mutación G11778A del ADN mitocondrial. Manejo de un caso*. Rev Mex Oftalmol. 2016; 90(6): 295-299.
7. Kim U.S., Jurkute N., Yu-Wai-Man P. *Leber Hereditary Optic Neuropathy – Light at the end of the tunnel?* Asia-Pac J Ophthalmology. 2018; 7: 242-245.
8. Carelli V., Rugolo M., Sgarbi G., Ghelli A., Zanna C., Baracca A., et al. *Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration*. Biochimica et Biophysica Acta 1658. 2004: 172-179.
9. van der Knaap M.S., Valk J. *Chapter 25: Leber Hereditary Optic Neuropathy. Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders*. 3<sup>ed</sup>. 2005, Springer Science. EEUU: 212-214.
10. Rui B., Ian L., Yong-Gang Y. *Leber Hereditary Optic Neuropathy: A mitochondrial disease unique in many ways*. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer International Publishing Switzerland. 2016.
11. Carelli V., La Morgia C. *Clinical syndromes associated with mtDNA mutations: where we stand after 30 years*. Essays in Biochemistry. 2018; 62: 235-254.
12. Barron M.J., Griffiths P., Turnbull D.M., Bates D., Nichols P. *The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head*. Br. J. Ophthalmol. 2004; 88: 286-290.
13. Kirches E. *LHON: Mitochondrial Mutations and More*. Current Genomics. 2011; 12: 44-54.
14. Gueven N., Nadikudi M., Daniel A., Chhetri J. *Targeting mitochondrial function to treat optic neuropathy*. Mitochondrion. 2016; 1-8.
15. Wong A., Cavellier L., Collins-Schramm H.E., Seldin M.F., McGrogan M., Savontaus M.L. et al. *Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells*. Human Molecular Genetics. 2002; 11(4): 431-438.
16. Hudson G., Carelli V., Spruijt L., Gerards M., Mowbray C., Achilli A. et al. *Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background*. Am J Hum Genet. 2007; 81: 228-233.
17. Johns D.R., Neufeld M.J. *Pitfalls in the molecular genetic diagnosis of leber hereditary optic neuropathy (LHON)*. Am J Hum Genet. 1993; 53: 916-920.
18. Carelli V., d'Adamo P., Valentino M.L., La Morgia C., Ross-Cisneros F.N., Caporali L. et al. *Parsing the differences in affected with LHON: genetic versus environmental triggers of disease conversion*. Brain. 2016; 139: 1-8.
19. López-Gallardo E., Emperador S., Hernández-Ainsa C., Montoya J., Bayona-Bafaluy M.P., Ruiz-Pesini E. *Food derived respiratory complex I inhibitors modify the effect of Leber hereditary optic neuropathy mutations*. Food Chem Toxicol. 2018; 120: 89-97.

20. Cwerman-Thibault H., Augustin S., Ellouze S., Sahel J.A., Corral-Debrinski M. *Gene therapy for mitochondrial disease: Leber hereditary optic neuropathy as the first candidate for a clinical trial.* C. R. Biologies. 2014; 337: 193-206.
21. Tonska K., Kodrom A., Bartnik E. *Genotype-phenotype correlations in Leber hereditary optic neuropathy.* Biochimica et Biophysica Acta 1797. 2010: 1119-1123.
22. Jurkute N., Yu-Wai-Man P. *Leber hereditary optic neuropathy: bridging the translational gap.* Curr Opin Ophthalmol. 2017; 28: 403-409.
23. Bianco A., Valletti A., Longo G., Bisceglia L., Montoya J., Emperador S. et al. *Mitochondrial DNA copy number in affected and unaffected LHON mutation carriers.* BMC Res Notes. 2018; 11: 911-914.
24. Ruiz-Pesini E., Emperador S., López-Gallardo E., Hernandez-Ainsa C., Montoya J. *Increasing mtDNA levels as therapy for mitochondrial optic neuropathies.* Drug Discovery Today. 2018.
25. Castillo L., Arruga J. *Neuropatía óptica hereditaria de Leber: ¿de qué perspectivas terapéuticas disponemos?* Arch Soc Esp Oftalmol. 2016: 1-2.
26. Theodorou-Kanakari A., Karampitianis S., Karageorgou V., Kampourelli E., Kapasakis E., Theodossiadis P. et al. *Current and emerging treatment modalities for Leber's hereditary optic neuropathy: a review of the literature.* Adv Ther. 2018: 1-9.
27. Yoon-ha J., Kwang-il L. *Recent advances in mitochondria-targeted gene delivery.* Molecules. 2018; 23: 1-16.
28. Kaltimbacher V., Bonnet C., Lecoivre G., Forster V., Sahel J.A., Corral-Debrinski M. *mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein.* RNA. 2006; 12: 1408-1417.
29. Cwerman-Thibault H., Sahel J.A., Corral-Debrinski M. *Mitochondrial medicine: to a new era of gene therapy for mitochondrial DNA mutations.* J Inherit Metab Dis. 2011; 34(2): 327-344.
30. Jankauskaite E., Bartnik E., Kodron A. *Investigating Leber's hereditary optic neuropathy: cell models and future perspectives.* Mitochondrion. 2017; 32: 19-26.
31. Zhang X., Jones D., Gonzalez-Lima F. *Mouse model of optic neuropathy caused by mitochondrial complex I dysfunction.* Neurosci Lett. 2002; 326: 97-100.
32. Meyerson C., Van-Stavern G., McClelland C. *Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives.* Clinical Ophthalmol. 2015; 9: 1165-1176.
33. Wilkins H.M., Carl S.M., Swerdlow R.H. *Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathies.* Redox Biology. 2014; 2: 619-631.
34. Robinson B.H., Petrova-Benedict R., Buncic J.R., Wallace D.C. *Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts.* Biochem Med Metab Biol. 1992; 48: 122-126.
35. Iglesias E., Llobet L., Pacheu-Grau D., Gómez-Durán A., Ruiz-Pesini E. *Cybrids for mitochondrial DNA pharmacogenomics.* Drug Dev Res. 2012; 73: 453-460.
36. King M.P., Attardi G. *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation.* Science. 1989; 246: 500-503.
37. Chomyn A. *Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells.* Methods in Enzymology. 1996; 264: 334-339.
38. NCBI. [Internet]. GenBank. *Homo sapiens mitochondrion, complete genome.* Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_012920](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012920). Consultado el día 12/06/2019.
39. van Oven M, Kayser M. *Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation.* Hum Mutat. 2009; 30(2): 386-394.
40. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. *Real time quantitative PCR.* Genome Res. 1996; 6: 986-994.

41. FOSWIKI. [Internet]. MITOMAP. *A human mitochondrial genome database*. Disponible en: <http://www.mitomap.org> . Consultado el día 5/6/2019.
42. Grabson-Frodl E.M., Kösel S., Sprinzl M., von Eitzen U., Mehraein P., Graeber M.B. *Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease*. Neurogenetics. 1999; 2: 121-127.
43. CNRS. [Internet]. *Mamit-tRNA: Compilation of mammalian mitochondrial tRNA genes*. Disponible en: <http://mamit-trna.u-strasbg.fr/>. Consultado el día 5/6/2019.
44. FOSWIKI. [Internet]. MITOMAP. MITOMASTER. Disponible en: [https://www.mitomap.org/cgi-bin/index\\_mitomap.cgi?title=rRNA%2FtRNA+Variant+G-%3EA+at+rCRS+position+15950&pos=15950&ref=G&alt=A](https://www.mitomap.org/cgi-bin/index_mitomap.cgi?title=rRNA%2FtRNA+Variant+G-%3EA+at+rCRS+position+15950&pos=15950&ref=G&alt=A). Consultado el día 5/6/2019.
45. Kern A.D., Kondrashov F.A. *Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs*. Nature Genet. 2004; 36(11): 1207-1212.
46. Devlin T.M. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 3<sup>era</sup> Edición. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.; 2000.
47. Scaglia F., Wong L-J.C. *Human mitochondrial transfer RNAs: Role of pathogenic mutation in disease*. Muscle Nerve. 2008; 37: 150-171.
48. FOSWIKI. [Internet]. MITOMAP. *MitoTIP*. Disponible en: <https://www.mitomap.org/cgi-bin/mitotip?pos=15950&alt=A&quart=2>. Consultado el día 6/6/2019.
49. Carling P.J., Cree L.M., Chinnery P.F. *The implications of mitochondrial DNA copy number regulation during embryogenesis*. Mitochondrion. 2011; 11: 686-692.
50. Hofhaus G., Johns D.R., Hurko O., Attardi G., Chomyn A. *Respiration and growth defects in trans-mitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy*. J. Biol. Chem. 1996; 271(22): 13155-13161.
51. Ghelli A., Zanna C., Porcelli A.M., Schapira A.H.V., Martinuzzi A., Carelli V., et al. *Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in trans-mitochondrial cells incubated with galactose medium*. J. Biol. Chem. 2003; 278(6):4145-4150.
52. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. 5<sup>a</sup> Edición. Barcelona: Editorial Omega; 2005.
53. Harford S., Weitzman P.D.J. *Evidence for isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies*. Biochem J. 1975; 151(2): 455-458.
54. Yan M.H., Wang X., Zhu X. *Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease*. Free Radic. Biol. Med. 2012; 62: 90-101.
55. Bargiela D., Chinnery P.F. *Mitochondria in neuroinflammation – Multiple sclerosis (MS), leber hereditary optic neuropathy (LHON) and LHON-MS*. Neurosci. Lett. 2017; 1: 1-7.
56. Mauksch H. *Ein Beitrag zur Kenntnis der familiarhereditären Sehnervenatrophie*. Z. Augenheilk. 1925; 55: 196-198.
57. Pfeffer G., Burke A., Yu-Wai-Man P., Compston A.S., Chinnery P.F. *Clinical features of MS associated with Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations*. Neurology. 2013; 81: 2073-2081.
58. Mao P., Reddy P.H. *Is multiple sclerosis a mitochondrial disease?* Biochim Biophys Acta. 2010; 1802(1):66-79.
59. Su K.G., Banker G., Bourdette D., Forte M. *Axonal degeneration in multiple sclerosis: The mitochondrial hypothesis*. Curr Neurol Neurosci Rep. 2009; 9(5): 411-417.