

Carmen Josefina Hernández Ainsa

Deleciones en el DNA mitocondrial
causantes del síndrome de
Pearson: modelos celulares y
aproximaciones terapéuticas.

Director/es

Emperador Ortíz, Sonia
Montoya Villarroya, Julio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

DELECCIONES EN EL DNA MITOCONDRIAL
CAUSANTES DEL SÍNDROME DE PEARSON:
MODELOS CELULARES Y APROXIMACIONES
TERAPÉUTICAS.

Autor

Carmen Josefina Hernández Ainsa

Director/es

Emperador Ortíz, Sonia
Montoya Villarroya, Julio

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2021



Universidad
Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Deleciones en el DNA mitocondrial causantes del síndrome de Pearson: modelos celulares y aproximaciones terapéuticas

Memoria presentada por **Carmen J. Hernández Ainsa**

Graduada en Biotecnología
para optar al Grado de Doctor

Tesis Doctoral dirigida por la Dra. Sonia Emperador Ortiz
y el Dr. Julio Montoya Villarroya

Zaragoza, enero de 2021



Este trabajo ha sido financiado con fondo de los proyectos de investigación del Instituto de Salud Carlos III FIS PI14/00005 y PI17/00021, del Gobierno de Aragón (Grupos Consolidados B33_17R), del programa de *crowdfunding* (PR194) Precipita-FECYT, de FEDER 2014-2020 “Construyendo Europa desde Aragón” y de la Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI).

La doctoranda ha disfrutado de un contrato como investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón gracias a la donación de la asociación “Todos con Javier” y, posteriormente, de un contrato de personal investigador predoctoral en formación del Gobierno de Aragón. Además, ha realizado una estancia de investigación en Cambridge (Reino Unido) gracias al programa de movilidad de la fundación CAI-Ibercaja y al programa ERASMUS+.

Durante la realización de esta tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos científicos:

López-Gallardo E, Cammarata-Scalisi F, Emperador S, Hernández-Ainsa C, Habbane M, Vela-Sebastián A, Bayona-Bafaluy MP, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA pathogenic mutations in multiple symmetric lipomatosis. *Clin Genet*. 2020 May;97(5):731-735.

Emperador S, López-Gallardo E, Hernández-Ainsa C, Habbane M, Montoya J, Bayona-Bafaluy MP, Ruiz-Pesini E. Ketogenic treatment reduces the percentage of a LHON heteroplasmic mutation and increases mtDNA amount of a LHON homoplasmic mutation. *Orphanet J Rare Dis*. 2019 Jun 21;14(1):150.

López-Gallardo E, Emperador S, Hernández-Ainsa C, Montoya J, Bayona-Bafaluy MP, Ruiz-Pesini E. Food derived respiratory complex I inhibitors modify the effect of Leber hereditary optic neuropathy mutations. *Food Chem Toxicol*. 2018 Oct;120:89-97.

Ruiz-Pesini E, Emperador S, López-Gallardo E, Hernández-Ainsa C, Montoya J. Increasing mtDNA levels as therapy for mitochondrial optic neuropathies. *Drug Discov Today*. 2018 Mar;23(3):493-498.

Emperador S, Vidal M, Hernández-Ainsa C, Ruiz-Ruiz C, Woods D, Morales-Becerra A, Arruga J, Artuch R, López-Gallardo E, Bayona-Bafaluy MP, Montoya J, Ruiz-Pesini E. The Decrease in Mitochondrial DNA Mutation Load Parallels Visual Recovery in a Leber Hereditary Optic Neuropathy Patient. *Front Neurosci*. 2018 Feb 9;12:61.

*Tendremos que continuar,
y aguardaremos en la fila donde cambian la ansiedad
por ciclos de suerte más normal.*

¡Tampoco pides más!

¡Sí, saldremos de esta!

Love of Lesbian (2012) "Si salimos de esta"

A mi familia

ABREVIATURAS

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

AA: acetoacetato

AF: ácido fólico

AFP: α -fetoproteína

ATP: adenosín trifosfato

ATP6: subunidad 6 de la ATP sintasa

ATP8: subunidad 8 de la ATP sintasa

BHB: β -hidroxibutarato

CFU: unidad formadora de colonias

CIB: cíbridos o híbridos transmitocondriales

COI: subunidad 1 del complejo IV

COII: subunidad 2 del complejo IV

COIII: subunidad 3 del complejo IV

Complejo I: NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidorreductasa

Complejo II: succinato deshidrogenasa

Complejo III: ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa

Complejo IV o COX: citocromo c oxidasa

Complejo V: ATP sintasa o ATPasa

CPEO: oftalmoplejía crónica progresiva externa

CS: citrato sintasa

CYB: citocromo b

Cyt C: citocromo C

dA: desoxiadenosina

DBA: anemia Diamond-Blackfan

dC: desoxicitidina

DC: dieta cetogénica

dG: desoxiguanosina

DGOUK: desoxiguanosina quinasa

DiOC₆ (3): yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNS: desoxirribonucleósidos

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

DPBS: Dulbecco's PBS

DRPs: *dynamain related proteins*

DSB: rotura de doble hebra

dT: desoxitimidina

dTMP: desoxitimidilato

DTNB: ácido 2-nitrobenzoico

dUMP: desoxiuridilato

EDTA: ácido etilendiaminotetraácetico

ER: retículo endoplasmático

ESC: célula madre embrionaria

ETC: cadena transportadora de electrones

FADH₂: dinucleótido de flavina y adenina reducido

Fb: fibroblastos

FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

GTP: guanosín trifosfato

H: cadena pesada del mtDNA

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HIFs: *Hypoxia-inducible factors*

IBM: membrana interna de unión

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IMM: membrana mitocondrial interna

IMS: espacio intermembrana

iNSC: células madre neurales inducidas

iPSC: célula madre pluripotente inducida

kb: kilobases (DNA)

KCN: cianuro de potasio

KSR: KnockOut™ Serum Replacement

KSS: síndrome de Keans-Sayre

L: cadena ligera del mtDNA

LC3: *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber

MELAS: encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de *stroke-like*

MERRF: epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas

MFN: mitofusina

MICOS: *mitochondrial contact site and cristae junction organizing system*

MIMP: potencial de membrana interna mitocondrial

MIMS: superficie de membrana interna mitocondrial

mitoTALEN: *transcriptor activator-like effector nucleases*

mRNA: RNA mensajero

mtDNA: DNA mitocondrial

mtTORC: *mammalian target of rapamycin complex*

mtZFN: *mitochondrially targeted zincfinger-nucleases*

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

NAO: Naranja Nonil de Acridina

NARP: neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria

ND1: subunidad 1 del complejo I

ND2: subunidad 2 del complejo I

ND3: subunidad 3 del complejo I

ND4: subunidad 4 del complejo I

ND4L: subunidad 4L del complejo I

ND5: subunidad 5 del complejo I

ND6: subunidad 6 del complejo I

nDNA: genoma nuclear

NRFs: *nuclear respiratory factors*

O_H: origen de replicación de la cadena pesada

O_L: origen de replicación de la cadena ligera

OMM: membrana mitocondrial externa

OPA1: proteína de atrofia óptica 1

OXPHOS: sistema de fosforilación oxidativa

PA: ácido fosfatídico

pb: pares de bases (DNA)

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PGC-1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator- 1 α*

POLG: DNA polimerasa gamma

POLRMT: RNA polimerasa mitocondrial

PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*

PS: síndrome de Pearson

PSC: célula madre pluripotente

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

Rho⁰ o ρ⁰: células carentes de mtDNA

RITOLs: modelo de replicación *ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand*

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especies reactivas de oxígeno

RPMI: Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

rRNA: RNA ribosómico

SFB: suero fetal bovino

SLSMDs: *single large-scale mtDNA deletions*

SMA: α-actina de músculo liso

TFAM: factor de transcripción mitocondrial A

TK2: timidina quinasa 2

tRNA: RNA de transferencia

TUBB3: βIII-tubulina

UV: ultravioleta

wt-mtDNA: DNA mitocondrial completo

Δ-mtDNA: DNA mitocondrial delecionado

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.	La mitocondria, el sistema de fosforilación oxidativa y el genoma mitocondrial.....	3
1.1.1.	La mitocondria.....	3
1.1.2.	El Sistema OXPHOS: composición y función	4
1.1.3.	El DNA mitocondrial	5
1.1.3.1.	Replicación y expresión del mtDNA	6
1.1.3.2.	Particularidades del mtDNA.....	8
1.1.4.	Homeostasis de la masa mitocondrial	10
1.1.4.1.	Biogénesis y mitofagia	10
1.1.4.2.	Dinámica mitocondrial	11
1.2.	Papel de la mitocondria en la reprogramación, pluripotencia y diferenciación.....	12
1.3.	Enfermedades mitocondriales	14
1.4.	Patologías causadas por deleciones únicas en el mtDNA	14
1.4.1.	Clasificación de las deleciones	14
1.4.2.	Mecanismos moleculares para explicar el origen de las deleciones.....	15
1.4.3.	Relación entre el fenotipo y la localización y el tamaño de la deleción	17
1.4.4.	Expansión clonal y segregación mitótica de las deleciones	18
1.4.5.	Umbral patológico de la deleciones.....	20
1.4.6.	Fisiopatología celular de las deleciones	21
1.5.	El síndrome de Pearson y otras patologías causadas por deleciones en el DNA mitocondrial	23
1.5.1.	Epidemiología.....	23
1.5.2.	Aspectos clínicos del síndrome de Pearson	23
1.5.3.	Diagnóstico y consejo genético.....	24
1.5.4.	Otras patologías causadas por deleciones en el mtDNA	25
1.6.	Modelos para el estudio de patologías mitocondriales causadas por deleciones en el mtDNA.....	26
1.6.1.	Modelos celulares	27
1.6.1.1.	Fibroblastos.....	27
1.6.1.2.	Cíbridos o híbridos transmitocondriales.....	27
1.6.1.3.	Líneas celulares linfoblastoides.....	29
1.6.1.4.	Células madre pluripotentes inducidas.....	29
1.6.2.	Modelos animales	30
1.7.	Estrategias de tratamiento para patologías mitocondriales.....	31
1.7.1.	Antioxidantes e hipoxia.....	31
1.7.2.	Modulación de la biogénesis mitocondrial y la mitofagia.....	33

1.7.3.	Tratamiento cetogénico	34
1.7.4.	Baipás de la replicación del mtDNA	35
1.7.5.	Terapia génica	36
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
2.1.	Hipótesis.....	39
2.2.	Objetivos	40
3.	RESULTADOS	43
3.1.	Historia clínica, análisis genético y estudio anatómico-patológico de pacientes con síndrome de Pearson	43
3.1.1.	Historia clínica	43
3.1.2.	Variación del porcentaje de heteroplasmia a lo largo del tiempo en sangre de un paciente portador de la delección común (PS1).....	44
3.1.3.	Análisis genético: diagnóstico, determinación del tamaño de la delección y nivel de heteroplasmia	45
3.1.4.	Estudio anatómico-patológico de diferentes tejidos del paciente PS2 y relación con la distribución de la carga de delección.....	49
3.2.	Generación y caracterización de modelos celulares portadores de una delección única en el mtDNA	51
3.2.1.	Cultivo primario de fibroblastos a partir de biopsias de piel	51
3.2.2.	Obtención de líneas híbridas o híbridos mitocondriales con diferentes niveles de heteroplasmia	52
3.2.2.1.	Obtención de clones con diferentes niveles de heteroplasmia del híbrido CIB PS1	53
3.2.2.2.	Obtención de clones con diferentes niveles de heteroplasmia del híbrido CIB PS2	55
3.2.3.	Obtención y caracterización de células madre pluripotentes inducidas	56
3.2.3.1.	Estudio de los parámetros que definen una célula pluripotente inducida... 57	
3.2.3.1.1.	Morfología celular	57
3.2.3.1.2.	Pérdida del virus SeV	58
3.2.3.1.3.	Expresión de marcadores de pluripotencia	59
3.2.3.1.4.	Actividad de la fosfatasa alcalina.....	59
3.2.3.1.5.	Capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> a las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo.	60
3.2.4.	Caracterización genética de los modelos celulares.....	61
3.2.4.1.	Huella genética.....	61
3.2.4.2.	Cariotipado.....	62
3.2.4.3.	Secuenciación completa del mtDNA y determinación del haplogrupo mitocondrial	63

3.2.5.	Caracterización de la ultraestructura mitocondrial en los diferentes modelos celulares	64
3.3.	Efecto de las deleciones en alto nivel de heteroplasmia sobre la función mitocondrial en diferentes modelos celulares	68
3.3.1.	Análisis de la biogénesis mitocondrial	69
3.3.1.1.	Determinación de los niveles de mtDNA	69
3.3.1.2.	Actividad de la citrato sintasa	70
3.3.1.3.	Expresión de genes mitocondriales	71
3.3.1.4.	Niveles de mRNA del replisoma mitocondrial.	74
3.3.1.5.	Expresión de genes reguladores de la biogénesis mitocondrial	75
3.3.2.	Análisis de la función del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)	76
3.3.2.1.	Actividad y cantidad de la citocromo c oxidasa o complejo IV mitocondrial	76
3.3.2.2.	Consumo de oxígeno.....	78
3.3.2.3.	Determinación de los niveles de ATP mitocondrial	80
3.3.3.	Análisis de mitofagia	81
3.4.	Determinación del porcentaje de heteroplasmia umbral de las deleciones PS1 y PS2 causantes de efectos patológicos en el sistema OXPHOS.....	82
3.4.1.	Análisis del contenido mitocondrial en diferentes niveles de heteroplasmia	83
3.4.2.	Análisis de la función mitocondrial en diferentes niveles de heteroplasmia	86
3.5.	Efecto de la presencia de una deleción común en el mtDNA sobre la capacidad de diferenciación de células iPS a distintos tipos celulares	90
3.5.1.	Diferenciación hematopoyética de células iPS control y PS1	90
3.5.2.	Diferenciación a páncreas exocrino de células iPS control y PS1.....	93
3.5.3.	Diferenciación neuronal de células iPS control y PS1	94
3.5.4.	Diferenciación de células iPS control y PS1 a cardiomiocito.....	99
3.6.	Efecto de diferentes tratamientos en la variación del nivel de heteroplasmia y función OXPHOS de células en cultivo	101
3.6.1.	Tratamiento con cuerpos cetónicos.....	101
3.6.1.1.	Tratamiento de fibroblastos PS1 y PS2 con cuerpos cetónicos	102
3.6.1.2.	Tratamiento de híbridos PS1 y PS2 con cuerpos cetónicos.....	106
3.6.2.	Tratamiento con ácido fólico	108
3.6.2.1.	Efecto del tratamiento con ácido fólico en concentraciones superiores a las fisiológicas	109
3.6.2.2.	Efecto del suplemento de ácido ascórbico al tratamiento con ácido fólico en concentraciones superiores a las fisiológicas	111
3.6.2.3.	Efecto del tratamiento con ácido fólico en concentraciones fisiológicas...	113
3.6.2.4.	Efecto del ácido fólico sobre la diferenciación neuronal	116

3.6.2.5.	Estudio de la aparición de deleciones en el mtDNA por ausencia prolongada de ácido fólico	119
3.6.3.	Tratamiento con desoxirribonucleósidos.....	120
3.6.4.	Terapia génica con mtZFN.....	126
4.	DISCUSIÓN.....	131
4.1.	Modelos para el estudio de patologías causadas por deleciones en el mtDNA	131
4.2.	Estabilidad del nivel de heteroplasmia a lo largo del tiempo	133
4.3.	Influencia de las características de la deleción sobre el fenotipo celular.....	135
4.4.	El tamaño de la deleción no influye en el porcentaje umbral causante de efectos patológicos.....	137
4.5.	La presencia de una deleción en el mtDNA provoca alteraciones graves en la ultraestructura mitocondrial.....	139
4.6.	La deleción en el mtDNA influye negativamente sobre la reprogramación y la diferenciación de las células iPS.....	141
4.7.	Posibles tratamientos para patologías causadas por deleciones en el mtDNA	144
4.8.	Perspectivas futuras.....	146
5.	CONCLUSIONES	151
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	155
6.1.	Material biológico y líneas celulares	155
6.2.	Reactivos generales.....	156
6.3.	Cultivos celulares.....	156
6.3.1.	Medios, reactivos, materiales y equipos de cultivo celular	156
6.3.2.	Matrices de crecimiento	158
6.3.2.1.	Gelatina	158
6.3.2.2.	MEFs (Fibroblastos embrionarios de ratón).....	158
6.3.2.3.	Vitronectina.....	158
6.3.2.4.	Gel ECM.....	159
6.3.2.5.	Matrigel®	159
6.3.2.6.	CELLStart™	159
6.3.2.7.	Laminina y poli-L-ornitina	159
6.3.3.	Mantenimiento de los cultivos celulares	160
6.3.4.	Congelación y descongelación de células	161
6.3.5.	Recuento celular.....	161
6.3.6.	Análisis de contaminación con Mycoplasma sp.....	162
6.3.7.	Cariotipado de líneas celulares	162
6.3.8.	Microscopía electrónica	162
6.3.9.	Establecimiento del cultivo de fibroblastos a partir de una biopsia de piel	163

6.3.10.	Generación de híbridos	163
6.3.11.	Selección clonal de híbridos con diferente porcentaje de heteroplasmia mediante dilución al límite	164
6.3.12.	Generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs) a partir de fibroblastos	165
6.3.13.	Diferenciación de células iPSC.....	167
6.3.13.1.	Obtención de cuerpos embrioides a partir de iPSCs.....	167
6.3.13.2.	Diferenciación de células IPS a las tres capas germinales.....	168
6.3.13.2.1.	Endodermo	168
6.3.13.2.2.	Mesodermo	168
6.3.13.2.3.	Ectodermo	168
6.3.13.3.	Diferenciación específica de las células IPS a distintos tipos celulares.....	169
6.3.13.3.1.	Diferenciación hematopoyética.....	169
6.3.13.3.1.1.	Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU).....	169
6.3.13.3.2.	Diferenciación a células del páncreas exocrino.....	171
6.3.13.3.3.	Diferenciación neuronal	172
6.3.13.3.4.	Diferenciación a cardiomiocitos	173
6.3.14.	Inmunofluorescencia de cultivos celulares	174
6.3.14.1.	Inmunofluorescencia de células fijadas	174
6.3.14.2.	Inmunofluorescencia de células vivas sin fijar	175
6.3.15.	Tratamientos con medios de cultivo específicos	176
6.3.15.1.	Tratamiento con cuerpos cetónicos.....	176
6.3.15.2.	Tratamiento con ácido fólico	176
6.3.15.2.1.	Tratamiento con medio restrictivo sin ácido fólico	177
6.3.15.3.	Tratamiento con desoxirribonucleósidos	177
6.3.16.	Terapia génica mediante mtZFN	177
6.4.	Histoquímica.....	179
6.5.	Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	179
6.5.1.	Aislamiento de DNA total a partir de muestras biológicas o cultivos celulares	179
6.5.1.1.	Extracción de DNA total de células en cultivo	179
6.5.1.2.	Extracción de DNA total de muestras de sangre.....	179
6.5.1.3.	Extracción de DNA total de muestras de otros tejidos	180
6.5.2.	Aislamiento de RNA total a partir de células en cultivo.....	181
6.5.3.	Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría.....	181
6.5.4.	Retrotranscripción de RNA total	181
6.5.5.	Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	182
6.5.5.1.	Amplificación del DNA mitocondrial completo (PCR Larga)	182

6.5.5.2.	Amplificación del DNA mitocondrial en fragmentos para su secuenciación	183
6.5.5.3.	Amplificación de secuencias específicas de los vectores CytoTune™ para la detección de la presencia del virus en células iPS	184
6.5.6.	Separación electroforética de ácidos nucleicos mediante geles de agarosa	185
6.5.7.	Secuenciación del mtDNA	186
6.5.8.	Determinación del límite de las deleciones	186
6.5.9.	Determinación del genotipo mitocondrial	187
6.5.10.	Huella genética	188
6.5.11.	Cuantificación del porcentaje de heteroplasma de deleciones	188
6.5.11.1.	Cuantificación del porcentaje de heteroplasma de deleciones mediante PCR cuantitativa a tiempo real	188
6.5.11.2.	Cuantificación del porcentaje de heteroplasma de deleciones mediante Southern blot	190
6.5.12.	Cuantificación del número de copias del mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real	192
6.5.13.	Medida de expresión de transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real	193
6.5.13.1.	A partir de cDNA	194
6.5.13.2.	A partir de RNA	195
6.6.	Manipulación y análisis de proteínas	195
6.6.1.	Extracción de proteínas	195
6.6.1.1.	Extracción de proteínas de líneas celulares para Western blot	195
6.6.1.2.	Extracción de proteínas de líneas celulares para Blue native-PAGE (BN-PAGE)	195
6.6.2.	Determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Bradford	196
6.6.3.	Electroforesis de proteínas	197
6.6.3.1.	Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	197
6.6.3.2.	Electroforesis de proteínas en geles no desnaturizantes (Blue Native-PAGE)	197
6.6.4.	Transferencia a membranas PVDF desde geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	198
6.6.5.	Inmunodetección de proteínas en membranas PVDF	198
6.6.5.1.	Incubación con anticuerpos primario y secundario	198
6.6.5.2.	Detección de proteínas	199
6.6.5.2.1.	Detección de proteínas mediante el método clásico	199
6.6.5.2.2.	Detección de proteínas mediante el sistema Odyssey®	199
6.6.5.3.	Reutilización de membranas	200
6.7.	Estudios funcionales del sistema de fosforilación oxidativa	200

6.7.1.	Determinación de la actividad enzimática de la Citrato Sintasa	200
6.7.1.1.	Preparación de las muestras	200
6.7.1.2.	Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa	200
6.7.2.	Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo IV de la cadena respiratoria (CIV)	201
6.7.2.1.	Preparación de las muestras	202
6.7.2.2.	Determinación de la actividad y cantidad de CIV	202
6.7.3.	Medida de la actividad de los complejos respiratorios en gel	203
6.7.4.	Determinación de niveles de ATP mitocondrial	203
6.7.5.	Consumo de oxígeno en células intactas	204
6.7.6.	Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante citometría de flujo	205
6.7.7.	Medida de la superficie de membrana interna mitocondrial mediante citometría de flujo	205
6.7.8.	Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo	206
6.8.	Análisis estadístico	206
7.	BIBLIOGRAFÍA	209
8.	ANEXOS	235

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La mitocondria, el sistema de fosforilación oxidativa y el genoma mitocondrial

1.1.1. La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en la mayoría de las células eucariotas, a excepción de los eritrocitos maduros, y cuya función principal es la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).

Las mitocondrias derivan de la endosimbiosis de una α -proteobacteria por una célula eucariota ancestral, una teoría ampliamente aceptada y que se refleja en la doble membrana que delimita el orgánulo: la membrana mitocondrial externa (OMM, del inglés *Outer Mitochondrial Membrane*) y la membrana mitocondrial interna (IMM, del inglés *Inner Mitochondrial Membrane*) (1). Estas membranas encapsulan el espacio intermembrana (IMS, del inglés *Intermembrane Space*) y la matriz mitocondrial donde se localiza el genoma mitocondrial (mtDNA), las proteínas implicadas en su replicación y transcripción, los ribosomas para la traducción, y otros elementos que participan en diferentes procesos metabólicos. La OMM presenta una estructura lisa, permeable al paso de metabolitos y proteínas de unos pocos miles de Daltons, receptora de rutas de señalización celular y donde la mitocondria establece contactos con otros orgánulos celulares como el retículo endoplasmático (ER), peroxisomas o la membrana plasmática. La IMM delimita la matriz mitocondrial y puede subdividirse en dos compartimentos: la membrana interna de unión (IBM, del inglés *Inner Boundary Membrane*) cercana a la membrana externa y en contacto con ella; y las crestas, invaginaciones de la membrana interna que aumentan la superficie donde se sitúan los elementos implicados en la respiración mitocondrial y la producción de ATP (2,3). La curvatura de las crestas estaría inducida y estabilizada por la propia dimerización/oligomerización de la ATP sintasa (4). Además, estas crestas se unen estrechamente a la IBM en las denominadas uniones de crestas (5,6).

El número de mitocondrias por célula, así como sus distribución, dimensiones y ultraestructura puede variar en función del tipo celular y los requerimientos energéticos (7,8). Se trata, por tanto, de un orgánulo muy dinámico que lleva a cabo procesos de fusión, fisión, biogénesis y degradación (mitofagia) para adaptar el contenido mitocondrial a las necesidades celulares (9). Además, pueden encontrarse aislados o formando una red estrechamente conectada con otros orgánulos celulares (10).

1.1.2. El Sistema OXPHOS: composición y función

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se localiza en las crestas de la membrana interna mitocondrial y es el responsable de dos procesos metabólicos acoplados: la respiración celular y la síntesis de ATP. Para llevarlos a cabo, el sistema se compone de los complejos respiratorios I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa), II (succinato deshidrogenasa), III (ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa) y IV (citocromo c oxidasa, COX), de dos transportadores móviles de electrones (citocromo c y coenzima Q) y de la ATP sintasa (o complejo V). Según el modelo de plasticidad, los complejos del sistema OXPHOS se pueden encontrar en forma de complejos individuales o de supercomplejos de diferente composición y estequiometría (11).

La nutrientes ingeridos en la dieta se procesan por el sistema digestivo y son liberados a los diferentes tejidos a través del torrente sanguíneo. Una vez en las células, los electrones son extraídos tras la oxidación de carbohidratos y ácidos grasos en el citosol, y convertidos en equivalentes de reducción (NADH y FADH₂) por las enzimas del ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial. Paralelamente, el oxígeno es inhalado por los pulmones y distribuido a las células de los distintos tejidos a través de la sangre.

Los equivalentes de reducción ceden los electrones a los complejos I y II del sistema OXPHOS respectivamente, y posteriormente, son transferidos mediante sucesivas reacciones de oxidación-reducción a los complejos III y IV, donde finalmente se ceden al oxígeno que se reduce a agua. La energía producida por el paso de electrones es empleada por los complejos I, III y IV para bombear protones (H⁺) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico que es aprovechado por la ATP sintasa para generar ATP (figura 1.1). Además, este gradiente permite que tengan lugar otros procesos como el importe de proteínas y Ca²⁺ en la mitocondria o la generación de calor (12,13). En el desarrollo de su actividad, los complejos I y III también generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar componentes celulares como el lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Se ha sugerido que los ROS podrían contribuir a enfermedades asociadas con la disfunción mitocondrial, alterando la homeostasis celular y su capacidad de proliferación y diferenciación (4).

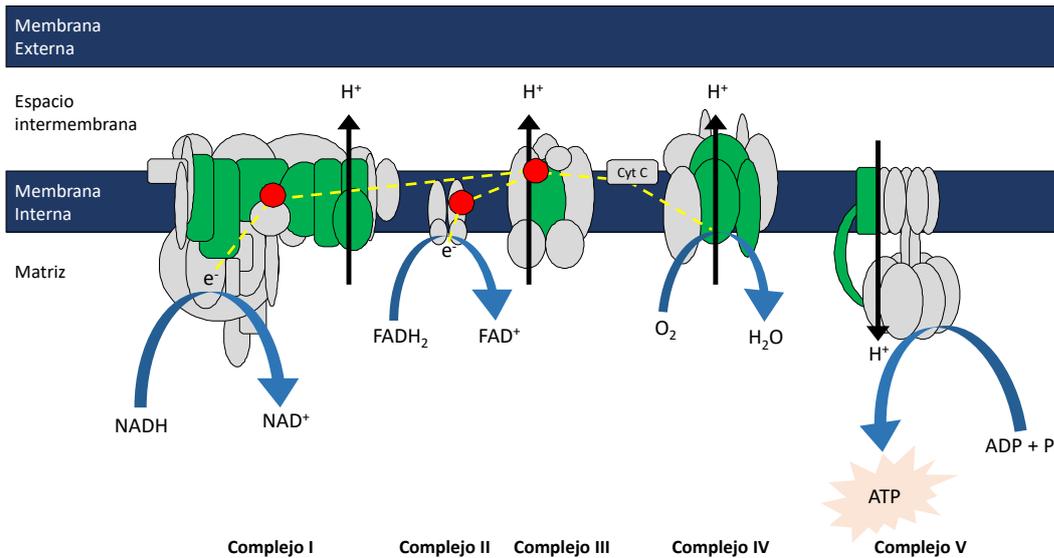


Figura 1.1 Representación esquemática del sistema OXPHOS. En la figura se observan los complejos de la cadena de transporte de electrones, el citocromo c, el coenzima Q10 (círculos rojos) y la ATP sintasa (se indican en gris, las subunidades codificadas por el genoma nuclear, y en verde, las codificadas por el mitocondrial). La línea discontinua amarilla marca el paso de electrones a través de los complejos. Las flechas negras señalan la dirección de salida de los protones al espacio intermembrana y de entrada por la ATP sintasa (complejo V). En la parte inferior se indica el nombre del complejo.

Aunque la producción de ATP es su función principal, la mitocondria y el sistema OXPHOS están implicados en gran cantidad de procesos metabólicos esenciales para la función celular como rutas de biosíntesis (nucleótidos, lípidos, ácido fólico, grupo hemo, entre otros), apoptosis, regulación de los niveles de metabolitos como aminoácidos o cofactores, metabolismo del hierro, homeostasis del calcio, etc. (4).

1.1.3. El DNA mitocondrial

Las mitocondrias son el único orgánulo de las células animales que contiene su propio DNA, característica probablemente derivada de su origen endosimbionte.

El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular de doble cadena, denominadas cadena pesada (H) y ligera (L), que en humanos consta de 16569 pares de bases (figura 1.2). Cada molécula codifica 37 genes que incluyen 22 tRNAs, 2 rRNAs (12S y 16S) y 13 polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones (ETC): 7 subunidades del complejo I (p.MT-ND1-ND6 y p.MT-ND4L), una del complejo III (p.MT-CYB), tres del complejo IV (p.MT-COI, p.MT-COII, p.MT-COIII) y dos del complejo V o ATP sintasa (p.MT-ATP6 y p.MT-ATP8) (14). El mtDNA es muy compacto, no dispone de histonas pero está organizado en estructuras denominadas nucleoides (15). Además, no contiene intrones por lo que los genes se encuentran uno a continuación del otro y apenas dispone de regiones no codificantes, siendo la principal la región *D-loop*, que tiene un papel importante en

la regulación de la replicación y la transcripción (16). El resto de las subunidades que componen los complejos de ETC están codificadas en el genoma nuclear (nDNA) y son importadas a la matriz mitocondrial. Por tanto, el funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) dependerá de la correcta coordinación en la expresión de ambos genomas.

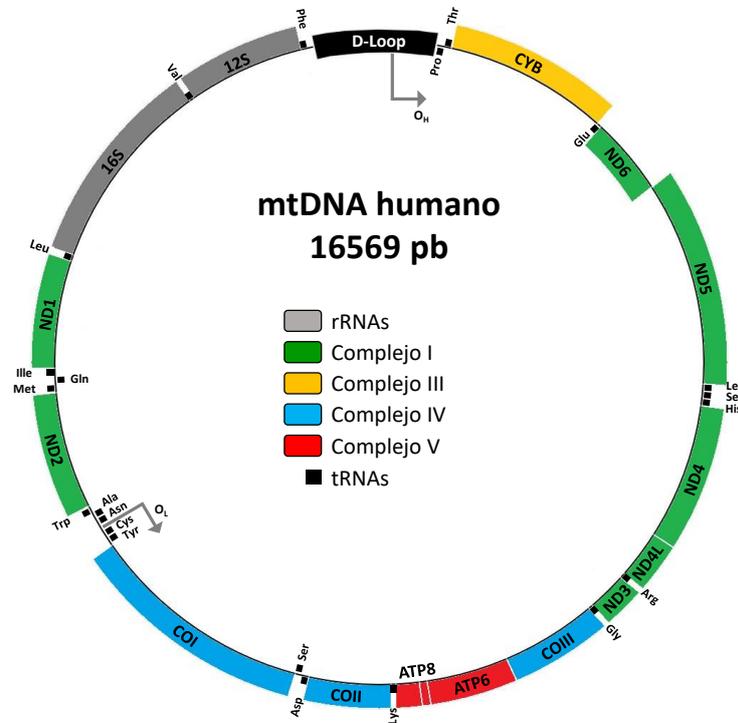


Figura 1.2 Mapa genético del mtDNA. Se indican los genes codificados en la cadena pesada (parte externa) y cadena ligera (parte interna). O_H y O_L señalan los orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera, respectivamente. rRNAs, RNAs ribosómicos. tRNAs, RNAs de transferencia.

1.1.3.1. Replicación y expresión del mtDNA

La replicación del mtDNA ocurre de forma independiente al ciclo celular ya que los niveles normalmente dependen de los requerimientos energéticos de la célula. Sin embargo, no se conocen los mecanismos específicos de regulación del número de copias de mtDNA (17).

Existen en la actualidad diferentes modelos para explicar la replicación del mtDNA. El de desplazamiento de hebra, propuesto en los años setenta, es el más aceptado (figura 1.3A) (18,19). Según este modelo, la replicación se produce de forma unidireccional, asimétrica y continua desde los orígenes de replicación de la cadena pesada (O_H), situado en la región *D-loop*, y de la cadena ligera (O_L). Otros modelos propuestos son el modelo de hebra acoplada, que considera que la replicación es bidireccional y simétrica, de manera que la síntesis de la hebra rezagada se produce mediante la incorporación de múltiples fragmentos de DNA (Figura 1.3B) (20); y el modelo RITOLS (del inglés, *ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand*),

según el cual la replicación sería unidireccional desde la región *D-loop*, mediante la incorporación de fragmentos de RNA a la hebra rezagada y su posterior conversión a DNA (figura 1.3C) (21). Se ha propuesto que estos dos últimos modelos podrían describir eventos interconectados dentro de un mismo proceso (22).

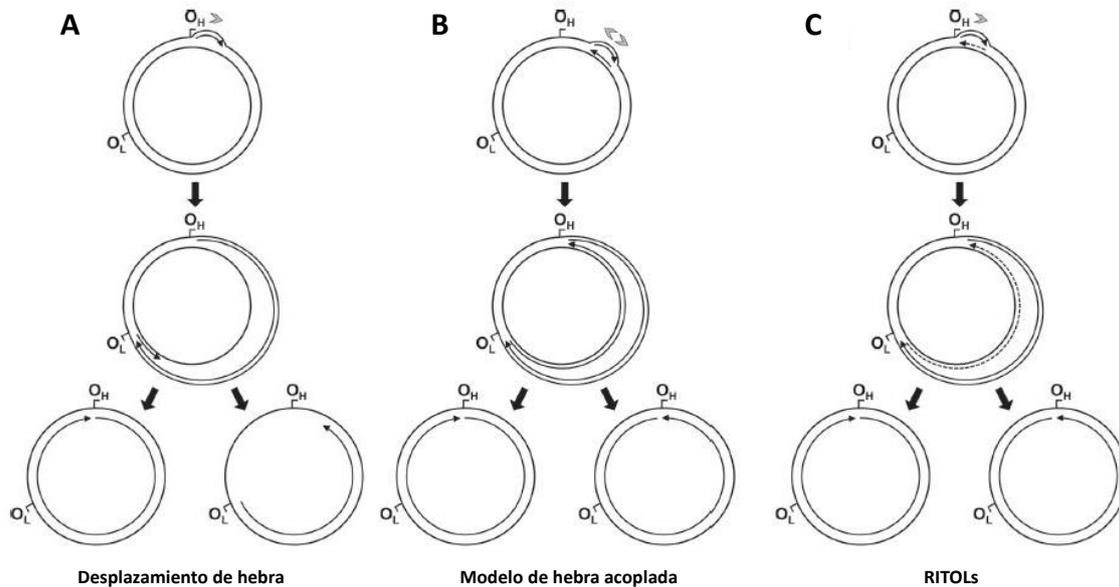


Figura 1.3 Modelos de replicación del mtDNA (figura adaptada de (22)). Se indican los orígenes de replicación (O_H y O_L), principalmente importantes en el modelo de desplazamiento de hebra, y la dirección de replicación (puntas de flecha). La flechas representan la síntesis de nueva cadena (de 5' a 3'), siendo la línea continua DNA y la línea discontinua RNA.

La polimerasa- γ (POLG) es la única DNA polimerasa presente en la mitocondria y es la encargada de generar las nuevas hebras de mtDNA, además de participar en los mecanismos de reparación. A medida que la helicasa TWINKLE desenrolla el mtDNA, la hebra pesada original desplazada se recubre de la proteína mtSSB (proteína de unión a hebra única mitocondrial) para evitar el inicio de la transcripción por parte de RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT) (figura 1.4). Según el modelo de desplazamiento de hebra, cuando POLG alcanza el origen de la cadena ligera (O_L), la secuencia monocatenaria se pliega formando una estructura que evita la unión de mtSSB y favorece la unión de POLRMT, que sintetiza un cebador de RNA como sustrato para la replicación de la cadena ligera por parte de POLG. Finalmente, la síntesis de ambas cadenas continua hasta que la molécula completa está replicada (17).

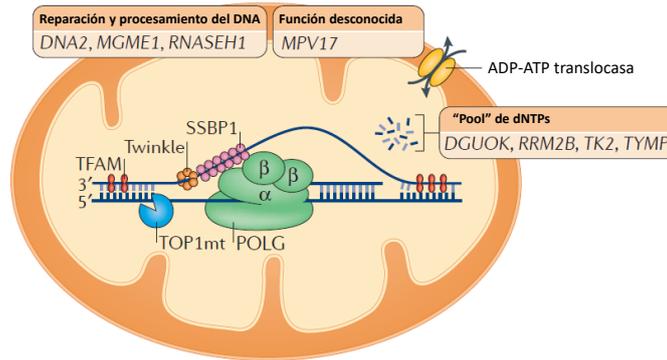


Figura 1.4 Mecanismo de replicación del mtDNA (figura adaptada de (23)). El replisoma mitocondrial se compone de la DNA polimerasa-γ (POLG), compuesta por la subunidad α catalítica y la subunidad β procesiva, la helicasa Twinkle y la proteína de unión a DNA de cadena única (mtSSBP1). El factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) desempeña una función similar a las histonas y la topoisomerasa I (TOP1mt) es la encargada de la rotura y unión de una hebra del DNA. La replicación del mtDNA también requiere un “pool” de nucleótidos (dNTPs).

El modelo de transcripción del mtDNA fue propuesto por Ojala, Montoya y Attardi en los años ochenta (16). Según este modelo, la transcripción se produce desde tres sitios de iniciación, generándose tres moléculas policistrónicas largas que se procesan por cortes endonucleolíticos delante y detrás de los tRNAs, dando lugar a los rRNA, tRNA y mRNA maduros. Para este mecanismo, son necesarias la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), dos factores de transcripción (TFAM y TFB2M), un factor de elongación (TEFM) y uno de terminación (MTERF).

Para la traducción de los mRNA mitocondriales, estos orgánulos disponen de un mecanismo propio. Los ribosomas mitocondriales se componen de dos subunidades (28S y 39S) formadas por rRNAs codificados en el mtDNA y proteínas codificadas en el genoma nuclear (24). Además, el código genético mitocondrial difiere del código universal, y requiere de un menor número de tRNAs (14).

1.1.3.2. Particularidades del mtDNA

El DNA mitocondrial presenta una serie de características especiales que lo diferencian del DNA nuclear. Una de ellas es la poliplasmia, es decir, la existencia de múltiples copias del genoma por mitocondria, y a su vez, múltiples mitocondrias por célula. Las poblaciones de mtDNA de una célula pueden ser genéticamente idénticas (homoplasmia) o, en presencia de mutaciones, pueden coexistir moléculas de mtDNA mutante y *wild-type* (heteroplasmia). La homoplasmia de algunas mutaciones, como las deleciones, resultan incompatibles con la vida. Asimismo, las moléculas de mtDNA segregan de forma aleatoria en la fisión de las mitocondrias y en la división celular, de manera que en presencia de una mutación en heteroplasmia, el fenotipo de las células hijas dependerá del porcentaje de mtDNA mutado que contengan. Además, el número

de copias de mtDNA varía según el tipo celular y sus requerimientos energéticos: mientras que células del tejido neuronal o muscular presentan miles de copias, en fibroblastos o células madre el número es mucho menor (25). Por tanto, el nivel umbral de heteroplasmia (proporción de moléculas de mtDNA mutado) a partir del cual aparece la clínica puede ser diferente entre mutaciones, e incluso, entre tejidos para la misma mutación (26).

A diferencia del genoma nuclear, el modo de herencia del mtDNA es exclusivamente materno. No obstante, estudios recientes han demostrado transmisión biparental del mtDNA sugiriendo que existen casos excepcionales en los que el mtDNA paterno también es heredado por la descendencia debido a fallos en los mecanismos de eliminación (27). Además, la herencia de mutaciones mitocondriales está sometida a un cuello de botella, ya que gran parte de las moléculas de mtDNA se degradan durante la maduración del ovocito, y posteriormente, durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (28). En el caso de las deleciones únicas, la aparición normalmente es esporádica y no serían heredadas, aunque se han descrito algunos casos de madres e hijos portadores (29).

Por otra parte, la tasa de mutación del mtDNA es muy superior a la del nDNA. Tradicionalmente, se ha considerado que esto se debía tanto a su localización en la matriz mitocondrial, donde la producción de ROS es constante, como por poseer mecanismos de reparación del DNA poco eficientes. Sin embargo, éstos no lo serían tanto ya que normalmente son capaces de mantener el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria a pesar del entorno hostil (30). El mecanismo de replicación asimétrico del mtDNA podría ser la causa del elevado número de mutaciones, a pesar de que la DNA polimerasa gamma (POLG) tiene una de las menores tasas de error de las polimerasas eucariotas (31,32).

Algunas mutaciones se producen en la línea germinal y se mantienen a lo largo del tiempo, dando lugar a nuevos fondos genéticos del mtDNA que constituirán los denominados haplogrupos. Cada uno se caracteriza por una determinada combinación de polimorfismos. En la actualidad se considera que todos se originaron a partir de un ancestro común denominado Eva mitocondrial y localizado en África. Los procesos de migración, evolución y adaptación a las condiciones ambientales y estilos de vida conducen a la generación de los distintos haplogrupos (33). De esta forma, las mutaciones que los definen pueden causar diferentes efectos en el sistema OXPHOS, por lo que es un parámetro a tener en cuenta en el estudio de patologías mitocondriales (34,35).

1.1.4. Homeostasis de la masa mitocondrial

Una célula sana regula de forma controlada la masa y la función mitocondrial en respuesta a cambios en el estado bioenergético, e intenta mantener unos niveles de mtDNA adecuados. Esta homeostasis mitocondrial requiere de la coordinación de procesos de generación de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial), degradación de las mitocondrias dañadas (mitofagia), y remodelación mediante procesos de fusión y fisión (9).

1.1.4.1. Biogénesis y mitofagia

Las células incrementan la masa mitocondrial en respuesta a una demanda energética provocada por procesos fisiológicos, como el ejercicio físico, o por el mal funcionamiento del sistema OXPHOS (36). Es un mecanismo complejo que requiere la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear para la regulación de diferentes procesos, como la síntesis de membrana mitocondrial interna y externa, la síntesis de proteínas mitocondriales codificadas en el mtDNA y en el nDNA, el importe a la mitocondria de éstas y la replicación del DNA mitocondrial (37). En este sentido, el incremento de copias de mtDNA podría ser un indicador de biogénesis mitocondrial (38).

Uno de los factores clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial es la familia de proteínas PCG-1 (*peroxisome proliferator-activated receptor y coactivator-1*). Concretamente, la isoforma PGC-1 α estimula la activación de diversos factores de transcripción nuclear como los NRFs (*Nuclear Respiratory Factors*) que finalmente inducen la expresión de TFAM, y por tanto, activan la replicación y transcripción de genes codificados en el mtDNA (9,39). Como consecuencia, los niveles de transcritos y proteínas mitocondriales aumentan para generar nuevas mitocondrias funcionales que incrementen la capacidad de fosforilación oxidativa de las células. Este mecanismo de compensación se ha descrito en algunas patologías mitocondriales, como la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) o cardiomiopatías (40–42).

Por otro lado, también existen mecanismos de control para eliminar mitocondrias dañadas y regular el número de orgánulos según las condiciones fisiológicas. Esta autofagia selectiva se denomina mitofagia y está implicada, entre otros procesos, en la degradación de las mitocondrias paternas tras la fecundación del óvulo, en la diferenciación celular, en la respuesta a la ausencia de oxígeno, o en la eliminación de mitocondrias con mutaciones patológicas en el mtDNA (43,44). El reconocimiento de las mitocondrias defectuosas por parte del autofagosoma se produce mediante la familia de proteínas LC3 (*Microtubule-associated protein 1 light chain 3*)

(45). La mitofagia desempeñaría un papel fundamentalmente protector, aunque podría llegar a ser perjudicial en caso de una excesiva fragmentación mitocondrial (46).

Tal es la importancia fisiológica de estos procesos que los compuestos potenciadores de la biogénesis mitocondrial o reguladores de la mitofagia se han convertido en nuevas estrategias de terapia y tratamientos frente a enfermedades en las que la función OXPHOS está afectada, como las enfermedades neurodegenerativas (9,46,47).

1.1.4.2. Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que experimentan constantes cambios de forma a nivel macro y ultraestructural, directamente asociados con su función bioenergética (48). Las mitocondrias pueden aparecer aisladas en forma esférica o tubular, corta o alargada, o constituir una red interconectada (49). Esta dinámica mitocondrial está controlada por los procesos de fisión y fusión, regulados por una familia de proteínas GTPasas llamadas DRPs (*dynamin related proteins*) (48).

La fisión mitocondrial requiere de la división de las membranas mitocondriales interna y externa. Este proceso se iniciaría con la constricción de la mitocondria por parte del retículo endoplasmático (RE) y la polimerización de actina, que permitiría el reclutamiento de DRP1 (*dynamin related protein 1*) del citosol, y otros factores implicados en la fisión, para acabar provocando la partición del orgánulo mediante la hidrólisis de GTP (48). Además, la replicación y segregación del mtDNA podrían estar asociadas a la fisión mitocondrial, ya que se ha observado que los nucleoides de mtDNA tienden a localizarse cerca de los puntos de contacto entre la mitocondria y el RE (50). Por otro lado, la fisión mitocondrial resulta esencial para la mitofagia y la apoptosis celular (2).

En cambio, la fusión implica la unión de dos mitocondrias en un proceso dependiente de dos mitofusinas y de la proteína OPA1 (proteína de atrofia óptica 1), localizadas en la membrana mitocondrial externa e interna, respectivamente. El proceso se inicia con la interacción entre las mitofusinas MFN1 de dos mitocondrias, que mediante hidrólisis de GTP, inducen un cambio conformacional que facilita la unión de las membranas externas. Finalmente, la proteína OPA1 media la combinación de las membranas internas para completar la fusión (2,48). Además, la presencia de fosfolípidos como el ácido fosfatídico (PA) o la cardiolipina en las membranas mitocondriales, podría tener un papel importante en la regulación de la fusión de la membrana externa e interna, respectivamente (51).

De forma independiente, la proteína OPA1 también funciona como reguladora del remodelamiento ultraestructural de las crestas, junto con el dominio F₀ de la ATP sintasa y el complejo proteico MICOS (*mitochondrial contact site and cristae junction organizing system*) (48). En 1966, Hackenbrock describió por primera vez que las crestas modificaban su forma durante la respiración mitocondrial (8). Actualmente, se sabe que este fenómeno ocurre en respuesta a cambios en la demanda energética de las células o a condiciones de estrés metabólico como hipoxia, aumento de ROS o la privación de glucosa, incluso induciendo la apoptosis (48).

1.2. Papel de la mitocondria en la reprogramación, pluripotencia y diferenciación

El metabolismo aeróbico basado en la fosforilación oxidativa es la principal fuente de energía de las células somáticas adultas, por el contrario, las células madre pluripotentes (PSC) son principalmente glucolíticas (52). Aunque es un mecanismo menos eficiente en la generación de energía, la glucólisis es un proceso más rápido y reduce la producción de ROS evitando el daño oxidativo de proteínas, lípidos y DNA, haciendo a las células capaces de resistir a la senescencia y el envejecimiento dependiente de los telómeros (53). Además, aporta cofactores y sustratos esenciales para mantener las demandas bioenergéticas y de proliferación de las células madre pluripotentes (54).

Durante el proceso de reprogramación de células somáticas adultas a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), se produce una transición del metabolismo oxidativo al metabolismo glucolítico (figura 1.5) (55). A nivel estructural, las mitocondrias experimentan un importante cambio hasta presentar una morfología mitocondrial inmadura con forma globular o esférica, crestas poco desarrolladas y localización perinuclear; algo también observado en otras células madre como las hematopoyéticas o las mesenquimales (53,54). El cambio metabólico se manifiesta en una elevada utilización de la glucosa, así como una acumulación de glucosa-6-fosfato, acetato y lactato (53,55). Por otra parte, el consumo de oxígeno de las células madre pluripotentes es muy reducido y se considera que su tasa de respiración es máxima al no aumentar en respuesta a una droga desacoplante (53). En comparación con los fibroblastos parentales, las iPSCs experimentan una disminución de la expresión de subunidades del complejo I y un aumento de la expresión de enzimas glucolíticas (52,55). Este descenso en la función del complejo I impediría el correcto acoplamiento entre el metabolismo oxidativo y la generación de ATP, reduciendo el consumo de oxígeno (55). Curiosamente, se ha observado que procesos que favorecen la glucólisis, como la hipoxia, podrían aumentar la eficiencia de la reprogramación (56).

A pesar de su perfil metabólico, las células madre pluripotentes presentan complejos respiratorios activos y funcionales (54), incluso se ha observado un aumento de la expresión de los complejos II y V en algunos casos, y experimentan una hiperpolarización de la membrana mitocondrial (53). Estos parámetros revelan un posible mecanismo preparativo de respuesta ante un estímulo que requiera mayor demanda energética, como la diferenciación celular (53).

Por otra parte, las células madre llevan a cabo un estricto control del número de copias de mtDNA durante el estado de pluripotencia y diferenciación (57). De hecho, durante el desarrollo embrionario experimentan un restablecimiento de los niveles de mtDNA alcanzando un número de copias muy bajo. En el caso de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), la reprogramación completa y la correcta co-expresión de los factores Oct-4, SOX-2 y NANOG, que determinan la pluripotencia, se consideran requisitos necesarios para conseguir llevar a cabo ese proceso (33,57).

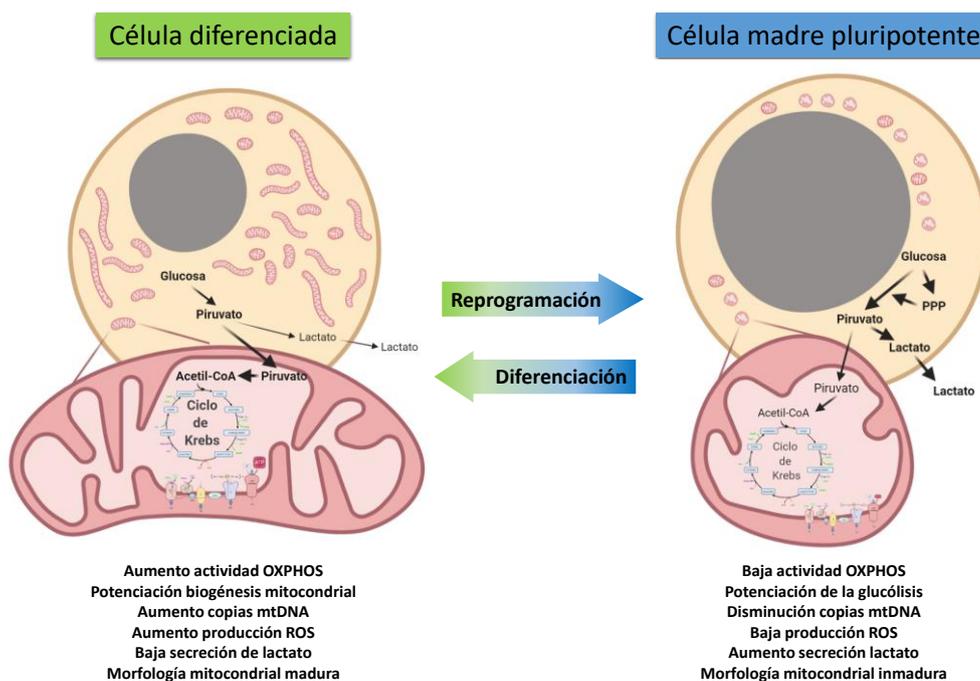


Figura 1.5 Transición metabólica y cambios en la morfología mitocondrial observados entre células madre pluripotentes y células diferenciadas. PPP, ruta de las pentosas fosfato. Figura creada con BioRender.com.

El proceso de diferenciación también requiere de la remodelación de la red mitocondrial y el sistema bioenergético en una transición del metabolismo glucolítico hacia la fosforilación oxidativa (figura 1.5). Las células diferenciadas necesitan mayor producción energética para mantener sus funciones pero presentan una menor capacidad de proliferación. En general, aumentan las copias de mtDNA, la masa mitocondrial, el consumo de oxígeno, los ROS, y la expresión de genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria y del ciclo de Krebs.

Además, las células modifican la estructura mitocondrial alcanzando una morfología más madura (58).

1.3. Enfermedades mitocondriales

Las patologías mitocondriales están originadas por un déficit de ATP provocado por el mal funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Este defecto del metabolismo mitocondrial puede estar causado por mutaciones en genes mitocondriales o nucleares que codifican para alguna de las subunidades de los complejos multienzimáticos y componentes del sistema OXPHOS. Puesto que las mitocondrias están presentes en todos los tejidos y órganos, estas enfermedades suelen ser multisistémicas y dan lugar a un amplio espectro de fenotipos, con síntomas que en ocasiones se solapan.

En concreto, las enfermedades causadas por alteraciones en el mtDNA pueden dividirse en tres grupos según estén asociadas a deleciones, a depleción (disminución del número de copias) o a mutaciones puntuales, ya sea en genes codificantes de proteínas, como la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), el síndrome de NARP (neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria) o el síndrome de Leigh, en tRNAs, como el síndrome de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares) o el síndrome de MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas), o en rRNAs, como la sordera neurosensorial. (59). Puesto que las enfermedades causadas por deleciones en el mtDNA han sido objeto de estudio en esta tesis, se describen en profundidad a continuación.

1.4. Patologías causadas por deleciones únicas en el mtDNA

Las deleciones grandes y únicas del DNA mitocondrial son una causa común de disfunción mitocondrial en adultos, y origina síndromes congénitos graves como el síndrome de Pearson (PS), Kearns-Sayre (KSS) o la oftalmoplejía crónica progresiva externa (CPEO). Estas deleciones conllevan la pérdida de tRNAs, rRNAs y mRNA codificantes de proteínas de los complejos del sistema OXPHOS por lo que sus consecuencias suelen ser muy graves.

1.4.1. Clasificación de las deleciones

En la base de datos de MITOMAP se recogen 157 entradas de deleciones únicas en el mtDNA, que van implicadas desde 4 hasta 10987 pares de bases (60). La deleción más frecuente afecta a 4977 pares de bases, desde la posición 8469 hasta la 13447, está flanqueada por una secuencia de repetición directa de 13 pares de bases y se denomina “deleción común”.

En base a las secuencias flanqueantes, las deleciones en el mtDNA se pueden clasificar en tres clases: de clase I, suponen un 60 % de los casos y son aquellas que están flanqueadas por secuencias de repetición cortas y directas, de entre 4 y 13 pb; de clase II, son el 30 % y están flanqueadas por secuencias de repetición imperfectas; y de clase III, que no estarían flanqueadas por ninguna secuencia de repetición (17). Las secuencias de repetición se distribuyen de manera uniforme a lo largo del genoma mitocondrial, por lo que podrían no ser la causa primigenia de la formación de una deleción (61). Además, un estudio realizado en 67 pacientes de edades muy diversas y portadores de distintas deleciones, reveló un aumento de la homología de secuencia en los puntos de inducción de las deleciones, independientemente de si éstas estaban flanqueadas o no por secuencias de repetición (62).

1.4.2. Mecanismos moleculares para explicar el origen de las deleciones

A pesar de que los mecanismos moleculares que explican la formación de moléculas de mtDNA delecionadas son aún desconocidos, se han propuesto diferentes modelos.

La formación de deleciones flanqueadas por secuencias de repetición (de clase I y II) podría explicarse con el modelo de deslizamiento de la replicación propuesto por Shoffner en 1989 (figura 1.6A) (63). Cuando la hebra pesada parental es cadena única durante la replicación, una de sus secuencias de repetición hibridaría con una secuencia homóloga de la cadena ligera formando un pliegue. Al producirse una rotura en la hebra pesada, el propio mecanismo de replicación la extendería y ligaría, siguiendo la hebra ligera como molde, y degradaría el fragmento cortado, generando finalmente una molécula completa y otra delecionada.

Recientemente, se ha propuesto otro modelo de formación de deleciones basado en la síntesis de la cadena ligera durante la replicación del mtDNA (figura 1.6B) (64). En este caso, un pliegue formado en la cadena pesada parental favorecería que la DNA polimerasa se disociara e hibridara de nuevo en otra región más avanzada, de modo que parte de la secuencia se perdería y se generaría una molécula completa y otra delecionada.

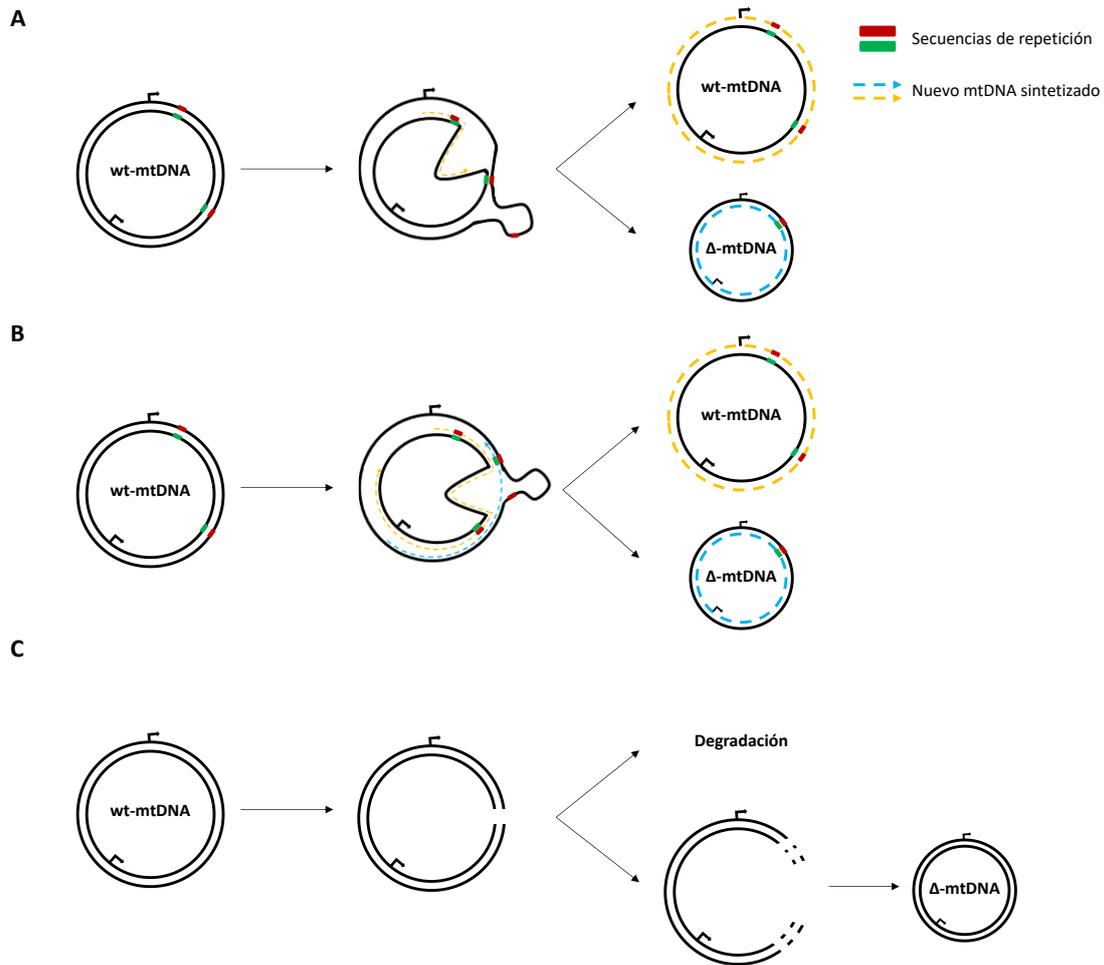


Figura 1.6 Modelos para explicar la formación de una deleción en el mtDNA (figura basada en (17)). A) Modelo de deslizamiento de la replicación. B) Modelo de recombinación en la síntesis de la hebra ligera. C) Modelo de formación tras la rotura de doble hebra y degradación incompleta de la molécula lineal.

Sin embargo, estas teorías no explicarían la formación de deleciones no flanqueadas por secuencias de repetición (clase III). Para éstas, se ha propuesto que la causa pudiera ser la aparición de roturas de doble hebra (DSBs) en el mtDNA junto con fallos en la maquinaria de reparación (figura 1.6C). Estas roturas serían consecuencia de la exposición del mtDNA a agentes externos, como la radiación UV, o agentes endógenos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por las propias mitocondrias. Cuando una molécula de mtDNA sufre una DSB, normalmente es degradada por nucleasas y miembros del replisoma como POLG, MGME1 o TWINKLE, que además replican moléculas completas para restablecer el número de copias. Este proceso podría ocurrir en aproximadamente 2 horas tras la DSBs. Sin embargo, si este sistema fallara, provocaría que las moléculas parcialmente degradadas se ligaran de nuevo, generándose nuevos mtDNAs de diferente tamaño (17,65–67).

1.4.3. Relación entre el fenotipo y la localización y el tamaño de la deleción

La relación entre una mutación patológica en el mtDNA y el fenotipo que genera no suele ser sencilla: distintas mutaciones pueden generar una sintomatología similar o el mismo defecto genético puede conllevar manifestaciones clínicas diferentes. Estudios funcionales han revelado que defectos bioquímicos que afectan a un determinado complejo de la cadena espiratoria provoca diferentes manifestaciones clínicas en pacientes para una misma mutación, o incluso entre distintos tejidos de un mismo paciente (68). Por tanto, factores como la localización o el tamaño de la deleción, la segregación mitótica y la diferente expansión clonal en células mitóticas y postmitóticas del mtDNA delecionado, la replicación relajada, los requerimientos energéticos específicos de cada tejido, o incluso los haplotipos del genoma mitocondrial y nuclear, podrían influir en el fenotipo que causa una deleción en el mtDNA (69).

La mayoría de las deleciones se localizan en el arco mayor del mtDNA, entre los orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera, de manera que las moléculas delecionadas son capaces de mantener su capacidad de replicación (69). El extremo 5' de las deleciones suele situarse entre la posición 8000 y 9000, mientras que el extremo 3' se suele localizar entre la posición 16000 y 16100, adyacente a una señal de parada implicada en la finalización de la síntesis de la región *D-loop* de la cadena pesada y con posibilidad de formar estructuras en horquilla. Las deleciones no asociadas a secuencias flanqueantes tienden a finalizar en esta región. Es poco frecuente que el O_L se vea implicado en la deleción, únicamente se han detectado bajos niveles en tejidos postmitóticos o en asociación con duplicaciones del mtDNA (61). Las duplicaciones se suelen originar por la unión de una molécula de mtDNA completa con una delecionada, por lo que, al codificar al menos una copia de todos los genes mitocondriales, no tendrían consecuencias patológicas graves (70). No obstante, las moléculas de mtDNA duplicado podrían ser transmitidas de madres a hijos y provocar la aparición de deleciones en ellos (71).

Las deleciones más grandes normalmente se asocian con una mayor severidad de la enfermedad y un debut más temprano de los síntomas (72). En un estudio realizado con 136 pacientes japoneses observaron que los pacientes con fenotipo de KSS tendían a presentar deleciones más grandes que pacientes con CPEO (73). Sin embargo, esto no fue detectado en análisis realizados por otros autores (62,74,75).

A pesar de que no existen evidencias claras de correlación positiva entre la naturaleza de una deleción y sus consecuencias bioquímicas, se ha propuesto que la implicación de determinadas zonas del mtDNA en una deleción conlleva consecuencias patológicas más graves. En un estudio

con 23 pacientes portadores de deleciones únicas en el músculo, observaron que el umbral de deficiencia de los complejos I y IV era diferente y dependía de los genes implicados en la deleción. Aquellos pacientes que presentaban mayor caída de actividad del complejo IV, tenían afectados los tres genes de COX y el umbral de heteroplasmia para el que se observaba deficiencia de este complejo resultaba más bajo que para el complejo I. En cambio, los pacientes que experimentaban mayor caída de actividad del complejo I, no presentaban ningún gen COX delecionado y el umbral de heteroplasmia a partir del cual se observaba defecto en la actividad del complejo I era menor que para el complejo IV (76). En otro metaanálisis de 313 deleciones, López-Gallardo *et al.* observaron que los pacientes con KSS, un fenotipo muy grave, tenían el gen *MT-CYB* más frecuentemente delecionado que los pacientes con CPEO (77). En este sentido, Grady *et al.* propusieron que la implicación de este gen en una deleción podría ser un marcador indicativo del progreso más acelerado de la enfermedad (72). En cambio, en el estudio realizado con pacientes japoneses, encontraron que aquellos que tenían implicados los genes COX o las subunidades de las ATPasa en la deleción, habían experimentado un debut de los síntomas más temprano que pacientes en los que la deleción únicamente afectaba a una región de genes del complejo I o del citocromo b, o a ambos (73).

Por otra parte, la región del genoma que codifica el gen *MT-ND4*, y en parte *MT-ND5*, parece ser la más frecuentemente afectada por las deleciones. En base a esto, se ha propuesto que estos genes podrían participar en un mecanismo de regulación por retroalimentación de la replicación del mtDNA, de modo que, en su defecto, las moléculas delecionadas se expandirían clonalmente gracias a una replicación descontrolada (74).

1.4.4. Expansión clonal y segregación mitótica de las deleciones

El momento del desarrollo en el que se origina la deleción puede ser un factor determinante en el fenotipo final (77). Si la heteroplasmia es especialmente alta en múltiples tejidos de un paciente joven se considera que la deleción ocurrió pronto en el desarrollo y se expandió de forma clonal (71). Además, en el caso de los síndromes de Pearson y Kearns-Sayre que presentan afectación multiorgánica, la deleción estaría presente ya en el ovocito o se produciría antes de la diferenciación a las tres capas embrionarias; mientras que en CPEO, la deleción aparecería durante el proceso de diferenciación de las células musculares progenitoras, por lo que únicamente este tejido se vería afectado (77).

En este sentido, tanto mutaciones puntuales como deleciones en el mtDNA tienden a acumularse en tejidos postmitóticos de pacientes, como el músculo (78), e incluso de personas sanas

durante el envejecimiento. De hecho, se ha considerado una posible causa del mismo al provocar una disfunción mitocondrial progresiva (67,79,80). Es habitual detectar la delección común en la piel de personas de avanzada edad, especialmente mayores de 70 años y que han experimentado una mayor exposición al sol (81). También se ha demostrado un aumento de mutaciones y deleciones en el genoma mitocondrial de neuronas de la sustancia negra de individuos con enfermedad de Parkinson (82).

La expansión clonal del mtDNA delecionado en estos tejidos podría deberse a la ventaja replicativa de las moléculas más pequeñas con respecto a las completas. Esto se ha descrito tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* con modelos portadores de delección en el mtDNA (83,84). Sin embargo, otros autores como Campbell no apoyan esta teoría, ya que no observaron diferencias significativas al comparar el ratio de expansión clonal en fibras musculares de moléculas de mtDNA de diferente tamaño, portadoras de distintas deleciones (78). También se han propuesto otros modelos para explicar la expansión clonal de las moléculas delecionadas, como la teoría de “la supervivencia del más lento” (del inglés, *survival of the slowest*) que sugiere que en presencia de mutaciones, la capacidad respiratoria de las mitocondrias se vería considerablemente reducida, provocando una menor producción de ROS y menor daño en la membrana interna, por lo que escaparía de la degradación por mitofagia y se acumularía (85). Otros modelos consideran que los aspectos particulares de la maquinaria de replicación también podrían estar detrás de la expansión de las moléculas de mtDNA delecionadas. Como ya se ha comentado previamente, la replicación del mtDNA está estrechamente ligada a la transcripción, ya que la DNA polimerasa requiere de un cebador de RNA para iniciar la síntesis de DNA. En base a esto, la replicación del mtDNA podría regularse por un mecanismo de retroalimentación de manera que la transcripción se reduciría si los niveles de proteínas fueran adecuados y, con ella la replicación. En presencia de una delección en el mtDNA, las células no lograrían alcanzar niveles suficientes de proteínas de los genes implicados en ella y la replicación se produciría de forma continua. Por ende, en un intento de recuperar niveles normales de mRNA y proteínas mitocondriales, las moléculas delecionadas se amplificarían y transcribirían, y el efecto patológico sería cada vez mayor (74,86).

Por el contrario, mientras las deleciones se acumulan en tejidos postmitóticos, éstas tienden a desaparecer en células proliferativas. Esto sugiere que estas células serían más susceptibles a los efectos negativos de la disfunción mitocondrial, por lo que serían progresivamente eliminadas por apoptosis. También podría deberse a que la tasa de división de las células con alta carga de mutación es más lenta (15,87). Este fenómeno explicaría que la anemia

sideroblástica normalmente remita en pacientes con síndrome de Pearson, que dejan de requerir transfusiones de sangre con el tiempo (88). No obstante, otras mutaciones puntuales heteroplásmicas, como la m.8344 A>G, no experimentan una reducción en células sanguíneas con la edad (15). Además, en un estudio realizado en el año 2017 con células madre pluripotentes inducidas portadoras de mtDNA deleciónado, Russel *et al.* describieron que se producía una expansión clonal de éste en algunos clones de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), resultados contradictorios a los descritos previamente por Cherry *et al.* (84,89).

Además de la expansión clonal, la redistribución aleatoria de las mitocondrias en los diferentes ciclos de división celular provoca que la proporción de mtDNA mutante en las células hijas se modifique. Esta segregación mitótica puede favorecer la acumulación de las moléculas mutadas en un determinado tejido e inducir la aparición del fenotipo cuando se supera un determinado umbral de heteroplasmia (90).

1.4.5. Umbral patológico de la deleciones

Como se ha descrito previamente, el número de copias de mtDNA y los requerimientos energéticos difieren según el tipo celular, por lo que el nivel umbral de heteroplasmia (proporción de moléculas de mtDNA mutado) a partir del cual aparece la clínica puede ser diferente entre tejidos para una misma mutación (figura 1.7) (25,26). A nivel bioquímico, el sistema OXPHOS no se encuentra en el mismo estado de actividad en todos los tipos celulares. La organización de los complejos y la capacidad de respuesta de un tejido una demanda energética puede compensar el efecto de una mutación y por tanto, modificar el umbral patológico (68).

En concreto, el umbral patológico de las deleciones se ha situado en torno al 60 %, si bien este porcentaje parece variar según el parámetro analizado y el tipo celular (91). Por ejemplo, se ha observado como la actividad del complejo IV se reducía significativamente en músculo de pacientes KSS con un 72 % de heteroplasmia, mientras que el consumo de oxígeno en cíbridos con un 65 % de la misma deleción solo disminuía ligeramente (92). A nivel de la traducción, se ha descrito que la síntesis de proteínas mitocondriales se bloquea con un 40 % de porcentaje de deleción, seguramente debido a que tanto RNAs codificantes de subunidades proteicas como rRNAs y tRNAs, se ven afectados (91). En cambio, otros autores no reportaron una afectación grave de la síntesis de proteínas mitocondriales en cíbridos portadores de deleción. Esto podría deberse a que este tipo celular presenta un elevado número de copias de mtDNA, tanto de

moléculas completas como delecionadas, y sería capaz de conseguir unos niveles de tRNAs cercanos a los normales (92). Por otro lado, en estudios realizados con ratones portadores de una deleción en el mtDNA, se observó que el fenotipo KSS comenzaba a manifestarse cuando el nivel de heteroplasmia superaba el 70-80 % en varios tejidos (93).

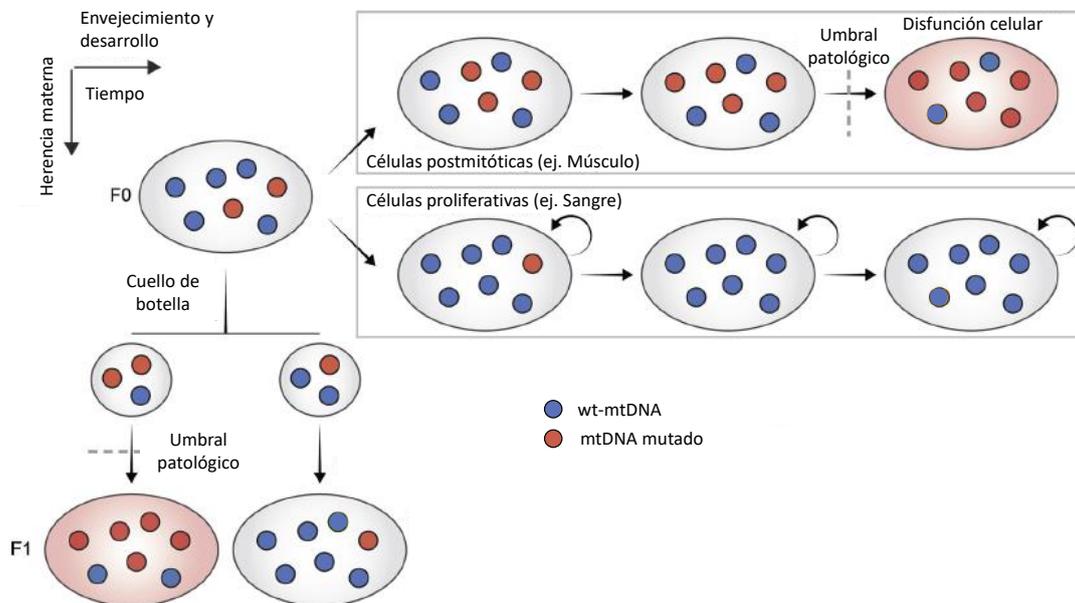


Figura 1.7 Representación del cambio de heteroplasmia en el tiempo (figura adaptada de (15)).

1.4.6. Fisiopatología celular de las deleciones

Las enfermedades mitocondriales son consecuencia de un defecto en el sistema OXPHOS y por tanto, de un déficit de ATP. Un fallo en la cadena transportadora de electrones, provocado por una mutación en el mtDNA o en genes nucleares, provocará una alteración del flujo de electrones que dificultará la generación de un correcto potencial de membrana para la síntesis de ATP y, por tanto, disminuirá el consumo de oxígeno. En el caso de deleciones, la cadena respiratoria se encuentra gravemente truncada debido a la pérdida de un gran número de tRNAs y genes codificantes de subunidades de los complejos del sistema OXPHOS. Este efecto se ha reflejado en diferentes estudios *in vitro* realizados con cíbridos portadores de la deleción común en los que se observó una importante caída del potencial de membrana, del consumo de oxígeno y de los niveles de ATP (94,95). Además, en fibroblastos derivados de un paciente con síndrome de Pearson también se observó una importante disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa (96).

Aunque los ROS son un producto principal del metabolismo oxidativo mitocondrial, el mal funcionamiento del sistema OXPHOS puede provocar un incremento de su producción e inducir

un importante daño oxidativo (97,98). Este aumento se ha descrito en líneas celulares portadoras de mutaciones en diferentes genes mitocondriales, como en *MT-ATP6* (99), y de grandes deleciones. Por ejemplo, en una comparativa realizada entre un híbrido portador de la deleción común y una línea *wild-type*, se observó un ligero incremento de los niveles basales de ROS en las células mutantes, y un importante aumento tras la adición de H₂O₂ (100).

Además, las células disponen de diferentes estrategias de control de calidad como mecanismos de defensa frente al mal funcionamiento del sistema OXPHOS. Algunos de ellos son la inducción de mitofagia, la remodelación de la red mitocondrial o la respuesta de proteínas desplegadas (UPR^{mt}) (101). Asimismo, la disminución de ATP mitocondrial por causas fisiológicas o patológicas también puede ser compensada por un aumento de la glucólisis (102). Por otro lado, el volumen de la masa mitocondrial también se incrementa como mecanismo compensatorio de biogénesis mitocondrial en algunas patologías mitocondriales. Es frecuente observar un incremento de fibras rojo rasgadas, ricas en mitocondrias, en biopsias musculares de pacientes con patologías mitocondriales como el síndrome de Kearns-Sayre o CPEO (103).

A nivel molecular, una de las estrategias de compensación celular en respuesta a una mutación en heteroplasmia es la generación de nuevas copias de mtDNA, en un intento de alcanzar los niveles mínimos necesarios para el desarrollo de una función normal. Este aumento de las moléculas de mtDNA inducirá un incremento de los niveles de transcritos y proteínas de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS. Para ello, es necesaria la activación de genes codificados a nivel nuclear implicados en la replicación, la transcripción y la traducción del mtDNA, como POLG o TFAM, mediante los factores de regulación de la familia PGC-1 (104). En el caso de las patologías causadas por deleciones, la preferente expansión clonal de las moléculas de mtDNA de menor tamaño podría dificultar esta compensación. Sin embargo, en otros síndromes como LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber) se ha observado que una mayor capacidad para incrementar los niveles de mtDNA e inducir biogénesis mitocondrial puede provocar que un paciente portador de una mutación manifieste el fenotipo o no (40,105).

A nivel estructural, como ya se ha comentado previamente, las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que adaptan su morfología y ultraestructura al metabolismo. Asimismo, las mitocondrias tubulares y alargadas se consideran bioenergéticamente más eficientes. En cambio, cuando presentan una ETC deficiente, por ejemplo por la presencia de una mutación en el mtDNA, tienden a fusionarse con otras mitocondrias sanas pudiendo generar mitocondrias de mayor tamaño, o cuando se induce apoptosis por un daño excesivo, tienden a fisionarse generando mitocondrias fragmentadas (2,106). En condiciones patológicas, también se altera la

ultraestructura de las crestas distribuyéndose en la zona periférica, formando estructuras circulares, o incluso desapareciendo casi completamente en algunas mitocondrias (106). De hecho, diferentes análisis de la ultraestructura mitocondrial en muestras de pacientes y en líneas celulares portadoras de mutaciones en el mtDNA, incluidas las deleciones, han revelado la presencia de mitocondrias hinchadas, con una distribución concéntrica de las crestas, formando estructuras cristalinas rígidas y con numerosos agregados de diferente electro-densidad (107–111).

1.5. El síndrome de Pearson y otras patologías causadas por deleciones en el DNA mitocondrial

El síndrome de Pearson (PS, del inglés *Pearson Syndrome*, OMIM 557000) es una enfermedad mitocondrial con afectación multisistémica, pero principalmente caracterizada por anemia sideroblástica y disfunción del páncreas exocrino. Fue descrita por primera vez en 1979 por Pearson (112), pero fue diez años después cuando Rotig *et al.* descubrieron la presencia de una deleción en el mtDNA de un paciente, corroborando la implicación del fallo mitocondrial (113). Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en todos los tejidos, a excepción de los eritrocitos maduros, lo que explica que la mayoría de las enfermedades mitocondriales, como el síndrome de Pearson, presenten una clínica multisistémica y muy heterogénea.

1.5.1. Epidemiología

La prevalencia de las enfermedades mitocondriales es de 1 caso por cada 5000 recién nacidos y de 5 a 15 casos por cada 100 000 individuos adultos (88,114,115), mientras que para las deleciones únicas y grandes en el mtDNA es de 1 por cada 100 000 (114,116). En el caso del síndrome de Pearson, se ha estimado una incidencia de un afectado por cada millón de habitantes en Italia (88). Sin embargo, al compartir características clínicas con otras anemias congénitas, el número de afectados podría ser mayor (117).

1.5.2. Aspectos clínicos del síndrome de Pearson

El periodo prenatal y el parto suelen ser normales en pacientes con síndrome de Pearson, aunque se han descrito algunas complicaciones por citopenia severa o acidosis metabólica. Normalmente, la enfermedad debuta con alteraciones hematológicas, habitualmente anemia en el periodo neonatal o en la lactancia, aunque se han descrito casos de inicio hasta los dos años. Los pacientes afectados dependen de transfusiones de sangre. Se suele detectar un elevado número de reticulocitos y trombocitopenia, además de neutropenia. La médula ósea de

los pacientes muestra vacuolización de precursores mieloides y eritroides, y un elevado porcentaje de sideroblastos en anillo, con depósitos de hierro localizados en las mitocondrias perinucleares detectados mediante tinción de Perls (figura 1.8). La insuficiencia pancreática exocrina es otro de los síntomas más frecuentes observados en pacientes con síndrome de Pearson. Está causada por fibrosis, infiltración de ácidos grasos, microquistes y dilatación de los ácinos, y conlleva problemas de malabsorción, esteatorrea y diarrea (88). También se ha descrito diabetes en algunos casos (118,119). A nivel neurológico, el desarrollo es normal tras el nacimiento pero la afectación tiende a aparecer de forma súbita e inesperada. La mitad de los enfermos desarrollan problemas neurológicos y neuromusculares como hipotonía, retraso del desarrollo, ataxia y convulsiones. Otros síntomas observados en pacientes con síndrome de Pearson son hepatomegalia, esplenomegalia, cardiomiopatías y afectación de la piel. También es frecuente observar retraso en el crecimiento sin microcefalia y alteraciones metabólicas como acidosis láctica (88). La mayoría de los pacientes con síndrome de Pearson (PS) suelen fallecer en los primeros años de vida, pero aquellos que sobreviven acaban desarrollando síndrome de Kearns-Sayre (KSS).

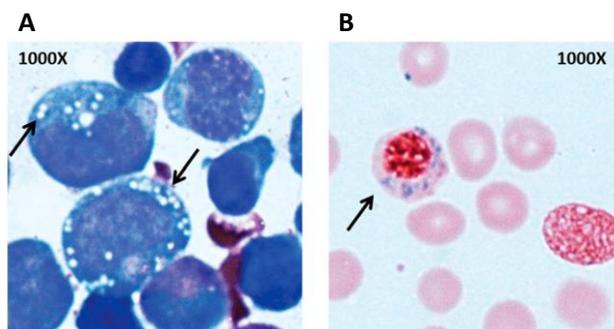


Figura 1.8 Evaluación de la médula ósea en un paciente con síndrome de Pearson (117). A) Vacuolas en precursores mieloides observadas tras tinción de Wright-Giemsa. B) Sideroblastos en anillo detectados tras la tinción del hierro con azul de Prusia (Tinción de Perls).

1.5.3. Diagnóstico y consejo genético

El diagnóstico diferencial de las patologías mitocondriales suele ser complejo debido, principalmente, a que suelen presentar afectación multisistémica y un fenotipo clínico variable entre pacientes.

El primer signo normalmente detectado en pacientes con síndrome de Pearson es la anemia sideroblástica, por lo que es esencial realizar un diagnóstico diferencial con otras anemias parecidas como la anemia de Diamond-Blackfan (DBA). Además de algunos marcadores bioquímicos como la adenosina deaminasa (normalmente alta en DBA), es necesario el estudio genético de mutaciones asociadas a esta patología, como las del gen *GATA1* (88). A pesar de

esto, un estudio genético realizado a pacientes con DBA reveló que un porcentaje importante de ellos padecía PS, lo que invita a pensar que el síndrome de Pearson está infradiagnosticado (117).

Tras la sospecha clínica, algunos parámetros bioquímicos pueden apoyar el diagnóstico de patologías mitocondriales. Es común encontrar un incremento en sangre y orina de aminoácidos como la alanina o de intermediarios metabólicos como el ácido láctico o el ácido fumárico (88). Por el contrario, los niveles de arginina, ornitina y citrulina suelen ser bajos en sangre (120). La hipocitrulemia podría estar causada por el exceso de secreción del aminoácidos en la orina (120). En algunos pacientes PS se ha descrito además un aumento de la aciduria 3-metilglucónica (3-MGA-uria) asociada al déficit de complejos de la cadena transportadora de electrones (121). También es interesante el análisis de biomarcadores en sangre como el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (122). En el estudio histológico de biopsias musculares, es común detectar fibras rojo rasgadas con la tinción tricrómico de Gomori y con defecto de la actividad de la citocromo c oxidasa (fibras COX negativas) (109).

No obstante, el diagnóstico definitivo de las patologías mitocondriales se suele lograr con el estudio genético de mutaciones del genoma mitocondrial y nuclear asociadas a estos síndromes. El DNA normalmente se obtiene de sangre periférica, aunque es también frecuente la recepción de muestras de orina, mucosa bucal o biopsias musculares que además ofrecen la posibilidad de realizar estudios histológicos. Para el análisis de deleciones, se realiza una amplificación por PCR Larga de una gran parte del mtDNA. En caso de obtener un resultado positivo, el nivel de heteroplasmia en el tejido analizado se determinará mediante Southern blot o PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Para conocer la localización concreta de la deleción en la molécula de mtDNA será necesario la secuenciación de la región (72).

El consejo genético para el síndrome de Pearson es complejo. Además de ser una enfermedad normalmente esporádica, la dinámica de propagación de la deleción durante el desarrollo embrionario y tras el nacimiento es impredecible. A este tenor, el diagnóstico prenatal resultará poco fiable y no es recomendable (88).

1.5.4. Otras patologías causadas por deleciones en el mtDNA

Además del síndrome de Pearson, existen otras patologías causadas por deleción única en el mtDNA. Lo fenotipos de estos síndromes se solapan frecuentemente al tener la misma causa genética; sin embargo, destacan algunas diferencias importantes que se detallan a continuación (123):

- La oftalmoplejía externa crónica progresiva (CPEO) se caracteriza por debilidad en los músculos extraoculares generando ptosis (caída del párpado superior) y parálisis extraocular.
- El síndrome de Kearns-Sayre (KSS) es una enfermedad multisistémica con inicio antes de los 20 años. Se caracteriza por retinopatía pigmentaria y oftalmoplejía externa progresiva (PEO), acompañada normalmente de disfunción del sistema nervioso central y problemas cardíacos.
- El síndrome de Leigh es una manifestación poco frecuente de delección en el mtDNA y se caracteriza por lesiones en el ganglio basal y el tronco encefálico.

A parte de estos síndromes, otras patologías con fenotipos variables se deben a la presencia de delecciones múltiples en el mtDNA y/o a la existencia de depleción, es decir, a una amplia reducción de los niveles de mtDNA por célula. Algunos ejemplos de estos trastornos son CPEO, MNGIE (encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial) o el síndrome de Alpers-Huttenlocher. Muchos de estos fenotipos estarían asociados a mutaciones en genes nucleares codificantes de proteínas del replisoma, como *POLG*, *POLG2* o *TWINK*, de las rutas de síntesis de dNTPs, como *TK2* o *DGUOK*, o proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial, como *OPA1* o *MFN2* (124).

1.6. Modelos para el estudio de patologías mitocondriales causadas por delecciones en el mtDNA

La mayoría de las enfermedades mitocondriales son multiorgánicas y debutan en la infancia. Con mucha frecuencia, las mutaciones que las causan se presentan en heteroplasmia, por lo que, como ya se ha comentado, el grado de afectación puede ser diferente entre tejidos de un mismo paciente. La gran complejidad de estas enfermedades hace necesario el desarrollo de nuevos modelos de estudio, tanto *in vitro* como *in vivo*, para conocer la biología de cada patología e investigar nuevos tratamientos y terapias. En la actualidad, existen pocos modelos disponibles portadores de delecciones en el mtDNA. El avance en este campo resultará interesante tanto para ampliar el conocimiento sobre estas enfermedades, como para el estudio de nuevas terapias.

1.6.1. Modelos celulares

1.6.1.1. Fibroblastos

Los fibroblastos se obtienen a partir de biopsias de piel de pacientes, por lo que se trata de un cultivo primario con capacidad de división y de mantenimiento *in vitro*. Es un modelo celular ampliamente utilizado debido, fundamentalmente, a su fácil obtención, aunque asimismo supone una desventaja al tratarse de un proceso invasivo para el paciente. Además, la capacidad de división de los fibroblastos en cultivo es limitada, por lo que no es posible su mantenimiento de forma indefinida.

A pesar de ello, se trata de un modelo fundamental en el estudio de enfermedades genéticas en general, y de las patologías mitocondriales en particular, ya que conservan el fondo genético nuclear y mitocondrial del paciente. A su vez, esto supone un menoscabo, ya que puede influir de forma diferente en los estudios realizados al comparar con otras líneas.

En la investigación sobre patologías causadas por deleciones en el mtDNA, los fibroblastos se han empleado principalmente para el estudio de la segregación del mtDNA delecionado a nivel intra e intercelular, y la evolución de la heteroplasmia en cultivo (96,125,126). Mediante técnicas FISH de hibridación *in situ* al mtDNA delecionado y *wild-type*, se ha observado que el nivel de heteroplasmia se reduce intercelularmente durante el cultivo, y que las células con alta carga de deleción se agrupan manteniendo su capacidad mitótica (126). La adición de uridina al medio de cultivo permitiría que la heteroplasmia se mantuviera constante o incluso aumentara, pero no en todos los casos, por lo que esta capacidad podría estar influenciada por el propio fondo genético de cada paciente (96,125). La uridina es necesaria para el mantenimiento en cultivo de líneas rho⁰, carentes de mtDNA, y de células con el sistema OXPHOS muy dañado, ya que la síntesis *de novo* de este nucleósido de pirimidina requiere de una cadena respiratoria funcional (127). Por otro lado, en el año 1993, Bourgeron *et al.* también publicaron datos sobre estudios funcionales realizados en fibroblastos portadores de la deleción común en los que observaron un descenso notable de la actividad del complejo IV con una heteroplasmia del 60 % (96).

1.6.1.2. Cíbridos o híbridos transmitocondriales

Los cíbridos o híbridos transmitocondriales fueron descritos por primera vez en células humanas por King y Attardi en 1989, y han sido el modelo celular más ampliamente utilizado para el estudio de enfermedades mitocondriales (127). Estas líneas se crean mediante la fusión de plaquetas o fibroblastos enucleados (citoplastos) portadores de un mtDNA de interés, con una

línea celular a la que se le ha eliminado el mtDNA (célula rho⁰ o ρ⁰). Así, se obtienen líneas celulares con un fondo genético nuclear idéntico y conocido, y que únicamente difieren en el genoma mitocondrial. Este modelo celular permite estudiar la patología de mutaciones en el mtDNA, y realizar estudios comparativos, ya que todas las diferencias observadas se deberán a su particular genoma mitocondrial. Además, en condición de heteroplasmia, es posible obtener líneas de híbridos portadoras de diferentes proporciones de mtDNA mutante (128).

En el caso particular de patologías causadas por deleciones en el mtDNA, varios autores han publicado sus resultados utilizando este modelo, demostrando las consecuencias patológicas en la función mitocondrial y celular (91,95,100,125,129). El primer modelo fue reportado por Hayashi *et al.* en 1991, que generaron y caracterizaron un híbrido derivado de la fusión de fibroblastos enucleados de un paciente con CPEO, con una deleción de 5196 pb, y células HeLa rho⁰. Estos autores describieron que había una ventaja en la propagación del Δ-mtDNA con el tiempo, además de un aumento en los niveles de transcritos de los genes no implicados en la deleción y una reducción significativa de la actividad del complejo IV y la traducción mitocondrial cuando la heteroplasmia era superior al 60 % (91). Posteriormente, Porteous *et al.* en 1998 estudiaron las consecuencias de la acumulación de una deleción en la energía celular utilizando híbridos con núcleo de células de osteosarcoma 143b y con diferentes niveles de heteroplasmia de la deleción común. En primer lugar, observaron que la formación del híbridos afectaba a la función mitocondrial al comparar con la línea parental 143b. Además, mostraron que había una reducción significativa del potencial de membrana y la producción de ATP en las células portadoras de deleción cuando la heteroplasmia era superior al 50 % (129). En el 2005, Palloti *et al.* obtuvieron resultados similares en híbridos portadores de dos deleciones diferentes (de 5,8 kb y 1,9 kb), y observaron un aumento de los niveles de lactato y piruvato intra y extracelular, pero no de la actividad de la citrato sintasa, una enzima codificada en el genoma nuclear e implicada en el ciclo de Krebs que normalmente se emplea como marcador del contenido mitocondrial (95). También se ha descrito un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en híbridos con deleción en el mtDNA, tanto en condiciones normales como en estrés oxidativo (100).

A pesar de la gran utilidad de los híbridos, este modelo también presenta numerosas desventajas. Las células presentan una dotación cromosómica aneuploide debido al origen tumoral de las células ρ⁰ receptoras del mtDNA. Además, se ha descrito algún caso en el que el fondo genético nuclear de la célula receptora influye en las características de la línea híbrida, por ejemplo, en la segregación del mtDNA mutante y *wild-type* durante el cultivo (130). Por último,

el fondo genético de todos los híbridos portadores de delección generados no permite la diferenciación celular de las líneas, lo que limita las posibilidades de estudio de las patologías. La fusión con otras células ρ^0 receptoras como la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, permitiría el estudio de la función OXPHOS en neuronas diferenciadas (131).

1.6.1.3. Líneas celulares linfoblastoides

Las líneas celulares linfoblastoides se obtienen mediante la inmortalización de células B aisladas de sangre periférica de los pacientes. Se trata de un cultivo primario inmortalizado mediante el virus Epstein Barr, y obtenido por un método no invasivo. Varios autores han utilizado este modelo para el estudio de patologías mitocondriales causadas por deleciones en el mtDNA (96,132). En particular, los autores mostraron una reducción en la síntesis de proteínas mitocondriales en células linfoblastoides portadoras de delección en el mtDNA, así como una mayor acumulación de las moléculas delecionadas durante el cultivo tras el tratamiento con doxiciclina (132). También se han empleado en el estudio de la relación entre los genotipos y fenotipos mitocondriales (96).

1.6.1.4. Células madre pluripotentes inducidas

En el año 2006, Takahasi y Yamanaka mostraron la posibilidad de reprogramar células somáticas de ratón mediante la transfección de cuatro factores de transcripción: Oct-3/4, SOX-2, c-Myc y Klf4 (133). Un año más tarde, generaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) humanas desde fibroblastos adultos y demostraron que presentaban capacidades similares a la células madre embrionarias (ESCs) (134). El empleo de este modelo celular se ha incrementado en los últimos años debido, principalmente, a su capacidad de diferenciación a las distintas capas germinales. En el caso de patologías mitocondriales, en su mayoría con manifestación multiorgánica, se han convertido en una gran herramienta al ofrecer la posibilidad de estudiar la biología de la enfermedad y sus posibles tratamientos directamente en el tipo celular afectado. Además, los niveles de heteroplasmia varían entre líneas celulares derivadas de la misma línea parental, sugiriendo una segregación mitocondrial durante la reprogramación. Se produce entonces un cuello de botella con potencial terapéutico ya que permitiría obtener líneas sin mutación derivadas del paciente y aptas para una posible terapia celular (53).

No obstante, en la reprogramación se ha observado cierta tendencia al reordenamiento cromosómico, que pueden afectar negativamente a la capacidad de diferenciación, y a la aparición de mutaciones homoplásmicas o heteroplásmicas en el mtDNA, que en su mayoría no son consideradas patológicas por las bases de datos (135,136). Además, también se ha

detectado la aparición de deleciones en el mtDNA en células madre embrionarias durante el cultivo (137). En base a esto, es necesario realizar una caracterización genética completa tras la generación de una nueva línea de células iPS para confirmar el cariotipo normal euploide y la estabilidad del mtDNA.

Únicamente dos grupos han publicado estudios realizados con células iPS portadoras de deleción en el mtDNA. En ambos casos, fueron generadas por reprogramación de fibroblastos obtenidos de pacientes con síndrome de Pearson. En el año 2013, Cherry *et al.* presentaron un modelo de células iPS con una deleción de 2,5 kb, y demostraron que las células hematopoyéticas derivadas presentaban el fenotipo característico PS (89). Posteriormente, en el año 2018, Russel *et al.* generaron células madre pluripotentes inducidas portadoras de una deleción de aproximadamente 6 kb, y las neuronas diferenciadas presentaron menor potencial de membrana mitocondrial (84). Además, ambos estudios mostraron que las células iPS portadoras de deleción experimentaban una caída del consumo de oxígeno y un aumento de la glucólisis, especialmente en clones con una heteroplasmia superior al 60 % (84,89).

1.6.2. Modelos animales

Puesto que las patologías mitocondriales suelen provocar afectación multiorgánica, el empleo de organismos completos como modelo de estudio ofrece grandes ventajas en el análisis de los mecanismos patológicos y de posibles tratamientos. El desarrollo de ratones transgénicos portadores de mutaciones en el mtDNA es complejo debido a las propias características del genoma mitocondrial, como la poliplasmia. Uno de los problemas principales es introducir de forma estable el DNA mutado en las mitocondrias del ratón. A pesar de ello, se han logrado desarrollar modelos de ratón portadores de diferentes mutaciones en el mtDNA mediante la introducción de mtDNA mutante exógeno, entre ellos de deleciones (138) .

En el año 2000, Inoue *et al.* generaron un ratón transmitocondrial portador de una deleción de 4696 pb, equivalente a la deleción común en humanos (139). El método de generación se basó en la electrofusión de citoplastos de ratón portadores del mtDNA delecionado con embriones sanos en estado pronuclear. Tras dos generaciones, gran parte de los ratones heredaron la mutación introducida en la F0 con una heteroplasmia inferior al 90 % en sus músculos, probablemente debido a la letalidad de un mayor porcentaje durante el desarrollo embrionario. Estos ratones mostraban un defecto importante en la respiración mitocondrial y el fenotipo característico de una encefalopatía mitocondrial con bajo peso, acidosis láctica, isquemia, miopatía, fallos renales, infertilidad masculina, problemas de memoria, etc. (140).

En un estudio posterior, observaron que la misma delección ocasionaba dos fenotipos diferentes de enfermedad mitocondrial en diferentes momentos del desarrollo: el síndrome de Pearson durante los primeros días después del nacimiento, y síndrome de Kearns-Sayre en ratones de mediana edad (6 meses). Además, aquellos que sobrevivían al primero desarrollaban KSS, experiencia similar a la observada en pacientes. Según los autores, la dinámica de propagación del mtDNA deleccionado en los diferentes tejidos era determinante en la transición de los fenotipos (93).

1.7. Estrategias de tratamiento para patologías mitocondriales

El tratamiento de las patologías mitocondriales normalmente se centra en los síntomas y suele estar basado en cócteles de suplementos nutricionales y vitaminas, con los que se consigue un efecto moderado pero no definitivo (115). No obstante, los avances conseguidos en los últimos años sobre el conocimiento de las causas y los mecanismos fisiopatológicos de estos síndromes han permitido diseñar nuevas estrategias de terapia con mecanismos de acción muy diversos.

En el caso de patologías causadas por mutaciones heteroplásmicas, como la delecciones, la reducción de la heteroplasmia por debajo del umbral patológico es uno de los objetivos principales de tratamiento. Esta modificación de los niveles de mtDNA mutante podría conseguirse mediante tratamientos farmacológicos, fisiológicos o genéticos (90). Algunos de los más prometedores se detallan a continuación.

1.7.1. Antioxidantes e hipoxia

La mayoría de las enfermedades mitocondriales cursan con un aumento del estrés oxidativo provocado por la disfunción de la cadena respiratoria. Por ello, a pesar de que su eficacia clínica está muy cuestionada, el tratamiento con agentes antioxidantes como la coenzima Q₁₀ o las vitaminas C (ácido ascórbico) o E, es muy frecuente en pacientes con estas patologías (141). La mayoría de estos compuestos actúan secuestrando radicales libres, reparando moléculas dañadas o bloqueando rutas activadas como la peroxidación de lípidos (142). Además, se están realizando ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes patologías mitocondriales con este tipo de compuestos y sus análogos, como la idebenona o el EPI-743 (143).

El conjunto de cofactores de vitaminas B desempeña un papel clave en el desarrollo de la función mitocondrial, por lo que son muchos los estudios de terapias basadas en ellos. Por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento con nicotinamida ribosidasa (análogo de la vitamina B₃, precursora de NAD⁺) retrasa de forma efectiva el progreso de miopatía mitocondrial en ratones,

ya que promueve un aumento de la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético y el tejido adiposo marrón, y previene el daño ultraestructural mitocondrial y la formación de deleciones en el mtDNA (144).

Asimismo, las vitaminas B9 (folato) y B12 (cobalamina) parecen desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del genoma mitocondrial y nuclear (145). Concretamente, el folato actúa como donador y aceptor de unidades de carbono para la síntesis de purinas, de timidilato y metionina, y para diferentes reacciones de metilación (figura 1.9) (146). Puesto que el ácido fólico es necesario para la síntesis de desoxitimidilato (dTMP) a partir de desoxiuridilato (dUMP), en condiciones de déficit de fólico se acumula dUMP favoreciendo la incorporación de uracilo al DNA en lugar de timina, lo que puede originar puntos de roturas en el DNA (145). A nivel mitocondrial, también participa en la síntesis de formiato y en la etapa de iniciación de la traducción en la síntesis de proteínas (147). Puesto que las células no son capaces de sintetizarlo *de novo*, el folato disponible se obtiene completamente de la dieta. Además, se ha demostrado que el suplemento con ácido fólico durante el embarazo previene defectos del tubo neural en el feto, y en estudios realizados *in vitro*, se ha observado que la presencia de ácido fólico en exceso favorece la diferenciación de células madre neurales a neuronas frente a astrocitos (148). En cambio, la privación de folato en la dieta de ratas durante cuatro semanas aumentó significativamente la frecuencia de aparición de la deleción común y disminuyó los niveles de mtDNA en diferentes tejidos (149,150). Asimismo, se ha observado déficit cerebral de folato en pacientes con KSS y otras patologías mitocondriales, y se ha asociado a la incapacidad de transportar el folato de la sangre al fluido cerebroespinal (151). Además, se ha descrito que el tratamiento oral prolongado con ácido folínico (forma en la que se encuentra en los alimentos y capaz de atravesar la barrera hematoencefálica) normaliza los niveles de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF, forma activa del folato) en el fluido cerebroespinal de pacientes con KSS (147,152,153). Por otra parte, el déficit de vitamina B12 conlleva una acumulación de ácido metilmalónico (MMA) que daña el metabolismo mitocondrial provocando un aumento de ROS (145).

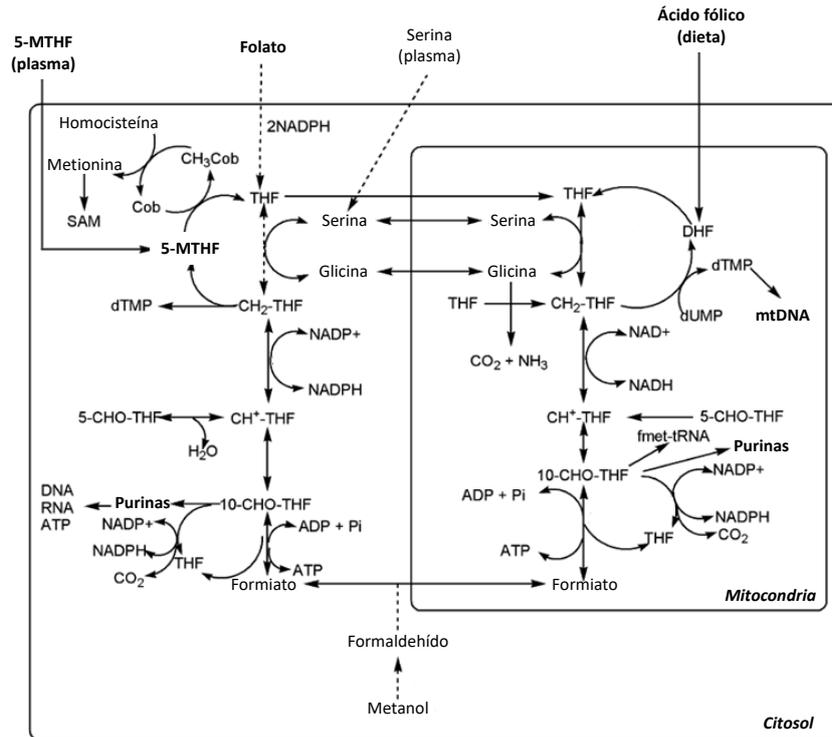


Figura 1.9 Rutas metabólicas de transferencia de grupos metilo dependientes de folato (figura adaptada de (146)).

La hipoxia se ha sugerido como un mecanismo terapéutico prometedor para las patologías mitocondriales. Un ejemplo es el estudio realizado en un ratón *Knockout* para el gen *NDUFS4* (subunidad S4 de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa) con fenotipo del síndrome de Leigh, en el que se observó una mejora de los síntomas y un aumento significativo de la esperanza de vida tras mantener a los animales en condiciones de hipoxia durante un periodo prolongado (154). Los ratones mostraron una estabilización de los factores HIFs (*Hypoxia-inducible factors*) que modulan el metabolismo celular favoreciendo la glucólisis frente a la fosforilación oxidativa (154,155)

1.7.2. Modulación de la biogénesis mitocondrial y la mitofagia

Como ya se ha descrito previamente, el incremento de masa mitocondrial es un mecanismo fisiológico de las células en respuesta a una demanda energética (36). En condiciones patológicas, la capacidad de las células de llevar a cabo este proceso podría correlacionarse con las consecuencias fenotípicas de la mutación, como en pacientes de LHON en los que se observó que el fenotipo patológico de las mutaciones dependía de los niveles de mtDNA (40). En base a esto, el aumento de la biogénesis mitocondrial mediante estrategias farmacológicas o fisiológicas se ha propuesto como una estrategia de tratamiento de patologías mitocondriales. Un ejemplo de ello, es el efecto beneficioso del aumento de los niveles de mtDNA observado en tejidos postmitóticos de ratones portadores de la mutación m. 5024 C>T tras la modificación de

la expresión del factor TFAM (156). Además, se han descrito diferentes tratamientos farmacológicos para intervenir y potenciar este proceso, como el bezafibrato, agonista de PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), o el resveratrol (157). En el caso particular de las deleciones, el aumento de los niveles de mtDNA completo deberá corregir el efecto negativo del mutante, que se expande de forma clonal. En base esto, se ha observado que un régimen controlado de ejercicio aeróbico en pacientes con deleciones potencia la fuerza muscular y su capacidad oxidativa. Las células del tejido muscular aumentarían la población de mtDNA completo y reduciría la proporción de moléculas delecionadas por debajo del umbral patológico (69).

Del mismo modo, la regulación de la mitofagia podría constituir una estrategia de tratamiento. En este sentido, la inhibición prolongada de la vía mTORC (*mammalian target of rapamycin complex*) mediante rapamicina provocó una disminución de la frecuencia de deleciones en el mtDNA así como de las fibras musculares COX negativas en un estudio realizado en ratones (158).

1.7.3. Tratamiento cetogénico

La modificación de la dieta se ha propuesto como estrategia para reducir los efectos patológicos de mutaciones en el mtDNA. Un ejemplo es la dieta cetogénica en la que se modula la ingesta de carbohidratos, proteínas, calorías y grasas para conducir el metabolismo hacia la β -oxidación de ácidos grasos y la producción de cuerpos cetónicos. Se ha empleado durante años para el tratamiento de la epilepsia en niños (159). Cuando la disponibilidad de glucosa en el organismo es limitada debido al ayuno, al ejercicio prolongado o la restricción de carbohidratos provocada por la dieta, los cuerpos cetónicos son producidos por las mitocondrias del hígado mediante la oxidación de los ácidos grasos movilizados desde el tejido adiposo, y vertidos al torrente sanguíneo para actuar como fuente de energía alternativa en tejidos extrahepáticos, entre ellos el cerebro, ya que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (160,161).

A nivel celular, el tratamiento cetogénico se consigue restringiendo la disponibilidad de glucosa y sustituyéndola por cuerpos cetónicos como el acetoacetato o el β -hidroxibutarato (figura 1.10). Se ha demostrado que este tratamiento consigue reducir el mtDNA mutante tanto en híbridos portadores de una deleción única en el mtDNA de 1,9 kb causante del síndrome de Kearns-Sayre (KSS) como líneas celulares portadoras de la mutación m. 13094 T>C causante de la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), y aumentar la biogénesis mitocondrial en fibroblastos humanos sin patología mitocondrial (160,162,163). También se ha descrito que la

dieta cetogénica consigue una ralentización del progreso de la miopatía mitocondrial en ratones (164). Sin embargo, se han observado algunos efectos secundarios graves en pacientes con patología mitocondrial que siguieron una dieta Atkins modificada (rica en grasas y baja en carbohidratos) (165). Todo ello indica que la dieta cetogénica podría ser una estrategia de tratamiento útil para determinadas patologías mitocondriales pero el protocolo para su aplicación debería ser optimizado y estudiado de forma más específica.

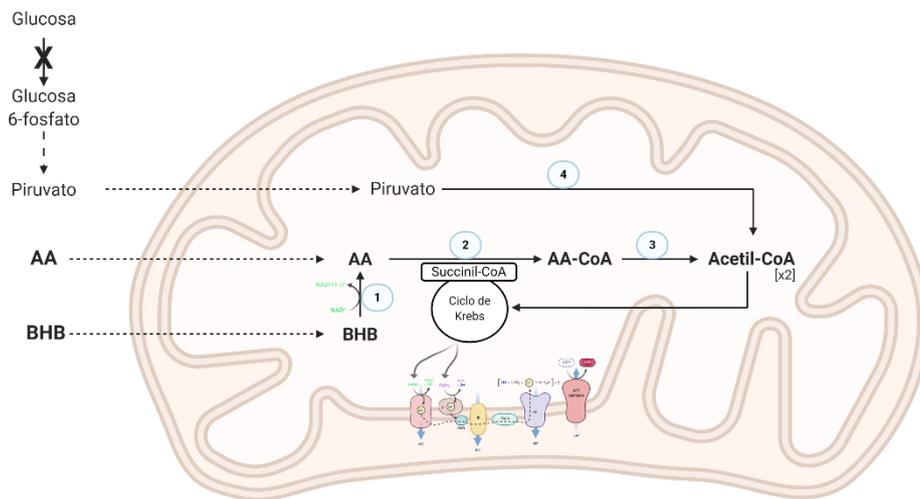


Figura 1.10 Metabolismo de los cuerpos cetónicos en la mitocondria (figura basada en (162)). El acetoacetato (AA) y el β -hidroxibutarato (BHB) son transportados al interior del orgánulo donde BHB es convertido a AA por la D- β -hidroxibutarato deshidrogenasa (1). AA es convertido en acetoacetil-CoA (AA-CoA) a partir del succinil-CoA del ciclo de Krebs, que se convierte en succinato, y mediante la enzima β -cetoacil-CoA transferasa (2). Posteriormente, AA-CoA se transforma en Acetil-CoA mediante la enzima acetil-CoA tiolasa (3), y entra de nuevo en el ciclo de Krebs. El piruvato se transforma en acetil-CoA a través de la piruvato deshidrogenasa (4). Figura creada con BioRender.com.

1.7.4. Baipás de la replicación del mtDNA

El mantenimiento del mtDNA depende del correcto funcionamiento del número de proteínas implicadas en su síntesis, codificadas a nivel nuclear, y del balance de nucleótidos disponibles, obtenidos de las rutas de reciclaje y de importe desde el citoplasma (166). El defecto o el malfuncionamiento de algunas de estos elementos interferirá en los mecanismos de replicación y reparación del mtDNA causando depleción, deleciones múltiples o mutaciones puntuales (143). En concreto, mutaciones en genes como *TK2*, codificante de la timidina quinasa 2, o *DGUOK*, codificante de la guanosina quinasa, se han relacionado directamente con la aparición de patologías (167). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el suplemento con desoxinucleósidos podría rescatar el fenotipo provocado por deficiencia de dNTPs, depleción y presencia de deleciones múltiples en el mtDNA causadas por mutaciones en alguno de estos genes (168,169).

1.7.5. Terapia génica

En patologías causadas por deleciones en el mtDNA, gran parte del sistema OXPHOS se encuentra truncado debido a la afectación de numerosos genes codificantes de sus subunidades y tRNAs. El desarrollo de estrategias de baipás de la cadena de transporte de electrones podría ser una alternativa de terapia. En esta línea, el reemplazo de la cadena transportadora de electrones por la proteína AOX (presente en eucariotas inferiores) mediante terapia génica de células rho⁰, permitió reestablecer el flujo de electrones a través de la ETC (170).

La eliminación específica de las moléculas de mtDNA delecionadas mediante técnicas de ingeniería genética es otra estrategia propuesta para el tratamiento de estas enfermedades. El empleo del sistema CRISPR/Cas9 para la modificación del genoma mitocondrial se ha visto limitado, al parecer, por la incapacidad de las mitocondrias de importar el RNA guía necesario en el proceso (171). Recientemente se ha propuesto que el empleo de una citidina deaminasa bacteriana podría permitir el empleo de este sistema para la modificación genética del mtDNA (172). Alternativamente, se reportado la posibilidad de modificar el genoma mitocondrial mediante técnicas basadas en la actividad de nucleasas: los mitoTALENs (del inglés, *transcriptor activator-like effector nucleases*) o los mtZFNs (del inglés, *mitochondrially targeted zincfinger-nucleases*). Mediante señales específicas de localización mitocondrial, estos sistemas son capaces de alcanzar la matriz mitocondrial, reconocer de forma específica los mtDNA mutados e inducir roturas de doble hebra que provocan su degradación para, finalmente, modificar la heteroplasma. De hecho, mediante mtZFNs diseñados específicamente para el reconocimiento de moléculas de mtDNA con la deleción común, se ha conseguido aumentar significativamente la proporción de mtDNA completo en líneas celulares de cíbridos (173). Además, se han publicado estudios de modificación de la heteroplasma de mutaciones puntuales en el mtDNA *in vivo* mediante ambos sistemas de ingeniería genética (174,175).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las deleciones grandes y únicas en el mtDNA (SLSMDs, del inglés *single large-scale mtDNA deletions*) conllevan la pérdida de tRNAs, rRNAs y mRNA codificantes de proteínas de los complejos de la cadena respiratoria, por lo que sus consecuencias suelen ser muy graves y diversas, con fenotipos que en ocasiones se solapan. Una de las patologías con esta causa genética es el síndrome de Pearson (PS), que cursa principalmente con anemia sideroblástica y disfunción del páncreas exocrino. Es relativamente frecuente que los pacientes PS que sobreviven a la infancia experimenten una transición hacia síndrome de Kearns-Sayre (KSS), con afectación multisistémica de diferentes tejidos.

Nuestra hipótesis propone que la dinámica de propagación de las deleciones grandes y únicas en el mtDNA y el fenotipo patológico que provocan podrían depender de diferentes factores como el tipo de deleción (tamaño, localización y genes mitocondriales implicados), el porcentaje de heteroplasmia, el fondo genético mitocondrial o nuclear, el estado celular (proliferativo o no proliferativo), el tejido afectado o las condiciones de cultivo. Además, el nivel umbral de heteroplasmia a partir del cual se observa efecto patológico podría variar entre deleciones de diferente tamaño, según los genes mitocondriales afectados.

Por otro lado, los pacientes con patologías causadas por deleciones en el mtDNA reciben terapias paliativas dirigidas a reducir la gravedad de los síntomas, para mejorar su calidad de vida, pero que no resultan definitivas. Lamentablemente, la mayoría de los pacientes suelen fallecer en la infancia lo que revela la necesidad de desarrollar estrategias de tratamiento tempranas y específicas. Los tratamientos que hacen a las células más dependientes del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), como el tratamiento cetogénico, o que potencian su actividad, como el tratamiento con antioxidantes, podrían disminuir el porcentaje de heteroplasmia de las SLSMDs por debajo del umbral patológico en los distintos estados y tipos celulares, y rescatar el fenotipo.

2.2. Objetivos

1. Desarrollo y caracterización de modelos celulares portadores de una deleción única y grande en el DNA mitocondrial, como cíbridos, células madre pluripotentes inducidas y células diferenciadas a distintos linajes, a partir de fibroblastos de pacientes con síndrome de Pearson.
2. Análisis del efecto de la deleción sobre la función OXPHOS y la morfología mitocondrial en los diferentes modelos celulares generados.
3. Obtención de clones de cíbridos con diferentes porcentajes de deleción para el estudio del nivel de heteroplasmia umbral causante de efecto patológico.
4. Estudio del efecto de la deleción sobre la diferenciación a distintos tipos celulares frecuentemente afectados en pacientes con patologías causadas por SLSMDs.
5. Análisis del efecto *in vitro* de diferentes estrategias de tratamiento sobre el porcentaje de deleción y la función OXPHOS en células PS tanto mitóticas como postmitóticas. Entre estas últimas, también en células PS que han seguido distintas rutas de diferenciación, como la diferenciación neuronal por su importancia en el KSS.
6. Realización de otros estudios complementarios con muestras de pacientes portadores de SLSMDs como el seguimiento del nivel de heteroplasmia en sangre de un paciente con síndrome de Pearson, el estudio anatomo-patológico de muestras de necropsia de distintos tejidos procedentes de otro paciente PS fallecido y el análisis genético mitocondrial de distintos pacientes.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Historia clínica, análisis genético y estudio anatómico-patológico de pacientes con síndrome de Pearson

3.1.1. Historia clínica

En esta tesis se ha trabajado principalmente con muestras y líneas celulares derivadas de dos pacientes con síndrome de Pearson. Su historia clínica se detalla a continuación.

El paciente 1 (PS1) es un varón de 7 años, nacido a término por cesárea y sin incidentes importantes durante el periodo prenatal. Sus padres son sanos, sin relación de consanguinidad, si bien la madre sufrió anemia durante el embarazo. El desarrollo psicomotor fue normal durante los primeros meses tras el nacimiento. A los 8 meses, el paciente ingresó por fiebre, palidez, taquicardia y petequias pretibiales. El estudio analítico reveló que padecía una anemia arregenerativa, trombopenia y neutropenia moderada. Además, la médula ósea presentaba hipoplasia de serie roja, y se detectó insuficiencia pancreática. La clínica motivó la realización del estudio genético del mtDNA a los 9 meses de edad, y se confirmó el diagnóstico del síndrome de Pearson.

Posteriormente, ha sufrido ingresos recurrentes con cuadros infecciosos de vías respiratorias y gastroenteritis. Sufre un desarrollo psicomotor más lento, sin ataxia pero con decaimiento y astenia, y sin alteraciones neurológicas graves. También se observan otras manifestaciones clínicas y bioquímicas como tubulopatía renal, hiperpigmentación de máculas, niveles elevados de aminoácidos en sangre, como la alanina, y déficit de magnesio y vitamina B12.

El paciente recibió transfusiones periódicas de hematíes y plaquetas hasta los 5 años, y ha precisado tratamiento con sustitutivos de enzimas pancreáticas, hidrocortisona, quelantes de hierro, hormonas de crecimiento, ácido fólico, vitamina C, vitamina B12 y coenzima Q10. En la actualidad, se encuentra relativamente estable gracias a que el tratamiento que recibe se adapta a los nuevos síntomas que van apareciendo como consecuencia de la enfermedad, detectados en las revisiones periódicas que se le realizan.

El paciente 2 (PS2) era un varón de 5 años, hijo de padres sanos sin relación de consanguinidad. El desarrollo prenatal fue normal, aunque se detectó retraso de crecimiento intrauterino en la semana 38. El nacimiento fue a término por parto eutócico, sin embargo, el paciente presentó una anemia severa 48 horas después, por lo que requirió transfusión de sangre. La analítica

reveló la presencia de sideroblastos en anillo, además de neutropenia, trombopenia y déficit de vitamina B12. Tras descartar la presencia de mutaciones en genes nucleares relacionados con estas manifestaciones clínicas (como el gen *ALAS2*), se analizó el mtDNA por sospecha de patología mitocondrial, y se confirmó el diagnóstico de síndrome de Pearson.

El paciente presentaba retraso en el crecimiento y bajo peso. Durante su vida sufrió varios ingresos hospitalarios y sus manifestaciones clínicas fueron evolucionando. Necesitó varias transfusiones de hematíes y una de plaquetas hasta los 14 meses de edad. Además, manifestó otros síntomas como fotosensibilidad, tubulopatía de Fanconi, hipotiroidismo, insuficiencia adrenal, elevación de enzimas hepáticas, diarrea crónica, insuficiencia pancreática exocrina, proteinuria, hipocalcemia, hiperlactacidemia, hipofosfatemia y déficit de magnesio. El desarrollo psicomotor fue normal durante el primer año de vida, pero empeoró a partir de los 18 meses hasta presentar hipotonía axial, microcefalia, y pérdida auditiva y del lenguaje.

Se le aplicaron diferentes tratamientos para amenorar sus síntomas: suplementos sustitutivos de enzimas pancreáticas, vitaminas B1, B2, B6 y B12, coenzima Q10, carnitina, antiácidos, folinato cálcico, magnesio, cloruro sódico, cloruro potásico, bicarbonato de sodio, hidroclorotiazida, hidrocortisona y fludrocortisona. A los 8 meses, inició el tratamiento con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y debido a su bajo peso, necesitó tubo nasogástrico y gastrostomía a los 20 meses. A los 3 años, manifestó diabetes mellitus requiriendo tratamiento con insulina. El paciente falleció a los 5 años por descompensación metabólica con acidosis láctica, hiponatremia e hiperglucemia.

3.1.2. Variación del porcentaje de heteroplasmia a lo largo del tiempo en sangre de un paciente portador de la delección común (PS1)

Debido a la expansión clonal y la segregación mitótica, las delecciones tienden a acumularse en tejidos postmitóticos; sin embargo, células replicativas, como las derivadas del linaje hematopoyético, parecen experimentar una pérdida de las moléculas mutadas con posibles consecuencias sobre el fenotipo clínico. En este sentido, tanto los pacientes estudiados en esta tesis como otros recogidos en la bibliografía, llegan a ser independientes de transfusiones de sangre, lo que podría deberse a una disminución de la heteroplasmia de la delección en este tejido a lo largo del desarrollo.

Para estudiar este fenómeno, se analizó la heteroplasmia en 7 muestras de sangre del paciente PS1 recogidas a lo largo del tiempo. Como se observa en la figura 3.1, la heteroplasmia se mantuvo constante entre el 85-90 % hasta los dos años y medio. Sin embargo, desde los 30

meses, se observó una tendencia clara de disminución hasta alcanzar un 58 % a los 6 años. El paciente PS1 dejó de necesitar transfusiones de sangre a los 5 años, por lo que este cambio en el fenotipo podría deberse a una reducción de la heteroplasmia por debajo del umbral patológico. El análisis de más muestras en el futuro, junto con el estudio de otros pacientes, permitirá confirmar esta tendencia y relacionarla con el fenotipo clínico.

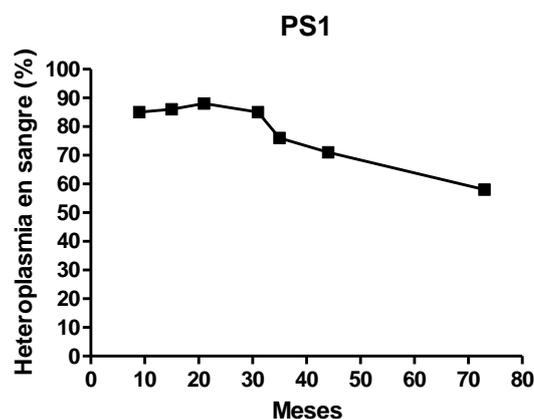


Figura 3.1 Variación de la heteroplasmia en sangre del paciente PS1 con el tiempo. DNA extraído de 7 muestras de sangre a diferentes edades.

3.1.3. Análisis genético: diagnóstico, determinación del tamaño de la deleción y nivel de heteroplasmia

Como se ha descrito en la historia clínica, el diagnóstico de síndrome de Pearson se ratificó mediante el análisis genético y tras la sospecha clínica. La confirmación de la presencia de deleción en el mtDNA en sangre se realizó mediante la técnica de PCR Larga en la que se amplifica la mayor parte del genoma mitocondrial (apartado 6.5.5.1). Posteriormente, se continuó con el análisis del tamaño de la deleción y el porcentaje de heteroplasmia en diferentes tejidos de ambos pacientes.

En la figura 3.2 se muestran los resultados de la electroforesis tras la PCR Larga realizada con DNA extraído de una muestra de sangre del paciente 1, y de diferentes tejidos *post mortem* del paciente 2. Como se puede observar, ambos pacientes mostraron amplificadores de menor tamaño que el control negativo, revelando la presencia de una deleción única en el mtDNA. El control positivo corresponde a un paciente portador de la deleción común en el mtDNA. Por tanto, la electroforesis parecía indicar que el paciente 1 presentaba una deleción similar, y el paciente 2 una de mayor tamaño.

Resultados

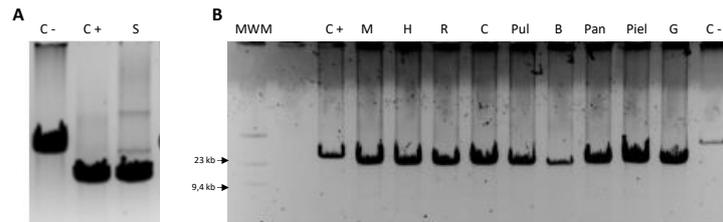


Figura 3.2 Electroforesis de los amplificados por PCR Larga del mtDNA de controles y pacientes portadores de delección. MWM, marcador de pesos moleculares. C-, control negativo. C+, control positivo. A) Paciente 1 (PS1). S, muestra de sangre. B) Paciente 2 (PS2). M, músculo; H, hígado; R, riñón; C, cerebro; Pul, pulmón; B, bazo; Pan, páncreas; Piel; G, grasa.

Posteriormente, se determinaron los límites de ambas delecciones siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.5.8. Así, se confirmó que el paciente 1 presentaba la delección común de 4977 pares de bases (figura 3.3A), flanqueada por una secuencia de repetición directa de 13 pares de bases. En el caso del paciente 2, se confirmó la presencia de una delección de 6514 pares de bases, entre la posición 6897 y 13411, y flanqueada por una secuencia de repetición imperfecta 6/7 (figura 3.3B). Se trata de una delección nueva, no descrita en la bibliografía ni en bases de datos (60).

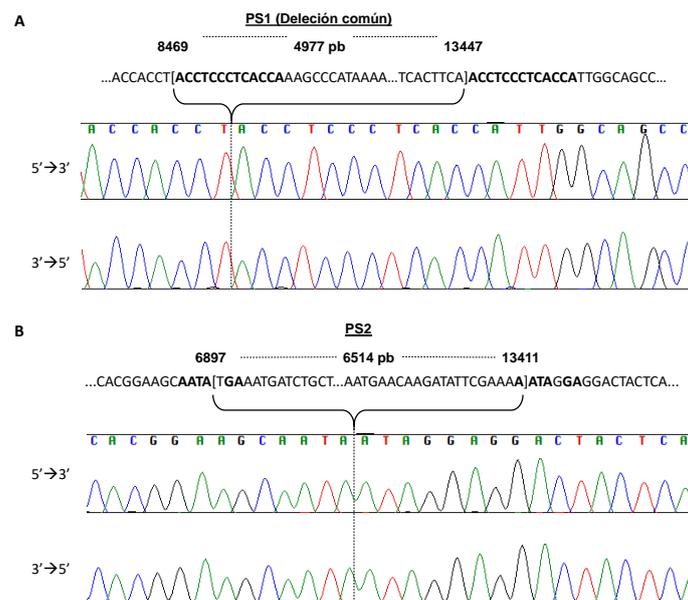


Figura 3.3 Límites de la delección de los pacientes 1 y 2. A) Paciente 1 (PS1). Se indican las posiciones del genoma mitocondrial en las que se inicia y finaliza la delección (8469/13477), y el tamaño (4977 pares de bases). B) Paciente (PS2). Se indican las posiciones del genoma mitocondrial en las que se inicia y finaliza la delección (6897/13411), y el tamaño (6514 pares de bases). Se representa el electroferograma de la región delecionada y en ambos sentidos de la secuencia. Se indica en negrita las secuencias flanqueantes de repetición.

Ambas delecciones conllevan la pérdida de una gran número de genes codificantes de subunidades del sistema OXPHOS y tRNAs. Como se puede observar en la figura 3.4, la delección común del paciente 1 (PS1, arco azul) afecta a los genes *MT-ATP8* (parcialmente), *MT-ATP6*, *MT-COIII*, *MT-ND3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4* y *MT-ND5* (parcialmente); y a los tRNAs de Leucina, Serina,

Histidina, Arginina y Glicina. Por otro lado, la delección del paciente 2 (PS2, arco rosa) implica los genes *MT-COI* (parcialmente), *MT-COII*, *MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-COIII*, *MT-ND3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4* y *MT-ND5* (parcialmente); y numerosos tRNAs (Leucina, Serina, Histidina, Arginina, Glicina, Lisina, Aspartato y Serina).

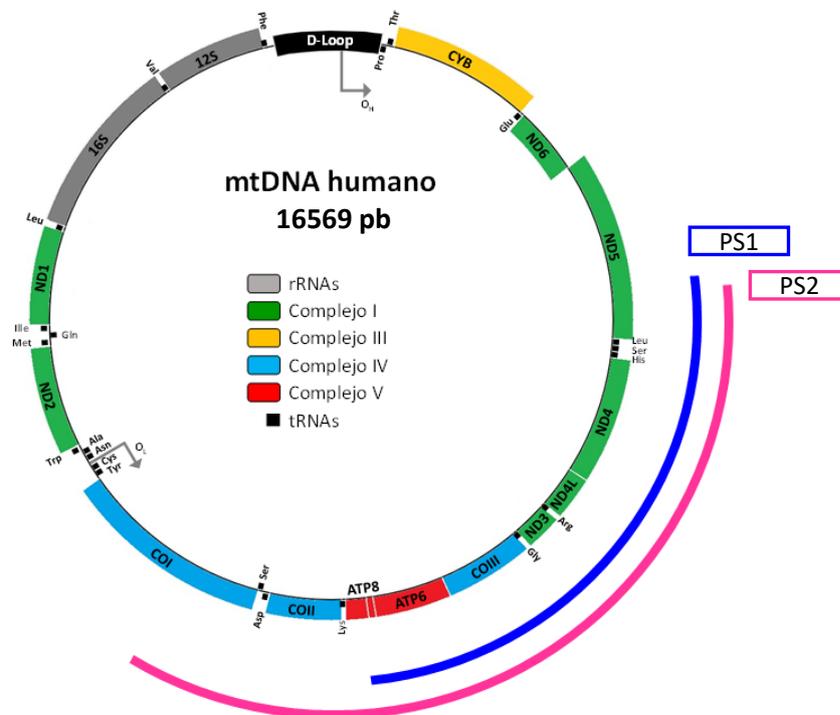


Figura 3.4 Representación esquemática del genoma mitocondrial y de la localización de las delecciones del paciente 1 (PS1, arco azul) y del paciente 2 (PS2, arco rosa).

Para determinar el nivel de heteroplasmia de las delecciones se recurrió a métodos cuantitativos como el Southern blot (apartado 6.5.11.2) o la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) (apartado 6.5.11.1). En la siguiente figura (figura 3.5), se muestra el resultado de la detección por Southern blot de muestras de ambos pacientes, que confirma la PCR Larga y evidencia la diferencia de tamaño entre las delecciones.

Resultados

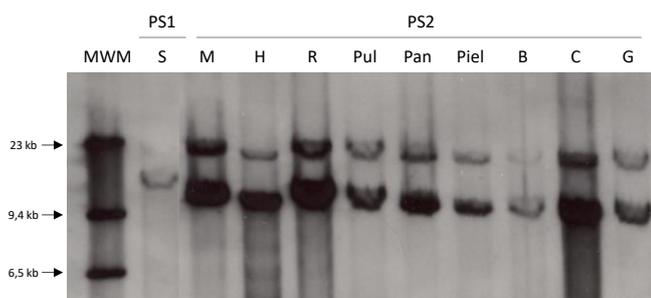


Figura 3.5 Inmunodetección por Southern blot del mtDNA de los pacientes PS. MWM, marcador de pesos moleculares. Paciente 1 (PS1): Muestra de sangre (S). Paciente 2 (PS2): muestras de músculo (M), hígado (H), riñón (R), pulmón (Pul), páncreas (Pan), Piel, bazo (B), cerebro (C) y grasa (G).

La heteroplasmia de estas muestras fue cuantificada por ambas técnicas (densitometría de las bandas obtenidas en el Southern blot y qPCR) y se expone en la tabla 3.1. Además, en esta tabla se incluye la heteroplasmia de una segunda muestra de sangre y de muestras de mucosa bucal y orina del paciente 1, analizadas por qPCR. La heteroplasmia de las deleciones fue muy elevada en ambos pacientes, superando el 70 % en todos los tejidos analizados, e incluso superando el 90 % en orina y mucosa bucal del paciente 1 y en hígado del paciente 2.

Tabla 3.1 Heteroplasmia de la deleción en diferentes muestras de ambos pacientes cuantificada mediante Southern blot y qPCR. ND indica valores no determinados.

Paciente	Muestra	Heteroplasmia (%)	
		Southern blot	qPCR
PS1	Sangre 1	75	85
	Sangre 2	90	86
	Orina	ND	95
	Mucosa bucal	ND	95
PS2	Músculo	80	87
	Hígado	90	92
	Riñón	85	85
	Pulmón	75	74
	Páncreas	75	85
	Piel	80	77
	Bazo	80	83
	Cerebro	85	83
	Grasa	70	75

Como se puede observar en la tabla, los valores de ambas técnicas fueron muy similares, obteniéndose una máxima diferencia de un 10 % en la primera muestra de sangre del paciente 1, y la muestra de páncreas del paciente 2. A pesar de esto, ambas metodologías parecían eficaces para la determinación de la heteroplasmia, por lo que se decidió emplear la PCR cuantitativa en la mayoría de los experimentos realizados en esta tesis. Se trata de una técnica más sencilla, rápida y que requiere menor cantidad de DNA, permitiendo estudiar muestras en las que el rendimiento de extracción es muy bajo, como la orina o la mucosa bucal.

Además de los pacientes PS1 y PS2, de manera complementaria se ha realizado el análisis genético de otros pacientes portadores de deleciones únicas en el mtDNA y que se resumen en la siguiente tabla (tabla 3.2).

Tabla 3.2 Resumen del análisis genético de los pacientes PS disponibles. EM, enfermedad mitocondrial. Se indica el valor medio de heteroplasmia en muestras en las que se realizaron distintas medidas.

Paciente	Diagnóstico	Tejido	Heteroplasmia (%)	Deleción (límites)
1	PS	Sangre 1	80	Deleción común
2	PS	Músculo	80	Deleción de 6514 pb (6897/13411)
3	PS>KSS	Sangre	-	Deleción común
4	PS>KSS	Sangre	50	Deleción común
5	EM	Sangre	50	Deleción de 4947 pb (10448/15395)
6	EM	Sangre	-	Deleción común
7	PS	Sangre	40	-
8	PS	Sangre	80	Deleción común
9	KSS/CPEO	Orina	90	Deleción común

3.1.4. Estudio anatómico-patológico de diferentes tejidos del paciente PS2 y relación con la distribución de la carga de deleción

La autopsia del paciente 2 fue realizada en colaboración con el Hospital La Paz de Madrid, y permitió revelar algunas características patológicas interesantes en varios de sus tejidos. Además, a fin de establecer una posible relación entre la naturaleza de la deleción y el fenotipo histopatológico, se analizó en cada tejido el nivel de heteroplasmia y el número de copias de mtDNA por célula (tabla 3.3), que resultaron elevados en todos los casos.

Tabla 3.3 Porcentaje de heteroplasmia de la deleción y número de copias de mtDNA por célula en los diferentes tejidos analizados del paciente PS2. El porcentaje de heteroplasmia se ha considerado la media entre los valores obtenidos por Southern blot y qPCR.

Muestra	Músculo	Cerebro	Hígado	Páncreas	Riñón
Heteroplasmia (%)	84	84	91	80	85
Copias de mtDNA/nDNA	2244	2343	2656	837	1486

En la figura 3.6A y B, se muestran las imágenes de cortes histológicos del músculo estriado del paciente PS2. El músculo es uno de los tejidos más estudiados en pacientes con patología mitocondrial por ser, normalmente, uno de los más afectados. A pesar de presentar un 85 % de heteroplasmia, la arquitectura de las fibras musculares parecía estar conservada. No obstante, se observaron algunas fibras vacuoladas (figura 3.6A), seguramente generadas por depósito de lípidos, y fibras rojo-rasgadas (figura 3.6B), características de las patologías mitocondriales, y causadas por un incremento de la masa mitocondrial en respuesta a un sistema OXPHOS

Resultados

deficiente (103). Además, aunque se trata de un tejido que suele presentar un elevado número de copias de mtDNA debido su alta demanda energética, los niveles en el paciente fueron superiores a los encontrados en músculo de personas sanas (176).

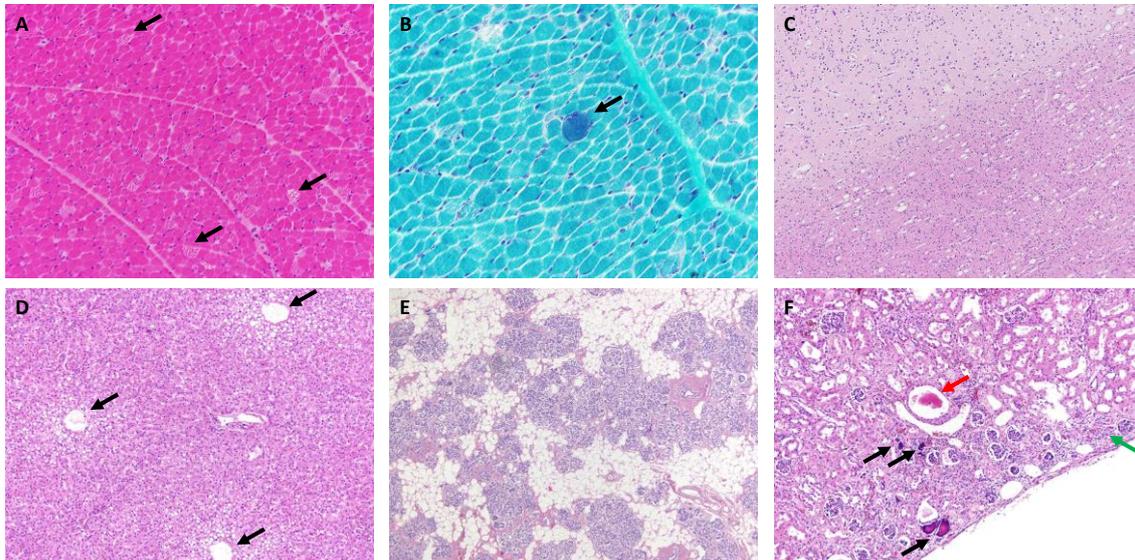


Figura 3.6 Imágenes de histología de varios tejidos del paciente PS2. A) Músculo. Se indican las fibras vacuoladas (flechas). B) Músculo. Se indica una fibra rojo-rasgada (flecha). C) Cerebro. D) Hígado. Se señala esteatosis alrededor de venas centrolobulillares (flechas). E) Páncreas. F) Riñón. Se indican microcalcificaciones (flechas negras), glomérulo atrófico (flecha roja) y túbulos atróficos (flecha verde). Las imágenes A, C, D, E y F corresponden a la tinción de Hematoxilina-Eosina y la imagen B a la tinción de Tricrómico de Gomori. Aumentos no proporcionados por el servicio.

El resto de los tejidos analizados también presentaron niveles de heteroplasmia muy elevados, probablemente por encima del umbral patológico, por lo que era esperable observar una arquitectura histológica alterada compatible con el efecto patológico de la delección. En el examen macroscópico del cerebro se observó un peso en fresco muy por debajo del correspondiente para su edad, lo que evidenciaba una atrofia cerebral. A nivel histológico, se observó una intensa vacuolización difusa en toda la sustancia blanca y la conservación de la trama de neurofilamentos (figura 3.6C). También se apreció vacuolización en cerebelo, sustancia negra de mesencéfalo, protuberancia y en médula espinal (imágenes no mostradas). Además, los niveles de mtDNA detectados en este tejido fueron superiores a los habituales en personas sanas (177). El hígado mostraba esteatosis moderada alrededor de las venas centrolobulillares (figura 3.6D), y el páncreas evidenciaba una atrofia del parénquima con intensa sustitución adiposa, ectasia ducto-acinar y ausencia de células beta (figura 3.6E). En cuanto al riñón, se observó atrofia de los glomérulos y los túbulos, y microcalcificaciones (figura 3.6F). Así pues, todos los tejidos analizados presentaron alteraciones graves compatibles con un defecto de la función OXPHOS.

3.2. Generación y caracterización de modelos celulares portadores de una delección única en el mtDNA

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado diferentes modelos celulares portadores de una delección única y grande en el DNA mitocondrial: fibroblastos, híbridos transmitocondriales o cíbridos y células madre pluripotentes inducidas (figura 3.7). Los fibroblastos mutantes y controles fueron obtenidos a partir de biopsias de piel de pacientes e individuos sin patología mitocondrial, respectivamente. Como se resume en la figura 3.7B, los cíbridos y las células madre pluripotentes inducidas se generaron a partir de fibroblastos utilizando diferentes estrategias. Cada una de las líneas celulares generadas fue caracterizada a nivel genético, molecular y morfológico.

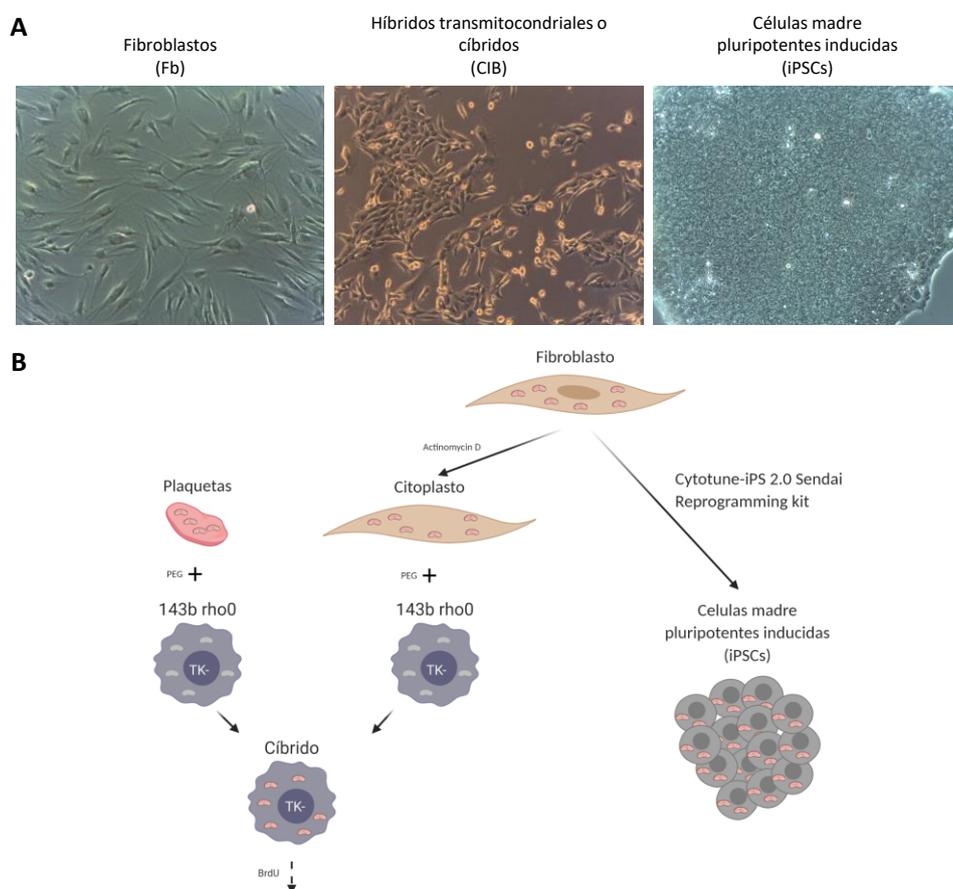


Figura 3.7 Modelos celulares empleados: fibroblastos, cíbridos o híbridos transmitocondriales y células madre pluripotentes inducidas. A) Imágenes de microscopía óptica de fibroblastos, cíbridos y células madre pluripotentes inducidas del paciente PS2, 100X. B) Esquema de los protocolos utilizados para la generación de los diferentes modelos celulares. Figura creada con BioRender.com.

3.2.1. Cultivo primario de fibroblastos a partir de biopsias de piel

En los diferentes experimentos realizados en esta tesis, se ha trabajado con dos líneas de fibroblastos mutantes, establecidas a partir de biopsias de piel de los pacientes con síndrome

de Pearson: la línea Fb PS1, portadora de la delección común, y la línea Fb PS2, portadora de la delección de 6514 pares de bases. Asimismo, se han empleado dos líneas de fibroblastos control: la línea Fb Control 5 años (FbC 5a), derivada de un niño de 5 años sin patología mitocondrial, y la línea Fb Control 1 mes (FbC 1m), obtenida de un bebé con un mes de edad también sin patología conocida.

Como se puede observar en figura 3.8, al analizar la heteroplasmia de ambas líneas patológicas con los pases, se observó que se mantenía entre el 75 % y 98 %, situándose en niveles muy cercanos a la homoplasmia. No obstante, el cultivo prolongado puede inducir una selección de clones con menor proporción de moléculas delecionadas, debido a la segregación mitótica y su mayor capacidad de supervivencia, provocando una caída del porcentaje de heteroplasmia, como la observada en el crecimiento de la línea Fb PS2 (87). Para reducir las posibilidades de que ocurriera este fenómeno, las líneas se crecieron en medio de cultivo suplementado con uridina y se evitó el mantenimiento prolongado.

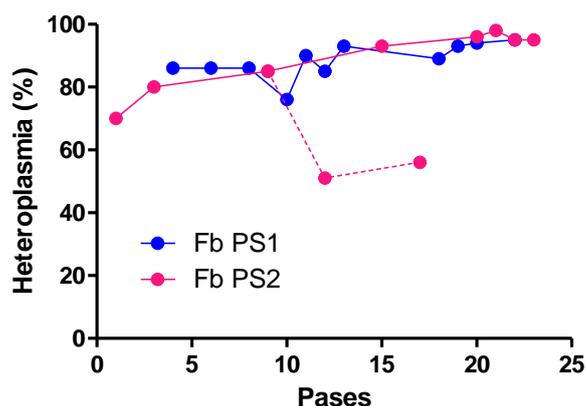


Figura 3.8 Variación de la heteroplasmia de los fibroblastos PS1 y PS2 durante el mantenimiento en cultivo. En línea discontinua se indica la caída puntual de heteroplasmia experimentada por Fb PS2.

3.2.2. Obtención de líneas cíbridas o híbridos transmitocondriales con diferentes niveles de heteroplasmia

Las líneas transmitocondriales se generaron mediante la fusión de células de osteosarcoma 143b rho⁰ con fibroblastos del paciente PS1 (portador de la delección común) y del paciente PS2 (portador de una delección de 6514 pb) siguiendo el protocolo resumido en figura 3.7B y descrito en el apartado 6.3.10.

Tras el protocolo de generación de cíbridos, se aislaron al menos 8 clones de cada línea con el objetivo de obtener diferentes niveles de heteroplasmia. En la tabla 3.4 se muestran los datos de los primeros pases tras la fusión y selección de cada uno de ellos. Se cuantificó el número de

copias de DNA mitocondrial y el porcentaje de heteroplasmia por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), y en algunos casos por Southern blot para confirmar los resultados.

Tabla 3.4 Número de copias de mtDNA y porcentaje de heteroplasmia de los diferentes clones obtenidos tras la generación de híbridos PS1 (CIB PS1) y PS2 (CIB PS2). Se muestran los valores obtenidos en pase 0, 1 o 2. Se indica ND en los valores que no pudieron ser determinados.

CIB PS1				CIB PS2			
Clones	Copias de mtDNA	Heteroplasmia (%) qPCR	Heteroplasmia (%) Southern blot	Clones	Copias de mtDNA	Heteroplasmia (%) qPCR	Heteroplasmia (%) Southern blot
A1	ND	81	ND	A1	664	0	ND
A2	2966	91	90	A2	878	5	ND
A3	4034	16	15	A3	2501	89	ND
A4	2878	0	ND	A4	1119	60	60
C1	3091	78	80	B1	580	0	10
C2	ND	0	ND	B2	504	47	70
C3	1507	0	0	B3	750	0	ND
C4	ND	37	ND	B4	437	18	60
				C1	1145	77	90
				C2	674	75	90
				C3	1863	89	90
				C4	333	33	0

Se seleccionaron clones con distintos niveles de heteroplasmia y se crecieron durante al menos 15 pases, comprobando el número de copias y heteroplasmia periódicamente.

3.2.2.1. Obtención de clones con diferentes niveles de heteroplasmia del híbrido CIB PS1

En el caso del híbrido CIB PS1, se seleccionaron cuatro clones iniciales con porcentajes de heteroplasmia dispares: A2, A3, C3 y C4. Sin embargo, al comprobar los niveles de mtDNA y la heteroplasmia tras unos pases, se descartó el clon A3 por alcanzar un número de copias de mtDNA demasiado bajo (figura 3.9).

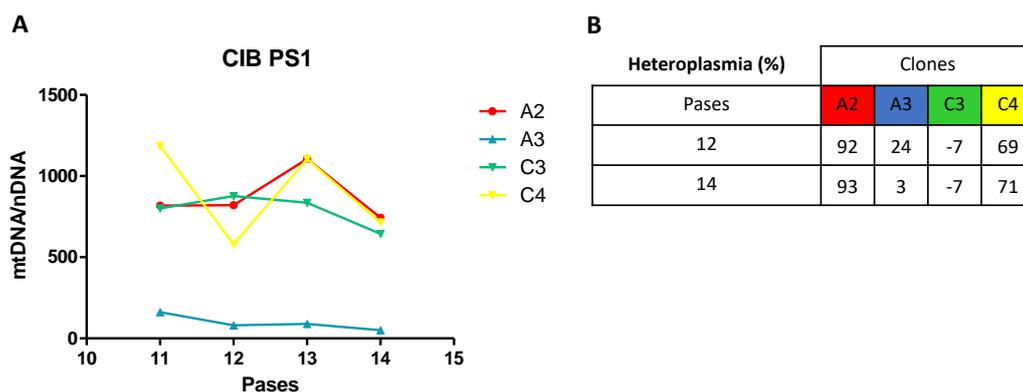


Figura 3.9 Clones seleccionados del CIB PS1. A) Análisis de la variación en el número de copias de mtDNA de los clones seleccionados durante cuatro pases. B) Nivel de heteroplasma de los clones seleccionados en pase 12 y 14. Los valores negativos indican ausencia de delección.

Con el objetivo de obtener una línea con un porcentaje de heteroplasma por debajo del 50 %, se creció el clon C4 durante varios pases en diferentes medios restrictivos: en alta concentración de glucosa (25 mM), 5 % de SFB y ausencia de uridina; y en medios con baja concentración de glucosa (5 mM), sin uridina y con 5 % de SFB o dSFB. Como se observa en la figura 3.10, se consiguió reducir el porcentaje de heteroplasma hasta un 40 %. Estos niveles también se alcanzaron con el crecimiento de la línea en medio normal (25 mM de glucosa, 5 % de SFB y uridina a 50 µg/µg) por lo que la caída de la heteroplasma podría deberse únicamente al mantenimiento en cultivo durante un tiempo prolongado. Finalmente, se trataron durante unos pases con galactosa y 5 % de SFB o dSFB para intentar restringir el crecimiento y potenciar aún más la caída de heteroplasma, pero no se consiguió una reducción por debajo del 40 %.

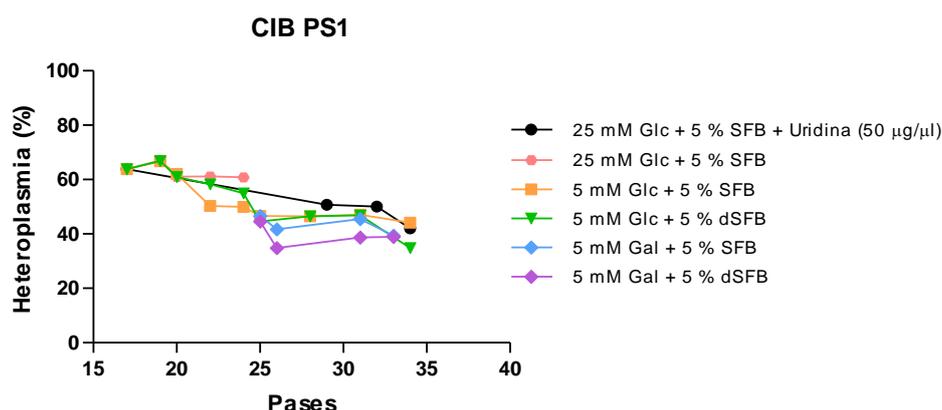


Figura 3.10 Caída del porcentaje de heteroplasma tras el tratamiento prolongado del clon C4 del CIB PS1 en medios de crecimiento restrictivos. El medio normal de crecimiento se indica en negro. Glc, glucosa. Gal, galactosa.

La tabla 3.5 resume los clones del CIB PS1 finalmente seleccionados para la realización de diferentes estudios y su nivel de heteroplasma, que se muestra como rangos debido a que se observaron algunas fluctuaciones durante el mantenimiento de las líneas en cultivo. Por ello, se

evitó el crecimiento prolongado de las líneas y se analizó la heteroplasmia de todos los clones en cada estudio realizado.

Tabla 3.5 Clones finales seleccionados del CIB PS1 y su nivel de heteroplasmia aproximado.

Clones	CIB PS1			
	1	2	3	4
Heteroplasmia aproximada (%)	85-95	70-50	50-40	0

3.2.2.2. Obtención de clones con diferentes niveles de heteroplasmia del híbrido CIB PS2

En el caso del CIB PS2, se seleccionaron cinco clones iniciales con diferentes porcentajes de heteroplasmia: B1, B2, B3, B4 y C3. Sin embargo, al comprobar los niveles de mtDNA y la heteroplasmia tras varios pases, se observó una polarización del porcentaje de delección: los clones B2 y C3 alcanzaron un porcentaje de delección muy elevado mientras que B1, B3 y B4 eran homoplásmicos sin delección (figura 3.11). Este fenómeno se ha descrito previamente en híbridos con otras mutaciones y se sugiere que el fondo genético nuclear de la célula receptora (143b ρ^0) puede influir en la segregación del mtDNA mutante y salvaje (130).

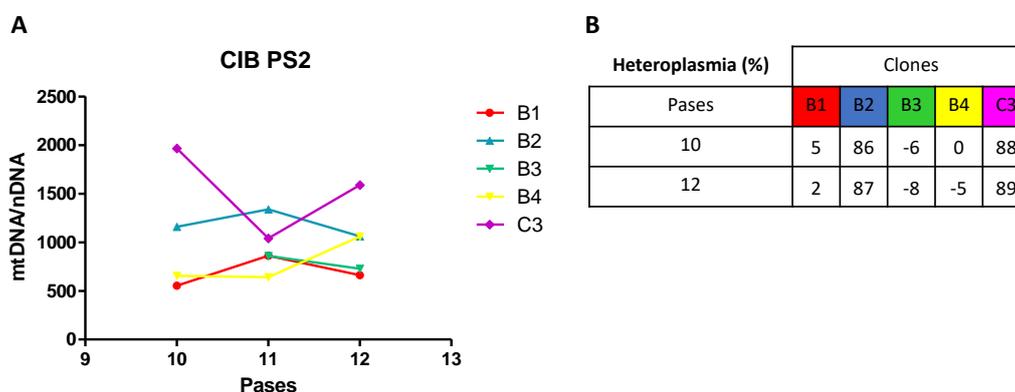


Figura 3.11 Clones seleccionados del CIB PS2. A) Copias de mtDNA de los clones seleccionados durante tres pases. B) Nivel de heteroplasmia de los clones seleccionados en pase 10 y 12. Porcentaje de heteroplasmia medido por qPCR. Los valores negativos indican ausencia de delección.

Para intentar obtener líneas con porcentajes de heteroplasmia intermedios, procedimos a generar nuevos clones a partir de células únicas de la línea CIB PS2 C3.1, resultante de un tratamiento del CIB PS2 con cuerpos cetónicos (descrito en el apartado 3.6.1.2). El nivel de heteroplasmia inicial de la línea C3.1 era del 50-60 % y mediante dilución al límite obtuvimos 10 nuevos clones, cuyos porcentajes de delección se recogen en la tabla 3.6. De ellos se seleccionaron los clones 3 y 5 por tener niveles intermedios de heteroplasmia, pero el clon 3 perdió la delección tras sólo 3 pases. Decidimos tratar el clon 5 con medios de crecimiento

restrictivos, siguiendo la estrategia utilizada con la línea CIB PS1 (figura 3.10), pero no conseguimos reducir la heteroplasmia por debajo del 55 %.

Tabla 3.6 Clones obtenidos mediante dilución al límite desde la línea CIB PS2 C3.1. Porcentaje de heteroplasmia determinado por qPCR.

CIB PS2										
Clones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Heteroplasmia (%)	78	77	15	ND	61	85	82	73	76	75

La tabla 3.7 resume los clones del CIB PS2 finalmente seleccionados para la realización de diferentes estudios y su nivel de heteroplasmia aproximado. Al igual que ocurría con el CIB PS1, se observaron algunas variaciones en el nivel de heteroplasmia durante el cultivo, por lo que se analizó el porcentaje exacto de cada clon en cada estudio realizado. Además de los clones B3 y C3, se escogió el clon C3.2 obtenido tras dos tratamientos con cuerpos cetónicos (apartado 3.6.1.2) y el clon 5 de C3.1 tras el crecimiento en galactosa durante algunos pases.

Tabla 3.7 Clones finales seleccionados del CIB PS2 y su nivel de heteroplasmia aproximado.

CIB PS2				
Clones	1	2	3	4
Heteroplasmia aproximada (%)	80	70-60	60-55	0

3.2.3. Obtención y caracterización de células madre pluripotentes inducidas

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han generado células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos control, obtenidos de un individuo de 1 mes de edad sin patología mitocondrial, y de fibroblastos de los pacientes PS1 (portador de la delección común) y PS2 (portador de una delección de 6514 pares de bases) siguiendo el protocolo resumido en figura 3.7B y descrito en el apartado 6.3.12. Tras llevar a cabo tres experimentos de reprogramación independientes, se obtuvieron diferentes líneas celulares: tres clones a partir de los fibroblastos control (clon V, G y A), dos clones a partir de los fibroblastos del paciente PS1 (clon 10 y 11), y un único clon a partir de los fibroblastos del paciente PS2. No fue posible conseguir una línea *wild-type* del paciente PS1, ni una con delección del paciente PS2, por lo que no se pudieron realizar estudios comparativos entre las líneas mutantes y sus controles isogénicos. En los experimentos realizados se emplearon los clones V y G como controles ya que decidimos descartar el clon A por mostrar un crecimiento más lento y diferente a las otras dos líneas iPSCs controles, que si mostraron un comportamiento propio de células ES.

La generación de células madre pluripotentes inducidas portadoras de delecciones en el mtDNA solo se ha descrito en dos ocasiones, lo que evidencia que no es un proceso sencillo (84,89). En nuestro caso, las líneas de iPSCs con delección común (clon 10 y 11 de iFb PS1) se consiguieron

en el tercer experimento de reprogramación de los fibroblastos del paciente PS1 y coincidió con la sustitución del medio *Essential 8™* (Gibco™ ThermoFisher Scientific), empleado en los dos experimentos anteriores, por el medio *NutriStem® hPSC XF* (Biological Industries), siguiendo lo sugerido por Russell *et al.* (84). Como se observa en la figura 3.12, el nivel de heteroplasma de los clones 10 y 11 de iFb PS1 se mantuvo constante durante varios pases. No obstante, se detectó una disminución en el nivel de heteroplasma del clon 10 cuando se mantuvo en cultivo durante un tiempo prolongado, por encima del pase 30. Por ello, siempre que fue posible se intentó reducir el crecimiento de las células iPS antes de la realización de los diferentes estudios y se analizó el porcentaje de heteroplasma de todas las líneas en cada uno de los experimentos.

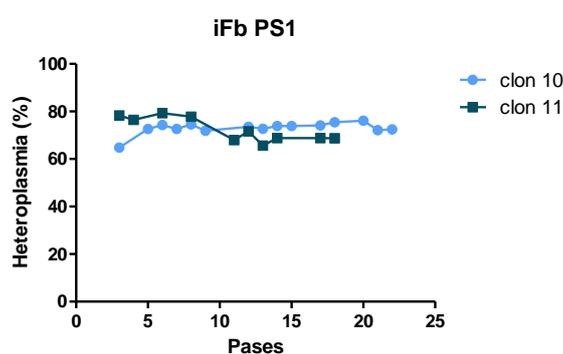


Figura 3.12 Variación de la heteroplasma de la delección común en los clones 10 y 11 de iFb PS1 durante varios pases.

3.2.3.1. Estudio de los parámetros que definen una célula pluripotente inducida

Las publicaciones en las que se presenta una nueva línea de célula madre pluripotente inducida describen una serie de parámetros que se consideran esenciales para poder identificar la línea y concluir que es correcta (178–180). Además del análisis genético, que se describe más adelante y que es importante realizar en cualquier nuevo modelo celular generado, es esencial comprobar que la morfología celular es la adecuada, confirmar la pérdida de los vectores virales, analizar la expresión de marcadores de pluripotencia, medir la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, y comprobar la capacidad de la línea de diferenciarse a cuerpos embrioides y a las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo.

3.2.3.1.1. Morfología celular

Una de las características que definen a las células madre pluripotentes inducidas y que observamos en todas las líneas obtenidas en este trabajo es su particular morfología celular. Es muy característico su crecimiento en colonias compactas y con bordes redondeados. Además,

Resultados

el ratio núcleo-citoplasma es muy elevado y se observan nucleolos muy condensados en el interior nuclear (figura 3.13).

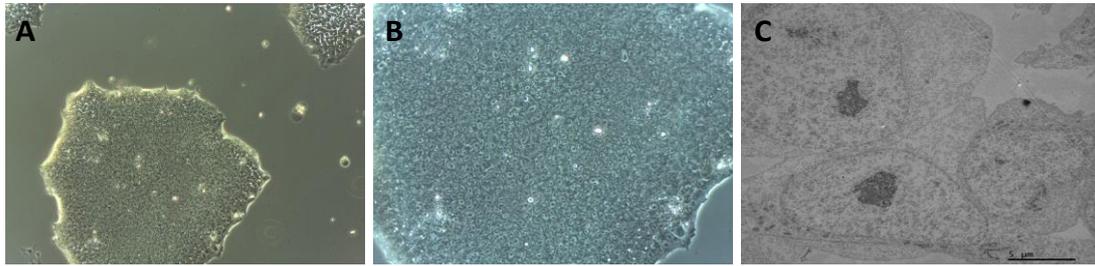


Figura 3.13 Morfología de las células madre pluripotentes inducidas. A) Imagen de microscopía óptica de la línea iFb PS2, 100 X. B) Imagen de microscopía óptica de la línea iFb PS2, 200 X. C) Imagen de microscopia electrónica de la línea iFbC clon V.

3.2.3.1.2. Pérdida del virus SeV

El kit de reprogramación Cytotune®-iPS 2.0 es un sistema no integrativo, sin embargo, es necesario comprobar que las células iPS generadas no contienen ningún elemento del kit después de la reprogramación. Para ello, se extrajo RNA total de las líneas en diferentes pases, se obtuvo cDNA mediante transcripción reversa y se amplificaron mediante PCR secuencias específicas de los diferentes vectores y del genoma del Sendai Virus. Finalmente, se detectaron los amplificados mediante una electroforesis en gel de agarosa. En la figura 3.14 se muestran los resultados obtenidos para todas las líneas de células madre pluripotentes inducidas generadas en esta tesis. Al comparar con los controles positivos, que son los fibroblastos justo después de la transfección, se confirma la pérdida de los vectores de reprogramación en todas ellas tras un determinado número de pases. Como control negativo se emplearon los fibroblastos sin tratamiento en medio de crecimiento normal.

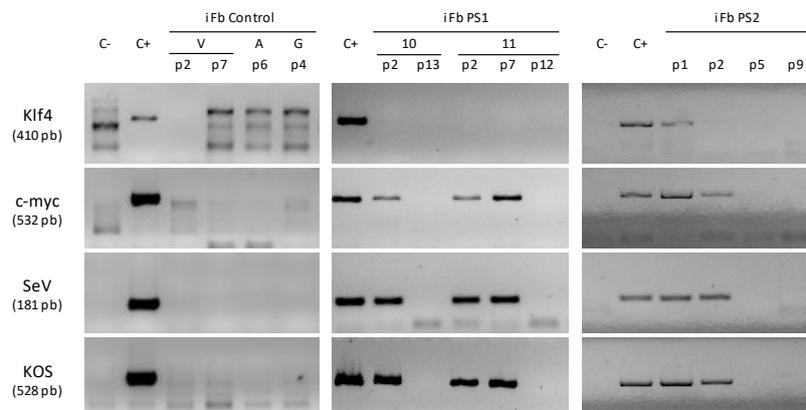


Figura 3.14 Electroforesis de los fragmentos amplificados utilizando oligonucleótidos específicos para los transgenes de reprogramación y el genoma viral: Klf4, c-myc, SeV, KOS. Se muestran los resultados para los diferentes clones de las diferentes líneas de iPSCs analizadas y en diferentes pases. C-, control negativo, fibroblastos sin tratamiento en medio de crecimiento normal. C+, control positivo, fibroblastos justo después de la transfección.

3.2.3.1.3. Expresión de marcadores de pluripotencia

Para confirmar que las líneas generadas eran pluripotentes, se analizó la expresión de marcadores de pluripotencia mediante inmunofluorescencia. Los marcadores que habitualmente se analizan son los factores de transcripción Oct-4, SOX-2 y NANOG, y el antígeno TRA-1-60 expresado en la superficie de células madre. Los resultados para el clon V de iFb Control se muestran en la figura 3.15, y el resto de las líneas generadas en el anexo 1. Todas las líneas mostraron un marcaje positivo de todos los marcadores de pluripotencia analizados.

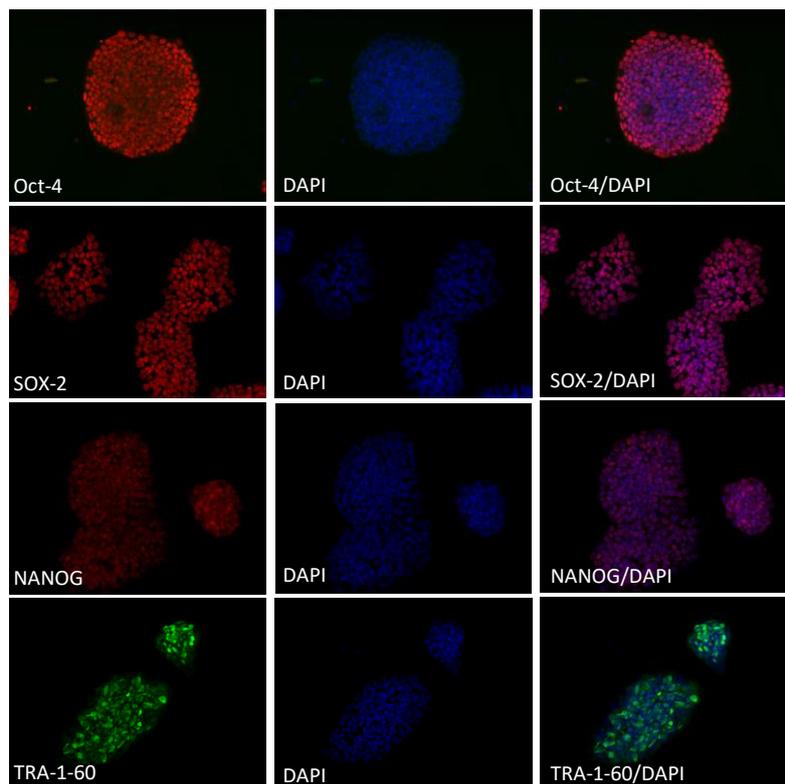


Figura 3.15 Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia de la línea iFb Control clon V. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X. Se observan en azul los núcleos celulares (DAPI).

3.2.3.1.4. Actividad de la fosfatasa alcalina

Una de las características observadas en las células madre es la alta actividad de la fosfatasa alcalina. Todas las líneas de células iPS generadas durante el desarrollo de esta tesis mostraron actividad de esta enzima como se observa en la figura 3.16.

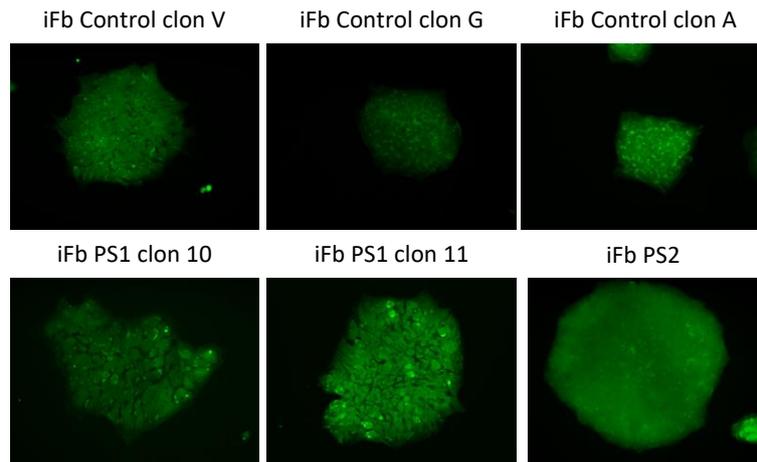


Figura 3.16 Actividad de la fosfatasa alcalina en las líneas iPSCs generadas. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X.

3.2.3.1.5. Capacidad de diferenciación *in vitro* a las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo.

La característica más importante que define a una célula madre pluripotente es su capacidad de diferenciación a las tres capas germinales embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Comprobamos la capacidad de diferenciación *in vitro* de las líneas iPSCs generadas adaptando el protocolo descrito por Zurita *et al.* (181). Para la diferenciación a endodermo y ectodermo se realizó la diferenciación intermedia de las células iPS a cuerpos embrioides. Para confirmar la correcta diferenciación de las líneas, se analizó la presencia de proteínas específicas de cada capa germinal mediante inmunofluorescencia. AFP, α -fetoproteína, es una proteína producida por el saco vitelino y el hígado durante el desarrollo embrionario e identificativa de la capa endodérmica. SMA, α -actina de músculo liso, importante para la fibrogénesis, identifica al endodermo y es la isoforma de actina que predomina en células del tejido muscular liso. TUBB3, β III-tubulina, principalmente expresada en neuronas e identificativa de ectodermo.

Como se observa en la figura 3.17, todas las líneas iPSC generadas mostraron capacidad de diferenciación a cuerpos embrioides y a las tres capas germinales.

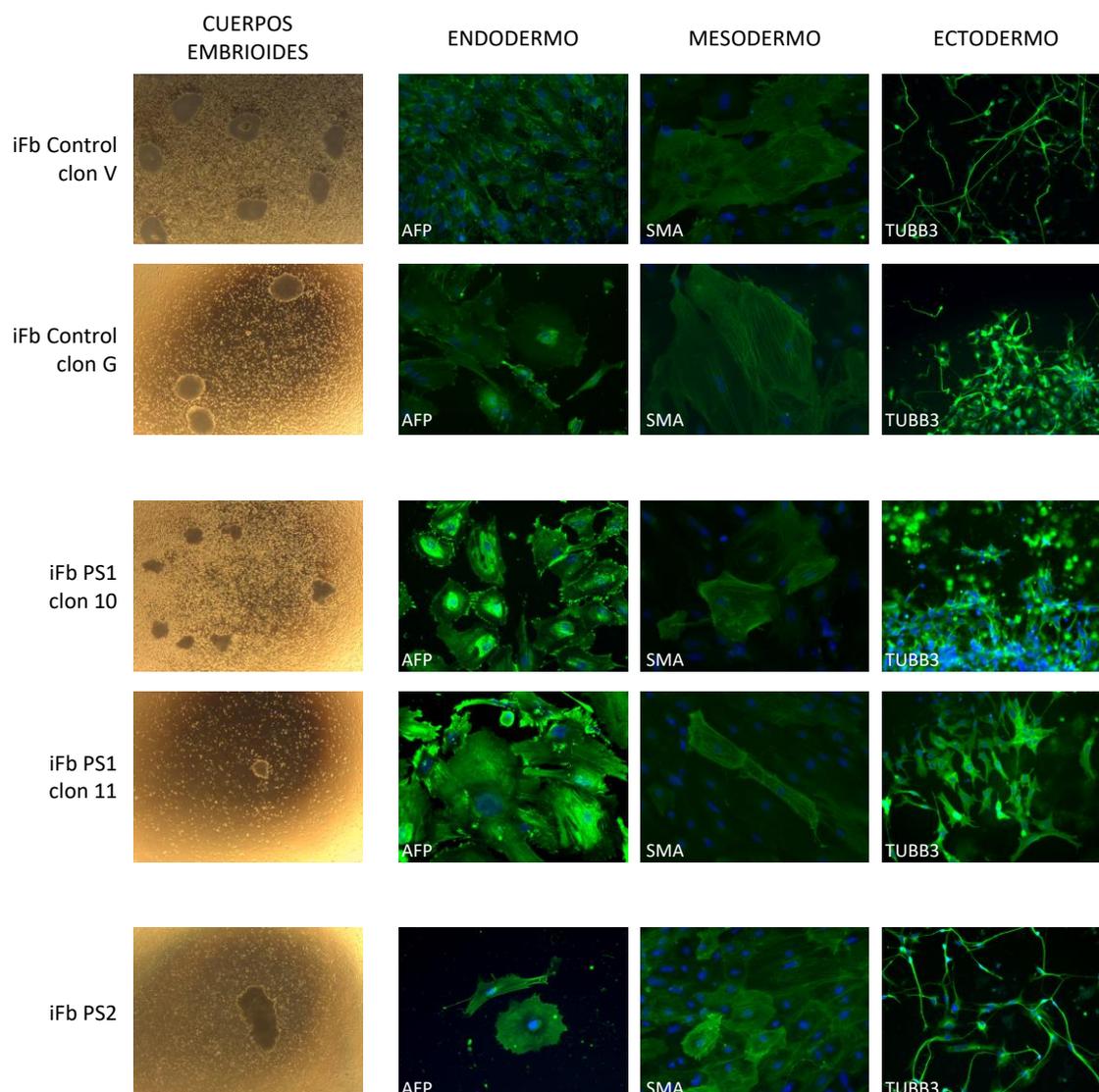


Figura 3.17 Diferenciaciones de las células madre pluripotentes inducidas a cuerpos embrioides y a las tres capas germinales. A la izquierda, imágenes de cuerpos embrioides tomadas mediante microscopía óptica, 40X. El resto, imágenes de inmunofluorescencia de las diferenciaciones a las tres capas germinales mostrando la expresión de marcadores de diferenciación AFP, SMA y TUBB3 (verde) y los núcleos celulares marcados con DAPI (azul), 200X.

3.2.4. Caracterización genética de los modelos celulares.

3.2.4.1. Huella genética

Para caracterizar genéticamente las células generadas y utilizadas en esta tesis, se analizó la huella genética de 16 secuencias cortas repetidas en tándem (STR, del inglés *short tandem repeats*), altamente polimórficas y dispersas por todo el genoma. Esta técnica permite conocer la autenticidad de las células utilizadas. Esto es importante tanto para evitar la posible contaminación cruzada entre distintas células, que suele ser un problema común en laboratorios en los que se trabaja con cultivos celulares, como para describir los posibles cambios ocurridos durante la generación de los diferentes modelos celulares (182).

Resultados

En la siguiente tabla (tabla 3.8), se muestran los resultados obtenidos para todas las líneas celulares, organizadas en bloques con el mismo fondo genético nuclear:

Tabla 3.8 Huella genética de las líneas generadas y utilizadas. Se indican en rojo las alteraciones detectadas con respecto a la línea parental.

Marcador	Alelos												
	FbC 5a	FbC 1m	iPSC FbC clon V	iPSC FbC clon G	iPSC FbC clon A	FbPS1	iPSC FbPS1 clon 10	iPSC FbPS1 clon 11	FbPS2	iPSC FbPS2	143B	CIB PS1 134B	CIB PS2 143B
TPOX	8	8,9	8,9	8,9	8,9	8	8	8	11	11	11	11	11
D2S1338	16,23	17,20	17,20	17,20	17,20	19	19	19	19	19		24,25	24,25
D3S1358	14,19	18	18	18	18	15	15	15	15,16	15,16		15	15
FGA	20,23	24,25	24,25	24,25	24,25	22	22	22	22,25	22,25		24	24
D5S818	11,12	11	11	11	11	10,12	10,12	10,12	11,12	11,12	13	13	13
CSF1PO	10,11	11,12	11,12	11,12	11,12	11	11	11	10,12	10,12	12	12	12
D7S820	8,12	9,10	9,10	9,10	9,10	9	9	9	11,12	11,12	11,12	11,12	11,12
D8S1179	11,13	13,14	13,14	13,14	13,14	13,15	13,15	13,15	14,15	14,15		11,14	11,14
TH01	7,9,3	7,9	7,9	7,9	7,9	8,3,9	8,3,9	8,3,9	6,1	6,1	6	6	6
vWA	17,19	15,17	15,17	15,17	15,17	16,17	16,17	16,17	16,18	16,18	18	18	18
D13S317	11,12	10,12	10,12	10,12	10,12	8,12	8,12	8,12	8,12	8,12	12	12	12
D16S539	10,13	11,13	11,13	11,13	11,13	12,13	12,13	12,13	11,12	11,12	10,13	10,13	10,13
D18S51	15	16,19	16,19	16,19	16,19	15	15	15	12	12		17	17
D19S433	12,14	12,15,2	12,15,2	15,2	12,15,2	14	14	14	13,14	13,14		13	13
D21S11	30,31,2	29	29	29	29	32,2	32,2	32,2	27,32	27,32		31,2, 32,2	31,2, 32,2
AMEL	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X,Y	X	X,Y	X,Y	X	X	X

Se observaron cambios entre el fibroblasto original y la iPSC generada en alguna de las líneas: el clon G de iPSC Fb control perdió un marcador del cromosoma 19, mientras que el clon 11 de la línea iPSC Fb PS1 perdió el marcador del cromosoma Y. No obstante, los datos mostrados confirman la identidad de cada una de las líneas.

3.2.4.2. Cariotipado

Las alteraciones en el cariotipo pueden aparecer cuando se mantienen las líneas celulares en cultivo durante periodos de tiempo prolongados (183). También se ha sugerido que pueden aparecer alteraciones cromosómicas durante el proceso de reprogramación (184–186). Por todo ello, se analizó el cariotipo de los fibroblastos y las iPSC derivadas de ellos para descartar posibles alteraciones cromosómicas con consecuencias importantes. No se analizó el cariotipo de los híbridos ni de la línea de osteosarcoma 143b rho⁰ ya que se trata de una línea tumoral y por tanto aneuploide. Además, se ha descrito previamente como híbridos con el mismo fondo nuclear 143b muestran diferencias en el número de cromosomas pero no alteraciones fenotípicas (187).

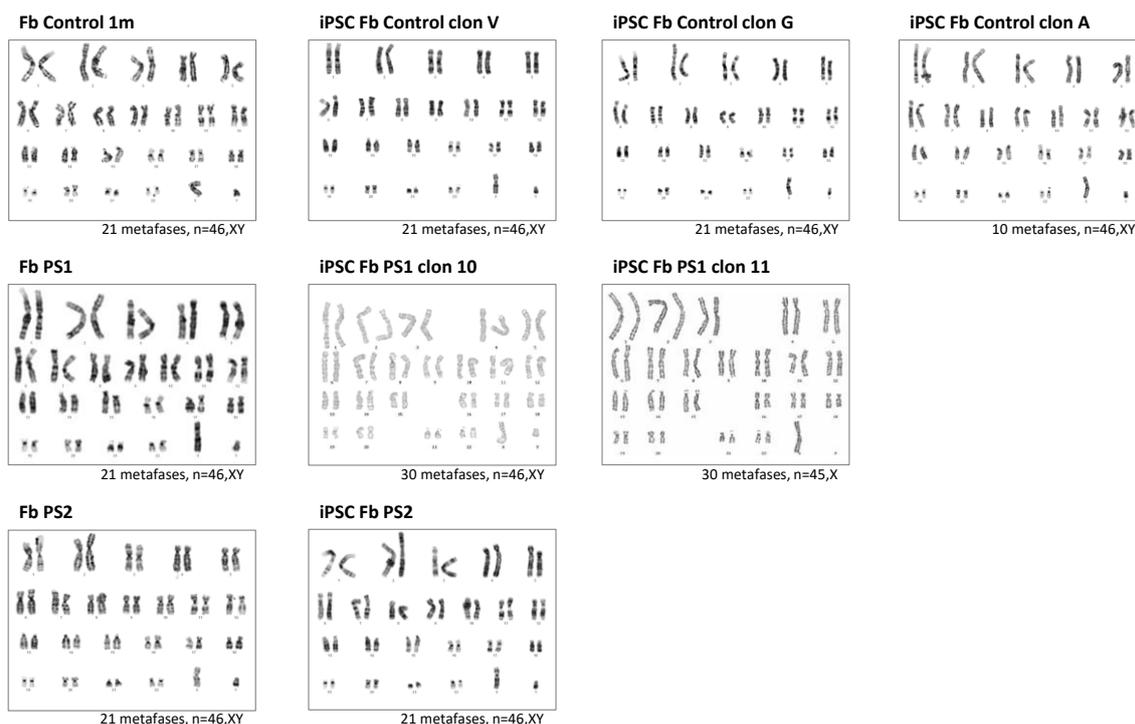


Figura 3.18 Cariotipos ordenados de las fibroblastos y las líneas de iPSC generadas. En la parte superior de cada cariotipo ordenado se indica el nombre de la línea celular. Debajo de cada uno se indica el número de metafases analizadas, así como el número modal de los cromosomas cuantificados (n) y los cromosomas sexuales.

Se analizaron al menos 20 metafases en todas las líneas, salvo en el clon A de iPSC control en la que solo se pudieron analizar 10 metafases. En la figura 3.18 se muestran los cariotipos obtenidos para cada una de las líneas, con los pares de cromosomas ordenados según su morfología y tamaño (cariograma). Solo se observaron alteraciones cromosómicas en el clon 11 de la línea iFb PS1, en el que el número modal de cromosomas fue 45 debido a la pérdida del cromosoma Y, como también se observó en el análisis de los STR (tabla 3.8). Las demás líneas celulares mostraron un cariotipo normal euploide de 46 cromosomas.

3.2.4.3. Secuenciación completa del mtDNA y determinación del haplogrupo mitocondrial

Para completar la autenticación de las líneas celulares se secuenció el mtDNA completo de cada una de ellas. Además de descartar posibles contaminaciones cruzadas durante el cultivo, la secuenciación completa nos permitió determinar si existían mutaciones patológicas y encuadrar las líneas dentro de un haplogrupo mitocondrial, definido por la combinación de unas determinadas variaciones en el mtDNA.

En el anexo 2, se detallan los polimorfismos detectados en el análisis genético de cada una de las líneas. Estos cambios han sido descritos anteriormente como variantes poblacionales asociadas a su correspondiente haplogrupo. Aparentemente, ninguna de ellas es patológica,

según los criterios de la base de datos MITOMAP (60). Los polimorfismos detectados en los híbridos y en las células madre pluripotentes inducidas coinciden con los de los fibroblastos parentales utilizados para su generación. Esto confirma la autenticidad de las líneas celulares generadas y descarta posibles contaminaciones durante el cultivo.

Según los polimorfismos encontrados, los fibroblastos control 5a se encuadran dentro del haplogrupo U2e1a1, los fibroblastos control 1m y las células generadas a partir de ellos se incluyen dentro del haplogrupo H1j1, las líneas de PS1 son del haplogrupo H5a1d y las líneas de PS2 del haplogrupo U3a1. Se han publicado numerosos estudios que muestran cómo el haplogrupo mitocondrial puede modificar las características y funcionalidad del sistema OXPHOS, e incluso puede modificar el riesgo a sufrir determinadas patologías o la respuesta a tratamientos (34,35,188–192).

En siguientes apartados de esta tesis, se muestran análisis de diferentes parámetros bioquímicos del sistema OXPHOS, tratamientos y diferenciación a distintos tipos celulares de estas líneas, por lo que el haplogrupo de cada una puede ser un factor relevante a tener en cuenta en la interpretación de los resultados.

3.2.5. Caracterización de la ultraestructura mitocondrial en los diferentes modelos celulares

Mediante microscopía electrónica se analizó la ultraestructura de la mitocondria en los diferentes modelos celulares portadores de deleciones en el mtDNA y sus respectivos controles.

Las células modulan la forma de sus mitocondrias mediante procesos de fusión y fisión adaptándose a sus necesidades energéticas. Estos cambios pueden producirse por procesos fisiológicos como la falta de nutrientes, por lo que es común encontrar diferentes morfologías mitocondriales en células sanas (2). Sin embargo, algunas variaciones se han observado con cierta frecuencia en biopsias de piel y musculares de pacientes con diferentes enfermedades mitocondriales (107–111).

La ultraestructura mitocondrial normal se define por una forma tubular o esférica con una red de crestas bien definidas y una matriz electrodensa. Los fibroblastos control analizados presentaron principalmente mitocondrias con esta morfología, tubulares y muy alargadas. En cambio, las mitocondrias de los fibroblastos PS1 y PS2 con alto nivel de heteroplasmia presentaron mitocondrias más redondeadas e hinchadas con crestas poco numerosas y claramente dañadas, y una matriz con menor densidad de electrones. Además, se observaron

numerosas mitocondrias con compartimentos internos anormales limitados por doble membrana y en algunos casos, completamente separados de la membrana mitocondrial externa y distribuidos de forma concéntrica formando mitocondrias “con forma de cebolla”. Durante el mantenimiento en cultivo se redujo el porcentaje de heteroplasmia en la línea PS2 de forma espontánea hasta un 50 %. Esto nos permitió observar que con este porcentaje las mitocondrias mostraban mayoritariamente una morfología normal y muy diferente a las de la misma línea con alto nivel de heteroplasmia (93 %). Por otra parte, ambos fibroblastos PS mostraron algunas mitocondrias ramificadas (figura 3.19).

Estos resultados evidencian que la presencia de delección en el mtDNA provoca graves consecuencias sobre la ultraestructura mitocondrial en los fibroblastos PS, que no se detectan en las líneas control o con una heteroplasmia por debajo del umbral patológico.

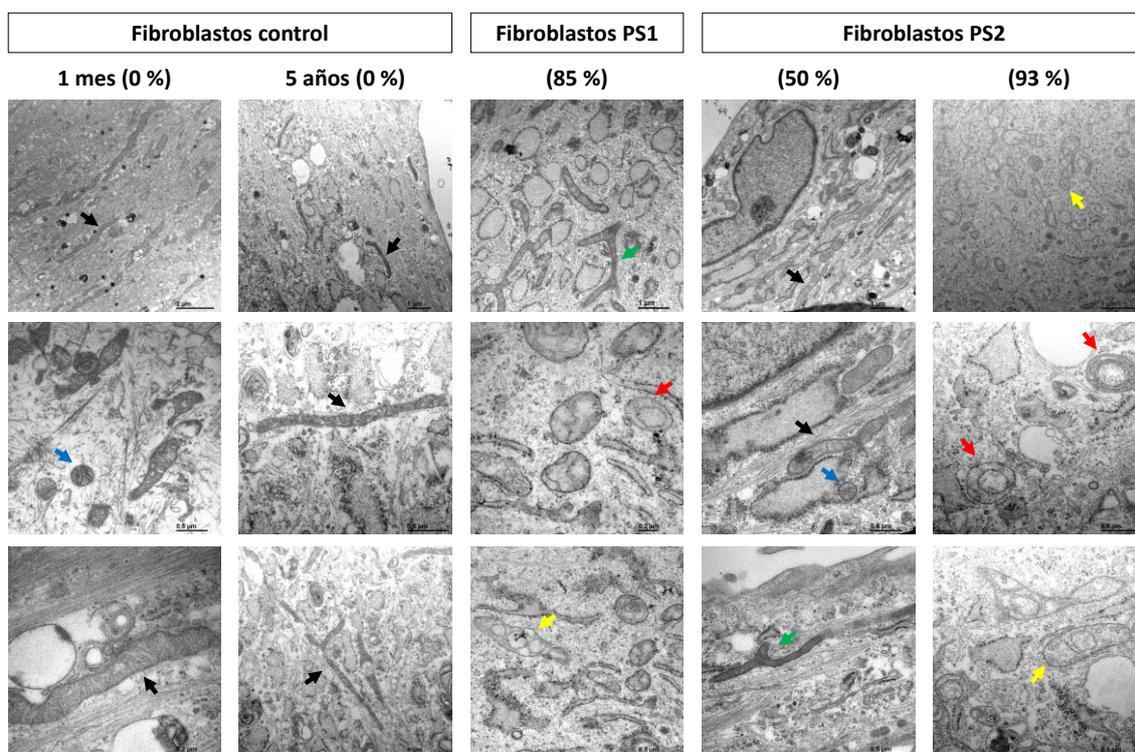


Figura 3.19 Ultraestructura mitocondrial de los fibroblastos control, PS1 y PS2. Imágenes de microscopía electrónica. En paréntesis se indica el porcentaje de heteroplasmia de la línea. En vertical se muestran tres imágenes correspondientes a la misma línea. Se señalan ejemplos de mitocondrias tubulares (flechas negras), esféricas (flechas azules), ramificadas (flechas verde), mitocondrias con compartimentos internos aberrantes (flechas amarillas) y con forma de cebolla (flechas rojas).

El análisis ultraestructural de las células madre pluripotentes inducidas control y ambos clones de PS1, con una heteroplasmia del 77 % y del 78 % respectivamente, reveló que todas ellas presentaban mitocondrias con una morfología mayoritariamente inmadura, con crestas poco desarrolladas y una matriz con poca densidad electrónica (figura 3.20). Los clones de PS1 parecían presentar una red de crestas más pobre e incluso inexistente. Las micrografías

Resultados

revelaron que tanto las iPSCs control como las mutantes tenían mitocondrias con un espacio intermembrana engrosado y con mayor densidad de electrones, además de mostrar una distribución principalmente perinuclear.

Estos resultados parecen indicar que, a pesar de que las células iPS presentan mitocondrias principalmente inmaduras, la presencia de delección en alta heteroplasmia afectaría ligeramente a la ultraestructura mitocondrial al observarse una morfología incluso menos desarrollada en los clones de PS1 que en la línea celular control.

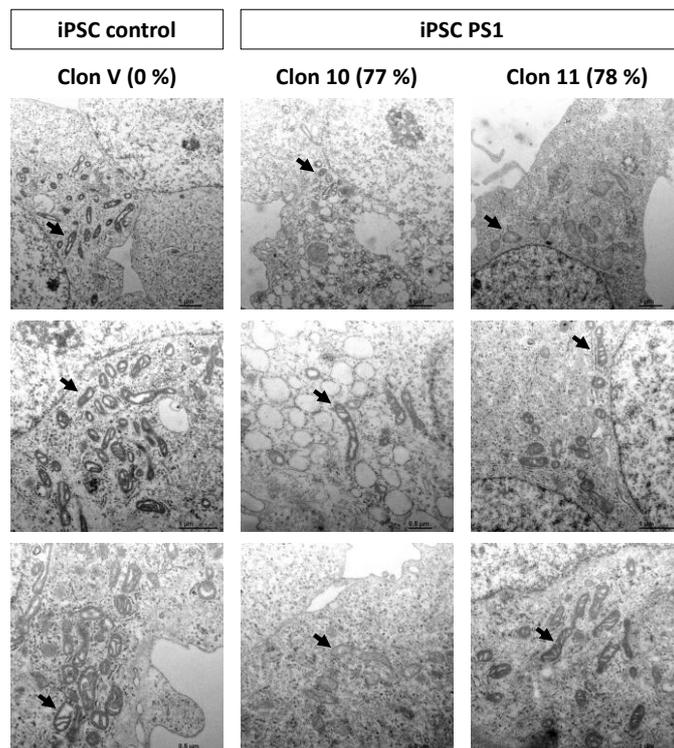


Figura 3.20 Ultraestructura mitocondrial de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) control (clon V) y PS1 (clon 10 y 11). Imágenes de microscopía electrónica. En paréntesis se indica el porcentaje de heteroplasmia de la línea. En vertical se muestran imágenes correspondientes a la misma línea. Se señalan ejemplos de mitocondrias inmaduras (flechas negras).

La disponibilidad de cíbridos PS1 y PS2 con diferentes niveles de heteroplasmia permitió estudiar si la ultraestructura mitocondrial se veía afectada en diferente grado según el porcentaje de delección, y además realizar una comparativa entre líneas con distinto tipo de delección. Aunque se encontraron alteraciones en ambos cíbridos, éstas fueron diferentes a pesar de presentar una heteroplasmia similar. Los clones del cíbrido PS1 con 45 % y 60 % de heteroplasmia mostraron mitocondrias gigantes y redondeadas con unas crestas muy irregulares formando compartimentos internos aberrantes (figura 3.21). En cambio, las micrografías de los clones con 60 % y 70 % de mtDNA deleccionado del cíbrido PS2, no revelaron cambios importantes en el tamaño de las mitocondrias pero si algunas con una red de crestas defectuosa (figura 3.22). En

estos clones del cíbrido PS2 también se observaron mitocondrias ramificadas similares a las detectadas en los fibroblastos PS (figura 3.19).

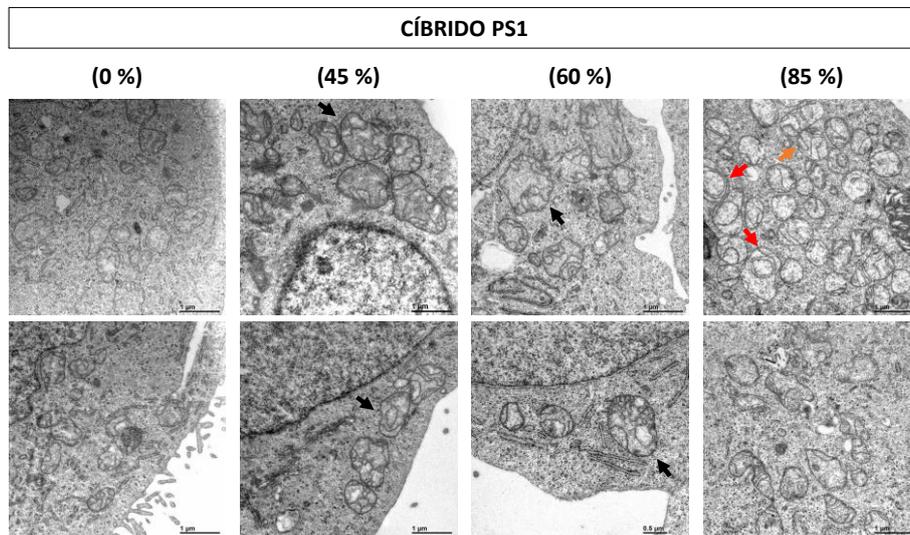


Figura 3.21 Ultraestructura mitocondrial de los clones del cíbrido PS1 con diferentes niveles de heteroplasmia. Imágenes de microscopía electrónica. En paréntesis se indica el porcentaje de heteroplasmia de la línea. En vertical se muestran imágenes correspondientes a la misma línea. Se señalan ejemplos de mitocondrias grandes con crestas irregulares (flechas negras), con crestas linealizadas (flecha naranja) y con crestas concéntricas (flechas rojas).

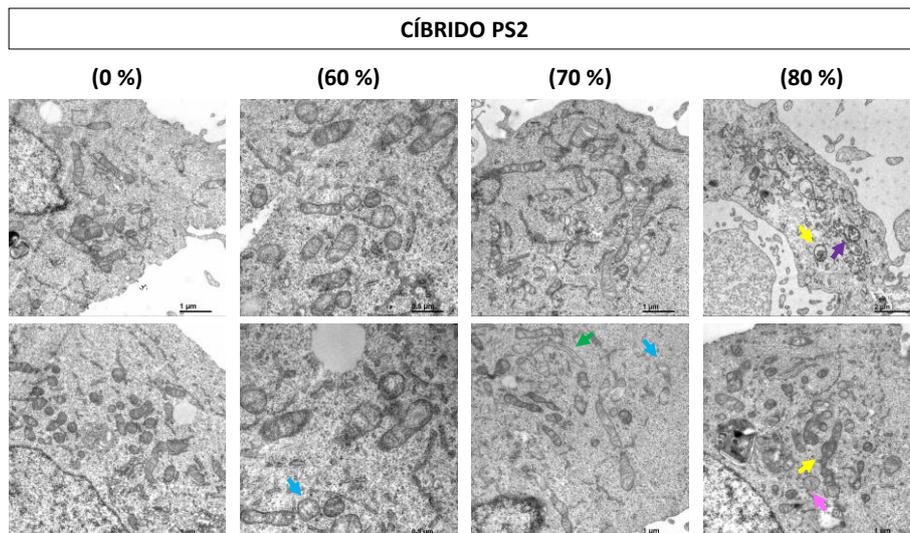


Figura 3.22 Ultraestructura mitocondrial de los clones del cíbrido PS2 con diferentes niveles de heteroplasmia. Imágenes de microscopía electrónica. En paréntesis se indica el porcentaje de heteroplasmia de la línea. En vertical se muestran imágenes correspondientes a la misma línea. Se señalan ejemplos de mitocondrias con una red de crestas defectuosa (flechas azules), mitocondrias ramificadas (flecha verde), mitocondrias con compartimentos aberrantes y diferente densidad de electrones (flechas amarillas), con inclusiones paracristalinas (flecha rosa) y nanotúneles (flecha morada).

Las alteraciones en la ultraestructura mitocondrial en los cíbridos PS fueron especialmente importantes en los clones con el nivel de heteroplasmia más alto. El clon del CIB PS1 con 85 % de heteroplasmia mostró mitocondrias redondeadas con una matriz con poca densidad de electrones y una red de crestas muy desorganizada (figura 3.21). Además, la mayoría de las mitocondrias mostraban crestas linealizadas con formas geométricas o concéntricas similares a

las observadas en los fibroblastos PS (figura 3.19). Por otra parte, el clon del CIB PS2 con 80 % de delección mostró mitocondrias con compartimentos anormales y, en muchos casos, con diferente densidad de electrones, e inclusiones paracrystalinas en su interior (figura 3.22). En cuanto a la forma, algunas mitocondrias de este clon parecían constreñidas y formando estrechamientos constituidos por membrana mitocondrial interna y externa denominados nanotúneles.

Estos resultados indican que la presencia de una delección en el mtDNA en alto nivel de heteroplasma provoca graves alteraciones en la ultraestructura mitocondrial. Gracias al análisis de ambos híbridos con diferentes niveles de heteroplasma, se han observado diferencias en las alteraciones morfológicas según el tipo de delección y el porcentaje, cuando se sitúa entre el 45 y el 70 %. Sin embargo, en modelos con mitocondrias poco desarrolladas como las células madre pluripotentes inducidas, las consecuencias sobre la ultraestructura son menos evidentes.

3.3. Efecto de las deleciones en alto nivel de heteroplasma sobre la función mitocondrial en diferentes modelos celulares

Para estudiar el efecto de las deleciones únicas en el mtDNA sobre el contenido y la función mitocondrial, se analizaron diferentes parámetros bioquímicos en los diferentes modelos celulares generados, y se observó un defecto de la función OXPHOS en todos los casos.

Para determinar si este defecto pudiera variar entre deleciones únicas de diferente tamaño, se realizaron estudios comparativos entre líneas PS1 y PS2. Es importante destacar que los fondos genéticos nuclear y mitocondrial son diferentes en las comparaciones realizadas entre las líneas PS1 y PS2 de fibroblastos; mientras que en los híbridos la única diferencia es a nivel mitocondrial.

Para poder comparar los resultados obtenidos entre las líneas, se homogenizaron las condiciones de cultivo en la medida de lo posible. En el caso de los fibroblastos y los híbridos, se mantuvieron en medio de crecimiento con glucosa 5 mM durante al menos 72 horas antes del estudio. Esto no fue posible en las líneas de células madre pluripotentes inducidas ya que requieren de un medio de crecimiento específico en el que la concentración de glucosa es de 17 mM.

3.3.1. Análisis de la biogénesis mitocondrial

Las células incrementan la masa mitocondrial en respuesta a una demanda energética provocada por procesos fisiológicos, como el ejercicio físico, o por el mal funcionamiento del sistema OXPHOS (36). Este mecanismo de compensación se denomina biogénesis mitocondrial y se ha descrito en algunas patologías mitocondriales, como la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) o cardiomiopatías (40–42).

Para determinar cómo afectan las deleciones en el mtDNA al contenido mitocondrial en los diferentes modelos celulares, se estudiaron parámetros bioquímicos a diferentes niveles: se cuantificó el número de copias de mtDNA, se midió la actividad de la enzima citrato sintasa, se midieron los niveles de mRNA de genes codificados en el genoma mitocondrial y se analizó la expresión de genes nucleares implicados en la replicación del mtDNA y de genes clave en la ruta de activación de la biogénesis mitocondrial.

3.3.1.1. Determinación de los niveles de mtDNA

Se observó un aumento significativo del número de copias de mtDNA en todas las líneas mutantes (figura 3.23). Al comparar los niveles entre los diferentes modelos celulares con deleción, se observó que tanto las líneas de PS1 como las de PS2 duplicaban sus niveles, a excepción de los fibroblastos PS1 en los que el incremento de copias fue ligeramente inferior. Además, se obtuvieron diferencias significativas entre los fibroblastos PS1 y PS2, siendo mayor el número de copias en la línea con la deleción de mayor tamaño, pero no entre los híbridos de estos pacientes, para unos niveles de heteroplasmia similares. Esta diferencia podría deberse a una influencia del fondo genético nuclear en la regulación de la replicación del DNA mitocondrial, aunque no se pudo corroborar esta hipótesis al carecer de una línea de células iPS de PS2 con deleción.

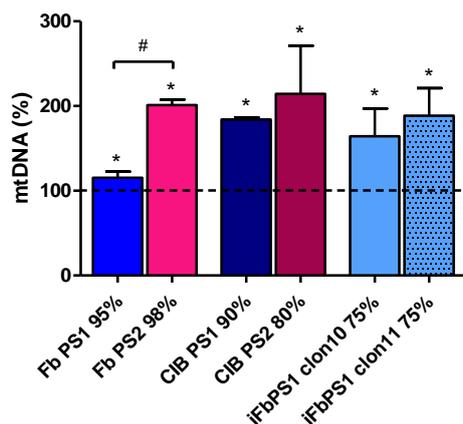


Figura 3.23 Niveles de mtDNA de las líneas PS1 y PS2 con alto porcentaje de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. Fb Control 5a: $100 \pm 5,2$ (3); Fb PS1: $115,5 \pm 7,2$ (3); Fb PS2: $201,2 \pm 6,4$ (3); CIB PS1 0%: $100 \pm 5,2$ (3); CIB PS1 90%: $184,2 \pm 2,5$ (3); CIB PS2 0%: $100 \pm 13,8$ (3); CIB PS2 80%: $214,4 \pm 56,8$ (3); iFb Control clon V: $99,1 \pm 5,2$ (3); iFb Control clon G: $100,9 \pm 14,8$ (3); iFbPS1 clon 10: $164,3 \pm 32,9$ (3); iFbPS1 clon 11: $188,6 \pm 32,6$ (3). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin delección y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control (en iPSCs: negro frente a ambos, rojo frente a clon V y verde frente a clon G)); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2); § $p < 0,05$ (entre clones PS1 de iPSCs).

El aumento observado en el número de copias de mtDNA podría ser un mecanismo de compensación frente a deleciones en un alto nivel de heteroplasmia. Las células tratarían de suplir el déficit energético aumentando la cantidad de genes mitocondriales y así de complejos, aunque resultaría ineficaz puesto que la mayoría de las nuevas moléculas de mtDNA generadas presentarían la delección.

3.3.1.2. Actividad de la citrato sintasa

Para continuar con el análisis de la biogénesis mitocondrial en las líneas mutantes, fue necesario el estudio de otros parámetros como la actividad de la citrato sintasa (CS). Esta enzima está codificada a nivel nuclear y participa en el ciclo de Krebs, por lo que está situada en la matriz mitocondrial aunque su actividad no se ve influida directamente por la función OXPHOS. Estas características hacen que se utilice habitualmente como marcador del contenido mitocondrial (193).

Los resultados obtenidos para las diferentes líneas celulares portadoras de delección se muestran en la figura 3.24, y revelan que la actividad de la citrato sintasa variaba de forma diferente según el modelo celular analizado. En ambos fibroblastos PS se producía un aumento de la actividad de la CS, siendo significativamente superior en PS1 respecto a PS2. Sin embargo, no se observaron variaciones en el resto de los modelos, excepto en la línea CIB PS1 en la que se obtuvo una caída significativa de la actividad. Según este resultado, los fibroblastos mutantes podrían experimentar un incremento de la actividad de las enzimas de la matriz mitocondrial

como fenómeno relacionado con la biogénesis mitocondrial en respuesta a la presencia de una deleción en el mtDNA. Se ha descrito que las iPSCs y los cíbridos, éstas últimas con fondo genético nuclear de célula tumoral, son células menos dependientes del ATP mitocondrial, por lo que podrían no necesitar ese incremento de enzimas de la fosforilación oxidativa. Además, el descenso observado en el cíbrido PS1 podría deberse a otros mecanismos celulares en respuesta al mal funcionamiento del sistema OXPHOS.

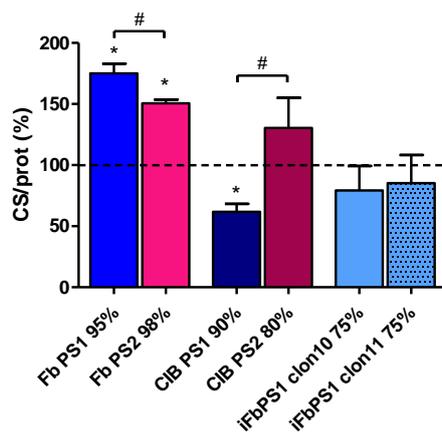


Figura 3.24 Actividad de la citrato sintasa (CS) por miligramos de proteína total de las líneas PS1 y PS2 con alto porcentaje de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. Fb Control 5a: 100 ± 3 (3); Fb PS1: 175 ± 8 (3); Fb PS2: $150,7 \pm 3$ (3); CIB PS1 0 %: $100 \pm 4,6$ (3); CIB PS1 90 %: $61,8 \pm 6,5$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 29,4$ (3); CIB PS2 80%: $130,4 \pm 24,8$ (3); iFb Control clon V: $102,6 \pm 12,2$ (3); iFb Control clon G: $97,4 \pm 7,4$ (3); iFbPS1 clon 10: $79,3 \pm 19,9$ (3); iFbPS1 clon 11: $85,2 \pm 23$ (3). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin deleción y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2).

3.3.1.3. Expresión de genes mitocondriales

Mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) se analizó si la presencia de deleciones en el mtDNA conllevaba una alteración de la expresión de genes mitocondriales en los modelos celulares PS1 y PS2. Para ello, como se detalla en tabla 3.9, se analizaron genes localizados a lo largo del genoma mitocondrial, en ambas hebras, codificantes de subunidades de diferentes complejos mitocondriales y situados dentro y fuera de los límites de las deleciones de PS1 y PS2.

Tabla 3.9 Genes mitocondriales analizados mediante qPCR. Se muestra la hebra mitocondrial en la que se localizan (pesada o ligera), el complejo mitocondrial del que forma parte la proteína codificada y si están afectados por las deleciones de PS1 y PS2.

Gen	MT-ND1	MT-COI	MT-ATP6	MT-ND4	MT-CYB	MT-ND6
Hebra	Pesada	Pesada	Pesada	Pesada	Pesada	Ligera
Complejo	I	IV	V	I	III	I
Deleción	No	No en PS1 Parcial en PS2	Si	Si	No	No

En la figura 3.25, se observa como la expresión de los genes afectados por ambas deleciones (*MT-ATP6* y *MT-ND4*) disminuyó significativamente en las líneas celulares mutantes con

Resultados

respecto a los controles, lo que era de esperar puesto que la cantidad de copias de estos genes en dichas células será mínima. Además, la expresión fue significativamente menor en los fibroblastos de PS2 respecto a PS1, que presentan un porcentaje de delección ligeramente superior; mientras que los híbridos mostraron resultados opuestos correspondientes a su diferente nivel de heteroplasmia. En el caso de los genes situados fuera de la región delecionada, los niveles de transcritos tendieron a aumentar en las líneas mutantes, siendo significativamente superiores los de *MT-CYB* en las líneas celulares de PS2 respecto a PS1, y los del gen *MT-ND6* entre ambos fibroblastos. Esto podría deberse a la diferencia en el tamaño de las deleciones (PS2 carece de un mayor número de subunidades de la cadena de transporte de electrones por lo que podría intentar sobreexpresar en mayor medida los genes completos de los que dispone) o a la diferencia en el número de copias de mtDNA, ya que es significativamente mayor en la línea de fibroblastos PS2 (figura 3.23). Sin embargo, esta tendencia no se observó para el gen *MT-ND1*, ya que no se obtuvieron diferencias entre los fibroblastos con delección, y los híbridos de PS1 mostraron unos niveles significativamente superiores a los de PS2.

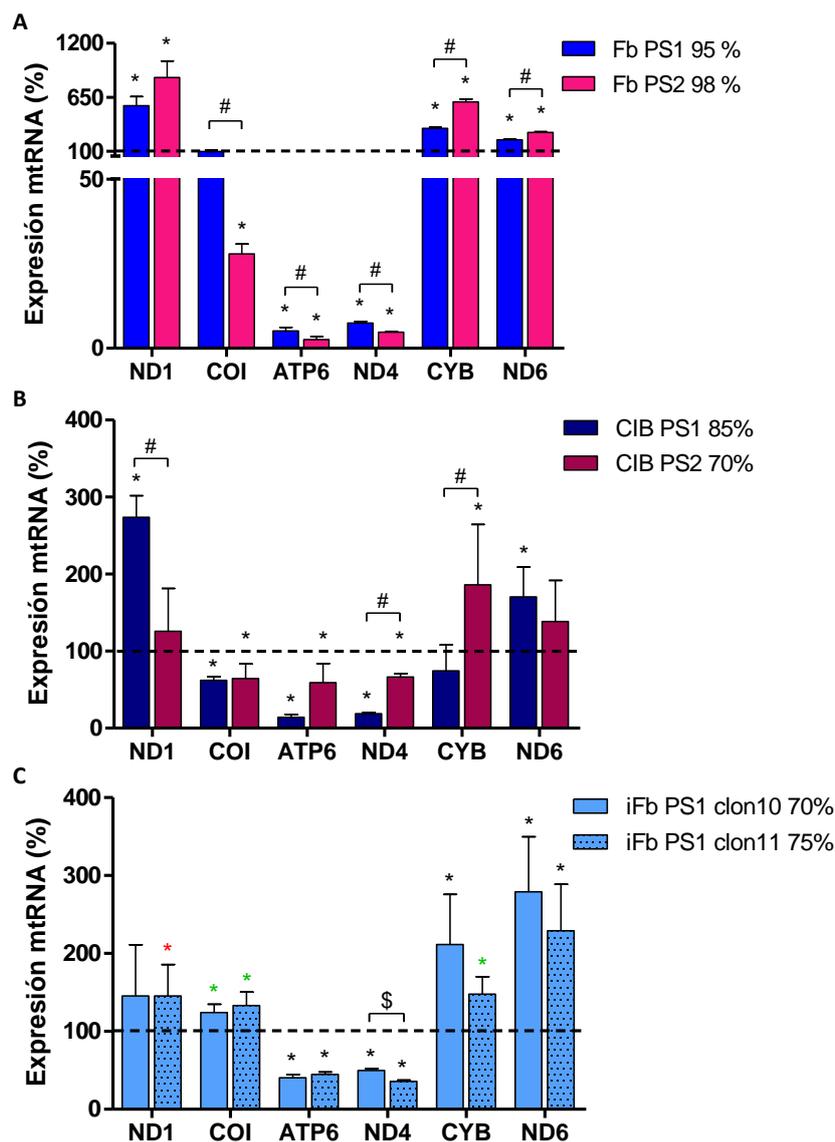


Figura 3.25 Niveles de mtRNA en las líneas celulares PS1 y PS2 con alto nivel de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. A) Niveles de mtRNA en fibroblastos. *ND1*. Fb Control 5a: $100 \pm 18,3$ (3); Fb PS1: $565,5 \pm 91,6$ (3); Fb PS2: $850,5 \pm 170,3$ (3). *COI*. Fb Control 5a: $100 \pm 6,2$ (3); Fb PS1: $99,1 \pm 14,8$ (3); Fb PS2: $27,9 \pm 2,9$ (3). *ATP6*. Fb Control 5a: $100 \pm 11,7$ (3); Fb PS1: $5,1 \pm 1$ (3); Fb PS2: $2,6 \pm 0,9$ (3). *ND4*. Fb Control 5a: $100 \pm 6,4$ (3); Fb PS1: $7,5 \pm 0,5$ (3); Fb PS2: $4,7 \pm 0,3$ (3). *CYB*. Fb Control 5a: $100 \pm 5,8$ (3); Fb PS1: $332,6 \pm 12,2$ (3); Fb PS2: $601,7 \pm 29,7$ (3). *ND6*. Fb Control 5a: $100 \pm 13,4$ (3); Fb PS1: $216 \pm 6,7$ (3); Fb PS2: $292 \pm 7,9$ (3). B) Niveles de mtRNA en híbridos. *ND1*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 36,2$ (3); CIB PS1 85 %: $273,9 \pm 28$ (3); CIB PS2 0 %: 100 ± 46 (3); CIB PS2 70 %: $125,7 \pm 55,8$ (3). *COI*. CIB PS1 0 %: 100 ± 47 (3); CIB PS1 85 %: $62,1 \pm 4,9$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 6,6$ (3); CIB PS2 70 %: $64,5 \pm 18,9$ (3). *ATP6*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 17,8$ (3); CIB PS1 85 %: $14,3 \pm 3,5$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 5,7$ (3); CIB PS2 70 %: $59,2 \pm 24,7$ (3). *ND4*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 15,5$ (3); CIB PS1 85 %: $18,8 \pm 1,7$ (3); CIB PS2 0 %: 100 ± 20 (3); CIB PS2 70 %: $66,4 \pm 4,5$ (3). *CYB*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 5,6$ (3); CIB PS1 85 %: $74,7 \pm 33,5$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 12,4$ (3); CIB PS2 70 %: $186 \pm 78,4$ (3). *ND6*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 14,3$ (3); CIB PS1 85 %: $170,5 \pm 38,7$ (3); CIB PS2 0 %: 100 ± 11 (3); CIB PS2 70 %: $138,7 \pm 53,2$ (3). C) Niveles de mRNA en iPSCs. *ND1*. iFb Control clon V: $98,1 \pm 44$ (3); iFb Control clon G: $101,9 \pm 97,8$ (3); iFbPS1 clon 10: $230,8 \pm 145,2$ (3); iFbPS1 clon 11: $240 \pm 38,5$ (3). *COI*. iFb Control clon V: $118,9 \pm 45$ (3); iFb Control clon G: $81,1 \pm 6,1$ (3); iFbPS1 clon 10: $116,4 \pm 9,9$ (3); iFbPS1 clon 11: $115,3 \pm 10,2$ (3). *ATP6*. iFb Control clon V: $110,4 \pm 3,5$ (3); iFb Control clon G: $89,6 \pm 1$ (3); iFbPS1 clon 10: $42,2 \pm 0,8$ (3); iFbPS1 clon 11: $43 \pm 0,9$ (3). *ND4*. iFb Control clon V: $129,5 \pm 62,2$ (3); iFb Control clon G: $70,5 \pm 4,8$ (3); iFbPS1 clon 10: $34,9 \pm 2,2$ (3); iFbPS1 clon 11: $30,4 \pm 2,4$ (3). *CYB*. iFb Control clon V: $104 \pm 19,5$ (3); iFb Control clon G: $96 \pm 11,7$ (3); iFbPS1 clon 10: $162,7 \pm 18,8$ (3); iFbPS1 clon 11: $119,2 \pm 12,2$ (3). *ND6*. iFb Control clon V: $83,2 \pm 7,2$ (3); iFb Control clon G: $116,8 \pm 8,6$ (3); iFbPS1 clon 10: $275,3 \pm 29,4$ (3); iFbPS1 clon 11: $253,2 \pm 26,6$ (3). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin delección y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control (en iPSCs: negro frente a ambos, rojo frente a clon V y verde frente a clon G)); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2); \$ $p < 0,05$ (entre clones PS1 de iPSCs).

Estos resultados parecen indicar que, ante la carencia de subunidades para constituir el sistema OXPHOS, las líneas celulares portadoras de deleción en el mtDNA incrementan los niveles de mtDNA y la expresión de los genes codificados en él.

3.3.1.4. Niveles de mRNA del replisoma mitocondrial.

El incremento en los niveles de mtDNA, además del aumento de copias de mRNA de los genes localizados fuera de la región delecionada, podría ser consecuencia de un aumento en la tasa de replicación mitocondrial, para lo cual proteínas codificadas a nivel nuclear implicadas en este fenómeno podrían verse sobreexpresadas. A fin de comprobar este fenómeno, se analizaron los niveles de mRNA de subunidades de proteínas componentes del replisoma mitocondrial humano: proteína TWINKLE, codificada por el gen *TWINK*, proteína de unión a ssDNA mitocondrial (*SSBP*) y polimerasa gamma (*POLG*). Mutaciones en estas proteínas se han asociado a diferentes patologías mitocondriales (194–197).

Como se observa en la figura 3.26, el patrón de expresión de estos genes resulta diferente entre líneas celulares con la misma deleción. Los fibroblastos PS1 mostraron un aumento significativo de la expresión de *TWINK*, mientras que no se detectaron variaciones en los cíbridos de PS1. Sin embargo, en las células madre pluripotentes inducidas de PS1, los niveles de todos los genes analizados se redujeron. Sorprendentemente, también se observaron diferencias significativas en la expresión de *TWINK* y *POLG2* entre ambos clones de iPSCs con la deleción común (figura 3.26C). Además, las líneas de PS2 también mostraron comportamientos opuestos en los niveles de *SSBP1*: mientras que se detectó un aumento significativo en los fibroblastos, en el cíbrido disminuían.

Por otro lado, estos resultados no permiten determinar si las deleciones de diferente tamaño modifican la maquinaria de replicación de modo distinto. En el caso de los fibroblastos se observó mayor expresión de *TWINK* en la línea PS1 que en PS2, pero el patrón era opuesto para el gen *SSBP1* (figura 3.26A).

En base a los datos mostrados en este apartado, podemos confirmar que parte de la maquinaria de replicación no está sobreexpresada en las líneas portadoras deleción, e incluso se reduce en las iPSCs, lo que podría deberse a la ventaja replicativa de las moléculas de mtDNA delecionadas (Δ -mtDNA) (83,84,198). Estas moléculas son de menor tamaño por lo que se replican de forma más rápida, lo que explicaría el aumento en el número de copias (figura 3.23) sin necesidad de aumentar la cantidad de maquinaria de replicación (figura 3.26).

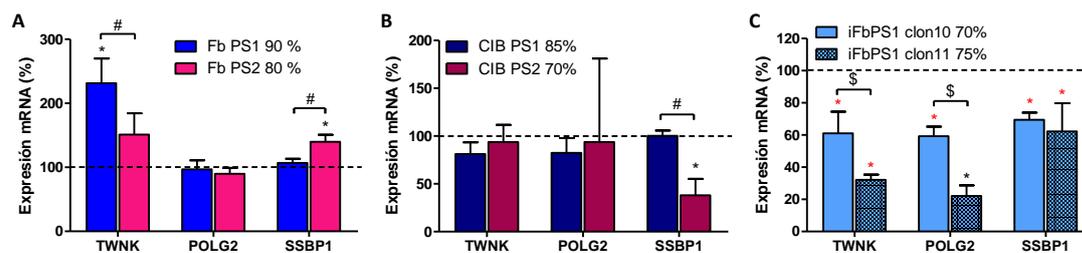


Figura 3.26 Niveles de mRNA de genes codificantes de proteínas del replisoma mitocondrial (*TWNK*, *POLG2* y *SSBP1*) de las líneas PS1 y PS2 con alto nivel de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. A) Niveles de mRNA en fibroblastos. *TWNK*. Fb Control 5a: $100 \pm 41,8$ (3); Fb PS1: $231,4 \pm 38,4$ (3); Fb PS2: $151,1 \pm 33,3$ (3). *POLG2*. Fb Control 5a: $100 \pm 27,8$ (3); Fb PS1: 97 ± 14 (3); Fb PS2: $89,9 \pm 9,2$ (3). *SSBP1*. Fb Control 5a: $100 \pm 3,8$ (3); Fb PS1: $106,8 \pm 6,7$ (3); Fb PS2: $140 \pm 10,9$ (3). B) Niveles de mRNA en cíbridos. *TWNK*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 33,1$ (3); CIB PS1 85 %: $81,3 \pm 12,2$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 54,2$ (3); CIB PS2 70 %: $93,8 \pm 17,9$ (3). *POLG2*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 19,6$ (3); CIB PS1 85 %: $82,4 \pm 15,5$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 22,7$ (3); CIB PS2 70 %: $93,8 \pm 17,9$ (3). *SSBP1*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 18,6$ (3); CIB PS1 85 %: $100,2 \pm 5,5$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 26,6$ (3); CIB PS2 70 %: $38,1 \pm 17$ (3). C) Niveles de mRNA en iPSCs. *TWNK*. iFb Control clon V: $161,2 \pm 30$ (3); iFb Control clon G: $38,8 \pm 19,3$ (3); iFbPS1 clon 10: $61 \pm 13,5$ (3); iFbPS1 clon 11: $32,1 \pm 3,2$ (3). *POLG2*. iFb Control clon V: $158,5 \pm 56,9$ (3); iFb Control clon G: $41,5 \pm 11,8$ (3); iFbPS1 clon 10: $59,2 \pm 5,9$ (3); iFbPS1 clon 11: $22,1 \pm 6,5$ (3). *SSBP1*. iFb Control clon V: $143,6 \pm 57,4$ (3); iFb Control clon G: $56,4 \pm 11,6$ (3); iFbPS1 clon 10: $69,5 \pm 4,4$ (3); iFbPS1 clon 11: $62,2 \pm 17,5$ (3). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin delección y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control (en iPSCs: negro frente a ambos, rojo frente a clon V y verde frente a clon G)); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2); § $p < 0,05$ (entre clones PS1 de iPSCs).

3.3.1.5. Expresión de genes reguladores de la biogénesis mitocondrial

A pesar de no observar una sobreexpresión generalizada de los genes codificantes de la maquinaria de replicación del mtDNA (figura 3.26), el aumento de los niveles de mtDNA (figura 3.23), el aumento de la actividad de la citrato sintasa en los fibroblastos PS (figura 3.24) y la sobreexpresión de genes mitocondriales no implicados en la delección (figura 3.25) podrían indicar que se produce un aumento de factores relacionadas con el contenido mitocondrial en las líneas celulares mutantes.

Para analizar de forma directa si la ruta de biogénesis mitocondrial estaba activada en estas líneas, se estudió la expresión de dos genes clave en su regulación: el gen *PPARGC1A*, codificante de la proteína PGC-1 α , y el gen *TFAM*, que codifica el factor de transcripción mitocondrial A.

Al comparar los niveles de mRNA de estos genes, se observaron distintas tendencias entre las diferentes líneas celulares portadoras de delección (figura 3.27). En el caso de los fibroblastos, ambos mostraron un aumento significativo de los niveles de *TFAM* (figura 3.27A). Sin embargo, manifestaron un patrón de expresión opuesto para gen *PPARGC1A*: mientras que en la línea PS1 aumentaba significativamente, en la línea PS2 disminuía. Por otro lado, se detectó un descenso de la expresión del gen que codifica para PGC-1 α en ambos cíbridos, siendo significativamente menor en la línea PS2. Por el contrario, los niveles de *TFAM* fueron similares a los de los controles en ambas líneas cíbridas, aunque significativamente superiores en PS2 respecto a PS1 (figura 3.27B). Sorprendentemente, y a pesar de tener el mismo fondo genético, se obtuvieron

diferencias significativas entre ambos clones de las iPSC con la delección común (figura 3.27C), fenómeno que ya observamos en la expresión de algunos de los genes implicados en la replicación mitocondrial (figura 3.26C). Por tanto, se observa cierta sobreexpresión de estos genes en los fibroblastos, pero en el resto modelos celulares PS la tendencia no es obvia.

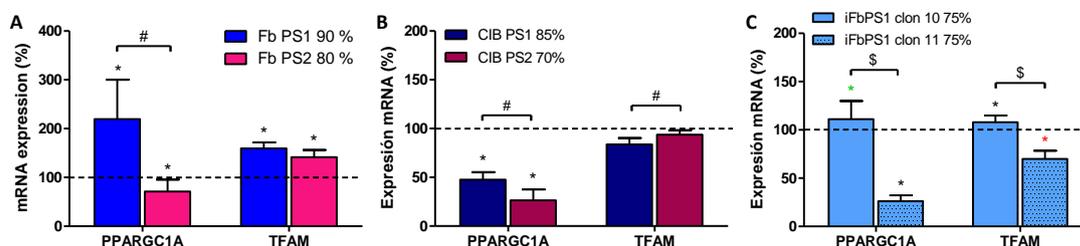


Figura 3.27 Niveles de mRNA de genes implicados en la biogénesis mitocondrial (*PPARGC1* y *TFAM*) de las líneas PS1 y PS2 con alto nivel de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. A) Niveles de mRNA en fibroblastos. *PPARGC1A*. Fb Control 5a: $100 \pm 21,2$ (3); Fb PS1: $219,4 \pm 80,8$ (3); Fb PS2: $71,4 \pm 24,4$ (3). *TFAM*. Fb Control 5a: $100 \pm 10,2$ (3); Fb PS1: $159,5 \pm 12,2$ (3); Fb PS2: $141,4 \pm 14,6$ (3). B) Niveles de mRNA en cíbridos. *PPARGC1A*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 33,4$ (3); CIB PS1 85 %: $47,5 \pm 7,7$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 12,4$ (3); CIB PS2 70 %: $26,3 \pm 11,3$ (3). *TFAM*. CIB PS1 0 %: $100 \pm 14,5$ (3); CIB PS1 85 %: $83,8 \pm 6,5$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 16,9$ (3); CIB PS2 70 %: $93,8 \pm 4,5$ (3). C) Niveles de mRNA en iPSCs. *PPARGC1A*. iFb Control clon V: $149,8 \pm 30,2$ (3); iFb Control clon G: $50,2 \pm 4,6$ (3); iFbPS1 clon 10: $111,2 \pm 18,8$ (3); iFbPS1 clon 11: $26,3 \pm 5,9$ (3). *TFAM*. iFb Control clon V: $137 \pm 18,2$ (3); iFb Control clon G: $63 \pm 12,8$ (3); iFbPS1 clon 10: $107,9 \pm 7$ (3); iFbPS1 clon 11: $69,9 \pm 8,6$ (3). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin delección y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control (en iPSCs: negro frente a ambos, rojo frente a clon V y verde frente a clon G)); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2); \$ $p < 0,05$ (entre clones PS1 de iPSCs).

3.3.2. Análisis de la función del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)

Para analizar cuantitativamente el defecto en la función mitocondrial que provocan las delecciones grandes y únicas en el mtDNA, se midieron diferentes parámetros bioquímicos en los modelos celulares disponibles. Se estudió de forma específica la actividad y cantidad de uno de los complejos directamente afectados por las delecciones PS1 y PS2 (la citocromo c oxidasa o complejo IV mitocondrial). También se analizó la función general de la cadena de transporte de electrones mediante la medida del consumo de oxígeno y la cuantificación del producto final de la misma: el ATP mitocondrial.

3.3.2.1. Actividad y cantidad de la citocromo c oxidasa o complejo IV mitocondrial

Todas las líneas mutantes estudiadas presentaron una disminución significativa de la actividad y de la cantidad del complejo IV mitocondrial al comparar con los controles (figura 3.28). Este resultado era esperable, ya que las subunidades de este complejo codificadas en el mtDNA están directamente afectadas por ambas delecciones: la delección de PS1 implica el gen *MT-COIII*, y la delección de PS2 implica a los genes *MT-COIII*, *MT-COII*, y parcialmente al gen *MT-COI*.

Sin embargo, esta caída no fue igual de pronunciada en todas las líneas celulares. Si comparamos los fibroblastos y las células madre pluripotentes de PS1, observamos que el descenso de ambos parámetros es mayor en las células iPS a pesar de que el nivel de heteroplasmia es menor. La caída de la actividad es del 61 % en el clon 10 y del 52 % en el clon 11 de iFb PS1, mientras que en Fb PS1 es solo del 34 %. Los resultados son similares para la cantidad de complejo IV, mientras que cae un 69 % en el clon 10 y un 66 % en el clon 11 de iFb PS1, en Fb PS1 solamente se reduce un 23 %. Por otra parte, la línea CIB PS1 presenta niveles de cantidad de complejo IV similares a las células iFbPS1, sin embargo la actividad únicamente se ve reducida un 12 %, siendo esta caída menor que en los fibroblastos con la misma delección. De forma similar, el CIB PS2 muestra una caída de cantidad de complejo IV muy drástica (del 63 %) mientras que la actividad de dicho complejo se reduce solo un 22 %; en cambio los fibroblastos PS2 presentan una actividad muy reducida del complejo con una caída de cantidad del 44 %.

Según estos resultados, los híbridos con delección son capaces de presentar más actividad de complejo IV a pesar de tener menor cantidad de este, algo que no ocurre en fibroblastos e iPSCs, lo que indica que existen diferencias en el comportamiento de la cadena de transporte de electrones entre modelos celulares portadores de delección en el mtDNA.

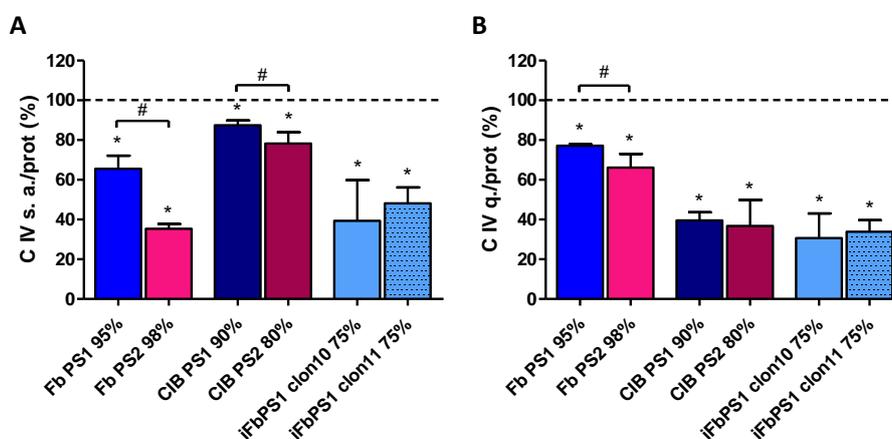


Figura 3.28 Actividad (CIV s.a.) y cantidad (CIV q.) de complejo IV por proteína total de las líneas PS1 y PS2 con alto porcentaje de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. A) Actividad específica del CIV por miligramos de proteína total (CIV s.a.). Fb Control 5a: $100 \pm 17,6$ (3); Fb PS1: $65,5 \pm 6,7$ (3); Fb PS2: $35,4 \pm 2,3$ (3); CIB PS1 0 %: $100 \pm 0,7$ (3); CIB PS1 90 %: $87,5 \pm 2,4$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 3,5$ (3); CIB PS2 80 %: $78,3 \pm 5,4$ (3); iFb Control clon V: $101,7 \pm 10,8$ (3); iFb Control clon G: $98,3 \pm 17,7$ (3); iFbPS1 clon 10: $39,4 \pm 20,5$ (3); iFbPS1 clon 11: $48,2 \pm 8$ (3). B) Cantidad de CIV por miligramos de proteína total (CIV q.). Fb Control 5a: $100 \pm 8,3$ (3); Fb PS1: $77,1 \pm 0,8$ (3); Fb PS2: $66,2 \pm 6,8$ (3); CIB PS1 0 %: $100 \pm 4,3$ (3); CIB PS1 90 %: $39,6 \pm 4,1$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 21,8$ (3); CIB PS2 80 %: $36,7 \pm 13,1$ (3); iFb Control clon V: $99,2 \pm 13,4$ (3); iFb Control clon G: $100,8 \pm 36,3$ (3); iFbPS1 clon 10: $30,6 \pm 12,4$ (3); iFbPS1 clon 11: $33,8 \pm 5,8$ (3). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin delección y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2).

Además, la actividad y cantidad de COX de los fibroblastos PS2 resultó significativamente menor que las de los fibroblastos PS1. También se observó esta tendencia en la actividad de los cíbridos a pesar de que el nivel de heteroplasmia del CIB PS2 era menor (figura 3.28A). Esta diferencia parece estar causada por el distinto tamaño de las deleciones y su localización, ya que las líneas PS2 presentan un mayor número de genes COX delecionados. La disparidad en el fondo genético entre las líneas también podría afectar, aunque no se pudo confirmar al carecer de una línea de células iPS con la deleción de PS2.

3.3.2.2. Consumo de oxígeno

Un parámetro representativo del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (ETC) es la medida del consumo de oxígeno de células vivas. Para cuantificarlo, se empleó un oxígrafo de alta resolución (Oroboros). En todas las líneas celulares se analizó la respiración endógena o basal, la respiración filtrante, para lo que añadimos oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa), y la desacoplada o capacidad de respiración máxima, adicionando el desacoplante FCCP. Finalmente, se añadió KCN para inhibir el complejo IV y la respiración mitocondrial, y restamos este valor a los anteriores para descartar el consumo de oxígeno no dependiente de la ETC.

Como se puede apreciar en la figura 3.29, el consumo de oxígeno basal de todas las líneas mutantes fue significativamente menor que los controles, lo que muestra de nuevo el gran efecto patológico de las deleciones en el mtDNA sobre la función mitocondrial. A diferencia de lo que ocurría con la actividad y cantidad de complejo IV mitocondrial (figura 3.28), la caída en la respiración endógena es más dramática en la línea de Fb PS1 (un 73 %) que en las líneas de iPSCs con la misma deleción (un 46 % y un 45 % en el clon 10 y 11, respectivamente). Además, a pesar de que la caída en la actividad de dicho complejo no era muy drástica en ambos cíbridos (figura 3.28A), el consumo de oxígeno basal se ve reducido hasta un 60-70 % (figura 3.29). Asimismo, la diferencia de tamaño de las deleciones no parece influenciar este parámetro ya que la reducción en la respiración basal es muy similar entre fibroblastos y cíbridos PS1 y PS2.

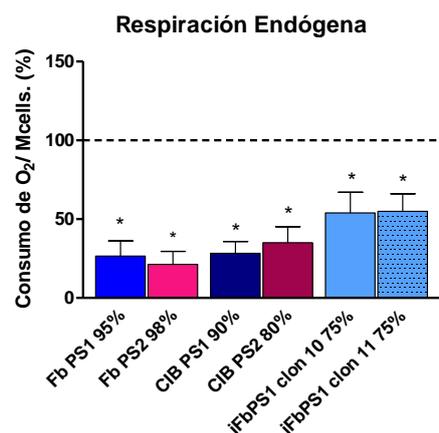


Figura 3.29 Respiración endógena por millón de células de las líneas PS1 y PS2 con alto porcentaje de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. Fb Control 5a: $100 \pm 25,7$ (3); Fb PS1: $26,6 \pm 9,6$ (3); Fb PS2: $21,4 \pm 8,2$ (3); CIB PS1 0 %: $100 \pm 24,4$ (3); CIB PS1 90 %: $28,3 \pm 7,5$ (3); CIB PS2 0 %: $100 \pm 20,8$ (3); CIB PS2 80 %: $35 \pm 10,2$ (3); iFb Control clon V: $94 \pm 13,7$ (3); iFb Control clon G: $106 \pm 32,5$ (3); iFbPS1 clon 10: $53,9 \pm 13,2$ (3); iFbPS1 clon 11: $54,9 \pm 11,2$ (3). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin delección y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control (en iPSCs: negro frente a ambos, rojo frente a clon V y verde frente a clon G)); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2); § $p < 0,05$ (entre clones PS1 de iPSCs).

Tras inhibir el complejo V con oligomicina, solo se observaron diferencias significativas frente a los controles en la respiración filtrante del fibroblasto PS1 y en el clon 10 de las iPSCs (figura 3.30A). Este resultado era esperable, ya que al inhibir la ATP sintasa, el transporte de electrones a través de la cadena ya no está acoplado al bombeo de protones, y por tanto, es independiente del mal funcionamiento del sistema OXPHOS causado por las delecciones en el mtDNA. En cuanto a la capacidad de respiración máxima (figura 3.30B), se observa una disminución en todas las líneas mutantes. Además, a pesar de las condiciones desacopladas, no todas las líneas fueron capaces de alcanzar la tasa de respiración endógena de las líneas control.

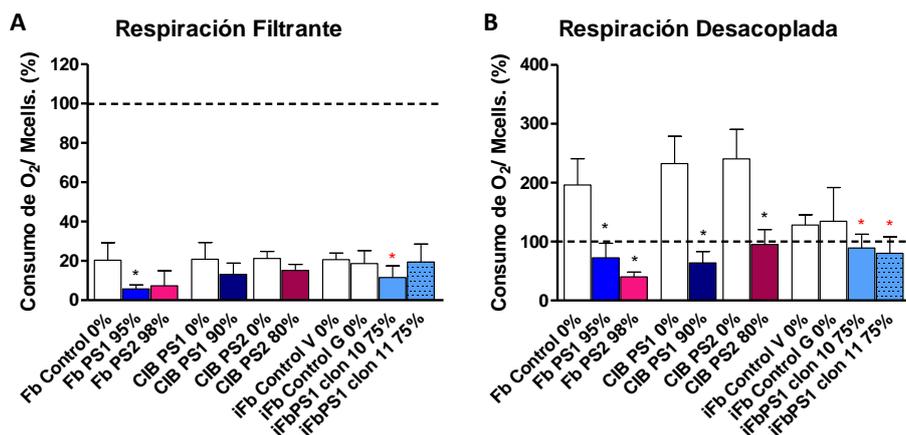


Figura 3.30 Respiración filtrante y desacoplada por millón de células de las líneas PS1 y PS2 con alto porcentaje de heteroplasma relativizadas a la respiración endógena de los controles. El nivel de heteroplasma de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. A) Respiración filtrante por millón de células. Fb Control 5a: $20 \pm 8,9$ (3); Fb PS1: $5,8 \pm 1,9$ (3); Fb PS2: $7,3 \pm 7,6$ (3); CIB PS1 0 %: $20,8 \pm 8,6$ (3); CIB PS1 90 %: $13,2 \pm 5,7$ (3); CIB PS2 0 %: $21,2 \pm 3,6$ (3); CIB PS2 80 %: $15,1 \pm 3,1$ (3); iFb Control clon V: $20,6 \pm 3,3$ (3); iFb Control clon G: $18,7 \pm 6,5$ (3); iFbPS1 clon 10: $11,6 \pm 5,8$ (3); iFbPS1 clon 11: $19,5 \pm 9,1$ (3). B) Respiración desacoplada por millón de células. Fb Control 5a: $196,1 \pm 44,7$ (3); Fb PS1: $72,5 \pm 24,8$ (3); Fb PS2: $40,1 \pm 7,9$ (3); CIB PS1 0 %: $232,6 \pm 46,2$ (3); CIB PS1 90 %: $63,7 \pm 19,4$ (3); CIB PS2 0 %: $240,4 \pm 50,2$ (3); CIB PS2 80 %: $95,3 \pm 25,2$ (3); iFb Control clon V: $128,2 \pm 17,3$ (3); iFb Control clon G: $134,5 \pm 57,5$ (3); iFbPS1 clon 10: $89,3 \pm 23,4$ (3); iFbPS1 clon 11: $80,1 \pm 28$ (3). La línea discontinua representa los valores de respiración endógena de las líneas controles sin delección y la media de los controles de iPSCs, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control (en iPSCs: negro frente a ambos, rojo frente a clon V y verde frente a clon G); # $p < 0,05$ (entre líneas PS1 y PS2); $\$p < 0,05$ (entre clones PS1 de iPSCs). El análisis estadístico se ha realizado mediante la comparación de los valores de las líneas controles sin delección y las líneas mutantes en cada caso.

3.3.2.3. Determinación de los niveles de ATP mitocondrial

Otro de los parámetros fundamentales del estado de la cadena de transporte de electrones (ETC) es la producción de ATP, puesto que es el objetivo final de la misma. Para determinar únicamente el ATP generado a nivel mitocondrial, se incubaron las células durante 2 horas en ausencia de glucosa, con piruvato y 2-deoxi-D-glucosa, para bloquear la glucólisis. La medida se realizó mediante el reactivo CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay y se relativizó al número de células cuantificado mediante el reactivo CellTiter-Blue® Reagent, ambos de la casa comercial Promega, como se indica en el apartado 6.7.4.

Todas las líneas mutantes con delección en el mtDNA mostraron un descenso significativo en la producción de ATP mitocondrial (figura 3.31). De forma similar a lo que observamos en la respiración endógena (figura 3.29), y a diferencia de lo que ocurría con el complejo IV mitocondrial (figura 3.28), la caída en la producción de ATP mitocondrial fue más dramática en la línea de fibroblastos PS1 (un 68 %) que en las líneas de iPSCs del mismo paciente (un 42 % en el clon 10 y un 49 % en el clon 11), y similar a la del CIB PS1 (un 65 %)(figura 3.31). Esto podría deberse a la diferencia en el porcentaje de heteroplasma, mucho menor en las células iPSC. En cambio, al comparar las líneas con la delección PS2, se observó un mayor descenso en la

producción de ATP mitocondrial en los fibroblastos (72 %) que los cíbridos (53 %), los últimos con un menor nivel de heteroplasmia, aunque en ambos casos fue muy severo. Además, se observaron diferencias significativas entre PS1 y PS2, probablemente debidas a los diferentes niveles de heteroplasmia: mientras que la producción de ATP mitocondrial fue mayor en Fb PS1 que en Fb PS2, la línea CIB PS1 mostró niveles inferiores que la línea CIB PS2.

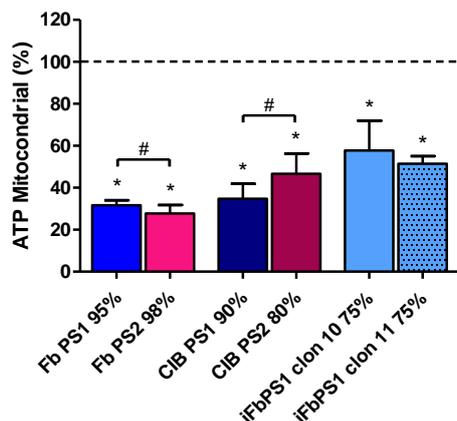


Figura 3.31 Niveles de ATP mitocondrial por número de células. El nivel de heteroplasmia de cada línea se indica en porcentaje tras el nombre identificativo. Fb Control 5a: $100 \pm 16,1$ (12); Fb PS1: $31,6 \pm 2,5$ (12); Fb PS2: $27,7 \pm 4$ (12); CIB PS1 0 %: $100 \pm 11,7$ (6); CIB PS1 90 %: $34,8 \pm 7,1$ (6); CIB PS2 0 %: $100 \pm 24,4$ (11); CIB PS2 80 %: $46,7 \pm 9,7$ (11); iFb control (clon V y G): $100 \pm 12,7$ (68); iFbPS1 clon 10: $57,7 \pm 14,2$ (28); iFbPS1 clon 11: $51,4 \pm 3,6$ (28). La línea discontinua representa los valores de las líneas controles sin delección, que se ha considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas con delección).

3.3.3. Análisis de mitofagia

Como se ha descrito en el apartado anterior, la presencia de una delección en el mtDNA provoca graves consecuencias sobre la función OXPHOS, y por tanto, podría conllevar un aumento de la cantidad de mitocondrias dañadas. Las células disponen de mecanismos de control para eliminar mitocondrias y adaptarse a los requerimientos energéticos y fisiológicos. Además, las mitocondrias defectuosas generadas en condiciones patológicas también son degradadas por esta maquinaria, por lo que podría estar sobreexpresada en los modelos celulares PS. Para analizarlo, estudiamos la cantidad de proteína LC3B mediante Western blot en las diferentes líneas celulares portadoras de delección. Esta proteína se presenta en dos isoformas según esté conjugada o no con fosfatidiletanolamina (LC3B-II y LC3B-I, respectivamente). Es LC3B-II la que se correlaciona directamente con la autofagia al estar presente en la membrana de los autofagosomas (43,199).

En la figura 3.32 se muestra el resultado de la inmunodetección de LC3B para las diferentes líneas celulares control y portadoras de delección en el mtDNA (PS1 y PS2), y la representación gráfica de su cuantificación. Como se puede observar, tanto los fibroblastos PS1 como ambos

Resultados

clones de células iPS experimentaron un aumento en la cantidad de esta proteína, lo que sugiere un incremento de la mitofagia. Sin embargo, tanto el fibroblasto PS2 como ambos híbridos mostraron una reducción de los niveles, por lo que no se observa una tendencia clara en todos los modelos celulares portadores de delección.

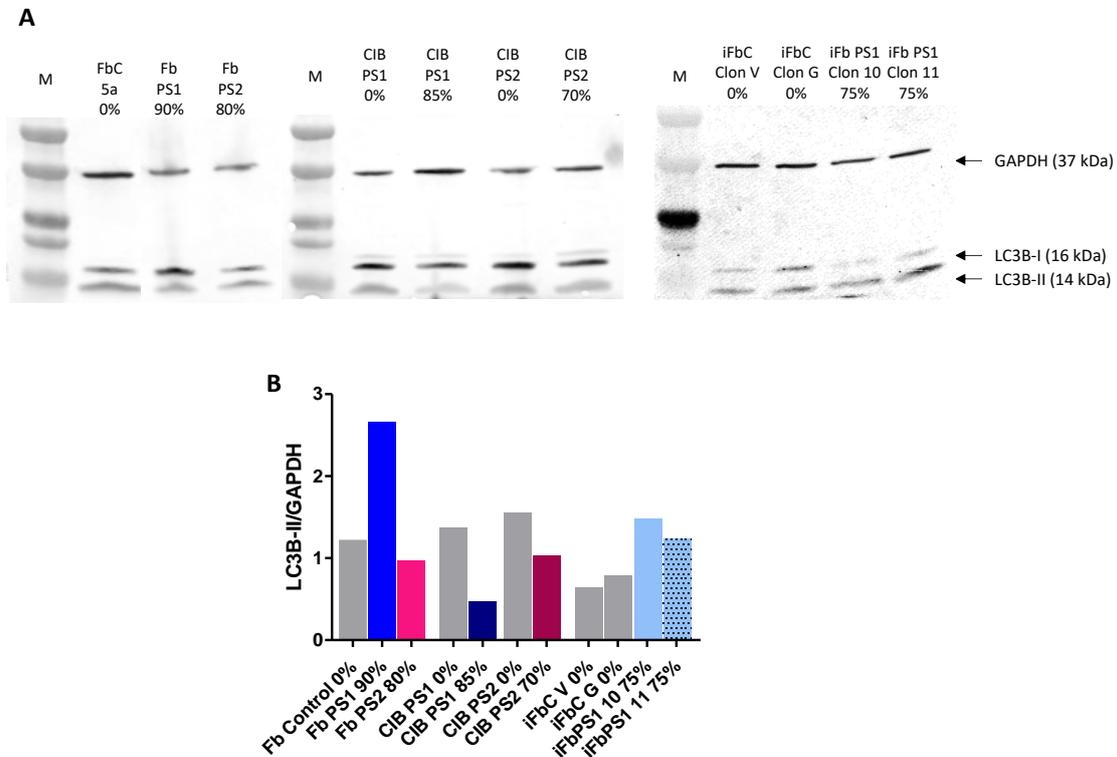


Figura 3.32 Cuantificación de los niveles de proteína LC3B-II mediante Western blot en las diferentes líneas celulares portadoras de delección en el mtDNA y de sus correspondientes controles no patológicos. El porcentaje de heteroplasma se indica después del nombre de cada línea. A) Imagen de la inmunodetección. M, marcador de pesos moleculares. B) Representación gráfica de la cuantificación del Western blot (n=1).

3.4. Determinación del porcentaje de heteroplasma umbral de las delecciones PS1 y PS2 causantes de efectos patológicos en el sistema OXPHOS

La función OXPHOS y la energía celular disminuyen a medida que el porcentaje de mtDNA mutante aumenta. Un tejido no puede desarrollar su función normal cuando la producción de energía de las células que lo componen cae por debajo de un nivel umbral, y como consecuencia, los síntomas de la enfermedad aparecen. Como ya se ha comentado, este umbral puede ser diferente entre distintas mutaciones o incluso entre diferentes tejidos para una misma mutación, probablemente debido a los diferentes requerimientos energéticos de cada tipo celular (200).

Previamente hemos descrito como la presencia de una delección grande y única en el mtDNA provoca un grave defecto de la función OXPHOS en diferentes modelos celulares (apartado 3.3).

A fin de conocer el umbral patológico de las deleciones de los pacientes PS1 y PS2, se analizaron diferentes parámetros bioquímicos relativos al contenido mitocondrial y a la función OXPHOS en cíbridos con diferentes niveles de heteroplasmia. La determinación del umbral patológico de estas deleciones es interesante tanto para analizar si existen variaciones entre deleciones de diferente tamaño como para el estudio de posibles tratamientos. Lamentablemente, no pudimos obtener clones de ambos pacientes con exactamente los mismos porcentajes de deleción (apartado 3.2.2). Los cíbridos se mantuvieron en medio de crecimiento con glucosa 5mM durante 72 horas antes de cada análisis.

3.4.1. Análisis del contenido mitocondrial en diferentes niveles de heteroplasmia

Con el fin de conocer si existe una correlación positiva entre el porcentaje de deleción y el aumento en la masa mitocondrial celular, se estudiaron varios parámetros indicativos de biogénesis mitocondrial.

Al analizar los niveles de mtDNA en diferentes porcentajes de heteroplasmia (figura 3.33), observamos un aumento significativo gradual en el número de copias en todos los casos, excepto en el CIB PS2 con 60 % de mtDNA deleccionado. En este clon se observó una tendencia de aumento pero no resultó significativa debido probablemente a la alta desviación estándar obtenida. Además, el número de copias de mtDNA casi se duplica cuando el nivel de heteroplasmia de ambas deleciones alcanza el 80 %, niveles de deleción similares a los detectados en sangre de pacientes con síndrome de Pearson (apartado 3.1.2). En el caso del CIB PS1, solo fue necesario una heteroplasmia del 45 % para provocar un incremento significativo de este parámetro.

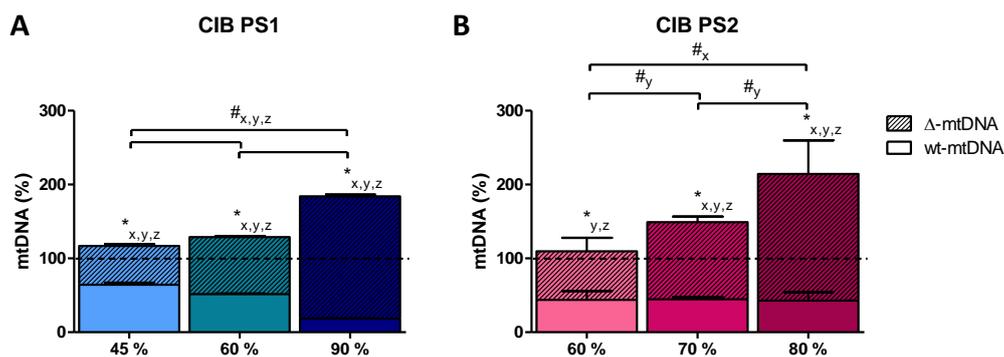


Figura 3.33 Número de copias de wt-mtDNA y Δ -mtDNA en diferentes niveles de heteroplasmia. A) CIB PS1 143b. mtDNA total: 0 %: $100 \pm 5,2$ (3); 45 %: $116,8 \pm 5$ (3); 60 %: $128,8 \pm 2$ (3); 90 %: $184,2 \pm 2,5$ (3). wt-mtDNA: 0 %: $100 \pm 5,2$ (3); 45 %: $64,3 \pm 2,8$ (3); 60 %: $51,5 \pm 0,8$ (3); 90 %: $18,4 \pm 0,2$ (3). Δ -mtDNA: 0 %: 0 ± 0 (3); 45 %: $52,6 \pm 2,3$ (3); 60 %: $77,3 \pm 1,2$ (3); 90 %: $165,8 \pm 2,2$ (3). B) CIB PS2 143b. mtDNA total: 0 %: $100 \pm 13,8$ (3); 60 %: $109,6 \pm 30,2$ (3); 70 %: $149,1 \pm 10,6$ (3); 80 %: $214,4 \pm 56,8$ (3). wt-mtDNA: 0 %: $100 \pm 13,8$ (3); 60 %: $43,8 \pm 12,1$ (3); 70 %: $44,7 \pm 3,2$ (3); 80 %: $42,9 \pm 11,4$ (3). Δ -mtDNA: 0 %: 0 ± 0 (3); 60 %: $65,8 \pm 18,1$ (3); 70 %: $104,4 \pm 7,4$ (3); 80 %: $171,5 \pm 45,5$ (3). La línea discontinua representa las líneas celulares controles sin delección (0 %), que se ha considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a línea control), # $p < 0,05$ (entre líneas con delección). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ -mtDNA) y z (wt-mtDNA).

También es interesante destacar que la tendencia del porcentaje de moléculas de mtDNA completas con el aumento de heteroplasmia es diferente entre ambos cíbridos. En el cíbrido PS1, la proporción de wt-mtDNA se redujo a medida que las moléculas delecionadas aumentaban (figura 3.33A). Sin embargo, en el cíbrido PS2 las moléculas completas se mantuvieron constantes a pesar del aumento de Δ -mtDNA (figura 3.33B). Esto podría indicar que éste cíbrido es capaz de mantener una cantidad de cadena de transporte de electrones completa aunque los complejos defectuosos aumenten.

A pesar del aumento en el número de copias de mtDNA total, y en coherencia con los resultados mostrados en el apartado anterior de esta tesis, el resto de los parámetros analizados no parecen indicar que se produzca una biogénesis mitocondrial dependiente de la heteroplasmia. Como se observa en la figura 3.34, no se produjo un incremento de la actividad de la citrato sintasa en ningún caso que, como ya se ha comentado anteriormente, es un parámetro que se emplea habitualmente para el análisis del contenido mitocondrial. Paradójicamente, se observó una caída significativa de la actividad en el CIB PS1 en todos los porcentajes.

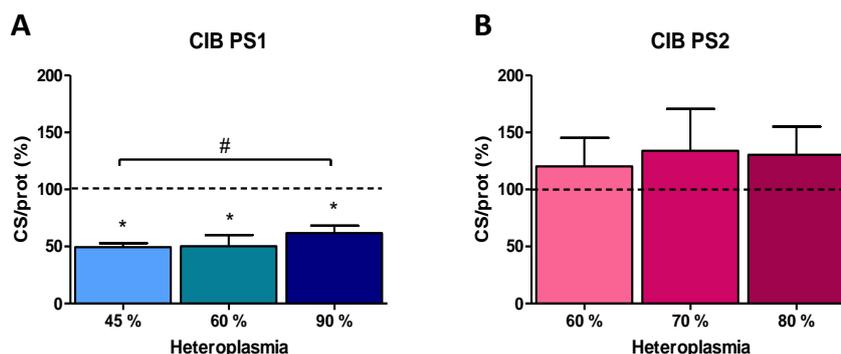


Figura 3.34 Actividad específica de la citrato sintasa por proteína total en diferentes niveles de heteroplasmia. A) CIB PS1. 0 %: $100 \pm 4,6$ (3); 45 %: $49,4 \pm 3,6$ (3); 60 %: $50,2 \pm 9,8$ (3); 85 %: $61,8 \pm 6,5$ (3). B) CIB PS2. 0 %: $100 \pm 29,4$ (3); 60 %: $120,2 \pm 25$ (3); 70 %: $133,8 \pm 36,7$ (3); 80 %: $130,4 \pm 24,8$ (3). La línea discontinua representa las líneas celulares controles sin delección (0 %), que se ha considerado el 100 %. Mann-Whintey test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas con delección).

Tampoco se observó un incremento gradual de la superficie de membrana interna mitocondrial (MIMS) con el aumento del nivel de heteroplasmia (figura 3.35). El contenido mitocondrial fue significativamente superior al control cuando el porcentaje de delección en el CIB PS1 era menor del 50 %. Sin embargo, no se observaron variaciones con respecto a la ausencia de delección cuando el nivel de heteroplasmia era del 60 % en ambos cíbridos; y en los clones con el porcentaje de delección más elevado, las tendencias parecían opuestas y seguían la misma línea observada en el actividad de la citrato sintasa (figura 3.34): mientras que en el CIB PS1 disminuía significativamente, en el CIB PS2 aumentaba, aunque no de forma significativa. Las variaciones con respecto a la ausencia de delección en la línea CIB PS2 no fueron significativas en ningún caso debido probablemente a que la desviación estándar del control resultó demasiado grande.

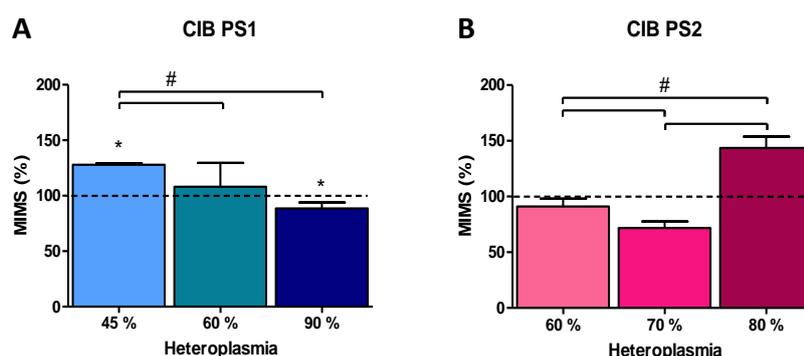


Figura 3.35 Superficie de membrana interna mitocondrial (MIMS) en diferentes niveles de heteroplasmia. A) CIB PS1. 0 %: $100 \pm 0,8$ (3); 45 %: $128 \pm 1,3$ (3); 60 %: $108,1 \pm 21,4$ (3); 90 %: $88,6 \pm 5,3$ (3). B) CIB PS2. 0 %: $100 \pm 38,2$ (3); 60 %: $91 \pm 7,1$ (3); 70 %: $71,8 \pm 5,8$ (3); 80 %: $143,6 \pm 10,1$ (3). La línea discontinua representa las líneas celulares controles sin delección, que se ha considerado el 100 %. Mann-Whintey test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas con delección).

Atendiendo a estos resultados es difícil determinar el umbral de heteroplasmia de delección necesario para modificar el contenido mitocondrial, siendo los niveles de mtDNA el único parámetro analizado que parece correlacionar con el porcentaje de delección.

3.4.2. Análisis de la función mitocondrial en diferentes niveles de heteroplasmia

Al analizar la actividad y cantidad del complejo IV mitocondrial o citocromo C oxidasa (COX), se observó que ambos cíbridos presentaban una caída significativa cuando la heteroplasmia era igual o superior al 60 % (figura 3.36). Sin embargo, no se detectó defecto en COX cuando el porcentaje de delección era del 45 % en el CIB PS1, lo que podría indicar que solo es necesaria la mitad de las moléculas de mtDNA completas para que la cantidad de complejo IV sea equivalente a la de las células sin delección. Es interesante destacar que la caída de cantidad de complejo IV fue más drástica que la de la actividad en ambos cíbridos. Además, la disminución de la actividad y la cantidad fue ligeramente mayor en el CIB PS2, que portaba una delección de mayor tamaño y con mayor número de genes de COX comprometidos.

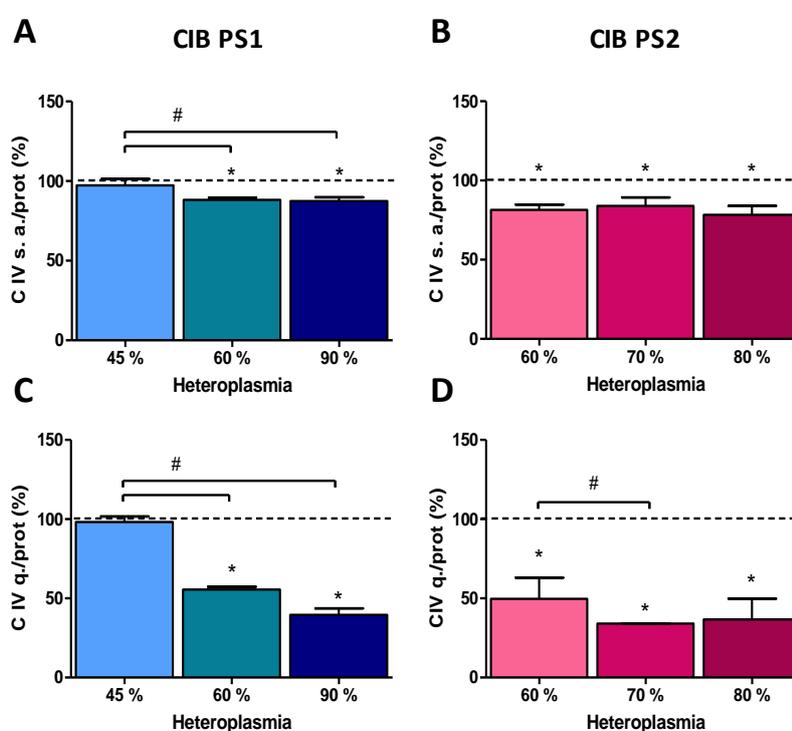


Figura 3.36 Actividad (CIV s.a.) y cantidad (CIV q.) de complejo IV por proteína total en diferentes niveles de heteroplasmia. Actividad específica del CIV por miligramos de proteína total (CIV s.a.). A) CIB PS1. 0 %: $100 \pm 0,7$ (3); 45 %: $97,3 \pm 4$ (3); 60 %: $88,2 \pm 1,3$ (3); 90 %: $87,5 \pm 2,4$ (3). B) CIB PS2. 0 %: $100 \pm 3,5$ (3); 60 %: $81,4 \pm 3,5$ (3); 70 %: $83,9 \pm 5,4$ (3); 80 %: $78,3 \pm 5,7$ (3). Cantidad de CIV por miligramos de proteína total (CIV q.). C) CIB PS1. 0 %: $100 \pm 4,3$ (3); 45 %: $98,2 \pm 3,5$ (3); 60 %: $55,5 \pm 1,7$ (3); 90 %: $39,6 \pm 4,1$ (3). D) CIB PS2. 0 %: $100 \pm 21,8$ (3); 60 %: $49,7 \pm 13,4$ (3); 70 %: $34 \pm 0,2$ (3); 80 %: $36,7 \pm 13,1$ (3). La línea discontinua representa las líneas celulares controles sin delección, que se ha considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas con delección).

A pesar de que la actividad y cantidad de COX estaban significativamente reducidas cuando el nivel de heteroplasmia era del 60 %, no se observó caída del consumo de oxígeno (figura 3.37) ni de la producción de ATP mitocondrial (figura 3.38) en los clones con este porcentaje de delección. Sin embargo, cuando la heteroplasmia alcanzaba el 70 % o superior, se observó en

ambas líneas una reducción significativa de la respiración endógena y desacoplada (figura 3.37), así como de la producción de ATP mitocondrial (figura 3.38). Estos defectos fueron especialmente dramáticos en ambas líneas cuando el nivel de heteroplasmia era igual o superior al 80 % (figura 3.37 y figura 3.38). Además, parece que el efecto sobre CIB PS1 era mayor al presentar un nivel de heteroplasmia más alto y a pesar de portar una deleción de menor tamaño que el CIB PS2. La incapacidad de esta línea para mantener moléculas de mtDNA completas también podría estar relacionada con esta diferencia (figura 3.33A).

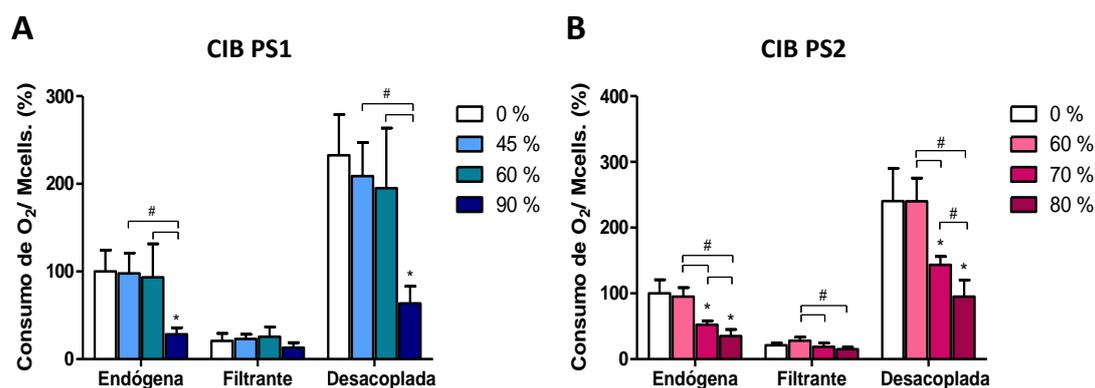


Figura 3.37 Consumo de oxígeno por millón de células en diferentes niveles de heteroplasmia. A) CIB PS1. Endógena: 0 %: $100 \pm 24,4$ (3); 45 %: $98 \pm 23,2$ (3); 60 %: $93,3 \pm 38,3$ (3); 90 %: $28,3 \pm 7,5$ (3). Filtrante: 0 %: $20,8 \pm 8,6$ (3); 45 %: $23,1 \pm 5,3$ (3); 60 %: $25,7 \pm 11$ (3); 90 %: $13,2 \pm 5,7$ (3). Desacoplada: 0 %: $232,6 \pm 46,2$ (3); 45 %: $208,8 \pm 38,4$ (3); 60 %: $195,1 \pm 68,5$ (3); 90 %: $63,7 \pm 19,4$ (3). B) CIB PS2. Endógena: 0 %: $100 \pm 20,8$ (3); 60 %: $95,1 \pm 13,7$ (3); 70 %: $52,6 \pm 6$ (3); 80 %: $35 \pm 10,2$ (3). Filtrante: 0 %: $21,2 \pm 3,6$ (3); 60 %: $28,2 \pm 5,2$ (3); 70 %: $18,9 \pm 5,6$ (3); 80 %: $15,1 \pm 3,1$ (3). Desacoplada: 0 %: $240,4 \pm 50,2$ (3); 60 %: $240,2 \pm 35,1$ (3); 70 %: $143,5 \pm 12,5$ (3); 80 %: $95,3 \pm 25,2$ (3). La respiración endógena de las líneas celulares controles sin deleción se ha considerado el 100 %. La respiración filtrante y endógena son relativas a la endógena en cada línea. Mann-Whintey test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas con deleción).

Como se observa en la figura 3.37, no se detectaron diferencias significativas en la respiración filtrante en ninguno de los clones frente a los controles sin deleción. No obstante, sí que se obtuvieron diferencias significativas entre el clon con el 60 % de heteroplasmia del CIB PS2 y los otros dos clones con porcentajes de deleción superiores.

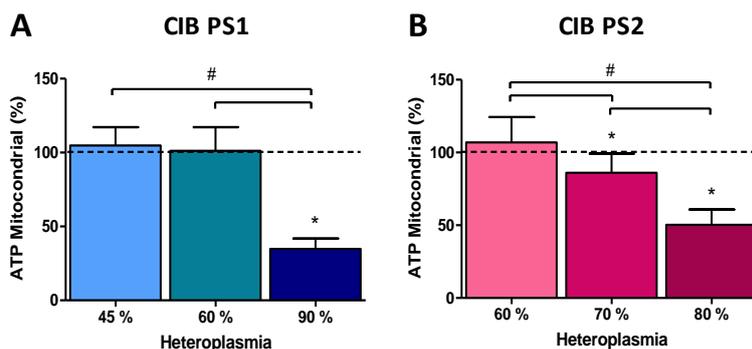


Figura 3.38 ATP mitocondrial por número de células en diferentes niveles de heteroplasmia. A) CIB PS1. 0 %: $100 \pm 11,7$ (6); 45 %: $104,8 \pm 12,4$ (6); 60 %: $101,2 \pm 16$ (6); 90 %: $34,8 \pm 7,1$ (6). B) CIB PS2. 0 %: $100 \pm 26,3$ (11); 60 %: $106,9 \pm 17,5$ (12); 70 %: $86 \pm 13,3$ (11); 80 %: $50,3 \pm 10,5$ (11). La línea discontinua representa las líneas celulares controles sin delección, que se ha considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas con delección).

Para la producción de ATP y el funcionamiento del sistema OXPHOS es esencial la generación de un adecuado potencial de membrana interna mitocondrial (MIMP). En base a esto, decidimos analizar si el potencial se veía alterado en presencia de una delección en el mtDNA y si esta variación era proporcional al porcentaje de heteroplasmia. Como se observa en la figura 3.39B, se produjo una caída significativa del 20-30 % del potencial de membrana interna mitocondrial en el CIB PS2, en todos los niveles de heteroplasmia analizados. Este resultado podría indicar que la disminución del potencial de membrana no es la única causa que provoca el descenso de ATP mitocondrial. Por otra parte, no se observó esta tendencia en el CIB PS1 (figura 3.39A), que mostró una disminución significativa del potencial de membrana cuando la heteroplasmia era del 45 %, pero que aumentaba significativamente cuando la delección era del 85 %. Esto no parece coherente con la caída de ATP mitocondrial observada previamente.

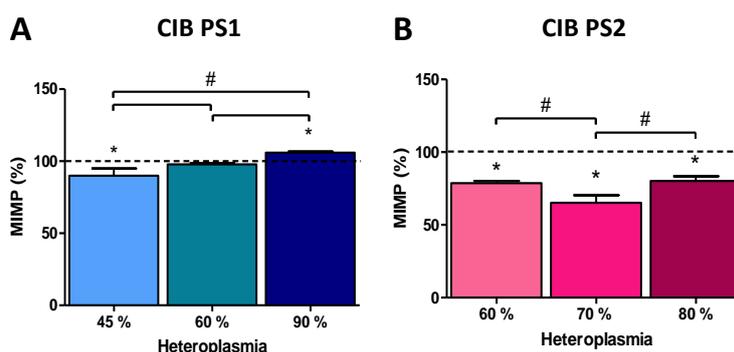


Figura 3.39 Potencial de membrana interna mitocondrial (MIMP) en diferentes niveles de heteroplasmia. A) CIB PS1. 0 %: $100 \pm 2,1$ (3); 45 %: $89,9 \pm 5$ (3); 60 %: $97,8 \pm 0,9$ (3); 90 %: $105,9 \pm 0,8$ (3). B) CIB PS2. 0 %: $100 \pm 3,2$ (3); 60 %: $78,7 \pm 1,6$ (3); 70 %: $65,2 \pm 5,3$ (3); 80 %: $80,2 \pm 3,2$ (3). La línea discontinua representa las líneas celulares controles sin delección, que se ha considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (frente a la línea control); # $p < 0,05$ (entre líneas con delección).

Al analizar la producción de ROS se observó un descenso significativo cuando el nivel de heteroplasmia era superior al 80 % en ambas líneas de híbridos (figura 3.40). Este resultado fue

sorprendente ya que esperaríamos una acumulación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia del mal funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (100). En el caso del CIB PS1, se observó un aumento significativo de los niveles de ROS cuando el nivel de heteroplasmia era del 45 %, pero éstos se normalizaban cuando alcanzaba el 60 % de delección. En cambio, la producción de ROS descendió un 30-40 % en todos los niveles de heteroplasmia analizados del CIB PS2, de manera similar al potencial de membrana (figura 3.39).

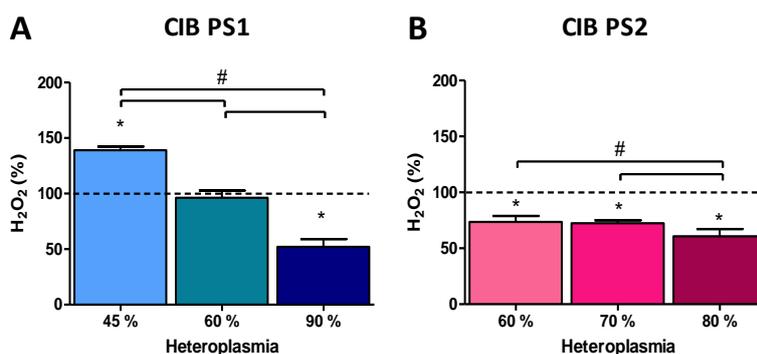


Figura 3.40 Producción de ROS (H₂O₂) en diferentes niveles de heteroplasmia. A) CIB PS1. 0 %: 100 ± 1,6 (3); 45 %: 139,1 ± 3,3 (3); 60 %: 96,2 ± 6,5 (3); 90 %: 52,2 ± 7 (3). B) CIB PS2. 0 %: 100 ± 5,3 (3); 60 %: 73,6 ± 5,4 (3); 70 %: 72,3 ± 2,7 (3); 80 %: 60,7 ± 6,5 (3). La línea discontinua representa las líneas celulares controles sin delección, que se ha considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (frente a la línea control); #p<0,05 (entre líneas con delección).

Si analizamos en conjunto todos estos resultados se podría determinar que el umbral patológico de ambas delecciones se sitúa sobre el 70 %. En el CIB PS1, no se observa defecto en la función del sistema OXPHOS cuando el nivel de heteroplasmia es inferior al 50 %, salvo un aumento en la producción de ROS. Cuando el porcentaje de delección alcanza el 60 %, el consumo de oxígeno y la producción de ATP se sitúan en niveles normales en ambos cíbridos, a pesar de que la actividad y cantidad de complejo IV se ve significativamente disminuida. Es en niveles de heteroplasmia iguales o superiores al 70 % cuando se producen efectos patológicos graves sobre la función OXPHOS, niveles de mutación observados en sangre en pacientes con síndrome de Pearson (apartado 3.1.2).

3.5. Efecto de la presencia de una delección común en el mtDNA sobre la capacidad de diferenciación de células iPS a distintos tipos celulares

La diferenciación de células madre pluripotentes requiere de una transición desde un metabolismo principalmente glucolítico hacia un sistema basado en la fosforilación oxidativa (54). Por tanto, este proceso estaría estrechamente ligado al correcto funcionamiento del sistema OXPHOS, por lo que las células iPS portadoras de una delección en el mtDNA podrían ver afectada su capacidad de diferenciación.

En el desarrollo de esta tesis, se han puesto a punto protocolos de diferenciación de las células iPS hacia algunos de los tipos celulares más gravemente afectados en pacientes con los síndromes de Pearson y Kearns-Sayre: células hematopoyéticas, células del páncreas exocrino, neuronas y cardiomiocitos. Además de estudiar el efecto de la delección común en el mtDNA sobre la diferenciación de las células iPS mediante la cuantificación de marcadores específicos de cada tipo celular, también se ha analizado la variación de los niveles de heteroplasmia durante el proceso, a fin de conocer si se produce una expansión clonal de las moléculas delecionadas en las células postmitóticas.

En todas las diferenciaciones realizadas, se ha trabajado con el clon V de la línea de iPSCs control y el clon 10 de las iPSCs derivadas del paciente PS1, portador de la delección común. Además de presentar las características propias de una línea de células madre pluripotentes inducidas (apartado 3.2.3.1), ambas mostraban un crecimiento adecuado, un cariotipo normal y, tanto la huella genética del DNA genómico como la secuencia de mtDNA se correspondían con las del fibroblasto parental.

3.5.1. Diferenciación hematopoyética de células iPS control y PS1

La anemia sideroblástica, junto con la disfunción del páncreas exocrino, son las manifestaciones clínicas más características de pacientes con síndrome de Pearson (88). El motivo de la afectación específica de estos tejidos es aún desconocido. Por ello, decidimos estudiar la capacidad de diferenciación hematopoyética de las células madre pluripotentes inducidas portadoras de la delección común derivadas de un paciente con esta enfermedad.

El protocolo llevado a cabo para esta diferenciación (apartado 6.3.13.3.1) permite obtener células progenitoras hematopoyéticas con capacidad de generar unidades formadoras de colonias (CFUs), un parámetro empleado en la clínica y que sirve de marcador de la correcta diferenciación *in vitro* de las células iPS a este linaje (201). Tras el proceso de diferenciación,

aproximadamente el 75 % de estas células progenitoras hematopoyéticas se sitúan en suspensión, por lo que se emplearon para realizar el ensayo CFU. No obstante, aunque las células adherentes son más heterogéneas, también pueden contener alguna célula progenitora, por lo que igualmente se recogieron y se emplearon en otros análisis.

A fin de comprobar que las células obtenidas eran realmente progenitoras hematopoyéticas, se llevó a cabo el ensayo de generación de unidades formadoras de colonias (CFU) a partir de las células diferenciadas recogidas en suspensión. La identificación y cuantificación de las CFUs se realizó varias veces por dos personas independientes, empleando un microscopio óptico invertido. Como se puede observar en la figura 3.41, tanto las células progenitoras hematopoyéticas derivadas de la línea control como las obtenidas de la línea mutante, fueron capaces de generar CFUs de todos los tipos (descritos en el apartado 6.3.13.3.1.1)

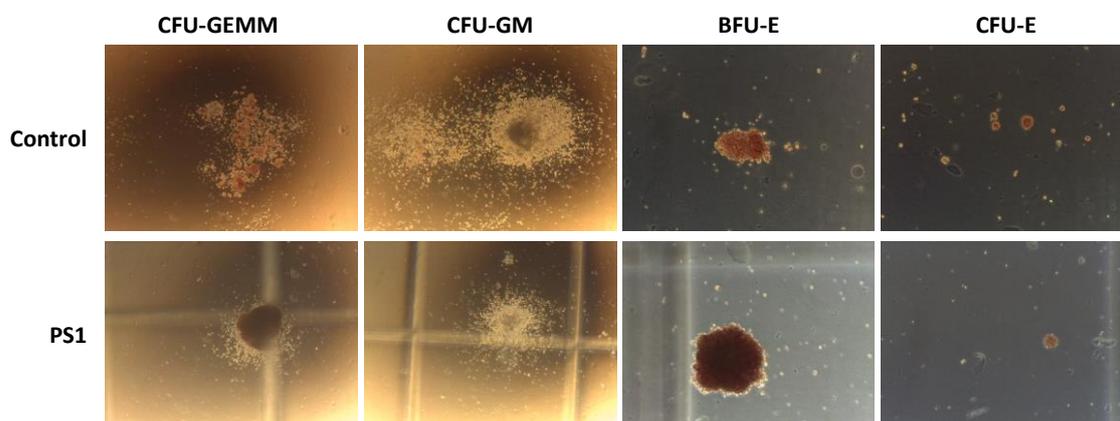


Figura 3.41 Imágenes representativas de las unidades formadoras de colonias (CFU) generadas a partir de las células progenitoras hematopoyéticas control y PS1. Unidades formadoras de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (CFU-GEMM), unidades formadoras de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) y unidades formadoras de eritrocitos grandes (BFU-E) y pequeñas (CFU-E). Imágenes de microscopía óptica. Aumento 40X en CFU-GEMM y CFU-GM, aumento 100X en BFU-E y CFU-E.

La cuantificación de estas colonias reveló que no existían diferencias significativas entre el número de CFUs totales generados por la línea control y la línea PS1 (figura 3.42A). Al analizar cada tipo de CFUs de forma individual, se observó también una gran similitud entre ambas líneas celulares (figura 3.42B). No obstante, se observaron diferencias significativas en el número de colonias CFU-GEMM, el tipo más grande y con mayor capacidad progenitora, siendo menor en las células mutantes.

Resultados

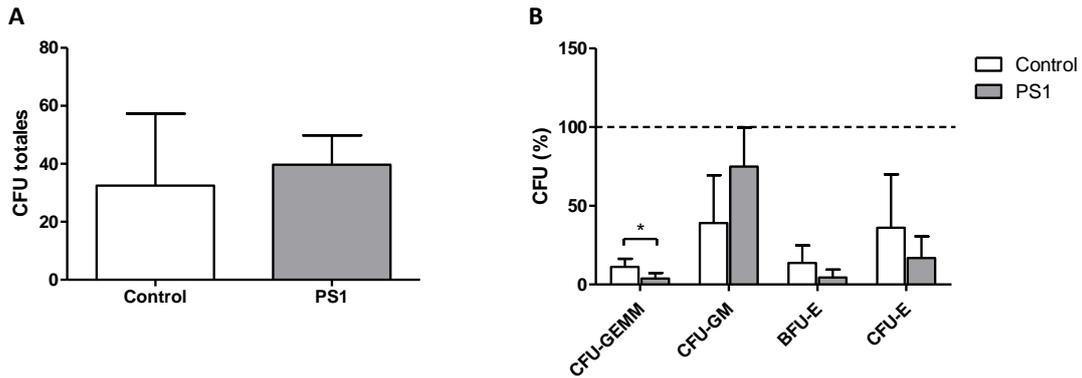


Figura 3.42 Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (CFUs) derivadas de la línea control y la línea portadora de la delección común (PS1). Unidades formadoras de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (CFU-GEMM), unidades formadoras de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) y unidades formadoras de eritrocitos grandes (BFU-E) y pequeñas (CFU-E). A) Colonias totales cuantificadas por pocillo. Control: $32,5 \pm 24,8$ (6); PS1: $39,7 \pm 10,2$ (6). A) Proporción de CFUs de cada tipología respecto al número total de colonias de cada línea por pocillo. CFU-GEMM. Control: $11,2 \pm 5,1$ (6); PS1: $3,8 \pm 3,6$ (6). CFU-GM. Control: $39,1 \pm 30,4$ (6); PS1: $75 \pm 24,7$ (6). BFU-GEMM. Control: $13,7 \pm 11,1$ (6); PS1: $4,4 \pm 5$ (6). CFU-E. Control: $36,1 \pm 33,8$ (6); PS1: $16,8 \pm 13,7$ (6). La línea discontinua representa el número total de colonias de cada línea celular por pocillo, que se ha considerado el 100%. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (entre control y PS1).

En la figura 3.43 se muestra la variación del nivel de heteroplasma durante la diferenciación hematopoyética. Lamentablemente, las células iPS sin diferenciar se mantuvieron demasiado tiempo en cultivo y la heteroplasma inicial se situó en un 44 %, por debajo del umbral patológico establecido previamente para esta delección (apartado 3.4). A pesar de ello, pudimos observar que el porcentaje de delección se redujo durante la diferenciación hasta, aproximadamente, un 25 % tanto en las células diferenciadas en suspensión como en las adherentes. Esto podría explicar la similitud observada previamente en la capacidad de formar CFUs de ambas líneas (figura 3.42). Sería interesante analizar la capacidad de diferenciación de las células iPS PS1 con un alto porcentaje de delección inicial, y así poder valorar su efecto sobre el fenotipo.

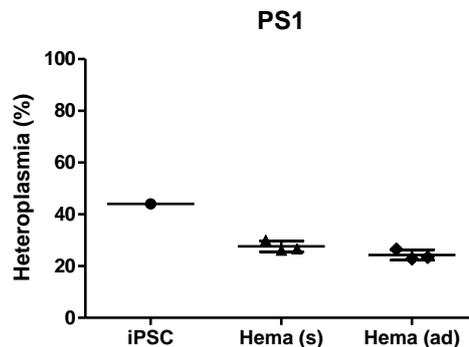


Figura 3.43 Heteroplasma de línea portadora de la delección común (PS1) en la diferenciación a células progenitoras hematopoyéticas. Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células progenitoras hematopoyéticas (Hema) en suspensión (s) y adherentes (ad). iPSCs: 44 (1). Hema (s): $27,6 \pm 2,1$ (3); Hema (ad): $24,3 \pm 2$ (3).

3.5.2. Diferenciación a páncreas exocrino de células iPS control y PS1

El páncreas exocrino es uno de los tejidos más frecuentemente afectados en pacientes con síndrome de Pearson (88), sin embargo, no es un síntoma habitual en el resto de patologías mitocondriales (202). Como ya se ha comentado previamente, el motivo de la afectación específica de este tejido es aún desconocido, por lo que decidimos analizar la capacidad de diferenciación de las células iPS portadoras de la delección común a este tipo celular, y compararla con una línea control sin patología mitocondrial.

Para ello, se adaptó el protocolo descrito por Shirasawa *et al.* para la diferenciación específica de las ESCs y que requiere de la diferenciación intermedia a cuerpos embrioides (203). A nivel morfológico, tanto la línea control como la mutante mostraron cambios importantes con respecto a las iPSCs sin diferenciar, adquiriendo finalmente una estructura poliédrica característica de las células acinares del páncreas exocrino (figura 3.44) (204).

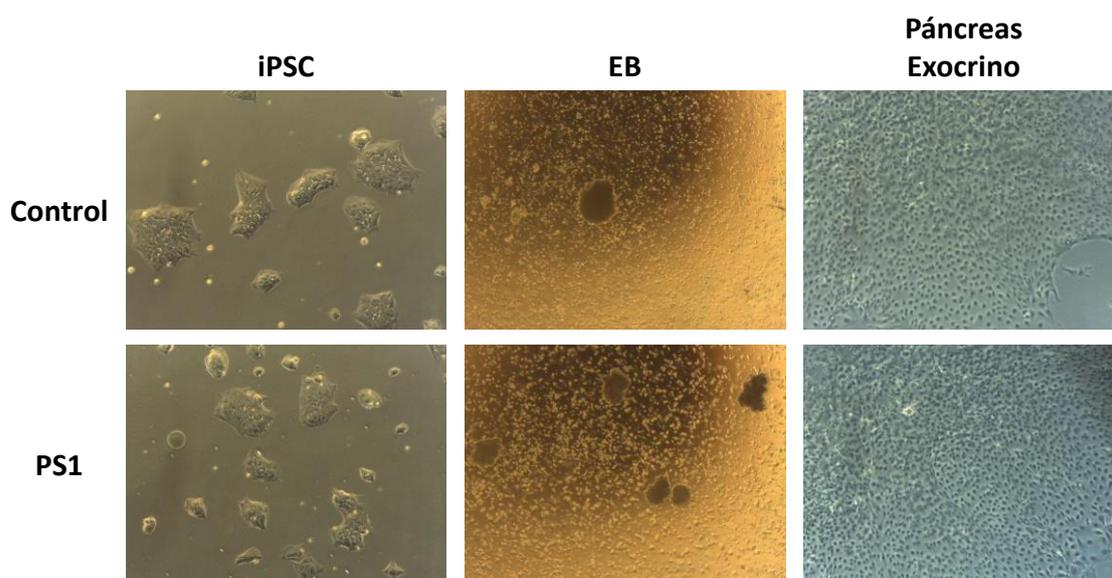


Figura 3.44 Imágenes representativas de la diferenciación de las células iPS control y PS1 a páncreas exocrino. iPSCs, células madre pluripotentes inducidas. EB, cuerpos embrioides. Imágenes de microscopía óptica, aumento 40X para EB y 100X para las células iPS y diferenciadas.

La confirmación del fenotipo se realizó mediante el análisis de la expresión por inmunofluorescencia de la α -amilasa pancreática, una de las enzimas secretadas por el páncreas exocrino. Como se puede observar en la figura 3.45, ambas líneas mostraron expresión de esta enzima, aunque no fue posible realizar un estudio cuantitativo para valorar diferencias en su capacidad de diferenciación.

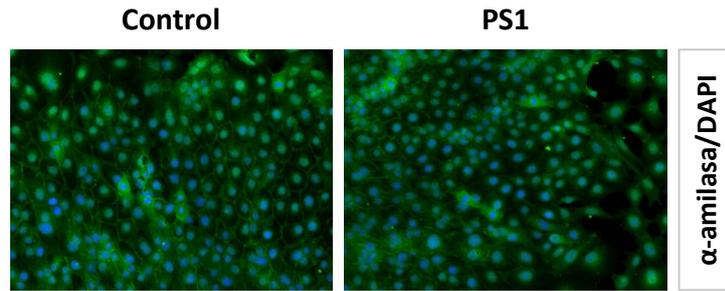


Figura 3.45 Inmunofluorescencia de la α -amilasa pancreática en células control y PS1 diferenciadas a páncreas exocrino. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la α -amilasa pancreática (en verde) y los núcleos celulares marcados mediante DAPI (en azul), 200X.

Al analizar la heteroplasma de la línea PS1 durante la diferenciación (figura 3.46), observamos una importante caída hasta alcanzar niveles de condición *wild-type*. Lamentablemente, el porcentaje de deleción inicial de las células iPS también fue demasiado bajo, probablemente debido al mantenimiento prolongado de la línea en cultivo. No obstante, y a pesar de varios intentos, no fue posible completar con éxito la diferenciación de células iPS PS1 con alto porcentaje de deleción, lo que podría reflejar la dependencia de este tejido respecto al sistema OXPPOS. Sería interesante repetir el estudio con un mayor número de líneas para confirmar este fenómeno.

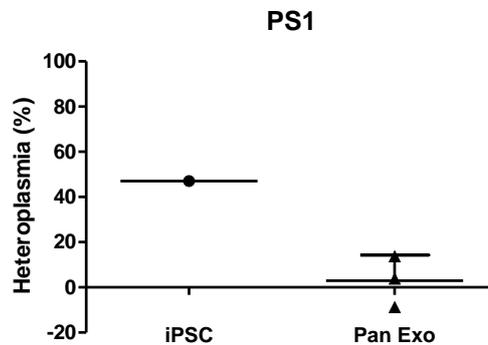


Figura 3.46 Heteroplasma de línea portadora de la deleción común (PS1) en la diferenciación a páncreas exocrino. Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células diferenciadas a páncreas exocrino (Pan Exo). iPSCs: 47 (1). Pan Exo: 2,96 ± 11,27 (3).

3.5.3. Diferenciación neuronal de células iPS control y PS1

La función y el desarrollo del tejido nervioso parece ser muy dependiente del sistema OXPPOS y de los niveles de ATP, por lo que suele estar gravemente afectado en pacientes con distintas patologías mitocondriales, como el síndrome de Kearns-Sayre (109,115). A pesar de que no es un síntoma frecuente del síndrome de Pearson, los pacientes que sobreviven a esta enfermedad acaban desarrollando KSS y presentando afectación neurológica. Por tanto, para intentar comprender este proceso, decidimos estudiar el efecto que una deleción en el mtDNA tendría sobre la diferenciación neuronal.

Para ello, se llevó a cabo la diferenciación neuronal de las células iPS control y PS1, adaptando el protocolo descrito por Shuhei Soeda *et al.* (2005), y que se divide en dos fases: la primera fase de diferenciación de iPSCs a células madre neurales inducidas (iNSC), y la segunda fase de iNSCs a neuronas.

A nivel morfológico, se observaron grandes cambios en las iNSCs y las neuronas respecto a las células iPSC sin diferenciar (figura 3.47). El patrón de crecimiento también se modificó, ya que a diferencia de las iPSCs, las células madre neurales no mostraron un crecimiento en colonias compactas. Además, se observaron diferencias cualitativas importantes entre las neuronas de la línea control y de PS1, como en la formación de agregados o en el número y el tamaño de las neuritas, que fue menor en la línea mutante, por lo que podrían estar causadas por la delección en el mtDNA.

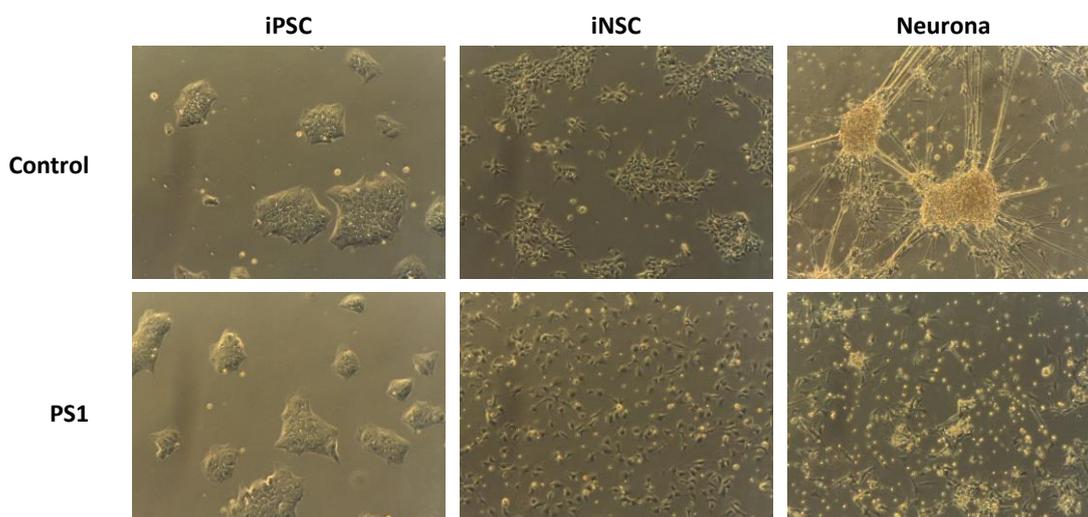


Figura 3.47 Cambios morfológicos observados en la diferenciación neuronal de las células iPSC control y PS1 a células madre neurales inducidas (iNSC) y neuronas. Imágenes de microscopía óptica, 100X.

Para confirmar que los cambios morfológicos representaban un adecuado fenotipo neuronal, y que éste presentaba diferencias entre las células control y mutante, se determinó la expresión de varios marcadores específicos: nestina, β III-tubulina y MAP2. La nestina es una proteína constituyente de filamentos intermedios que se expresa principalmente en células madre del sistema nervioso central; la β III tubulina, o TUBB3, es una proteína principal de los microtúbulos que permite la correcta orientación y mantenimiento del axón; y MAP2, o proteína 2 asociada a microtúbulos, que estaría implicada en endurecer y estabilizar los microtúbulos, aunque su función exacta se desconoce.

El análisis de los niveles de mRNA de los genes codificantes de estas proteínas reveló que se producía un aumento de la expresión en el proceso de diferenciación (figura 3.48). Además, el

patrón observado en cada uno de los genes evidencia un correcto proceso de diferenciación: mientras que el incremento de *TUBB3* y *MAP2* fue especialmente significativo en las neuronas (figura 3.48A y B), los niveles de *NES* aumentaron en mayor medida en las iNSC para después reducirse o mantenerse a tiempo final (figura 3.48C).

Por otro lado, las neuronas derivadas de la línea PS1 mostraron niveles de *TUBB3* y *MAP2* significativamente inferiores a los de la línea control (figura 3.48A y B). Asimismo, la expresión de la nestina fue significativamente menor en las iNSC de PS1; y a diferencia del control y lo descrito en la bibliografía, no se observaron cambios entre las células madre neurales y las neuronas de PS1 a tiempo final (figura 3.48C).

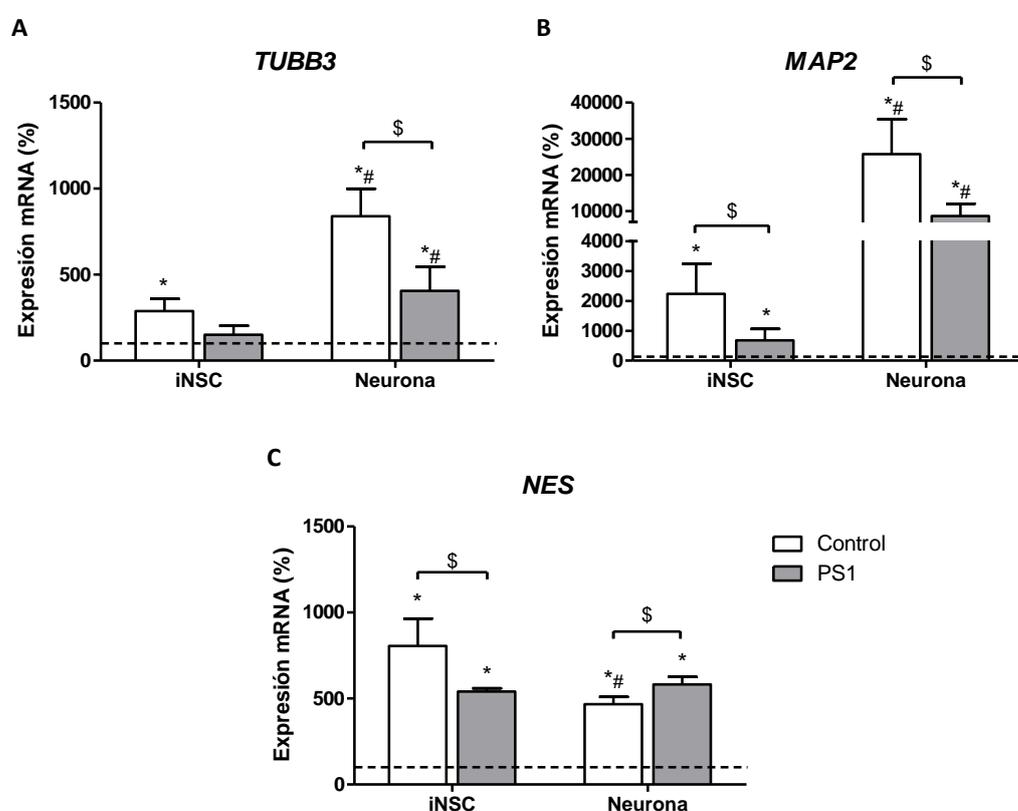


Figura 3.48 Expresión de genes asociados a diferenciación neuronal (*TUBB3*, *MAP2* y *NES*) en la línea control y la línea portadora de la delección común (PS1). Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células madre neurales inducidas (iNSCs). A) *TUBB3*. iPSCs. Control: 100 ± 37 (3); PS1: 100 ± 15 (3). iNSCs. Control: $287,7 \pm 71,9$ (3); PS1: $150,4 \pm 52,6$ (3). Neurona. Control: $838,8 \pm 160,5$ (3); PS1: $405,3 \pm 140,1$ (3). B) *MAP2*. iPSCs. Control: $100 \pm 14,6$ (3); PS1: $100 \pm 39,4$ (3). iNSCs. Control: $2235,3 \pm 1012,6$ (3); PS1: $680,5 \pm 385,1$ (3). Neurona. Control: $25759 \pm 9603,4$ (3); PS1: $8608,1 \pm 3399,9$ (3). C) *NES*. iPSCs. Control: $100 \pm 32,6$ (3); PS1: $100 \pm 7,5$ (3). iNSCs. Control: $805 \pm 159,2$ (3); PS1: $540,9 \pm 18,1$ (3). Neurona. Control: 467 ± 42 (3); PS1: $581,9 \pm 43,7$ (3). La línea discontinua representa a los valores de las iPSCs de ambas líneas, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a cada iPSC parental), # $p < 0,05$ (respecto a cada iNSC), \$ $p < 0,05$ (entre línea control y PS1).

Además de los niveles de mRNA, algunos de estos marcadores también se estudiaron mediante técnicas de análisis de proteínas. Como se observa en la figura 3.49, el marcaje de la Nestina permitió observar en detalle el cambio morfológico de las células iPS en la diferenciación a

células madre neuronales. A pesar de que las iPSCs mostraron un cierto marcaje para esta proteína, las iNSCs, que presentan un ratio núcleo-citoplasma menor, lo manifestaron de un modo más intenso y su distribución fue más homogénea.

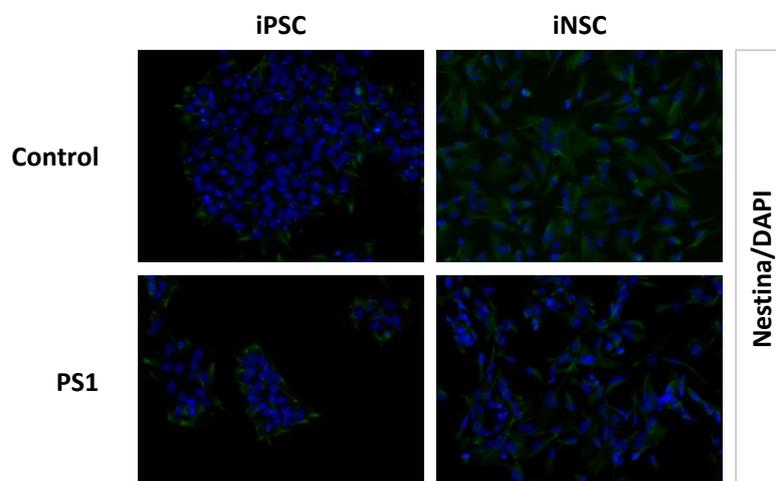


Figura 3.49 Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de Nestina en iPSCs e iNSCs de las líneas control y PS1. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la Nestina (en verde) y los núcleos celulares marcados mediante DAPI (en azul). Aumento 200X.

Paralelamente, la inmunofluorescencia de la proteína β III-tubulina también evidenció el importante cambio morfológico observado en las diferentes fases de la diferenciación (figura 3.50). Las iNSCs control mostraron un marcaje intenso y localizado en unas determinadas zonas, mientras que en las mutantes la distribución resultó más homogénea en el citoplasma. A tiempo final, el marcaje evidenció las numerosas conexiones formadas entre neuronas. Además, las neuronas portadoras de delección mostraron una red neuronal claramente más pobre que la línea celular control, con menor número de conexiones y agrupaciones más reducidas.

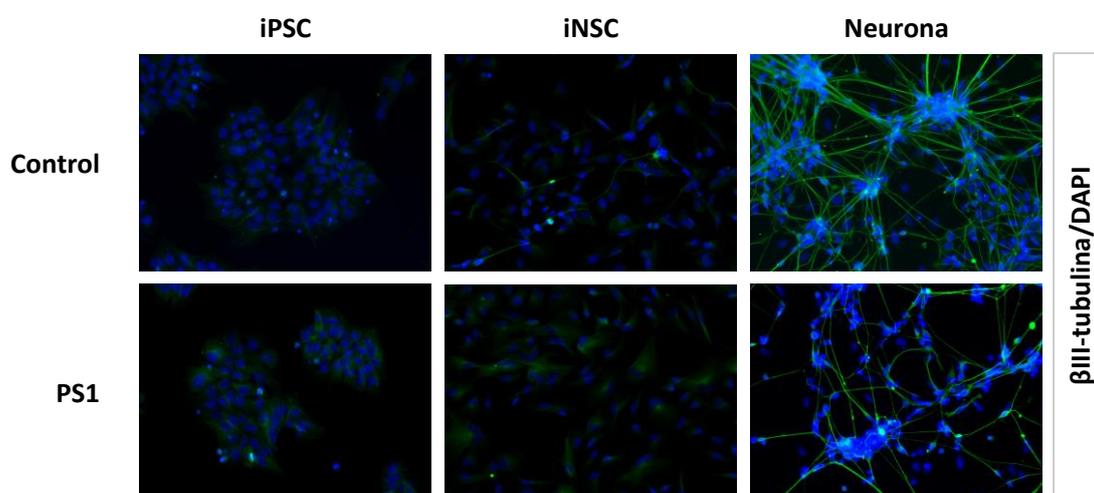


Figura 3.50 Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de β III-tubulina en iPSCs, iNSCs y neuronas de las líneas control y PS1. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la β III-tubulina (en verde) y los núcleos celulares marcados mediante DAPI (en azul). Aumento 200X.

Resultados

Un análisis cuantitativo de la proteína β III-tubulina mediante Western blot confirmó el aumento significativo de la expresión de esta proteína durante el proceso de diferenciación (figura 3.51). Además, reafirmó la gran diferencia observada entre la línea control y la línea PS1, tanto en las iNSCs como en las neuronas a tiempo final.

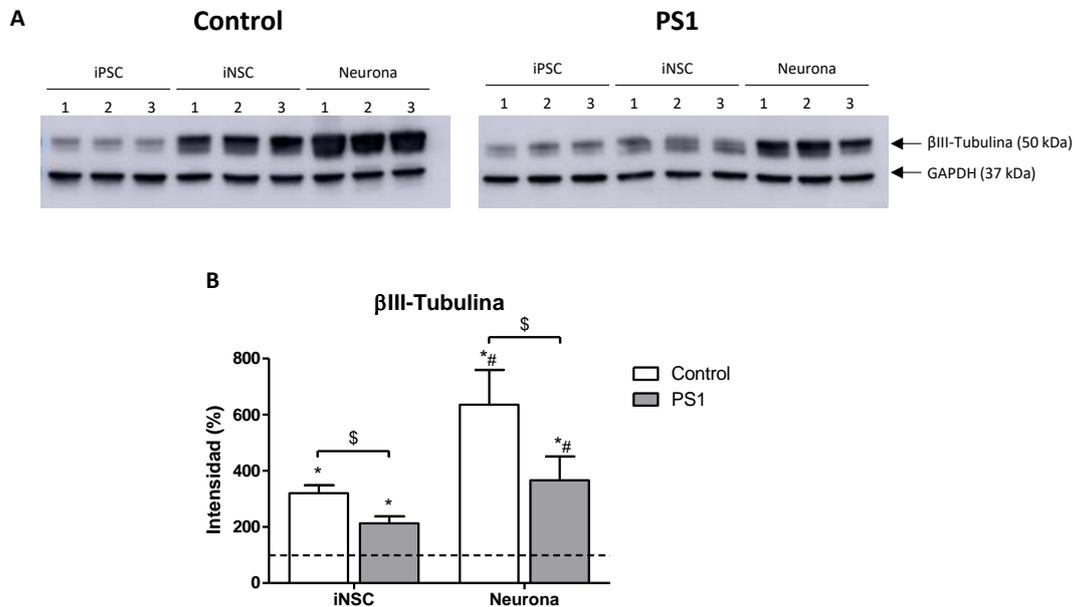


Figura 3.51 Determinación de la cantidad de la proteína β III-Tubulina en la diferenciación neuronal de la línea control y la línea portadora de la delección común (PS1) mediante Western blot. Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células madre neurales inducidas (iNSCs). A) Se muestran imágenes de la inmunodetección por Western blot de la línea control y mutante. B) Representación gráfica de la intensidad de las bandas normalizadas con GAPDH. iPSCs. Control: $100 \pm 12,6$ (3); PS1: $100 \pm 15,3$ (3). iNSCs. Control: $320,3 \pm 28$ (3); PS1: $213,2 \pm 24,4$ (3). Neurona. Control: $635,5 \pm 124,4$ (3); PS1: $366,6 \pm 84,4$ (3). La línea discontinua representa a los valores de las iPSCs de ambas líneas, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a cada iPSC parental), # $p < 0,05$ (respecto a cada iNSC), \$ $p < 0,05$ (entre línea control y PS1).

Como se observa en la figura 3.52, el nivel de heteroplasma de la delección se mantuvo por encima del 75 % durante la diferenciación neuronal de la línea PS1, siendo superior al umbral patológico establecido. Además, aunque la heteroplasma aumentó significativamente a tiempo final, este incremento fue sólo de un 2,3 %.

Estos resultados evidenciarían la dificultad de la línea celular PS1 de alcanzar una correcta diferenciación neuronal como consecuencia, probablemente, de la presencia de una delección en el mtDNA. El análisis a nivel funcional podría ser interesante para conocer el grado de afectación, y así establecer una posible correlación con el fenotipo clínico observado en el tejido nervioso de pacientes con patologías causadas por delecciones en el mtDNA.

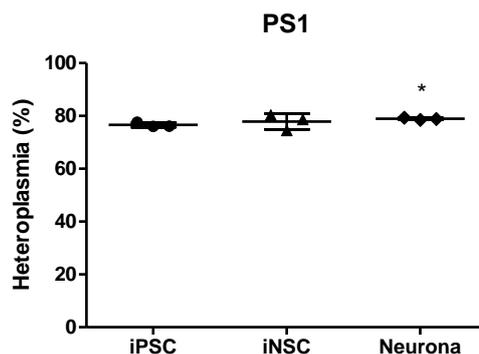


Figura 3.52 Heteroplasma de la línea celular portadora de la delección común (PS1) durante la diferenciación neuronal. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre neurales inducidas (iNSC). iPSCs: $76,6 \pm 0,9$ (3); iNSCs: $77,9 \pm 3$ (3); neurona: $78,9 \pm 0,4$ (3). Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a iPSC).

3.5.4. Diferenciación de células iPS control y PS1 a cardiomiocito

Las células del tejido muscular (miocitos) requieren de altos niveles de ATP para generar movimientos de contracción, por lo que su actividad puede ser gravemente alterada en casos de disfunción mitocondrial. Las cardiomiopatías y anomalías en la conducción cardíaca son manifestaciones frecuentes en pacientes con enfermedades mitocondriales, y con mucha frecuencia llegan a ser letales. En el caso de patologías causadas por deleciones en el mtDNA, se podría considerar un síntoma habitual y se ha observado principalmente en pacientes con síndrome de Kearns-Sayre (69,90,206,207).

Tras la completar la diferenciación, se observaron disimilitudes importantes entre ambas líneas celulares ya que los cardiomiocitos derivados de las iPSCs control fueron capaces de generar movimientos contráctiles de manera espontánea, algo que no ocurrió en la línea PS1. Para confirmar que el fenotipo observado se correspondía realmente con cardiomiocitos diferenciados, se analizaron dos marcadores asociados a este tipo celular: la troponina T cardíaca (cTnT) y el factor de transcripción NKX2-5. La troponina T cardíaca, codificada por el gen *TNNT2*, es la subunidad de unión a la tropomiosina del complejo troponina y se localiza sobre el filamento delgado del músculo estriado, regulando la contracción muscular en respuesta a las alteraciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} . El factor de transcripción NKX2-5, está codificado por el gen *NKX2.5* y participa en la formación y diferenciación del miocardio.

Los niveles de mRNA de ambos marcadores aumentaron significativamente en los cardiomiocitos de ambas líneas celulares con respecto a las células iPS sin diferenciar (figura 3.53), por lo que se pudo confirmar la correcta diferenciación. Además, la expresión en los

cardiomiocitos PS1 fue significativamente inferior a la de las células control, evidenciando los posibles efectos de la delección sobre la capacidad de diferenciación.

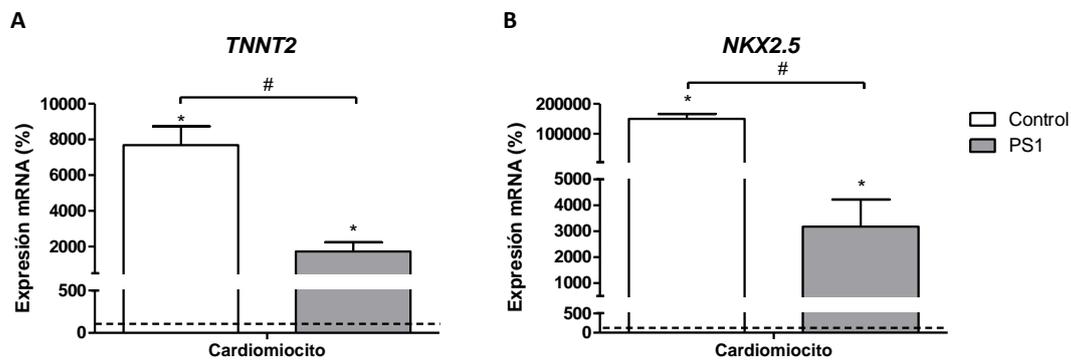


Figura 3.53 Niveles de mRNA de los genes asociados a diferenciación a cardiomiocito (*TNNT2* y *NKX2.5*) de la línea control y la línea portadora de la delección común (PS1). A) *TNNT2*. iPSCs. Control: 100 ± 27,9 (3); PS1: 100 ± 19,5 (3). Cardiomiocito. Control: 7686,9 ± 1048 (3); PS1: 1722,6 ± 511,9 (3). B) *NKX2.5*. iPSCs. Control: 100 ± 51,8 (3); PS1: 100 ± 102,7 (3). Cardiomiocito. Control: 150251,7 ± 16402,1 (3); PS1: 3182,4 ± 1044,9 (3). La línea discontinua representa a los valores de las iPSCs de ambas líneas, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto a cada iPSC parental), #p<0,05 (entre línea control y PS1).

El análisis de la expresión de Troponina T por Western blot también evidenció la disparidad en los niveles de esta proteína entre los cardiomiocitos de la línea control y la mutante (figura 3.54). No fue posible realizar la cuantificación por densitometría al no detectar expresión de esta proteína en las células madre pluripotentes inducidas.

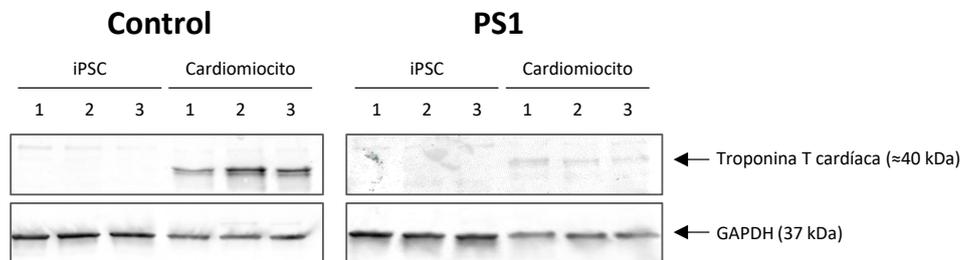


Figura 3.54 Determinación de la cantidad de proteína Troponina T cardíaca (cTnT) mediante Western blot en la diferenciación a cardiomiocito de la línea control y la línea portadora de la delección común (PS1). Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

En la figura 3.55 se puede observar que la heteroplasmia de la línea PS1 se redujo significativamente tras la diferenciación a cardiomiocito, alcanzando un porcentaje final del 66 %, cercano al umbral patológico establecido previamente para esta delección. Sin embargo, ese nivel de heteroplasmia sería suficiente para provocar un efecto patológico en estas células e impedir la correcta función de este linaje.

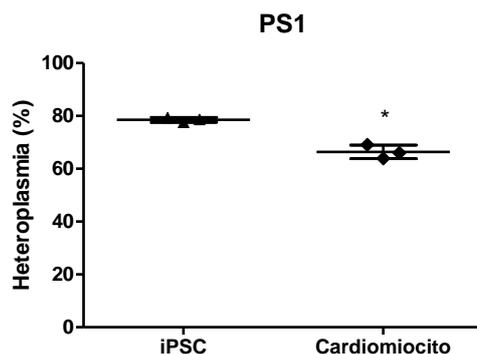


Figura 3.55 Heteroplasma de línea portadora de la delección común (PS1) en la diferenciación a cardiomiocito. Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). iPSCs: $76,6 \pm 0,9$ (3); cardiomiocito: $66,4 \pm 2,6$ (3). Media \pm SD. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a iPSC).

Las diferencias observadas en la expresión de ambos marcadores entre la línea control y mutante podrían ser consecuencia de la presencia de una delección en el mtDNA. Además, los niveles disponibles de ATP mitocondrial estarían considerablemente reducidos por la disfunción del sistema OXPHOS en la línea mutante, e impediría la inducción de movimientos contráctiles característicos de los cardiomiocitos diferenciados. No obstante, sería interesante realizar más estudios, como análisis funcionales, para comprender de forma más concreta el efecto patológico de una delección en el mtDNA sobre este tipo celular.

3.6. Efecto de diferentes tratamientos en la variación del nivel de heteroplasma y función OXPHOS de células en cultivo

El tratamiento de las patologías mitocondriales es principalmente sintomático y no suele alterar significativamente el curso de la enfermedad. En este apartado describimos unas aproximaciones a posibles tratamientos para pacientes portadores de delección única y grandes en el mtDNA.

Previamente se ha determinado que el porcentaje umbral de las delecciones a partir del cual se manifiesta el fenotipo patológico en híbridos con mtDNA de los pacientes PS1 y PS2 se sitúa entre el 60-70 %. Como ya se ha comentado, el umbral patológico para una mutación mitocondrial puede ser diferente entre tejidos según el requerimiento energético del mismo, y por tanto, también entre modelos celulares. En cualquier caso, nos sirve de referencia para determinar la posible efectividad de los tratamientos estudiados.

3.6.1. Tratamiento con cuerpos cetónicos

La dieta cetogénica (DC) está basada en la ingesta de bajas cantidades de carbohidratos, altas cantidades de grasas y niveles moderados de proteínas. La simulación de esta dieta *in vitro* se

Resultados

consigue mediante la eliminación de la glucosa del medio de cultivo y la adición de cuerpos cetónicos como el acetoacetato (AA) o β -hidroxibutarato (BHB) en concentraciones fisiológicas (162). Diferentes estudios han demostrado que el tratamiento cetogénico consigue una reducción del mtDNA mutante, así como un aumento de la biogénesis mitocondrial *in vitro* (160,162,163). También se ha observado mejora en ratones con miopatía mitocondrial y en pacientes, aunque con efectos secundarios que evidencian la necesidad de optimizar el tratamiento (164,165).

En esta tesis se ha estudiado el efecto del tratamiento con cuerpos cetónicos sobre la heteroplasmia y el número de copias de mtDNA en fibroblastos y cíbridos portadores de las deleciones de los pacientes PS1 y PS2. Para ello, las líneas se mantuvieron durante 5 días en medio DMEM sin glucosa, 10 % (fibroblastos) o 5 % (cíbridos) de SFB, uridina (50 μ g/ml) y con cuerpos cetónicos (5 mM), adaptando el protocolo propuesto por Santra *et al.* (apartado 6.3.15.1) (162).

3.6.1.1. Tratamiento de fibroblastos PS1 y PS2 con cuerpos cetónicos

El estudio realizado en fibroblastos mostró que el tratamiento afectaba de forma considerable a la viabilidad celular (figura 3.56), por lo que se añadió un tiempo de recuperación de 10 días en medio de crecimiento normal (glucosa 25 mM, 10 % de SFB y uridina (50 μ g/ml)). Como control del estudio se mantuvieron paralelamente las células PS1 y PS2 en este mismo medio.

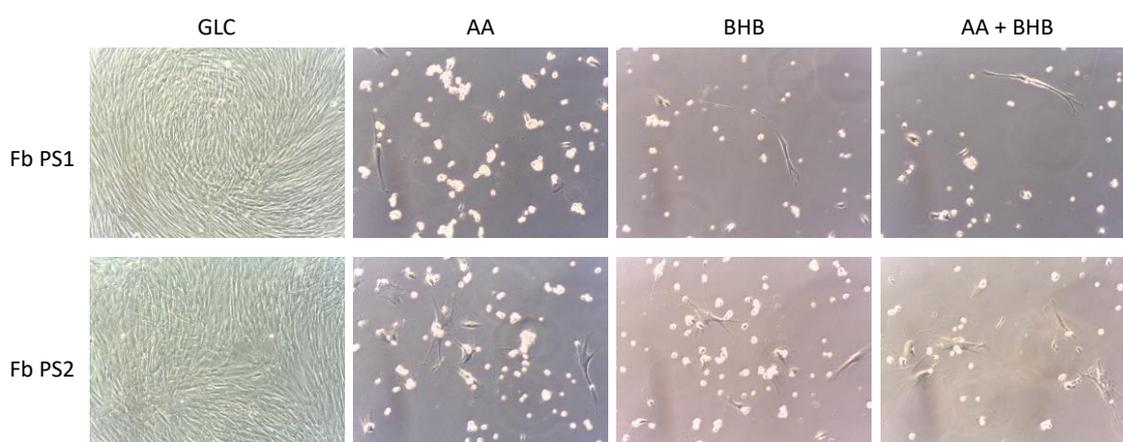


Figura 3.56 Fibroblastos con deleción PS1 y PS2 tras 5 días de crecimiento en medio normal (GLC) y en medios con cuerpos cetónicos (AA, BHB, ambos). Imágenes de microscopía óptica, 100X.

Al analizar los niveles de heteroplasmia tras 5 días de tratamiento y 10 días de recuperación en fibroblastos PS1 y PS2, se observó una reducción significativa en todos los casos al comparar con las líneas en medio de crecimiento normal, salvo en el tratamiento con acetoacetato (AA) de la línea Fb PS1 que mostró caída pero no significativa (figura 3.57). Además, el tratamiento con β -

hidroxibutarato pareció ser el más eficaz con una reducción del 13 % de la heteroplasmia en el Fb PS1 y del 16 % en el Fb PS2, y siendo significativamente diferente al tratamiento único con acetoacetato en ambos casos. En Fb PS1, el nivel de heteroplasmia tras la combinación de ambos cuerpos cetónicos también fue significativamente menor que con AA únicamente (figura 3.57A).

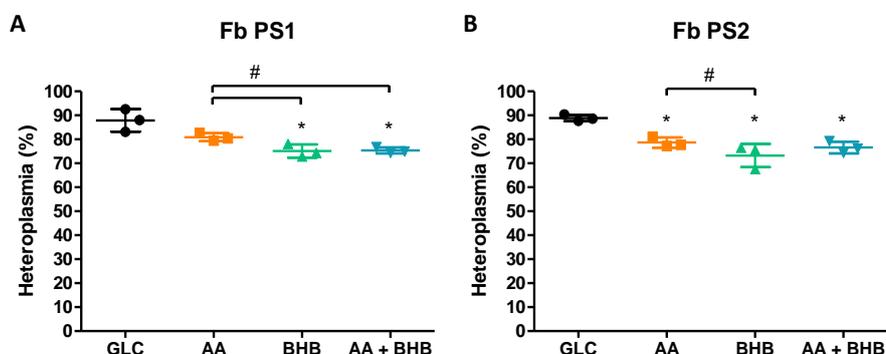


Figura 3.57 Variación del nivel de heteroplasmia en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 tras el tratamiento con cuerpos cetónicos: acetoacetato (AA), DL-β-hidroxibutarato (BHB) y la combinación de ambos (AA + BHB). GLC, medio glucosa (25 mM), 10 % de SFB y uridina (50 μg/ml). A) Fb PS1. GLC: 87,9 ± 4,7 (3); AA: 80,9 ± 1,7 (3); BHB: 75,1 ± 2,7 (3); AA+BHB: 75,4 ± 1,2 (3). B) Fb PS2. GLC: 88,9 ± 1,3 (3); AA: 78,7 ± 2,1 (3); BHB: 73,2 ± 4,9 (3); AA+BHB: 76,6 ± 2,5 (3). Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto a GLC), # p<0,05 (entre condiciones).

En cuanto al efecto del tratamiento sobre el número de copias de mtDNA totales se observaron comportamientos diferentes entre ambas líneas celulares (figura 3.58). Mientras que Fb PS1 mostró una disminución significativa de los niveles en todas las condiciones, Fb PS2 experimentó una tendencia de aumento en todos los casos, que solo resultó significativa para el tratamiento con BHB (probablemente por la ausencia de triplicado en los otras condiciones). Al analizar los niveles de mtDNA completo (wt-mtDNA) y deletado (Δ -mtDNA) también se observaron diferencias entre ambos fibroblastos. Con el tratamiento con cuerpos cetónicos sobre Fb PS1 se consiguió una reducción significativa del mtDNA deletado y un ligero aumento en los niveles de wt-mtDNA, que fue significativo en el tratamiento combinado con AA y BHB. Sin embargo, no se consiguió una reducción del Δ -mtDNA en Fb PS2, pero si un aumento de los niveles de mtDNA completo, significativo en el tratamiento con BHB. Las diferencias en los fondos genéticos nuclear y mitocondrial podrían influir en estos mecanismos de respuesta al tratamiento. No obstante, e independientemente de la estrategia que sigue cada línea celular, en ambos casos se consigue una reducción de la de la heteroplasmia sin afectar negativamente al número de copias de mtDNA completo.

Resultados

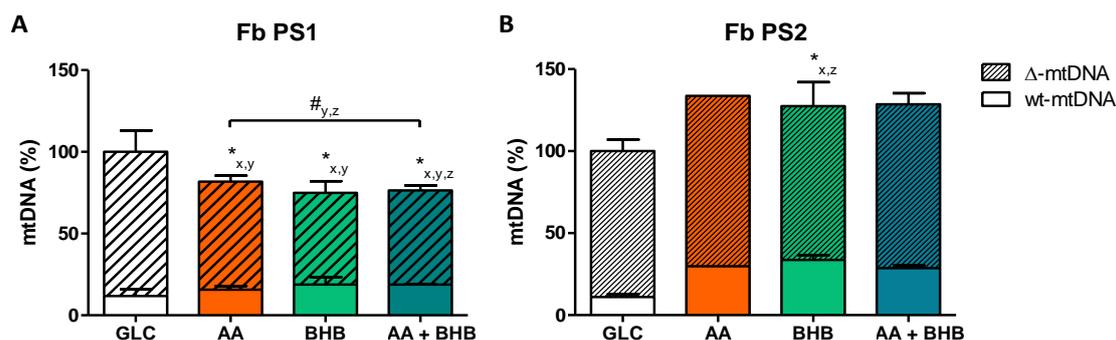


Figura 3.58 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 tras el tratamiento con cuerpos cetónicos: acetoacetato (AA), DL-β-hidroxibutarato (BHB) y la combinación de ambos. GLC, medio glucosa (25 mM), 10 % de SFB y uridina (50 μg/ml). A) Fb PS1. GLC: mtDNA total: 100 ± 10 (3), Δ-mtDNA: 88,1 ± 13 (3), wt-mtDNA: 11,93 ± 4 (3); AA: mtDNA total: 81,8 ± 5,8 (3), Δ-mtDNA: 66,1 ± 3,7 (3), wt-mtDNA: 15,7 ± 2,3 (3); BHB: mtDNA total: 74,9 ± 11,5 (3), Δ-mtDNA: 56,1 ± 7,1 (3), wt-mtDNA: 18,8 ± 4,6 (3); AA+BHB: mtDNA total: 76,4 ± 2,7 (3), Δ-mtDNA: 57,6 ± 3 (3), wt-mtDNA: 18,8 ± 0,3 (3). B) Fb PS2. GLC: mtDNA total: 100 ± 8 (3), Δ-mtDNA: 88,9 ± 7,1 (3), wt-mtDNA: 11,1 ± 1,7 (3); AA: mtDNA total: 133,7 (1), Δ-mtDNA: 103,9 (1), wt-mtDNA: 29,8 (1); BHB: mtDNA total: 127,5 ± 11,9 (3), Δ-mtDNA: 93,7 ± 14,6 (3), wt-mtDNA: 33,7 ± 3 (3); AA+BHB: mtDNA total: 128,6 ± 4,9 (2), Δ-mtDNA: 99,9 ± 6,7 (2), wt-mtDNA: 28,6 ± 1,8. Los valores de las células mantenidas en condiciones GLC se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto a GLC), #p<0,05 (entre condiciones). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ mtDNA) y z (wt mtDNA).

Sin embargo, según estos resultados, no se conseguiría reducir la heteroplasmia por debajo del umbral patológico, establecido en 60-70 % (apartado 3.4), que causaría efectos negativos sobre la función OXPHOS.

Para intentar alcanzar este objetivo, estudiamos si mediante tratamientos sucesivos con cuerpos cetónicos en fibroblastos PS1 y PS2 se conseguía reducir el nivel de heteroplasmia por debajo del umbral patológico. Para ello se seleccionó el β-hidroxibutarato (BHB) al ser la condición en la que se observó mayor caída de porcentaje de deleción en ambas líneas en el primer estudio realizado (figura 3.57). Cada ciclo de tratamiento consistió en 5 días de cultivo de las células en medio sin glucosa con BHB, y 10 días de recuperación en medio de crecimiento normal con glucosa. En paralelo, se mantuvo los fibroblastos en dicho medio normal como control del estudio.

Como se observa en la figura 3.59, ambas líneas experimentaron una caída del nivel de heteroplasmia progresiva tras cada ciclo, siendo significativamente diferentes a la condición control y entre sí. En la línea Fb PS1 se obtuvo una reducción del porcentaje de deleción del 26 %, alcanzándose a tiempo final una heteroplasmia del 70 % muy próxima al umbral patológico (figura 3.59A). En la línea Fb PS2, se observó una reducción del 54 % alcanzando una heteroplasmia final del 17 %, niveles que mostrarían ausencia de efectos patológicos (figura 3.59B).

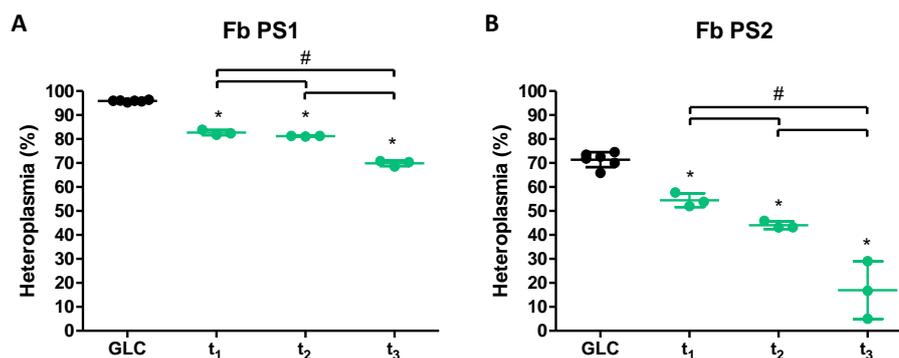


Figura 3.59 Variación del nivel de heteroplasma en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 durante tres tratamientos sucesivos con DL-β-hidroxibutarato (BHB). GLC, medio glucosa (25 mM), 10 % de SFB y uridina (50 μg/ml). A) Fb PS1. GLC: 95,9 ± 0,4 (3); t₁: 82,7 ± 1,1 (3); t₂: 81,2 ± 0,1 (3); t₃: 69,9 ± 1,2 (3). B) Fb PS2. GLC: 71,4 ± 3,1 (3); t₁: 54,4 ± 2,9 (3); t₂: 44,1 ± 1,6 (3); t₃: 17 ± 12 (3). Los valores de las células mantenidas en condiciones GLC se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto a GLC), # p<0,05 (entre condiciones).

En cuanto al número de copias, de nuevo se observaron diferentes comportamientos entre ambas líneas (figura 3.60). Tras el primer tratamiento (t₁) se observó el mismo fenómeno que en el estudio anterior (figura 3.58): en Fb PS1 disminuyeron significativamente los niveles de mtDNA total mientras que en Fb PS2 aumentaron. Con el segundo tratamiento (t₂), los niveles de mtDNA totales se igualaron a la condición control en ambas líneas, y a tiempo final, la cantidad de mtDNA total no se vio afectada en el Fb PS1 pero se redujo significativamente en el Fb PS2. Atendiendo a los niveles de mtDNA completo y deletado, Fb PS1 experimentó un incremento gradual significativo del wt-mtDNA tras cada ciclo, mientras que los niveles de Δ-mtDNA disminuyeron tras el primer tratamiento para aumentar significativamente en el segundo y finalmente, mostrar niveles similares a t₁ e inferiores a la condición control. En el caso de Fb PS2, los niveles de wt-mtDNA se incrementaron significativamente tras el primer ciclo y se mantuvieron constantes en los posteriores, mientras que los niveles de Δ-mtDNA disminuyeron de forma gradual y significativa a partir del segundo tratamiento.

Por tanto, y de nuevo independientemente de las diferentes estrategias de respuesta de cada línea celular, ambos fibroblastos PS experimentaron una reducción significativa de la heteroplasma, incluso alcanzando niveles por debajo del umbral patológico, y un aumento significativo del 20 %, aproximadamente, en las copias de mtDNA completo tras tres ciclos de tratamiento con BHB.

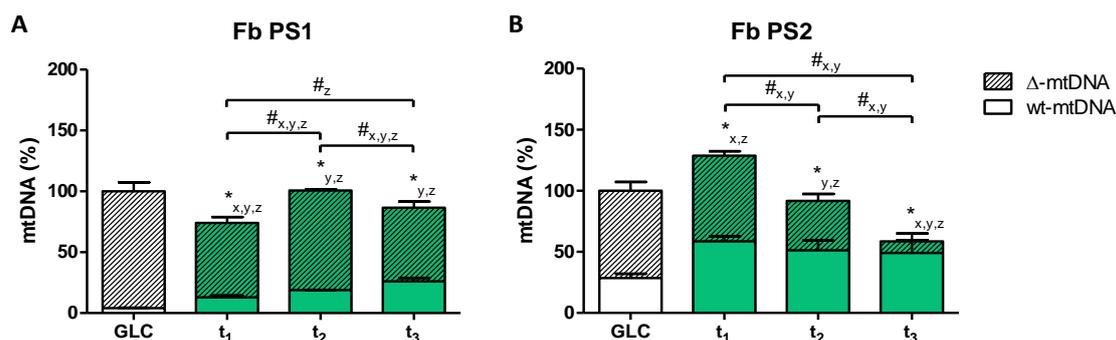


Figura 3.60 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 durante tres tratamientos sucesivos con DL-β-hidroxibutarato (BHB). GLC, medio glucosa (25 mM), 10 % de SFB y uridina (50 μg/ml). A) Fb PS1. GLC: mtDNA total: 100 ± 7,5 (3), Δ-mtDNA: 95,9 ± 13 (3), wt-mtDNA: 4,1 ± 0,3 (3); t1: mtDNA total: 74 ± 6,3 (3), Δ-mtDNA: 61,2 ± 4,9 (3), wt-mtDNA: 12,8 ± 1,6 (3); t2: mtDNA total: 100,8 ± 1,1 (3), Δ-mtDNA: 81,8 ± 1 (3), wt-mtDNA: 18,9 ± 0,2 (3); t3: mtDNA total: 86,5 ± 7,6 (3), Δ-mtDNA: 60,4 ± 5,1 (3), wt-mtDNA: 26,1 ± 2,9 (3). B) Fb PS2. GLC: mtDNA total: 100 ± 8,7 (3), Δ-mtDNA: 71,5 ± 7,2 (3), wt-mtDNA: 28,5 ± 3,6 (3); t1: mtDNA total: 128,7 ± 2,3 (3), Δ-mtDNA: 70,1 ± 3,6 (3), wt-mtDNA: 58,6 ± 4 (3); t2: mtDNA total: 91,7 ± 13,3 (3), Δ-mtDNA: 40,4 ± 5,8 (3), wt-mtDNA: 51,3 ± 7,9 (3); t3: mtDNA total: 58,6 ± 4,3 (3), Δ-mtDNA: 9,6 ± 6,5 (3), wt-mtDNA: 49 ± 10,5 (3). Los valores de las células mantenidas en condiciones GLC se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto a GLC), #p<0,05 (entre condiciones). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ-mtDNA) y z (wt-mtDNA).

3.6.1.2. Tratamiento de cíbridos PS1 y PS2 con cuerpos cetónicos

Con el objetivo de confirmar que el tratamiento podría ser eficiente en otros tipos celulares, se analizó el efecto de dos tratamientos sucesivos con BHB en cíbridos PS1 y PS2.

Como se observa en la figura 3.61, ambas líneas experimentaron una caída significativa del nivel de heteroplasmia con respecto a la condición control, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los dos ciclos de tratamiento, a diferencia de lo que ocurría en el estudio con fibroblastos (figura 3.59). En el CIB PS1, se obtuvo una reducción del 21 % alcanzando una heteroplasmia final del 69 %, mientras que en el CIB PS2 se redujo un 17 % alcanzando una heteroplasmia final del 61 %. En este último, se consiguió una reducción del 27 % tras el primer tratamiento pero se elevó ligeramente en el segundo. Por tanto, al igual que ocurría en el estudio con fibroblastos, ambas líneas de cíbridos alcanzaron niveles de heteroplasmia cercanos, o incluso inferiores, al umbral patológico tras el tratamiento con BHB.

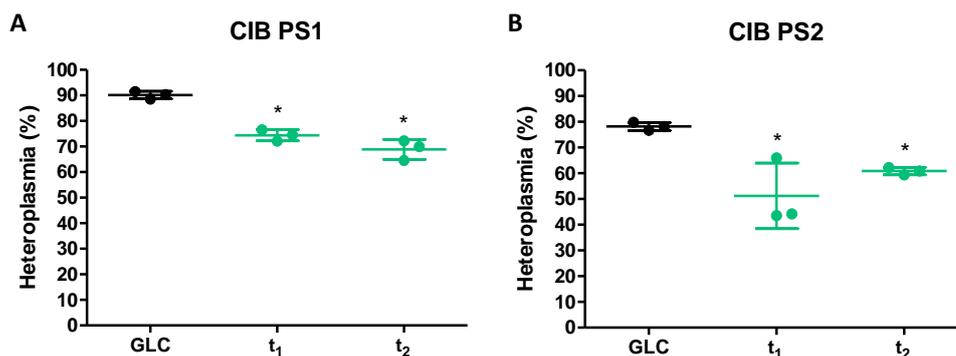


Figura 3.61 Variación del nivel de heteroplasmia en las líneas de cíbridos PS1 y PS2 durante dos tratamientos sucesivos con DL-β-hidroxibutarato (BHB). GLC, medio glucosa (25 mM), 5 % de SFB y uridina (50 μg/ml). A) CIB PS1. GLC: $90,1 \pm 1,5$ (3); t_1 : $74,4 \pm 2,2$ (3); t_2 : $68,9 \pm 3,9$ (3). B) CIB PS2. GLC: $78,2 \pm 1,5$ (3); t_1 : $51,2 \pm 12,7$ (3); t_2 : $60,8 \pm 1,4$ (3). Los valores de las células mantenidas en condiciones GLC se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a GLC).

Al analizar los niveles de mtDNA (figura 3.62), se obtuvieron distintas tendencias entre las líneas de cíbridos que fueron prácticamente similares a las observadas en los fibroblastos: mientras la línea CIB PS1 experimentó un tendencia de reducción del número de copias de mtDNA total, la línea CIB PS2 mostró una tendencia de aumento, aunque no significativa. Si observamos los niveles de mtDNA completo, ambos cíbridos experimentaron un aumento significativo de las moléculas de mtDNA completo, aproximadamente de un 10 % en el CIB PS1 y de un 20-30 % en el CIB PS2, que se mantuvieron constantes tras los dos ciclos de tratamiento. Además, el CIB PS1 presentó una caída significativa y progresiva de la cantidad de mtDNA deletado en ambos ciclos.

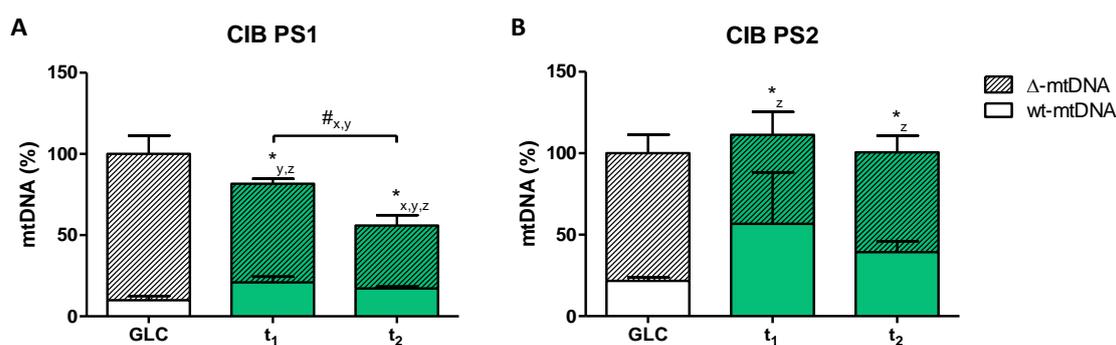


Figura 3.62 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de cíbridos PS1 y PS2 durante dos tratamientos sucesivos con DL-β-hidroxibutarato (BHB). GLC, medio glucosa (25 mM), 5 % de SFB y uridina (50 μg/ml). A) CIB PS1. GLC: mtDNA total: $100 \pm 13,5$ (3), Δ -mtDNA: $90,0 \pm 11,3$ (3), wt-mtDNA: $10 \pm 2,5$ (3); t_1 : mtDNA total: $81,6 \pm 6,4$ (3), Δ -mtDNA: $60,6 \pm 3,1$ (3), wt-mtDNA: $21 \pm 3,4$ (3); t_2 : mtDNA total: $55,9 \pm 6,7$ (3), Δ -mtDNA: $38,6 \pm 6,5$ (3), wt-mtDNA: $17,2 \pm 1,1$ (3). B) CIB PS2. GLC: mtDNA total: $100 \pm 13,2$ (3), Δ -mtDNA: $78,3 \pm 11,5$ (3), wt-mtDNA: $21,7 \pm 2$ (3); t_1 : mtDNA total: $111,3 \pm 42,4$ (3), Δ -mtDNA: $54,6 \pm 14$ (3), wt-mtDNA: $56,7 \pm 31,6$ (3); t_2 : mtDNA total: $100,5 \pm 16,7$ (3), Δ -mtDNA: $61,2 \pm 10,2$ (3), wt-mtDNA: $39,4 \pm 6,6$ (3). Los valores de las células mantenidas en condiciones GLC se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a GLC), # $p < 0,05$ (entre condiciones). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ -mtDNA) y z (wt-mtDNA).

Por tanto, se puede concluir que el tratamiento con cuerpos cetónicos, en concreto con β-hidroxibutarato, resulta eficaz para la reducción del porcentaje de heteroplasmia de delecciones

en el mtDNA *in vitro*, consiguiéndose niveles inferiores al umbral patológico y un aumento de las moléculas de mtDNA completo mediante tratamientos sucesivos alternados con periodos de descanso y recuperación. Sería interesante el análisis del estado de la función OXPHOS en estas líneas tras los tratamientos para confirmar su eficacia.

3.6.2. Tratamiento con ácido fólico

El tratamiento con ácido fólico, y sus diferentes formas como ácido folínico o 5-MTHF, es frecuente en pacientes con enfermedades mitocondriales y se han descrito resultados beneficioso para algunas patologías, como el síndrome de Kearns-Sayre (KSS) (147). Sin embargo, no está descrito de forma específica el efecto de este compuesto sobre el cultivo *in vitro* de células portadoras de deleciones únicas y grandes en el DNA mitocondrial.

Por otra parte, el déficit de folato se ha relacionado con la inestabilidad del DNA y con la posibilidad de aparición de deleciones (150,208). De hecho, se ha mostrado que la ausencia prolongada de folato en la dieta de ratas provoca un incremento en la frecuencia de aparición de la deleción común y un aumento de la biogénesis mitocondrial (149).

La concentración de ácido fólico en sangre de pacientes sin anemia se sitúa entre 20-60 nM, sin embargo en estudios realizados en cultivo *in vitro* se ha observado que en esos niveles se produce un aumento significativo de la roturas en DNA y de la inestabilidad cromosómica, incluso similares a las causadas por radiaciones ionizantes como rayos-X (209). En pacientes tratados con ácido fólico, la concentración en sangre suele situarse en 200 nM.

En esta tesis se ha estudiado el efecto de la ausencia y presencia del ácido fólico (AF) sobre la heteroplasmia, el número de copias de mtDNA y la función OXPHOS en fibroblastos control (FbC 1m) y portadores de las deleciones de los pacientes PS1 y PS2. Con este objetivo, se mantuvieron las líneas durante 15 días en medio RPMI sin ácido fólico suplementado con 10 % de SFB dializado, uridina (50 µg/ml), piruvato (50 g/l) y con ácido fólico a distintas concentraciones, todo ello ajustado a pH de 7,4. Por otro lado, también se ha analizado si el déficit prolongado de ácido fólico (AF) en el cultivo de fibroblastos control, sin patología mitocondrial, induce la aparición de deleciones en el mtDNA. Para ello, se mantuvo la línea durante un mes en medio RPMI sin ácido fólico y suplementados con 10 % de SFB dializado.

3.6.2.1. Efecto del tratamiento con ácido fólico en concentraciones superiores a las fisiológicas

En primer lugar, se estudiaron las diferencias a nivel de heteroplasma, copias de mtDNA y producción de ATP mitocondrial en los fibroblastos control y PS en condiciones de ausencia de ácido fólico y de exceso de éste, seleccionando concentraciones por encima de las fisiológicas (12 μ M y 500 μ M). Como se puede observar en la figura 3.63, si comparamos con la ausencia de ácido fólico, el nivel de heteroplasma de los fibroblastos PS1 fue significativamente menor conforme aumentaba la concentración de AF, aunque se trata de una caída sutil puesto que solo disminuyó un 3 %. En cambio, esto no se cumple en los fibroblastos PS2 ya que incluso se observó un aumento del porcentaje de delección para la concentración más alta de ácido fólico.

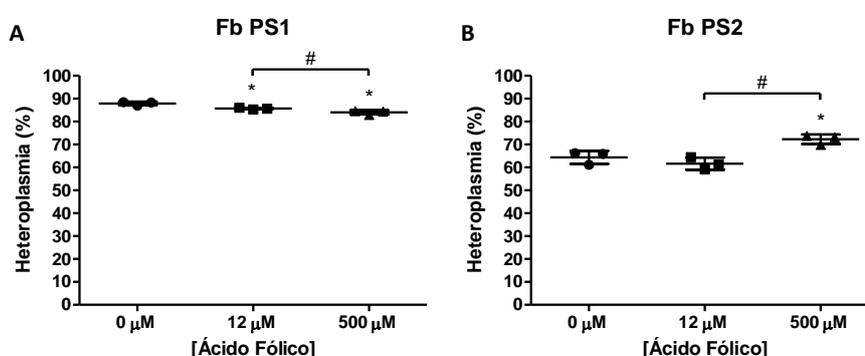


Figura 3.63 Variación del nivel de heteroplasma en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 en diferentes concentraciones de ácido fólico (AF). A) Fb PS1. AF 0 μ M: 87,9 \pm 0,8 (3); AF 12 μ M: 85,7 \pm 0,4 (3); AF 500 μ M: 84 \pm 0,9 (3). B) Fb PS2. AF 0 μ M: 64,4 \pm 2,8 (3); AF 12 μ M: 61,6 \pm 2,7 (3); AF 500 μ M: 72,3 \pm 2,1 (3). Mann-Whitney test: * p <0,05 (respecto al 0 μ M), # p <0,05 (entre condiciones).

En cuanto al número de copias (figura 3.64), no se obtuvieron variaciones, a excepción de una disminución significativa de la cantidad de wt-mtDNA en el fibroblasto PS2 cuando la concentración de ácido fólico era de 500 μ M. Este fenómeno, junto con lo observado en la figura 3.63, podría indicar que el AF en exceso provoca un efecto oxidante sobre la línea PS2, contrario al deseado.

Resultados

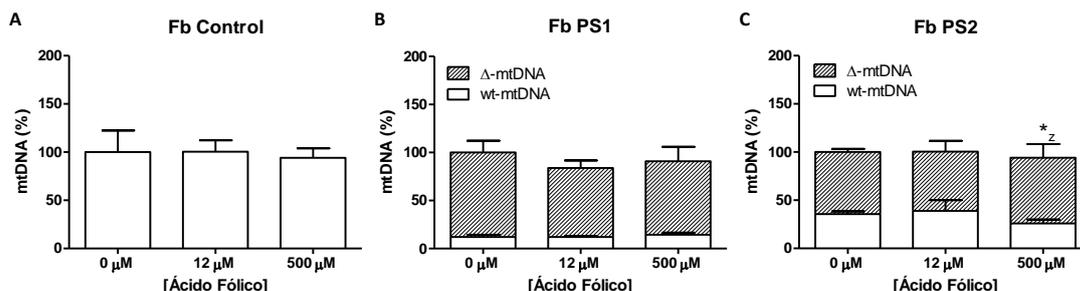


Figura 3.64 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos control, PS1 y PS2 en diferentes concentraciones de ácido fólico (AF). A) Fb Control. AF 0 μM: 100 ± 22,4 (3); AF 12 μM: 100,4 ± 11,8 (3); AF 500 μM: 94,1 ± 9,8 (3). B) Fb PS1. AF 0 μM: mtDNA total: 100 ± 14,4 (3), Δ-mtDNA: 87,9 ± 12,3 (3), wt-mtDNA: 12,1 ± 2,3 (3). AF 12 μM: mtDNA total: 83,9 ± 9,1 (3), Δ-mtDNA: 71,9 ± 7,8 (3), wt-mtDNA: 12 ± 1,3 (3). AF 500 μM: mtDNA total: 90,9 ± 17,1 (3), Δ-mtDNA: 76,4 ± 15 (3), wt-mtDNA: 14,1 ± 2,1 (3). C) Fb PS2. AF 0 μM: mtDNA total: 100 ± 1,8 (3), Δ-mtDNA: 64,4 ± 3,3 (3), wt-mtDNA: 35,6 ± 2,8 (3). AF 12 μM: mtDNA total: 100,5 ± 22,2 (3), Δ-mtDNA: 61,6 ± 11,1 (3), wt-mtDNA: 38,9 ± 11,2 (3). AF 500 μM: mtDNA total: 94,2 ± 17,9 (3), Δ-mtDNA: 68,2 ± 14,1 (3), wt-mtDNA: 25,9 ± 4,1 (3). Los valores de las células mantenidas en 0 μM se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto al 0 μM), # p<0,05 (entre condiciones). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ mtDNA) y z (wt mtDNA).

En cuanto a la función OXPHOS, y a pesar de que el ácido fólico no provocaba variaciones importantes sobre las heteroplasmia o el número de copias de mtDNA, observamos que el ATP mitocondrial producido aumentaba significativamente tras el tratamiento tanto en la línea celular control no patológica como en los fibroblastos PS1 y PS2, a excepción del segundo con ácido fólico a 500 μM, lo que apoyaría la teoría de un efecto tóxico del AF en exceso sobre esta línea (figura 3.65). Por tanto, en base a estos resultados podríamos concluir que el tratamiento con ácido fólico consigue mejorar la función mitocondrial tanto en células PS como en células sin defecto en la función OXPHOS.

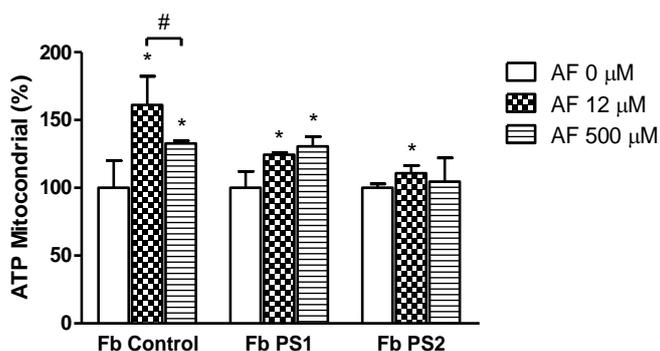


Figura 3.65 Variación de los niveles de ATP mitocondrial en las líneas de fibroblastos control, PS1 y PS2 en diferentes concentraciones de ácido fólico (AF). Fb Control. AF 0 μM: 100 ± 20,1 (3); AF 12 μM: 161,2 ± 21 (3); AF 500 μM: 132,8 ± 2,1 (3). Fb PS1. AF 0 μM: 100 ± 12 (3); AF 12 μM: 124,5 ± 1,4 (3); AF 500 μM: 130,6 ± 7,1 (3). Fb PS2. AF 0 μM: 100 ± 2,9 (3); AF 12 μM: 110,7 ± 5,7 (3); AF 500 μM: 104,6 ± 17,5 (3). Los valores de las células mantenidas en 0 μM se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto al 0 μM), # p<0,05 (entre condiciones).

3.6.2.2. Efecto del suplemento de ácido ascórbico al tratamiento con ácido fólico en concentraciones superiores a las fisiológicas

Al analizar si el tratamiento combinado de ácido fólico con otro antioxidante como el ácido ascórbico (AA) potenciaba su efecto sobre los parámetros estudiados, observamos que a una concentración de 100 μM , el ácido ascórbico redujo el porcentaje de heteroplasmia frente a la ausencia de ácido fólico en ambas líneas (figura 3.66). Además, en la línea Fb PS1 se observó una mayor caída de delección cuando se combinaba el ácido fólico a 12 μM con ácido ascórbico (figura 3.66A), así como en la línea Fb PS2 cuando la concentración de ácido fólico era de 500 μM (figura 3.66B). En este último caso, el ácido ascórbico podría contrarrestar el posible efecto tóxico del exceso de ácido fólico sobre las células PS2.

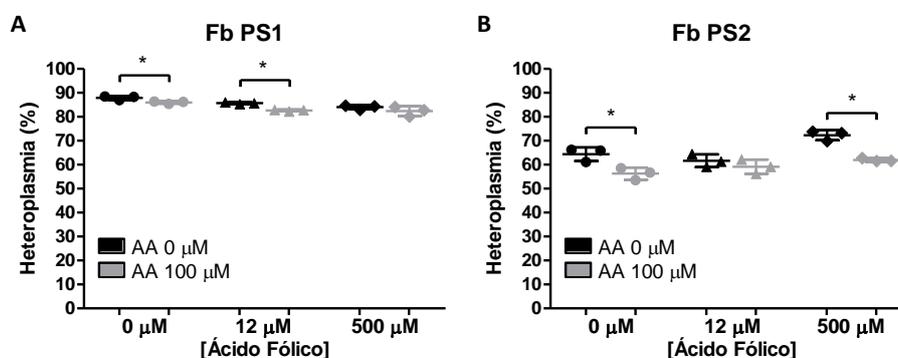


Figura 3.66 Variación del nivel de heteroplasmia en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 en diferentes concentraciones de ácido fólico (AF) en ausencia y presencia de ácido ascórbico (AA). A) Fb PS1. AF 0 μM : 87,9 \pm 0,8 (3), + AA: 86 \pm 0,5 (3); AF 12 μM : 85,7 \pm 0,4 (3), + AA: 82,6 \pm 0,4 (3); AF 500 μM : 84 \pm 0,9 (3), + AA: 82,3 \pm 2 (3). B) Fb PS2. AF 0 μM : 64,4 \pm 2,8 (3), + AA: 56,3 \pm 2,5 (3); AF 12 μM : 61,6 \pm 2,7 (3), + AA: 59,2 \pm 2,9 (3); AF 500 μM : 72,3 \pm 2,1 (3), + AA: 62 \pm 0,7 (3). Los valores de las células mantenidas en 0 μM se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a la ausencia de AA).

Además, la adición de ácido ascórbico indujo un aumento significativo en los niveles de mtDNA en la línea control cuando lo comparábamos frente a la ausencia de ácido fólico o cuando la concentración de éste era de 500 μM (figura 3.67A). Sin embargo, esta tendencia no se observó en la línea Fb PS1 portadora de la delección común (figura 3.67B), y los resultados de la línea Fb PS2 no mostraron una tendencia evidente, ya que la adición de AA aumentaba la proporción de wt-mtDNA o disminuía la cantidad de Δ -mtDNA según la condición (figura 3.67C).

Resultados

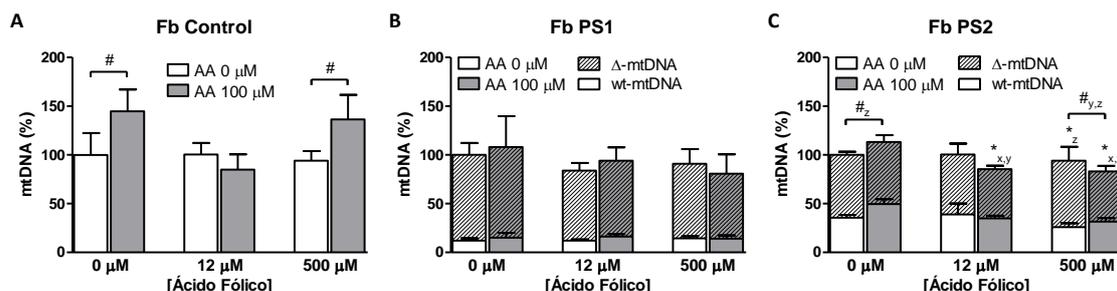


Figura 3.67 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos control, PS1 y PS2 en diferentes concentraciones de ácido fólico (AF) en presencia y ausencia de ácido ascórbico (AA). A) Fb C. AF 0 μM: 100 ± 22,4 (3), + AA: 144,8 ± 22,3 (3), AF 12 μM: 100,4 ± 11,8 (3), + AA: 84,9 ± 15,6 (3); AF 500 μM: 94,1 ± 9,8 (3), + AA: 136,4 ± 25,3 (3). B) Fb PS1. AF 0 μM: mtDNA total: 100 ± 14,4 (3), Δ-mtDNA: 87,9 ± 12,3 (3), wt-mtDNA: 12,1 ± 2,3 (3); + AA: mtDNA total: 108,1 ± 36,6 (3), Δ-mtDNA: 93 ± 31,6 (3), wt-mtDNA: 15,1 ± 5 (3). AF 12 μM: mtDNA total: 83,9 ± 9,1 (3), Δ-mtDNA: 71,9 ± 7,8 (3), wt-mtDNA: 12 ± 1,3 (3); + AA: mtDNA total: 94 ± 16,2 (3), Δ-mtDNA: 77,7 ± 13,7 (3), wt-mtDNA: 16,3 ± 2,5 (3). AF 500 μM: mtDNA total: 90,9 ± 17,1 (3), Δ-mtDNA: 76,4 ± 15 (3), wt-mtDNA: 14,1 ± 2,1 (3); + AA: mtDNA total: 80,8 ± 22,7 (3), Δ-mtDNA: 66,7 ± 19,8 (3), wt-mtDNA: 14,1 ± 3,3 (3). C) Fb PS2. AF 0 μM: mtDNA total: 100 ± 1,8 (3), Δ-mtDNA: 64,4 ± 3,3 (3), wt-mtDNA: 35,6 ± 2,8 (3); + AA: mtDNA total: 113,3 ± 10,4 (3), Δ-mtDNA: 63,7 ± 7 (3), wt-mtDNA: 49,5 ± 5,1 (3). AF 12 μM: mtDNA total: 100,5 ± 22,2 (3), Δ-mtDNA: 61,6 ± 11,1 (3), wt-mtDNA: 38,9 ± 11,2 (3); + AA: mtDNA total: 85,3 ± 3,5 (3), Δ-mtDNA: 50,5 ± 3,5 (3), wt-mtDNA: 34,8 ± 2,8 (3). AF 500 μM: mtDNA total: 94,2 ± 17,9 (3), Δ-mtDNA: 68,2 ± 14,1 (3), wt-mtDNA: 25,9 ± 4,1 (3); + AA: mtDNA total: 83 ± 9,3 (3), Δ-mtDNA: 51,4 ± 5,8 (3), wt-mtDNA: 31,6 ± 3,6 (3). Los valores de las células mantenidas en 0 μM de ácido fólico y ácido ascórbico se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto al 0 μM de AF y AA), # p<0,05 (respecto a la ausencia de AA). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ mtDNA) y z (wt mtDNA).

Atendiendo a la figura 3.68, la adición de ácido ascórbico no provocó un efecto homogéneo sobre la producción de ATP mitocondrial. En algunos casos, como en la línea control y la línea Fb PS1 cuando la concentración de ácido fólico era de 500 μM o en la línea Fb PS2 cuando la concentración de ácido fólico era de 12 μM, la adición de AA a 100 μM provocó un aumento significativo de la producción de ATP. Sin embargo, en ausencia de AF, la adición de ácido ascórbico disminuyó significativamente la producción de ATP mitocondrial en la línea de fibroblastos control.

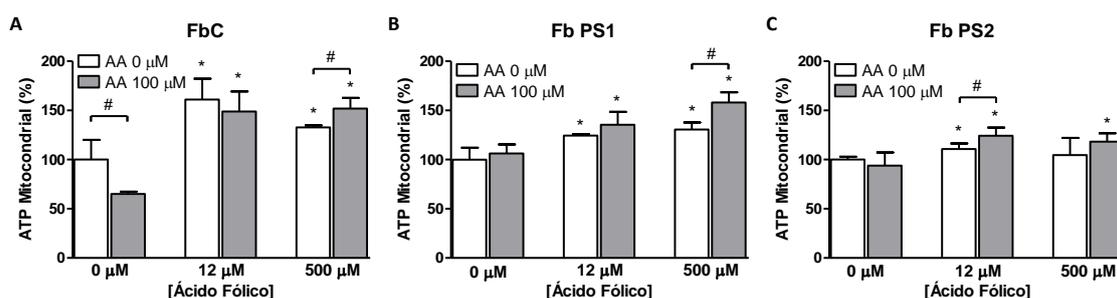


Figura 3.68 Variación de los niveles de ATP mitocondrial en las líneas de fibroblastos control, PS1 y PS2 en diferentes concentraciones de ácido fólico (AF) en presencia y ausencia de ácido ascórbico (AA). A) Fb Control. AF 0 μM: 100 ± 20,1 (3), + AA: 65,1 ± 2,4 (3); AF 12 μM: 161,2 ± 21 (3), + AA: 149 ± 20,3 (3); AF 500 μM: 132,8 ± 2,1 (3), + AA: 151,9 ± 10,6 (3). B) Fb PS1. AF 0 μM: 100 ± 12 (3), + AA: 106,2 ± 9,3 (3); AF 12 μM: 124,5 ± 1,4 (3), + AA: 135,4 ± 13,3 (3); AF 500 μM: 130,6 ± 7,1 (3), + AA: 158,1 ± 10,3 (3). C) Fb PS2. AF 0 μM: 100 ± 2,9 (3), + AA: 93,9 ± 13,5 (3); AF 12 μM: 110,7 ± 5,7 (3), + AA: 124,2 ± 8,4 (3); AF 500 μM: 104,6 ± 17,5 (3), + AA: 118,3 ± 8,5 (3). Los valores de las células mantenidas en 0 μM de ácido fólico y ácido ascórbico se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto al 0 μM de AF y AA), # p<0,05 (respecto a la ausencia de AA).

Por tanto, el tratamiento combinado de ácido fólico con ácido ascórbico podría potenciar la mejora en la función mitocondrial observada en los fibroblastos portadores de delección. Además, podría contrarrestar el supuesto efecto oxidante provocado por el exceso ácido fólico en la línea control (figura 3.68A). No obstante, la caída de ATP observada en esta línea cuando se trata con ácido ascórbico de forma aislada podría indicar cierta toxicidad de este compuesto en ausencia de otro antioxidante como el ácido fólico. Sería interesante continuar con el estudio de los beneficios y la posible toxicidad del ácido ascórbico en otras líneas celulares control.

3.6.2.3. Efecto del tratamiento con ácido fólico en concentraciones fisiológicas

Tras haber observado que el tratamiento con exceso de ácido fólico en las líneas de fibroblastos portadoras de delección en el mtDNA y en la línea control provocaba una disminución, aunque discreta, del nivel de heteroplasma y una mejora de la función OXPHOS manifestada en un aumento de la producción de ATP mitocondrial, analizamos si este efecto se podía obtener con concentraciones de ácido fólico observadas en sangre en pacientes tratados con este compuesto, y por tanto, consideradas como fisiológicas (50 nM y 200 nM).

Como se observa en la figura 3.69, la heteroplasma se redujo de forma significativa en la línea PS1 cuando la concentración de ácido fólico era de 50 nM, pero no observamos variación en la línea tratada con 200 nM. En el caso de los fibroblastos PS2, no se observó ninguna alteración, debido probablemente a que el nivel de heteroplasma inicial en este ensayo se situaba cerca del umbral patológico.

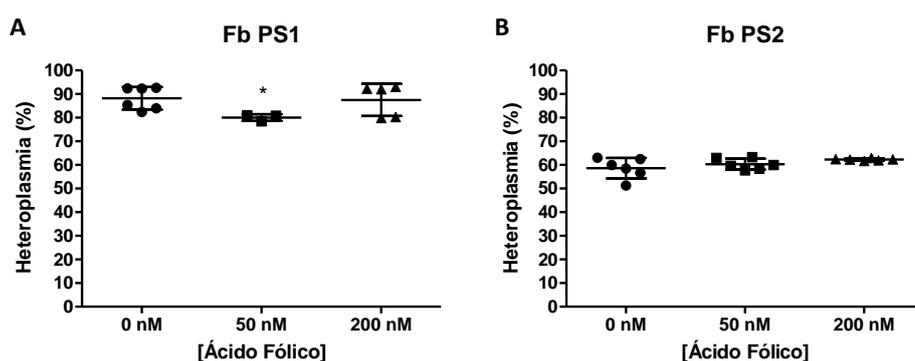


Figura 3.69 Variación del nivel de heteroplasma en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 en diferentes concentraciones fisiológicas de ácido fólico (AF). A) Fb PS1. AF 0 μ M: $88,2 \pm 4,8$ (6); AF 50 nM: $80,1 \pm 1,4$ (3); AF 200 nM: $87,5 \pm 6,8$ (5). B) Fb PS2. AF 0 μ M: $58,6 \pm 4,3$ (6); AF 50 nM: $60,3 \pm 2,3$ (6); AF 200 nM: $62,3 \pm 0,4$ (6). Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto al 0 μ M), # $p < 0,05$ (entre condiciones).

Al analizar el número de copias de mtDNA observamos una reducción significativa en la línea control tratada con 50 nM de ácido fólico (figura 3.70A) y en la línea Fb PS2 con ambas concentraciones fisiológicas de AF (figura 3.70C), a diferencia de lo observado en el tratamiento

Resultados

con concentraciones superiores de ácido fólico (figura 3.64C). En cambio, los fibroblastos PS1 de nuevo no mostraron ninguna variación (figura 3.70B). Además, la proporción de mtDNA completo en los fibroblastos PS2 se redujo de forma significativa en todas las condiciones junto con el mtDNA total (figura 3.70C), lo que probablemente impidió observar una caída de la heteroplasmia (figura 3.69).

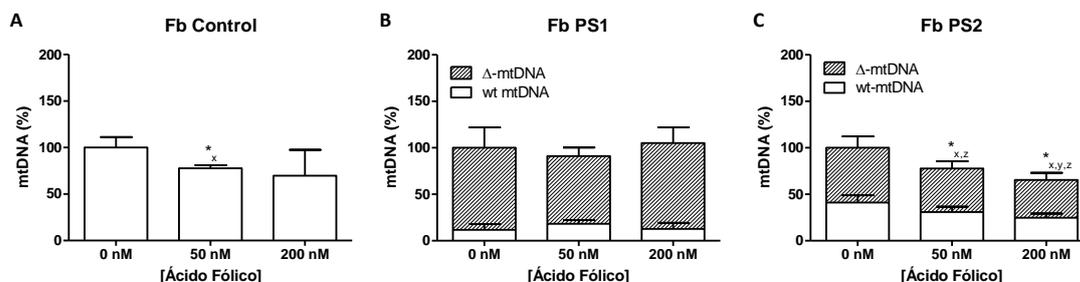


Figura 3.70 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos control, PS1 y PS2 en diferentes concentraciones fisiológicas de ácido fólico (AF). A) Fb Control. AF 0 μ M: $100 \pm 11,3$ (3), AF 50 nM: $77,8 \pm 3,3$ (3); AF 200 nM: $69,7 \pm 27,8$ (3) (3). B) Fb PS1. AF 0 μ M: mtDNA total: $100 \pm 25,4$ (6), Δ -mtDNA: $88,2 \pm 21,9$ (6), wt-mtDNA: $11,8 \pm 6,2$ (6). AF 50 nM mtDNA total: $81 \pm 13,2$ (3), Δ -mtDNA: $72,8 \pm 9,2$ (3), wt-mtDNA: $18,3 \pm 4$ (3). AF 200 nM: mtDNA total: $105 \pm 14,2$ (5), Δ -mtDNA: $92,2 \pm 16,9$ (5), wt-mtDNA: $12,8 \pm 6,4$ (5). C) Fb PS2. AF 0 μ M: mtDNA total: $100 \pm 18,4$ (6), Δ -mtDNA: $58,8 \pm 12,2$ (6), wt-mtDNA: $41,2 \pm 7,8$ (6). AF 50 nM mtDNA total: $77,8 \pm 13,2$ (6), Δ -mtDNA: $46,8 \pm 7,9$ (6), wt-mtDNA: $30,9 \pm 5,7$ (6). AF 200 nM: mtDNA total: $64,4 \pm 11,2$ (6), Δ -mtDNA: $40,1 \pm 7$ (6), wt-mtDNA: $24,3 \pm 4,2$ (6). Los valores de las células mantenidas en 0 μ M de ácido fólico se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto al 0 μ M), # $p < 0,05$ (entre condiciones). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ mtDNA) y z (wt mtDNA).

Cuando analizamos la función OXPHOS en los fibroblastos control y PS tras el tratamiento con concentraciones fisiológicas de ácido fólico observamos una tendencia de aumento en todos los casos, que resultó significativa en todas las condiciones de los fibroblastos control y en la línea PS2 con AF a 50 mM (figura 3.71).

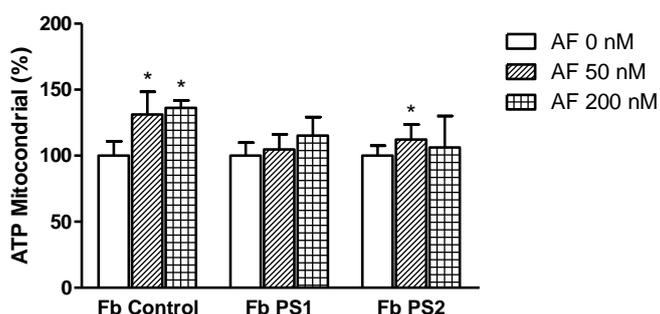


Figura 3.71 Variación de los niveles de ATP mitocondrial en las líneas de fibroblastos control, PS1 y PS2 en diferentes concentraciones fisiológicas de ácido fólico (AF). Fb Control. AF 0 μ M: 100 ± 11 (3); AF 50 nM: $131,3 \pm 17,2$ (3); AF 200 nM: $136,3 \pm 5,7$ (3). Fb PS1. AF 0 μ M: $100 \pm 9,9$ (3); AF 50 nM: $104,8 \pm 11,5$ (3); AF 200 nM: $115,2 \pm 13,9$ (5). Fb PS2. AF 0 μ M: $100 \pm 7,5$ (6); AF 50 nM: $112,3 \pm 11,3$ (6); AF 200 nM: $106,2 \pm 23,9$ (6). Los valores de las células mantenidas en 0 μ M se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto al 0 μ M).

A fin de conocer a que nivel al que actúa el ácido fólico sobre la función mitocondrial para provocar su mejora, analizamos si se producía un incremento de la tasa de transcripción

mitocondrial. Para ello, cuantificamos los niveles de transcritos de algunos genes mitocondriales en todas las líneas tratadas con 200 nM de ácido fólico (figura 3.72). Se eligió esta condición al tratarse de la concentración habitual en sangre en pacientes con este tratamiento. Curiosamente, los resultados obtenidos indicaron una reducción significativa de la expresión de todos los genes en la línea control, y de algunos de ellos en los fibroblastos PS2. En cambio, no se observaron variaciones en las células PS1. En base a esto, podríamos concluir que esta ruta no es la responsable de la mejora en la función OXPHOS provocada por ácido fólico.

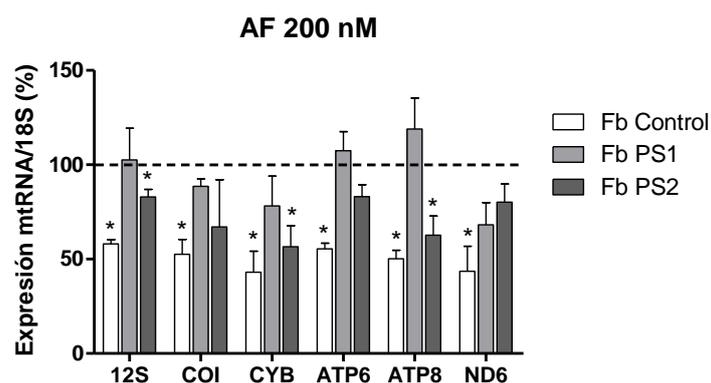


Figura 3.72 Variación de los niveles de mtRNA en las líneas de fibroblastos control, PS1 y PS2 tras el tratamiento con ácido fólico (AF) a una concentración de 200 nM. Fb Control. 12S. 0 nM: $100 \pm 18,6$ (3); 200 nM: $58,1 \pm 2,2$ (3). COI. 0 nM: $100 \pm 25,5$ (3); 200 nM: $52,6 \pm 7,8$ (3). CYB. 0 nM: $100 \pm 25,8$ (3); 200 nM: $43,1 \pm 11$ (3). ATP6. 0 nM: $100 \pm 6,5$ (3); 200 nM: $55,5 \pm 2,9$ (3). ATP8. 0 nM: $100 \pm 11,3$ (3); 200 nM: $50,2 \pm 4,5$ (3). ND6. 0 nM: $100 \pm 37,6$ (3); 200 nM: $43,6 \pm 13,2$ (3). Fb PS1. 12S. 0 nM: $100 \pm 2,6$ (3); 200 nM: $102,6 \pm 16,7$ (2). COI. 0 nM: $100 \pm 30,9$ (3); 200 nM: $88,6 \pm 3,8$ (2). CYB. 0 nM: $100 \pm 8,1$ (3); 200 nM: $78,2 \pm 15,7$ (2). ATP6. 0 nM: 100 ± 8 (3); 200 nM: $107,4 \pm 10,1$ (2). ATP8. 0 nM: $100 \pm 19,3$ (3); 200 nM: $119 \pm 16,4$ (2). ND6. 0 nM: $100 \pm 27,1$ (3); 200 nM: $68,1 \pm 11,8$ (2). Fb PS2. 12S. 0 nM: $100 \pm 9,4$ (3); 200 nM: $82,9 \pm 4$ (3). COI. 0 nM: $100 \pm 35,9$ (3); 200 nM: $67,1 \pm 25$ (3). CYB. 0 nM: $100 \pm 11,2$ (3); 200 nM: $56,6 \pm 11,1$ (3). ATP6. 0 nM: $100 \pm 8,8$ (3); 200 nM: $83,1 \pm 6,3$ (3). ATP8. 0 nM: $100 \pm 10,3$ (3); 200 nM: $62,6 \pm 10,2$ (3). ND6. 0 nM: $100 \pm 24,5$ (3); 200 nM: $80,2 \pm 9,5$ (3). Los valores de las células mantenidas en 0 nM se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto al 0 nM de cada línea).

Por otro lado, quisimos valorar si este aumento de ATP mitocondrial pudiera deberse a una mejora específica de la función de la ATP sintasa o complejo V mitocondrial. Mediante la técnica BlueNative-PAGE, analizamos si la adición de ácido fólico a 200 nM provocaba un aumento de su actividad, así como una reducción de los subcomplejos generados en las líneas portadoras de delección. Sin embargo, no se observaron variaciones en la actividad de este complejo frente a la ausencia de ácido fólico, ni en la proporción de subcomplejos en ninguna de las líneas analizadas (figura 3.73).

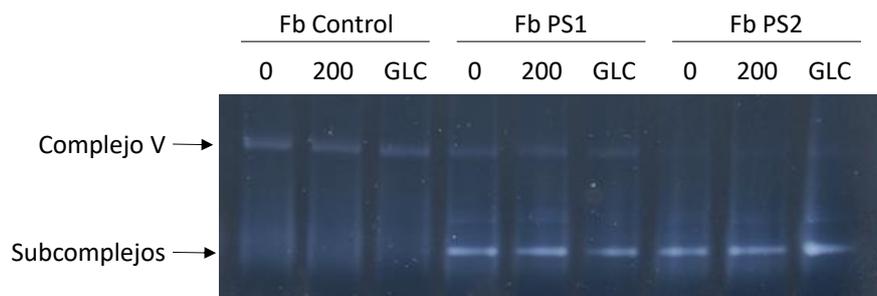


Figura 3.73 Actividad del complejo V del sistema OXPHOS por BlueNative-PAGE en fibroblastos control, PS1 y PS2 en ausencia de ácido fólico, tratados con ácido fólico a 200 nM y en medio de crecimiento normal DMEM con glucosa 25 mM (GLC).

3.6.2.4. Efecto del ácido fólico sobre la diferenciación neuronal

Como se ha descrito previamente, el cultivo de fibroblastos control y PS1 con concentraciones de ácido fólico superiores a las fisiológicas, inducía un aumento significativo de los niveles de ATP mitocondrial y una ligera reducción del porcentaje de heteroplasma en la línea PS1 (apartado 3.6.2.1). La dificultad de las células madre pluripotentes inducidas de la línea PS1 para diferenciarse correctamente a neurona, podría estar causada por el déficit de la función OXPHOS provocado por la presencia de la deleción común en alto porcentaje. En este caso, la adición de ácido fólico durante la diferenciación podría provocar un aumento de los niveles de ATP mitocondrial, y finalmente, mejorar la diferenciación. A fin de esclarecer esta hipótesis, se estudió la diferenciación neuronal de las células iPS control y PS1 en condiciones normales y en presencia de ácido fólico a 12 μ M, concentración en la que se observó un aumento significativo de los niveles de ATP mitocondrial en fibroblastos (apartado 3.6.2.1).

Al analizar los niveles de heteroplasma de la línea PS1 durante la diferenciación, no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones (figura 3.74). Si bien, a diferencia de lo observado anteriormente (figura 3.52), se detectó un descenso significativo de aproximadamente el 5 %, entre las iNSCs y las neuronas para cada condición. No obstante, el nivel de heteroplasma se mantuvo por encima del umbral patológico en todos los casos, por lo que se pueden considerar modelos adecuados para el estudio del fenotipo causado por una deleción en el mtDNA.

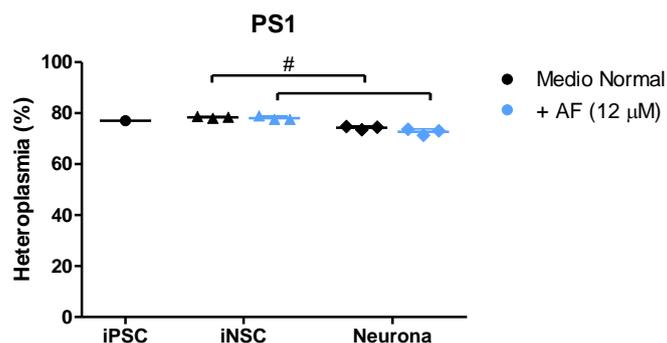


Figura 3.74 Heteroplasma de línea portadora de la delección común (PS1) durante la diferenciación neural en medio normal y en presencia de ácido fólico (AF) a 12 μ M. Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células madre neurales inducidas (iNSCs). iPSCs: 77 (1); iNSCs (medio normal): 78,4 \pm 0,3 (3); iNSC (+ AF): 78,1 \pm 0,7 (3); neurona (medio normal): 74,3 \pm 0,6 (3); neurona (+AF): 72,7 \pm 1,2 (3). Mann-Whitney test: # p <0,05 (respecto a iNSC).

A nivel morfológico, no se observaron cambios importantes entre las iNSCs y las neuronas de ambas líneas diferenciadas en medio normal o en presencia de ácido fólico en exceso, siendo de nuevo evidente la incapacidad de las células portadoras de delección de diferenciarse adecuadamente (figura 3.75).

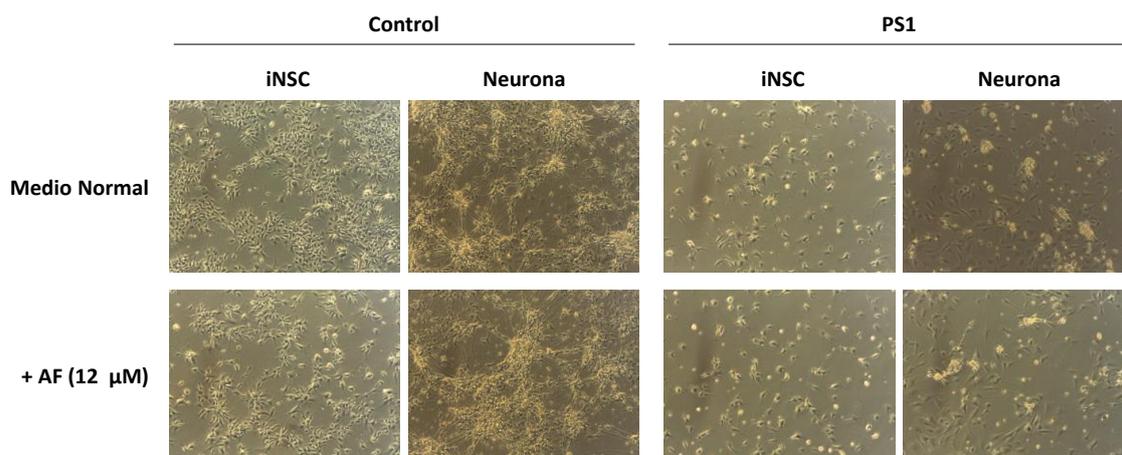


Figura 3.75 Imágenes representativas de las células madre neurales inducidas (iNSCs) y las neuronas generadas tras la diferenciación de las células iPS control y PS1, en medio normal y en presencia de ácido fólico a 12 μ M. Imágenes de microscopía óptica, 100X.

De igual modo, las imágenes de inmunofluorescencia de la proteína β III-tubulina en neuronas de ambas líneas no evidenciaron cambios morfológicos relevantes entre las condiciones de diferenciación (figura 3.76).

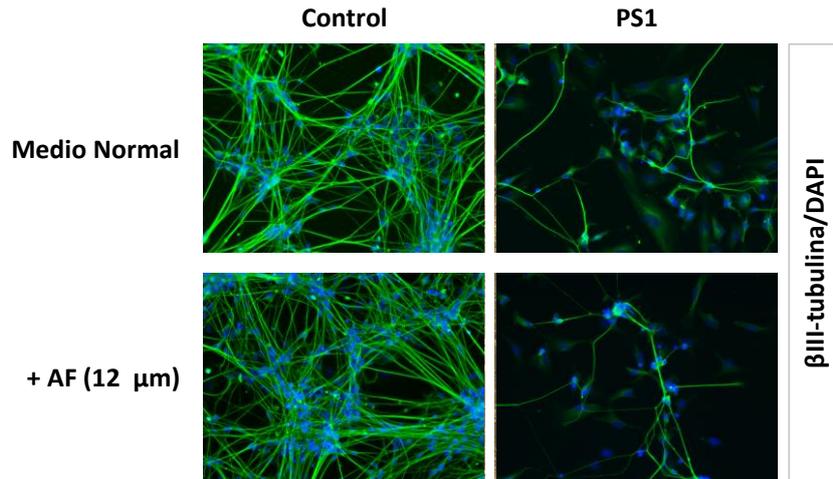


Figura 3.76 Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de β III-tubulina en neuronas de las líneas control y PS1, en medio normal y en presencia de ácido fólico a 12 μ M. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la β III-tubulina (en verde) y los núcleos celulares marcados con DAPI (en azul). Aumento 200X.

Para valorar de forma cuantitativa si realmente mejoraba la capacidad de diferenciación de las células iPS en presencia de ácido fólico en exceso, se compararon los niveles de mRNA de los distintos marcadores de diferenciación neuronal. Como se observa en la figura 3.77, la expresión de Nestina aumentó significativamente en las iNSCs frente a las iPSCs sin diferenciar en ambas líneas celulares, lo que indicaría la correcta diferenciación de éstas. Sin embargo, no se detectaron variaciones entre las condiciones de diferenciación.

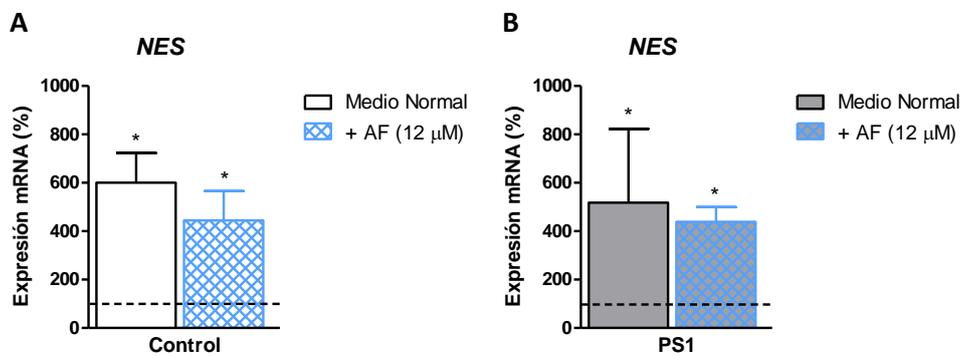


Figura 3.77 Niveles de mRNA del gen codificante de la Nestina (*NES*) en las células madre neurales inducidas (iNSC) tras la diferenciación de las líneas de iPSC control y portadora de la delección común (PS1) en exceso de ácido fólico (AF) a 12 μ M. A) Control. iPSCs: 100 \pm 15,9 (3). iNSC: Medio Normal: 600,2 \pm 122,7 (3); + AF: 444,8 \pm 121 (3). B) PS1. iPSCs: 100 \pm 14,8 (3). iNSC: Medio Normal: 518,2 \pm 304,8 (3); + AF: 438,6 \pm 60,7 (3). La línea discontinua representa a los valores de las iPSCs de ambas líneas en medio de crecimiento normal, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * p <0,05 (respecto a iPSC).

A tiempo final, todas las neuronas diferenciadas mostraron niveles de mRNA de *TUBB3* y *MAP2* significativamente superiores a los de las células iPS (figura 3.78). En la línea control, no se obtuvieron diferencias entre las condiciones de diferenciación para ninguno de los marcadores analizados (figura 3.78A y B). Sin embargo, las neuronas PS1 diferenciadas en presencia de ácido fólico a una concentración de 12 μ M, mostraron un incremento significativo de la expresión de

TUBB3 con respecto a la condición normal, lo que podría evidenciar un posible efecto positivo de este compuesto sobre la capacidad de diferenciación de esta línea portadora de delección (figura 3.78C). No obstante, esto no sucedió con el marcador *MAP2* (figura 3.78D), por lo que sería necesario la realización de más estudios para confirmar este efecto.

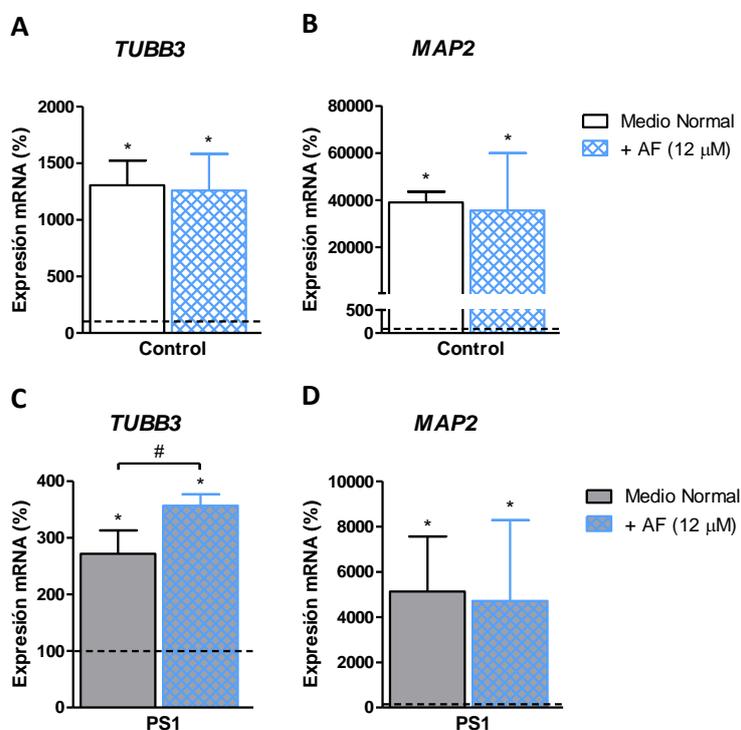


Figura 3.78 Niveles de mRNA de *TUBB3* y *MAP2* en las neuronas tras la diferenciación de las líneas de iPSC control y portadora de la delección común (PS1) en medio normal y en exceso de ácido fólico (AF) a 12 μ M. A) Control. *TUBB3*. iPSCs: $100 \pm 40,1$ (3); Neurona (Medio Normal): $1305,3 \pm 218,7$ (3); Neurona (+ AF): $1258,4 \pm 324$ (3). B) Control. *MAP2*. iPSCs: $100 \pm 30,3$ (3); Neurona (Medio Normal): $39046,5 \pm 4526,8$ (3); Neurona (+ AF): $35656,8 \pm 24291,6$ (3). C) PS1. *TUBB3*. iPSCs: $100 \pm 9,2$ (3); Neurona (Medio Normal): $271,7 \pm 41,4$ (3); Neurona (+ AF): $356,9 \pm 20,1$ (3). D) PS1. *MAP2*. iPSCs: $100 \pm 9,8$ (3); Neurona (Medio Normal): $5133,2 \pm 2432$ (3); Neurona (+ AF): $4711,9 \pm 3570,4$ (3). La línea discontinua representa a los valores de las iPSCs de ambas líneas en medio de crecimiento normal, que se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a iPSC), # $p < 0,05$ (entre medio normal y con exceso de AF).

3.6.2.5. Estudio de la aparición de delecciones en el mtDNA por ausencia prolongada de ácido fólico

Paralelamente a los estudios realizados sobre el tratamiento de células PS con ácido fólico a distintas concentraciones, analizamos si la ausencia prolongada de este compuesto en el cultivo de fibroblastos control de 1 mes (FbC 1m) provocaba la aparición de delecciones en el mtDNA. Tras un mes, se analizó el mtDNA de la línea mediante Southern blot y por triplicado, y no se observó aparición de delecciones de ningún tipo (figura 3.79). Por tanto, el déficit de ácido fólico podría no ser el único factor necesario para inducir la generación de delecciones en células sanas.

Resultados

La realización de este estudio en diferentes líneas control no patológicas podría revelar si otros factores, como el fondo genético, influirían en este fenómeno.

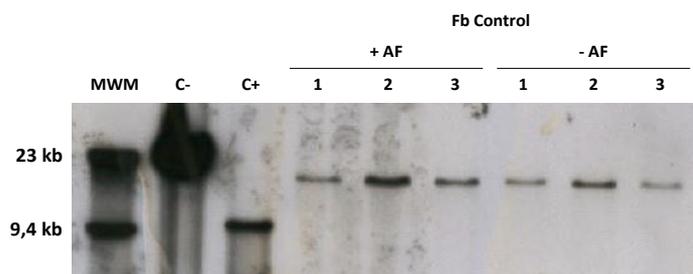


Figura 3.79 Análisis mediante Southern blot de deleciones en el mtDNA tras el mantenimiento prolongado (1 mes) de fibroblastos control en presencia (+AF) y ausencia (-AF) de ácido fólico, por triplicado (1,2 y 3). MWM, marcador de pesos moleculares. C-, fibroblastos control antes del estudio. C+, fibroblastos portadores de deleción en el mtDNA.

3.6.3. Tratamiento con desoxirribonucleósidos

En los últimos años se ha demostrado que el tratamiento con desoxinucleósidos (dNs) podría resultar beneficioso para determinadas patologías mitocondriales, como las causadas por mutaciones en el gen *TK2*, codificante de la enzima timidina quinasa encargada de la fosforilación de la desoxitimina y desoxicitina, y por tanto, implicada en la síntesis de dNTPs requeridos para la replicación y mantenimiento del mtDNA (169).

Así pues, quisimos valorar si la aportación extra de dNs a células PS *in vitro* podría favorecer la síntesis de mtDNA, tanto de moléculas delecionadas como de completas, así como disminuir la heteroplasmia y, finalmente mejorar su fenotipo. Para ello, fibroblastos PS portadores de deleción en el mtDNA, fibroblastos control no patológicos (FbC 1m), y fibroblastos mutantes del gen *TK2*, como control positivo, fueron tratados con dNs adaptando el protocolo propuesto por Camara *et al.* (168). Los fibroblastos se crecieron durante 10 días en medio de crecimiento normal (medio DMEM con 25 mM glucosa suplementado con 10 % de SFB y uridina (50 µg/ml)) hasta alcanzar la confluencia y se mantuvieron en quiescencia, sustituyendo el SFB por suero dializado y reduciéndolo al 0,1 %. Las células en quiescencia frenan la división celular y por tanto, los nuevos dNTPs sintetizados se destinarán a la replicación del genoma mitocondrial y no nuclear. El tratamiento combinado con los cuatro dNs (dT, dC, dA y dG) a una concentración de 50 µM cada uno, se mantuvo durante 12 días. En la figura 3.80 se muestra el diagrama de tiempo del tratamiento con las distintas condiciones así como el aspecto de las células a tiempo final. Lamentablemente, y como se puede observar, no fue posible mantener la línea Fb PS1 en confluencia durante todo el tratamiento.

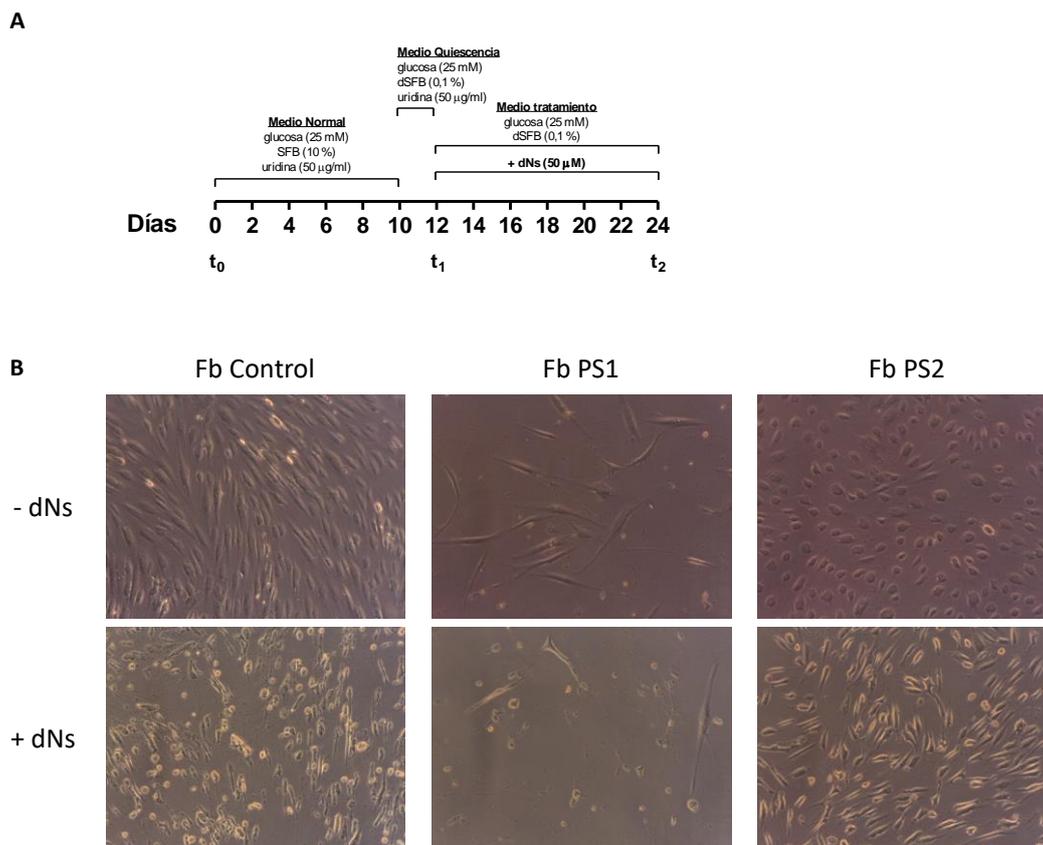


Figura 3.80 A) Diagrama de tiempo del tratamiento con desoxirribonucleósidos (dNs). B) Imágenes representativas de los fibroblastos control, PS1 y PS2 a tiempo final (t_2). Imágenes de microscopía óptica, 100X.

La heteroplasmia y los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 se analizaron en diferentes momentos del tratamiento: a tiempo inicial (t_0), tras entrar en estado de quiescencia (t_1) y a tiempo final con o sin adición de desoxinucleósidos (t_2).

Como se observa en la figura 3.81, la heteroplasmia de la línea PS1 disminuyó a tiempo final tanto en presencia de desoxinucleósidos como en ausencia de éstos. Además, se obtuvieron diferencias significativas entre ellas, alcanzándose la máxima caída (un 10 %) en las células mantenidas en quiescencia y sin dNs. En el caso de la línea PS2, el nivel de heteroplasmia inicial se situó por debajo del 50 %, y a pesar de que se observó una caída significativa a tiempo final tras el tratamiento con dNs, fue menor del 5 %.

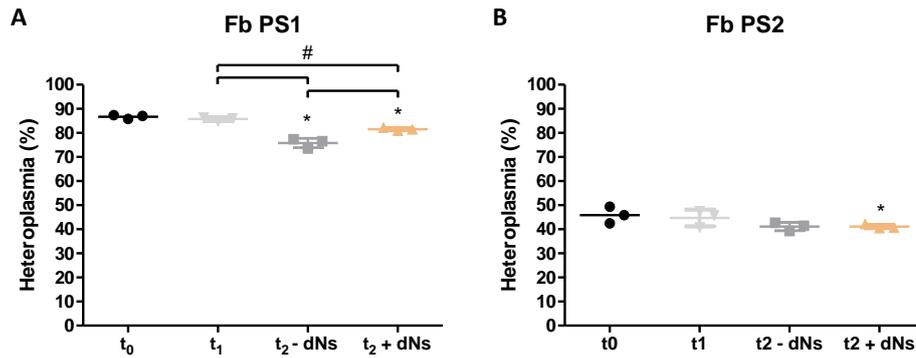


Figura 3.81 Variación del nivel de heteroplasmia en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 en diferentes tiempos y condiciones del tratamiento con desoxinucleósidos (dNs). A) Fb PS1. t₀: 86,7 ± 0,8 (3), t₁: 85,8 ± 0,8 (3), t₂-dNs: 75,8 ± 2 (3), t₂+dNs: 81,6 ± 0,6 (3). B) Fb PS2. t₀: 45,9 ± 3,4 (3), t₁: 44,7 ± 3,5 (3), t₂-dNs: 41,1 ± 1,7 (3), t₂+dNs: 41,1 ± 0,9 (3). Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto al t₀), #p<0,05 (entre condiciones).

Con el objetivo de analizar la variación en los niveles de mtDNA en los fibroblastos PS tratados con desoxirribonucleósidos, añadimos al estudio una línea de fibroblastos mutante del gen *TK2* como control positivo. El número de copias de mtDNA aumentó significativamente a tiempo final tras el tratamiento con dNs en todas las líneas, a excepción curiosamente del mutante de *TK2* (figura 3.82). Además, tanto en la línea control como en la línea mutante PS1, los niveles de mtDNA también aumentaron significativamente en las células a tiempo final sin haber sido tratadas con dNs, aunque de manera significativamente menor que las células tratadas (figura 3.82A y C).

Si analizamos la proporción de mtDNA completo y deletado en las líneas PS1 y PS2, observamos que ambos aumentaban significativamente a tiempo final tras el tratamiento con dNs. Además, en la línea PS1 también se detectó un aumento de ambos tipos de mtDNA a tiempo final sin adición de dNs al comparar con t₀ o t₁, y en el caso de los fibroblastos PS2 únicamente frente t₁ (figura 3.82C y D). A pesar de que observamos un aumento de la cantidad de ambas moléculas de mtDNA, resulta interesante el incremento significativo del mtDNA completo, ya que permitiría a las células disponer de mayor cantidad de cadena transportadora de electrones completa, y con ello, quizás podrían alcanzar una función mitocondrial normal.

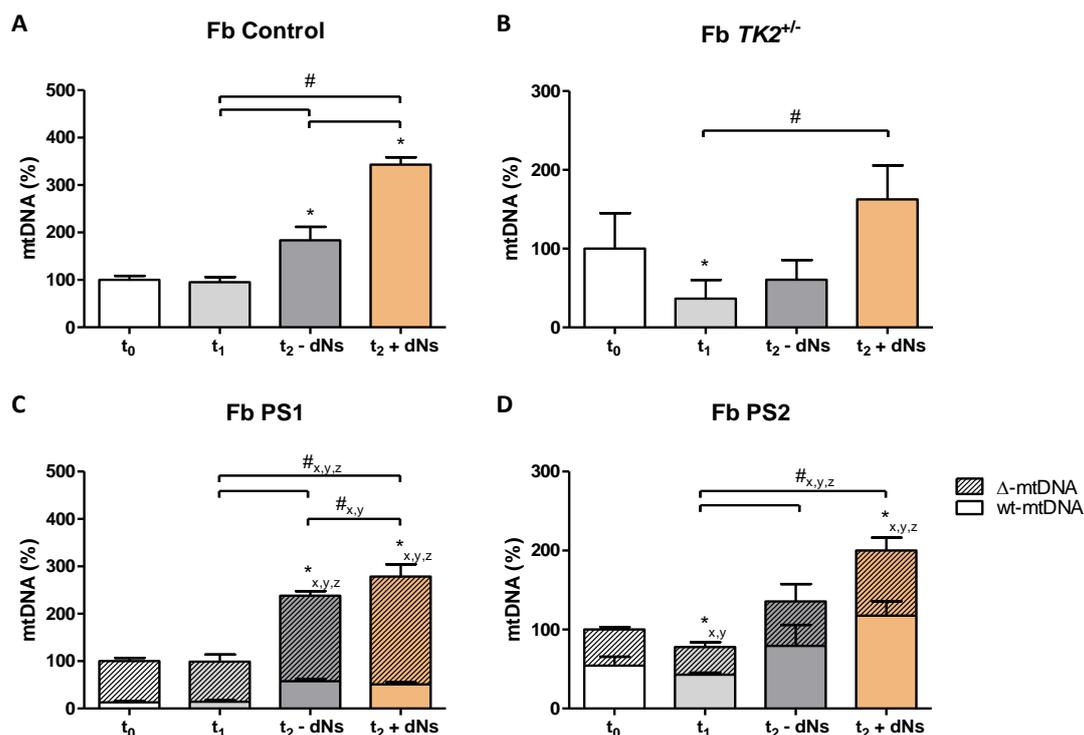
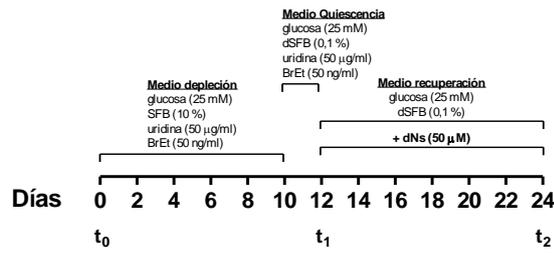


Figura 3.82 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos control, mutante de *TK2*, *PS1* y *PS2* en diferentes tiempos y condiciones del tratamiento con desoxinucleósidos (dNs) A) Fb Control. t₀: 100 ± 8,5 (3), t₁: 95,3 ± 10,8 (3), t₂-dNs: 183,5 ± 28,4 (3), t₂+dNs: 343,3 ± 15,5 (3). B) Fb *TK2*^{-/-}. t₀: 100 ± 45,1 (3), t₁: 36,6 ± 23,7 (3), t₂-dNs: 60,7 ± 25 (3), t₂+dNs: 162,7 ± 43 (3). C) Fb *PS1*. mtDNA total. t₀: 100 ± 8,5 (3), t₁: 99,1 ± 17,8 (3), t₂-dNs: 238,2 ± 8,5 (3), t₂+dNs: 278,6 ± 29,5 (3). wt-mtDNA. t₀: 13,3 ± 1,9 (3), t₁: 14,2 ± 3,1 (3), t₂-dNs: 57,6 ± 4,4 (3), t₂+dNs: 51,2 ± 3,8 (3). Δ-mtDNA. t₀: 86,7 ± 6,7 (3), t₁: 85 ± 14,8 (3), t₂-dNs: 180,6 ± 9,5 (3), t₂+dNs: 227,4 ± 25,7 (3). D) Fb *PS2*. mtDNA total. t₀: 100 ± 14,4 (3), t₁: 77,8 ± 8,7 (3), t₂-dNs: 135,7 ± 48,4 (3), t₂+dNs: 200,2 ± 34,5 (3). wt-mtDNA. t₀: 54,4 ± 11,3 (3), t₁: 42,8 ± 2,6 (3), t₂-dNs: 79,5 ± 26,4 (3), t₂+dNs: 117,6 ± 18,3 (3). Δ-mtDNA. t₀: 45,6 ± 3,2 (3), t₁: 35 ± 6,4 (3), t₂-dNs: 56,2 ± 22,1 (3), t₂+dNs: 82,6 ± 16,2 (3). Los valores de las células en el tiempo inicial (t₀) se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto a t₀), #p<0,05 (entre tiempos y condiciones). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ-mtDNA) y z (wt-mtDNA).

Paralelamente, analizamos si la maquinaria de replicación del mtDNA de los fibroblastos *PS* en presencia de exceso de dNs era capaz de alcanzar niveles normales de mtDNA completo tras sufrir depleción. Con este objetivo, se realizó un tratamiento previo de las células con bromuro de etidio (BrEt), para degradar el mtDNA y conseguir depleción. Posteriormente, se mantuvieron en presencia o ausencia de desoxirribonucleótidos y se analizaron los niveles de mtDNA y de heteroplasmia de las diferentes líneas. En la figura 3.83 se representa el diagrama de tiempo del tratamiento con las distintas condiciones así como el aspecto de las células a tiempo final. Igual que ocurría en el estudio anterior, no fue posible mantener la línea Fb *PS1* en confluencia durante todo el tratamiento.

A



B

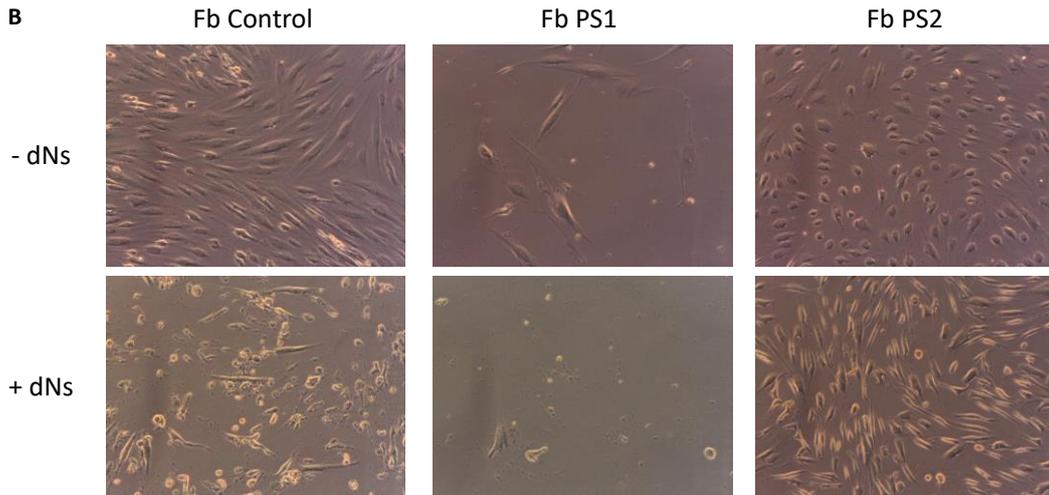


Figura 3.83 A) Diagrama de tiempo del tratamiento con desoxirribonucleósidos (dNs) tras un tratamiento previo con bromuro de etidio (BrEt). B) Imágenes representativas de los fibroblastos control, PS1 y PS2 a tiempo final (t₂). Imágenes de microscopía óptica, 100X.

Como era de esperar, la heteroplasmia se elevó significativamente en ambas líneas tras el tratamiento con bromuro de etidio (figura 3.84) a la vez que los niveles de mtDNA se redujeron (figura 3.85). A tiempo final, la heteroplasmia únicamente se redujo significativamente (un 8 %) en la línea PS1 sin haber sido tratadas con dNs tras la depleción (figura 3.84A).

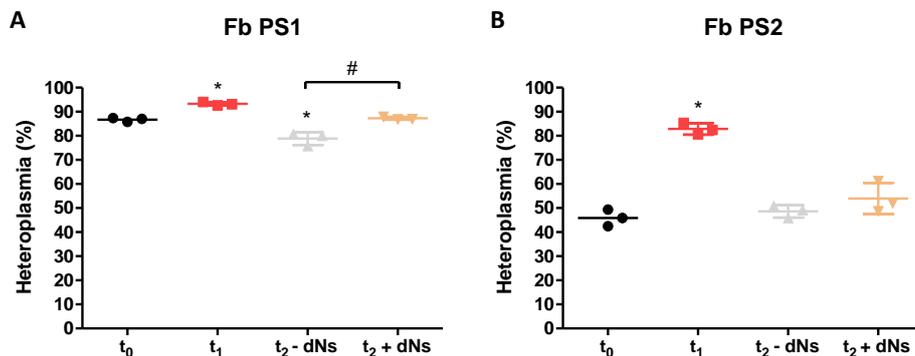


Figura 3.84 Variación del nivel de heteroplasmia en las líneas de fibroblastos PS1 y PS2 en diferentes tiempos del tratamiento con desoxinucleósidos (dNs) y tras generar depleción (t₁) con bromuro de etidio (50 ng/ml). A) Fb PS1. t₀: 86,7 ± 0,8 (3), t₁: 93,3 ± 0,7 (3), t₂-dNs: 78,9 ± 2,7 (3), t₂+dNs: 87,3 ± 0,6 (3). B) Fb PS2. t₀: 45,9 ± 3,4 (3), t₁: 82,9 ± 2,4 (3), t₂-dNs: 48,6 ± 2,6 (3), t₂+dNs: 54 ± 6,5 (3). Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto al t₀), #p<0,05 (entre condiciones).

En cuanto a las copias de mtDNA, los fibroblastos control y PS2 fueron capaces de recuperar niveles similares a los del inicio del estudio tras el tratamiento con dNs (figura 3.85). Curiosamente, la recuperación fue mayor en ausencia de desoxirribonucleótidos, siendo los niveles totales similares a los iniciales en las líneas PS1 y PS2, y significativamente superiores en la línea control.

Al analizar en detalle la proporción de moléculas de mtDNA completas y delecionadas en PS1 y PS2 observamos que no todas las líneas seguían la misma tendencia, siendo el aumento de los niveles de wt-mtDNA en la línea PS1 tras la recuperación sin dNs el resultado más relevante (figura 3.85C).

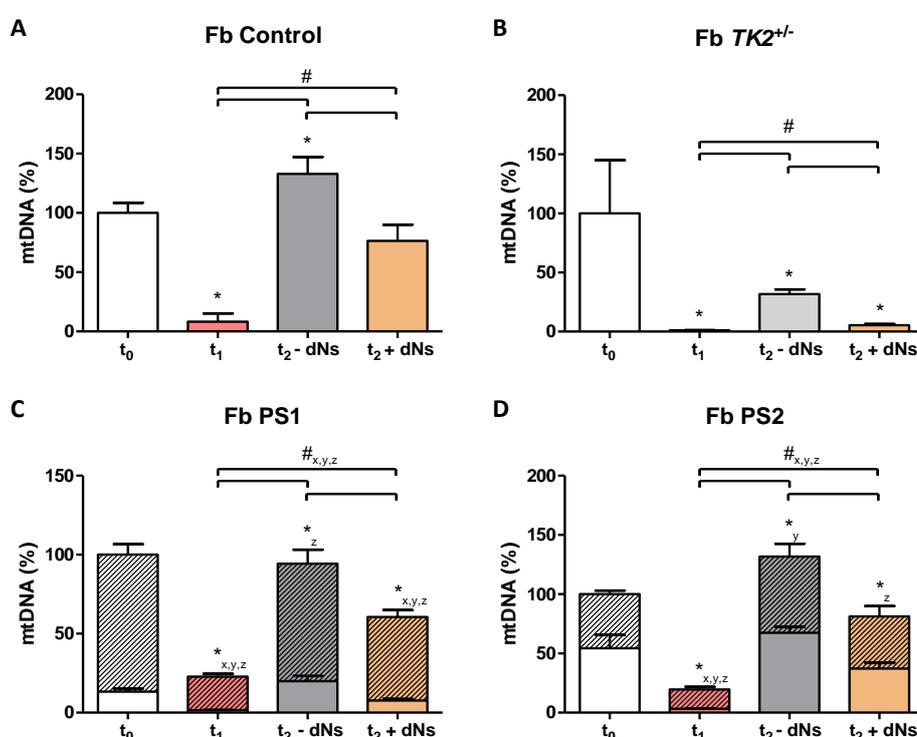


Figura 3.85 Variación de los niveles de mtDNA en las líneas de fibroblastos control, mutante de *TK2*, PS1 y PS2 en diferentes tiempos del tratamiento con desoxinucleósidos (dNs) y tras generar depleción (t₁) con bromuro de etidio (50 ng/ml). A) Fb Control. t₀: 100 ± 8,5 (3), t₁: 8,2 ± 7,1 (3), t₂-dNs: 132,9 ± 14,3 (3), t₂+dNs: 76,4 ± 13,7 (3). B) Fb TK2^{+/-}. t₀: 100 ± 45,1 (3), t₁: 1,1 ± 0,1 (3), t₂-dNs: 31,8 ± 3,9 (3), t₂+dNs: 5,5 ± 0,9 (3). C) Fb PS1. mtDNA total. t₀: 100 ± 8,5 (3), t₁: 22,8 ± 1,8 (3), t₂-dNs: 94,4 ± 10,3 (3), t₂+dNs: 60,6 ± 5,2 (3). wt-mtDNA. t₀: 13,3 ± 1,9 (3), t₁: 1,5 ± 0,2 (3), t₂-dNs: 19,9 ± 3,2 (3), t₂+dNs: 7,7 ± 0,9 (3). Δ-mtDNA. t₀: 86,7 ± 6,7 (3), t₁: 21,3 ± 1,8 (3), t₂-dNs: 74,4 ± 8,8 (3), t₂+dNs: 52,9 ± 4,4 (3). D) Fb PS2. mtDNA total. t₀: 100 ± 14,4 (3), t₁: 19,6 ± 2 (3), t₂-dNs: 131,7 ± 15,9 (3), t₂+dNs: 81,3 ± 9 (3). wt-mtDNA. t₀: 54,4 ± 11,3 (3), t₁: 3,3 ± 0,1 (3), t₂-dNs: 67,4 ± 5 (3), t₂+dNs: 37,2 ± 5 (3). Δ-mtDNA. t₀: 45,6 ± 3,2 (3), t₁: 16,2 ± 2,2 (3), t₂-dNs: 64,3 ± 11 (3), t₂+dNs: 44,1 ± 8,6 (3). Los valores de las células en el tiempo inicial (t₀) se han considerado el 100%. Mann-Whitney test: *p<0,05 (respecto a t₀), #p<0,05 (entre tiempos y condiciones). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ-mtDNA) y z (wt-mtDNA).

Los resultados obtenidos en ambos estudios podrían indicar que los fibroblastos PS1 portadores de deleción en alto grado de heteroplasmia son capaces de reducir los niveles de deleción y aumentar las moléculas mtDNA completo de manera significativa al mantenerse en estado de

quiescencia y sin necesidad de aportar mayor cantidad de desoxirribonucleósidos (figura 3.81A, figura 3.82C, figura 3.84A y figura 3.85C). A fin de confirmarlo, comparamos el comportamiento de la línea de fibroblastos PS1 en crecimiento normal y en quiescencia, y a su vez, estudiamos si la presencia o ausencia de uridina también podría influir en la variación de la heteroplasmia y el número de copias.

Como se observa en la figura 3.86, la quiescencia induce una caída significativa del porcentaje de delección en un 6 % y, como era esperable, un aumento significativo de los niveles de mtDNA, tanto delecionado como completo. De nuevo es interesante destacar que la proporción de moléculas de mtDNA completo aumenta significativamente al mantener las células en estado de quiescencia, lo que indicaría mayor cantidad de sistemas OXPHOS funcionales. El análisis de algún parámetro de función mitocondrial podría ser interesante para estudiar si dicho aumento es suficiente para provocar una mejora del fenotipo a nivel celular. Además, la presencia o ausencia de uridina no parece influir en el resultado obtenido.

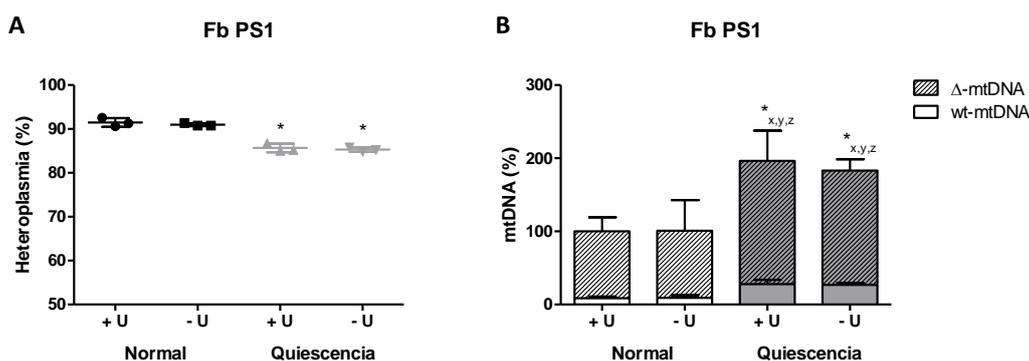


Figura 3.86 Variación de la heteroplasmia y los niveles de mtDNA en los fibroblastos PS1 en crecimiento normal o en estado de quiescencia, y en presencia o ausencia de uridina. A) Heteroplasmia PS1 (%). Normal + U: $91,5 \pm 1$ (3). Normal - U: $91 \pm 0,3$ (3). Quiescencia + U: $85,7 \pm 1$ (3). Quiescencia - U: $85,3 \pm 0,5$ (3). B) Niveles mtDNA. Normal + U. mtDNA total: $100 \pm 21,4$ (3), Δ -mtDNA: $91,4 \pm 19,3$ (3), wt-mtDNA: $8,6 \pm 2,4$ (3). AF 50 nM mtDNA total: $81 \pm 13,2$ (3), Δ -mtDNA: $72,8 \pm 9,2$ (3), wt-mtDNA: $18,3 \pm 4$ (3). Normal - U. mtDNA total: $100,8 \pm 45,8$ (3), Δ -mtDNA: $91,8 \pm 42$ (3), wt-mtDNA: $9 \pm 3,8$ (3). Quiescencia + U. mtDNA total: $196,4 \pm 46,7$ (3), Δ -mtDNA: $168,4 \pm 41,2$ (3), wt-mtDNA: $28 \pm 5,9$ (3). Quiescencia - U. mtDNA total: $183,2 \pm 17,5$ (3), Δ -mtDNA: $156,3 \pm 15,4$ (3), wt-mtDNA: $26,9 \pm 2,3$ (3). En la gráfica B, las células mantenidas en medio normal con uridina se han considerado el 100 %. Mann-Whitney test: * $p < 0,05$ (respecto a los valores de las células en medio normal con uridina). Subíndices: x (mtDNA total), y (Δ -mtDNA) y z (wt-mtDNA).

3.6.4. Terapia génica con mtZFN

Una de las estrategias propuestas para el tratamiento de patologías mitocondriales causadas por mutaciones heteroplásmicas es la eliminación específica de las moléculas de mtDNA mutante mediante técnicas de ingeniería genética basadas en la actividad de nucleasas como los mtZFN (del inglés, *mitochondrially targeted zincfinger-nucleases*). En concreto, el grupo del Dr. Minczuk del *MRC-Mitochondrial Biology Unit* de la Universidad de Cambridge, diseñó un

sistema de mtZFN acoplados a nucleasas específicos para eliminar las moléculas de mtDNA portadoras de la deleción común (173). Este sistema, se basa en el empleo de dos plásmidos que, de un modo simplificado, cuentan con una secuencia de exportación nuclear (NES), una secuencia de importación a la mitocondria (MTS), un dominio FokI de nucleasa, una secuencia codificante de los dedos de Zinc (ZFN) y un marcador fluorescente (mCherry y eGFP). Cada uno de los monómeros de ZFN, denominados R8 (con eGFP) y R13 (con mCherry), hibridan de forma específica en las regiones flanqueantes de la deleción. Por tanto, las nucleasas dimerizarán en moléculas de mtDNA delecionadas, generando una rotura de doble hebra (DSBs) e induciendo su linealización y posterior degradación por la maquinaria mitocondrial.

Gracias a una estancia realizada en el grupo del Dr. Minczuk, fue posible realizar un estudio preliminar del efecto de este sistema sobre la heteroplasma de la línea CIB PS1, portadora de la deleción común. Además de la doble transfección con R13 y R8, se realizaron también de forma individual con cada uno de ellos y, como control del procedimiento, con plásmidos únicamente codificantes de mCherry y eGFP. En las transfecciones realizadas con un solo mtZFN, se añadió también plásmido codificante de la proteína fluorescente opuesta, para garantizar que la cantidad de DNA disponible para la transfección fuera similar en todas las condiciones.

Como se puede observar en la figura 3.87, 24 horas después de la transfección se obtuvieron células doble-positivas para R13 y R8, y por tanto, portadoras de ambos mtZFN. Estas células, junto con las controles y las transfectadas con cada uno de los plásmidos, se sembraron y se crecieron durante dos semanas.

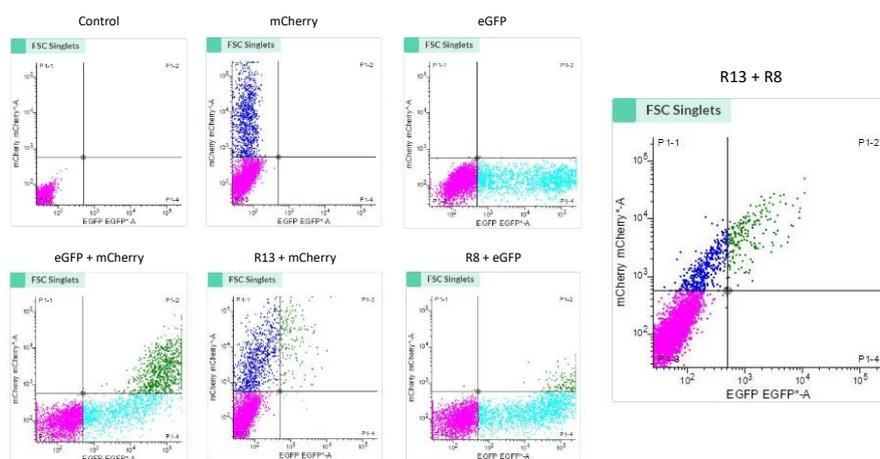


Figura 3.87 Diagramas de puntos de las poblaciones obtenidas por FACS para cada una de las condiciones de transfección de la línea CIB PS1 con los mtZFN. Control, células no transfectadas. mCherry, eGFP y eGFP + mCherry, células transfectadas con plásmidos sin mtZFN. R13 + mCherry y R8 + eGFP, células transfectadas con un plásmido mtZFN. R13 + R8, células transfectadas con ambos plásmidos mtZFN.

Resultados

Lamentablemente, no se observó una reducción importante de la heteroplasmia a tiempo final en la línea CIB PS1 transfectada con ambos plásmidos codificantes de mtZFN (R13 + R8) (figura 3.88). Sería interesante repetir el estudio por triplicado tras optimizar diferentes pasos, para corroborar el posible efecto de los mtZFN sobre el porcentaje de delección en la línea CIB PS1.

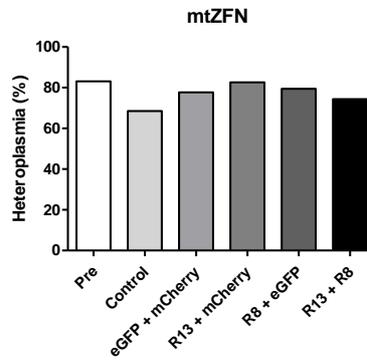


Figura 3.88 Nivel de heteroplasmia de las células CIB PS1 transfectadas con mtZFN. Pre (células antes del tratamiento): 83,1 (1); Control: 68,5 (1); eGFP + mCherry: 77,7 (1); R13 + mCherry: 82,6 (1); R8 + eGFP: 79,5 (1); R13 + R8: 74,4.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1. Modelos para el estudio de patologías causadas por deleciones en el mtDNA

Las patologías causadas por deleciones en el mtDNA son enfermedades muy graves que presentan una clínica muy compleja. Los pacientes con síndrome de Pearson suelen fallecer en la infancia, y aquellos que sobreviven desarrollan síndrome de Kearns-Sayre. Como para la mayoría de las patologías mitocondriales, no existe un terapia específica sino que los pacientes reciben tratamientos paliativos que aumentan su esperanza de vida. Por ello, resulta de especial importancia el desarrollo de modelos celulares y animales para el estudio del origen, el desarrollo y el tratamiento de estos síndromes. En esta tesis, se han desarrollado y comparado tres tipos de modelos celulares portadores de deleciones en el mtDNA: fibroblastos, cíbridos y células madre pluripotentes inducidas. Además de asegurar unas condiciones de trabajo adecuadas, la manipulación simultánea de varias líneas celulares conlleva riesgos de posibles contaminaciones cruzadas entre ellas. Por ello, se autentificaron todas las líneas a nivel nuclear, mediante el estudio de perfiles STR, y a nivel mitocondrial, mediante la secuenciación completa del mtDNA.

Aunque todos los modelos han resultado útiles para demostrar la patogenicidad de las deleciones, cada uno presenta unas características propias que en algunos casos suponen ventajas o inconvenientes. El cultivo primario de fibroblastos permite realizar estudios con muestras extraídas directamente del paciente sin necesidad de realizar ninguna manipulación previa, pero con una capacidad replicativa limitada a unos pocos pases. Además, al conservarse el fondo genético nuclear y mitocondrial del paciente, algunos efectos como los mecanismos de compensación podrían enmascarar las consecuencias de la deleción y dificultar la comparación con las líneas control (que poseen su propio fondo genético). Por ello, sería especialmente interesante disponer de controles isogénicos para cada línea mutante, pero a veces resulta imposible. No obstante, se recogen en la bibliografía varios trabajos publicados sobre deleciones en este modelo, que principalmente se centran en el estudio de la evolución del nivel de heteroplasmia durante el cultivo y la distribución del mtDNA delecionado a nivel inter e intracelular (96,125,126). Los cíbridos, o híbridos transmitocondriales, han sido el modelo celular más ampliamente utilizado para el estudio de patologías mitocondriales, entre ellas las causadas por deleciones en el mtDNA, ya que permiten estudiar la influencia del mtDNA sobre el fenotipo al homogenizar el fondo genético nuclear entre líneas patológicas y controles (83,91,92,95,100,125,129). Sin embargo, al heredar un núcleo de célula tumoral, los cíbridos son

aneuploides y presentan una alta inestabilidad cromosómica, con un perfil genético muy alejado de una célula normal. Por otro lado, su generación es relativamente sencilla ya que se pueden emplear plaquetas obtenidas directamente de sangre del paciente. En este sentido, las líneas celulares linfoides también son un cultivo primario fácil de establecer a partir de linfocitos aislados de sangre periférica, aunque presentan numerosas limitaciones según el estudio a realizar (210). No obstante, también ha sido un modelo empleado para estudiar la relación entre los genotipos y los fenotipos mitocondriales, y la dinámica de segregación del mtDNA (96,132,211).

Puesto que los mecanismos reguladores y fisiopatológicos pueden variar entre tejidos de un mismo paciente, en especial en patologías mitocondriales, resulta esencial centrar los estudios sobre el tipo celular afectado en cada caso. Por ello, la principal desventaja de los modelos comentados previamente es su limitada capacidad de diferenciación. Los modelos animales se postulan como una solución a este problema, al permitir estudiar diferentes tejidos en un organismo completo. En el año 2000, Inoue *et al.* publicaron el único modelo de ratón diseñado para el estudio de deleciones en el mtDNA, al que denominaron *mito-miceΔ* y del que han surgido varias publicaciones (93,139,140). Sin embargo, al estudiar tratamientos en modelos de ratón, es muy frecuente que la extrapolación de los resultados a humanos falle debido a las diferentes respuestas biológicas entre las especies (212). Para solventar este problema, en los últimos años se ha prestado especial interés al desarrollo de modelos de células humanas *in vitro* que evidencien los mecanismos fisiopatológicos de una enfermedad, permitiendo modelar y ajustar de forma más precisa las condiciones de un posible tratamiento. Es el caso de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Este modelo celular con deleción en el mtDNA únicamente ha sido descrito en dos ocasiones. El primero se publicó en el año 2013 por Cherry *et al.*, quienes generaron una línea de células iPS con una deleción de 2,5 kb en la que observaron diferencias en el crecimiento, la función mitocondrial y el fenotipo hematopoyético tras la diferenciación *in vitro* al comparar con un control isogénico (89). En el año 2018, Russel *et al.* consiguieron una nueva línea portadora de una deleción de 6 kb en la que describieron una deficiencia de la respiración mitocondrial y una segregación de la deleción durante la reprogramación y la diferenciación neuronal (84). Además de su capacidad de diferenciación a todas las capas germinales, las células iPS presentan un núcleo euploide y conservan el fondo genético del paciente. Sin embargo, el principal inconveniente reside en su generación y manipulación, ya que puede resultar compleja y económicamente costosa, especialmente al trabajar con mutaciones causantes de un fenotipo muy grave. En este sentido, ambos autores manifestaron la dificultad de obtener sendas líneas, y en nuestro caso, fueron necesarios tres

intentos de reprogramación independientes para conseguir dos líneas de células iPS portadoras de la delección común. Este éxito coincidió con la sustitución del medio de cultivo por el medio *Nutristem® hPSC XF*, siguiendo las recomendaciones de Russel *et al.*, ya que parece facilitar el cambio metabólico hacia la glucólisis reduciendo el impacto negativo de la delección sobre las células (84). A pesar de ello, no pudimos obtener una línea con delección derivada del paciente PS2, quizás el mayor tamaño de la delección pudo influir en la capacidad de reprogramación de la línea. También se ha sugerido que durante la reprogramación celular podrían aparecer alteraciones cromosómicas a nivel estructural, como duplicaciones o deleciones, o a nivel numérico, que podrían alterar la capacidad de diferenciación y aumentar su potencial oncogénico (135). Por lo tanto, para confirmar la idoneidad del modelo, resulta de nuevo imprescindible el análisis genético de las células iPS tras la reprogramación (186). Algunas de las líneas generadas en este trabajo presentaron alteraciones cromosómicas, como el clon G de la línea control que mostró la pérdida de un marcador STR en el cromosoma 19, y el clon 11 de la células iPS PS1 portadoras de delección, que mostraron la pérdida completa del cromosoma Y. Aunque las anomalías más frecuentemente descritas afectan a los cromosomas 12 y 20, se ha reportado la ausencia del cromosoma Y en algunas líneas de iPSCs (186,213). No obstante, esta línea no se seleccionó para los estudios de diferenciación a fin de evitar posibles alteraciones sobre el fenotipo observado, ya que se ha propuesto que la presencia de este cromosoma podría influir en el crecimiento y la diferenciación de células madre pluripotentes (214). Según esta premisa, la ausencia del cromosoma Y podría ser la causa de algunas diferencias observadas entre la función OXPHOS de ambos clones PS1.

4.2. Estabilidad del nivel de heteroplasmia a lo largo del tiempo

Las moléculas de mtDNA deleccionado tienden a acumularse en tejidos postmitóticos, como el músculo o el cerebro, de pacientes e incluso de personas sanas durante el envejecimiento (83). Aunque se han propuesto diferentes modelos para explicar la expansión clonal de las moléculas deleccionadas en estos tejidos, la ventaja replicativa de las moléculas pequeñas ha sido la teoría más aceptada (83), a pesar de que otros autores han mostrado resultados que la contradicen (78). Además, en el año 1990, Larsson *et al.* propusieron que el fenotipo causado por una delección en el mtDNA dependería de la distribución de ésta en los distintos tejidos, justificando así la pérdida de moléculas deleccionadas observada en sangre de pacientes con síndrome de Pearson, y el incremento detectado en músculo de pacientes con síndrome de Kearns-Sayre (215). En esta misma línea, el paciente PS1 estudiado en esta tesis mostró un descenso del nivel de heteroplasmia en sangre al tiempo que cesó de requerir transfusiones sanguíneas.

En este sentido, se ha propuesto que las células proliferativas serían más susceptibles a los efectos negativos de las deleciones, y por tanto, irían reduciendo la población de moléculas de mtDNA delecionadas (15). A pesar de la adición de uridina, algunos autores describen la pérdida de heteroplasma en el cultivo prolongado de líneas celulares portadoras de deleción (89,96,125). En el caso de nuestros cíbridos, observamos una tendencia de los clones hacia los extremos: aquellos con un porcentaje inicial bajo evolucionaban hacia la pérdida del mtDNA delecionado, mientras que otros con un nivel de heteroplasma inicial superior al 50 % mostraban un incremento hacia la homoplasma. Debido a la dificultad de mantener unos niveles de deleción constantes, evitamos el mantenimiento prolongado de los clones antes de los estudios y trabajamos dentro de unos rangos de heteroplasma. Asimismo, mientras unos autores describieron un aumento de la heteroplasma durante el cultivo de cíbridos (91), otros no detectaron variación, a excepción de clones con un 80 % de deleción que perdían completamente el mtDNA durante el cultivo prolongado, alcanzando un fenotipo de célula ρ^0 (125). Una posible explicación para la segregación de la heteroplasma fue propuesta por Hayashi *et al.* que sugirieron que cada línea celular tendría un umbral de tolerancia de moléculas delecionadas, de modo que aquellas con un umbral de tolerancia alto acumularían la deleción, mientras que las células con un umbral de tolerancia bajo serían capaces de eliminarlo y se expandirían gracias a la ventaja de crecimiento de las células sin mtDNA mutante descrita por Moraes *et al.* (87,91). También se podría considerar la influencia del fondo genético nuclear de la célula ρ^0 sobre la segregación de mtDNA mutante y *wild-type* en cíbridos (130).

En el caso de los fibroblastos, se ha descrito una reducción del porcentaje de heteroplasma de la deleción durante el cultivo, probablemente debido a la menor velocidad de división de las células con un elevado porcentaje de Δ -mtDNA (96,126). La adición de uridina al medio de cultivo evitó este efecto e incluso reveló un incremento de la proporción de mtDNA delecionado en los fibroblastos con los pases (96). En nuestro caso, los fibroblastos PS empleados en esta tesis mostraron unos niveles de heteroplasma altos, por encima del 75 %, alcanzando incluso niveles cercanos a la homoplasma. Si bien, también se detectó una caída de la heteroplasma en el fibroblasto PS2 que se reflejó en algunos de los estudios realizados. Puesto que la capacidad replicativa de los fibroblastos es limitada, el mantenimiento prolongado del cultivo podría haber provocado la reducción de la capacidad mitótica de las células, especialmente de aquellas portadoras de deleción en altos niveles de heteroplasma (87).

Respecto a las células madre pluripotentes inducidas, se han descrito diferentes tendencias. Cherry *et al.* observaron que dos de los tres clones portadores de altos niveles de deleción

obtenidos tras la reprogramación reducían la heteroplasmia con los pases (89). En cambio, Russel *et al.* describieron una expansión clonal del mtDNA delecionado en los clones portadores de niveles iniciales de heteroplasmia bajos, y un mantenimiento del porcentaje de deleción en un clon con un 65 % de heteroplasmia (84). Nuestras líneas de iPSCs portadoras de deleción mostraron una heteroplasmia constante de aproximadamente el 75 % durante al menos 20 pases, si bien observamos cierta caída del porcentaje cuando el cultivo se mantuvo más de 30 pases. En este sentido, ambos autores difieren considerablemente en el número de pases analizados, ya que mientras Cherry *et al.* mostraron resultados por encima del pase 35, Russel *et al.* únicamente mostraron los porcentajes de los 15 primeros pases. Además, el tamaño de las deleciones también era muy diferente, siendo más pequeña la publicada por Cherry *et al.*, por lo que la ventaja replicativa de estas moléculas delecionadas sería menor (89). Por tanto, al igual que lo observado en los fibroblastos, el mantenimiento prolongado de las iPSCs con deleción podría conllevar la caída del porcentaje de heteroplasmia por una menor capacidad de división y por la acumulación de daño oxidativo en las células con alta heteroplasmia (87).

4.3. Influencia de las características de la deleción sobre el fenotipo celular

Aunque diversas publicaciones han propuesto la asociación entre algunas características de las deleciones y el fenotipo que generan, esta relación resulta aún muy controvertida. Diversos meta-análisis, principalmente realizados en tejido muscular de pacientes portadores de deleción, han revelado la existencia de distintas correlaciones entre la heteroplasmia, el tamaño y la localización de la deleción con los síntomas o el progreso de la enfermedad (72,73,75–77). En los modelos *in vitro* analizados en esta tesis, observamos que algunos aspectos de la deleción, especialmente el nivel de heteroplasmia, influyen en el fenotipo celular.

Al analizar de forma aislada algunos parámetros de la función mitocondrial como la actividad y cantidad de complejo IV, detectamos una mayor afectación en las líneas portadoras de la deleción de mayor tamaño. Como ya han sugerido otros autores, este fenómeno se debería a la presencia de más genes COX implicados en la deleción (76). No obstante, se observaron también distintos comportamientos entre las líneas celulares, ya que los fibroblastos portadores de ambas deleciones experimentaron mayor caída de actividad que de cantidad de complejo IV, mientras que esta tendencia fue opuesta en los híbridos. El diferente fondo genético nuclear de las líneas podría influir en la disponibilidad de las subunidades del complejo IV no codificadas en el genoma mitocondrial y provocar esa diferencia de comportamiento. Al analizar parámetros relativos a la función mitocondrial global, como el consumo de oxígeno o la síntesis de ATP, también se observaron diferencias según el tamaño y la heteroplasmia de la deleción, pero en

este caso dependientes del tipo celular. Ambos fibroblastos con una heteroplasmia similar, mostraron una importante disminución en estos parámetros, especialmente aquellos con la deleción de mayor tamaño. En cambio, los cíbridos con deleción común evidenciaron un mayor caída de ATP al presentar un porcentaje de heteroplasmia mayor. Por tanto, y considerando que los cíbridos comparten el mismo fondo genético nuclear, el grado de heteroplasmia de una deleción podría ser el factor más determinante a la hora de provocar disfunción mitocondrial. Esta conclusión sería coherente con los resultados de Jeppensen *et al.*, según los cuales la carga de deleción en los tejidos postmitóticos determina la edad de comienzo y la progresión de la enfermedad (75).

Por otro lado, la biogénesis mitocondrial es un mecanismo de respuesta a una demanda energética provocada por procesos fisiológicos o por el mal funcionamiento del sistema OXPHOS (36). Este fenómeno se ha observado en células musculares de pacientes con patologías mitocondriales (90), aunque parece ser dependiente del tipo de mutación en el mtDNA (36). A pesar de que todos nuestros modelos celulares portadores de deleción en el mtDNA presentaron un déficit de ATP mitocondrial y un mal funcionamiento del sistema OXPHOS, no todos mostraron una activación de la biogénesis mitocondrial para intentar compensar el efecto patológico. En este sentido, los fibroblastos PS portadores de la deleción común (PS1) experimentaron un aumento de la masa mitocondrial que se refleja en diferentes parámetros: el aumento de actividad de la citrato sintasa, el incremento de los niveles de mtDNA, y la sobreexpresión de genes mitocondriales no delecionados, de algunos genes nucleares codificantes del replisoma mitocondrial y de genes codificantes de proteínas implicadas en la ruta de activación de la biogénesis. Además, es la única línea que parece sufrir un aumento importante de la mitofagia, según los niveles de proteína LC3B detectados, por lo que los fibroblastos PS1 podrían tratar de sustituir las mitocondrias degradadas mediante la activación de la biogénesis mitocondrial. Por otra parte, también encontramos algún indicio de que este proceso ocurre en los fibroblastos PS2, aunque de manera menos evidente. Puesto que cada fibroblasto PS conserva su propio fondo genético, las diferencias observadas entre ambos podrían deberse a la eficiencia y capacidad de sus respectivas maquinarias de respuesta. Sin embargo, este efecto no es claro en el resto de los modelos celulares, incluidos los de PS1. En concreto, algunos parámetros analizados en los cíbridos y las iPSCs, como la actividad de la citrato sintasa o la expresión de los genes codificantes de PGC-1 α y TFAM, indicarían una ligera modificación de la cantidad de mitocondrias, o incluso una reducción. Otros autores como Porteous *et al.* tampoco observaron diferencias en el contenido mitocondrial en sus estudios realizados con cíbridos portadores de deleción (129). Estas discrepancias podrían deberse a los

distintos perfiles metabólicos de estos modelos celulares, ya que las líneas tumorales y las células madre pluripotentes inducidas son más dependientes de la glucólisis (52,216), por lo que podrían no manifestar algunos efectos secundarios provocados por una mutación en el mtDNA, como la biogénesis mitocondrial. Además, las células iPS portadoras de delección si muestran cierto incremento de la mitofagia, según sus niveles de proteína LC3B, lo que podría limitar el aumento de la masa mitocondrial.

En cualquier caso, todos los modelos mostraron un incremento significativo de los niveles de mtDNA, especialmente las líneas con la delección de mayor tamaño. Este efecto también se observa en músculo de pacientes portadores de delección (217). A pesar de ello, muchos autores no consideran este parámetro como un buen marcador de biogénesis mitocondrial (38,193). La carencia de subunidades para constituir el sistema OXPHOS podría inducir que las células incrementarán los niveles de mtDNA y la expresión de los genes codificados en él. En el caso particular de las delecciones, el aumento de copias de mtDNA normalmente no implica un incremento de moléculas completas sino de moléculas delecionadas, ya que como se ha comentado previamente, éstas presentarían ventaja replicativa por ser de menor tamaño (83,84,198,218). Los distintos clones de híbridos PS empleados en esta tesis reflejan este efecto, ya que el aumento del número de copias de mtDNA con la heteroplasmia, se acompaña de un incremento mayoritario de las moléculas de mtDNA delecionadas. Además, al disponer de mayor cantidad de estas moléculas, todos los modelos celulares experimentaron un incremento de la expresión de genes no implicados en la delección. Puesto que se ha propuesto que los niveles de transcritos de los genes *MT-ND4* y *MT-ND5* podrían regular la replicación del mtDNA por un mecanismo de retroalimentación (74), y éstos están implicados en las delecciones estudiadas en esta tesis (PS1 y PS2), se podría esperar un aumento de la tasa de replicación del genoma mitocondrial. Sin embargo, los niveles de mRNA codificantes de proteínas implicadas en el replisoma (TWINKLE, POLG y SSBP1) no aumentaron en todos los modelos, o incluso disminuyeron significativamente en las células iPS, por lo que el aumento de copias de mtDNA total podría no deberse a un aumento de la tasa de replicación. Quizás otros mecanismos, como una disminución de la degradación del mtDNA, podrían subyacer tras este efecto (86).

4.4. El tamaño de la delección no influye en el porcentaje umbral causante de efectos patológicos

El balance entre el mtDNA completo y delecionado determinará el número de cadenas transportadoras de electrones completas, y con ello, la aparición o no del fenotipo patológico. Este umbral de heteroplasmia dependerá de la mutación y del tipo celular afectado (219),

aunque normalmente es mayor del 80 % sugiriendo que las mutaciones en el mtDNA serían haploinsuficientes o recesivas (218,219).

A pesar de que no pudimos obtener clones de ambos cíbridos con los mismos porcentajes de deleción, los niveles obtenidos nos permitieron determinar que el umbral de heteroplasmia a partir del cual se observa efecto patológico en la función OXPHOS se situaba sobre el 70 %, independientemente del tamaño de la deleción. Este resultado es coherente con las estimaciones hechas por otros autores, que lo sitúan en torno al 75 % al analizar la traducción mitocondrial en cíbridos derivados de pacientes con síndrome de Pearson (125). Nuestros cíbridos mostraron niveles normales del ATP mitocondrial y de consumo de oxígeno cuando el porcentaje de deleción era del 60 %, en concordancia con los datos reportados por otros autores (92). Sin embargo, con esa heteroplasmia observamos un defecto específico de la actividad y cantidad de complejo IV, similar a lo descrito por Hayashi *et al.* en cíbridos portadores de deleción en el mtDNA (91). Por tanto, y a pesar de presentar un defecto importante de la actividad de ese complejo, las células con un 60 % de las moléculas de mtDNA delecionadas serían capaces de desarrollar una función mitocondrial normal sin mostrar fenotipo patológico. Además, el cíbrido PS1 no presentó defecto de COX cuando el nivel de heteroplasmia era del 45 %, lo que indicaría que solamente requieren la mitad de las moléculas de mtDNA completo para la correcta función de este complejo.

Otro parámetro relevante en la función mitocondrial es el potencial de membrana interna mitocondrial, el cual se genera gracias al flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, y es esencial para la síntesis de ATP por parte del complejo V o ATP sintasa. Por tanto, es esperable que una mutación mitocondrial que afecta a la ETC provoque una disminución de este potencial (84,129,220). Sin embargo, los cíbridos PS generados y caracterizados en esta tesis, no mostraron siempre una caída del potencial, y cuando lo hicieron, ésta no fue proporcional al nivel de heteroplasmia. De hecho, el cíbrido PS1 con un 90 % de deleción mostró un potencial de membrana superior a la línea control, incoherente con los niveles de ATP mitocondrial; y el cíbrido PS2, mostró una caída del potencial en todos los niveles de heteroplasmia. Estos resultados indicarían que el potencial de membrana no sería el único mecanismo regulador de la producción de ATP mitocondrial en estos cíbridos. Además, se ha descrito que las células con una ETC deficiente serían capaces de revertir la actividad de la ATP sintasa, utilizando el ATP glucolítico, para bombear protones al espacio intermembrana, y así mantener el potencial necesario para diferentes funciones, como la importación de proteínas codificadas en el DNA nuclear (221). Por tanto, la línea PS1 podría estar experimentando este efecto, lo que sería

coherente con la caída de ATP mitocondrial observada. No obstante, puesto que los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8* codifican subunidades de F_0 de este complejo, la capacidad de los cíbridos de llevar a cabo este mecanismo sería limitada, especialmente en la línea PS2 por tener ambos genes totalmente implicados en la delección.

Asimismo, se ha propuesto que el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un mecanismo asociado con la disfunción de la cadena respiratoria, y en parte responsable del deterioro celular observado en patologías mitocondriales (222,223). No obstante, no sería un fenómeno constante ya que se han descrito cíbridos con mutaciones puntuales en el mtDNA que experimentan o no este aumento (99,224). A pesar de que diferentes autores han reportado un aumento de la producción de ROS en cíbridos portadores de delecciones en el mtDNA (223,225,226), nuestros cíbridos no mostraron mayores niveles cuando presentaban porcentajes elevados de heteroplasmia, e incluso se observó una disminución al comparar con los controles sin delección. Esto podría deberse a la menor cantidad de cadenas transportadoras de electrones completas y funcionales que contienen estas células. En este sentido, se ha descrito la inhibición de la producción de ROS en células ρ^0 , carentes de mtDNA (223). Al mismo tiempo, los cíbridos portadores de la heteroplasmia más alta tampoco parecen experimentar un aumento de la mitofagia, lo que podría deberse a que la capacidad respiratoria de las mitocondrias se encuentra considerablemente reducida, evitando la acumulación de ROS y el daño de la membrana mitocondrial interna, recordando lo propuesto por la teoría de “la supervivencia del más lento” para explicar la expansión clonal del mtDNA mutado (85).

4.5. La presencia de una delección en el mtDNA provoca alteraciones graves en la ultraestructura mitocondrial

Las células modifican la forma mitocondrial y la organización de las crestas mediante mecanismos de fusión y fisión para adaptarse a los requerimientos energéticos, por lo que es común observar diferentes morfologías mitocondriales en células sanas, por ejemplo por una privación de nutrientes (2), y en células con patologías mitocondriales (107–111). Mediante microscopía electrónica se analizó la morfología ultraestructural de las mitocondrias en los diferentes modelos portadores de delección en el mtDNA. Como era de esperar, nuestros modelos, que presentan una grave alteración del sistema OXPHOS, mostraron numerosas alteraciones ultraestructurales, aunque de nuevo dependientes del tipo celular analizado.

Tanto fibroblastos como cíbridos portadores de altos niveles de delección, mostraron mitocondrias características de células senescentes, agrandadas e hinchadas, con una red de crestas muy pobre y desorganizada, y una matriz con poca densidad de electrones (106). Además, muchas de ellas manifestaron inclusiones paracristalinas, crestas formando compartimentos internos aberrantes, a veces con diferente electrodensidad, y estructuras con forma concéntrica sin contacto con la membrana mitocondrial interna, formando las denominadas “mitocondrias con forma de cebolla”. Estas características ya habían sido descritas previamente en músculo de pacientes con diferentes patologías mitocondriales causadas por mutaciones puntuales como MELAS o MERRF, y por delecciones, como CPEO (110,111). En algunos casos, especialmente en los fibroblastos PS, se observaron mitocondrias ramificadas e interconectadas, un mecanismo de supervivencia normalmente detectado en células en cultivo sometidas a estrés (4). Asimismo, el cíbrido PS2 con alto nivel de heteroplasmia también mostró conexiones estrechas entre mitocondrias, denominadas “nanotuneles”, que se han propuesto como un mecanismo de cooperación entre mitocondrias con poca movilidad y con una reducida capacidad de fusión (227). Además, dichas alteraciones serían dependientes del nivel de heteroplasmia, ya que observamos mayor aparición de mitocondrias aberrantes conforme se incrementa el porcentaje de delección en ambos cíbridos PS. De la misma forma, los fibroblastos PS2 con un 50 % de heteroplasmia presentaron mitocondrias con una morfología normal, principalmente tubular, y una correcta distribución de las crestas, totalmente diferentes a las observadas en la misma línea con un 93 % de delección. Por tanto, si las alteraciones morfológicas se deben a la disfunción del sistema OXPHOS, quizás también sería posible definir un nivel umbral de heteroplasmia a partir del cual aparecen las modificaciones en la ultraestructura mitocondrial, probablemente cercano al umbral bioquímico establecido para estas delecciones.

Una posible explicación de las alteraciones observadas en las crestas podría ser la implicación en la delección, total o parcial, de las subunidades de la ATP sintasa codificadas en el mtDNA, ya que se ha descrito que la dimerización de este complejo resultaría esencial para el correcto plegamiento de las crestas (228). De hecho, la inestabilidad del complejo V en presencia de delecciones quedó reflejada al aparecer subcomplejos cuando analizamos su actividad en fibroblastos PS mediante la técnica de BlueNative-PAGE.

En cambio, la caracterización de la afectación ultraestructural de las mitocondrias en células iPS portadoras de delección resultó más compleja, ya que este tipo celular presenta una morfología mitocondrial inmadura, probablemente debido a su metabolismo glucolítico (55,229). No obstante, se observó una ultraestructura ligeramente menos desarrollada en las líneas

mutantes. Quizás la menor dependencia de estas células por la fosforilación oxidativa evita la aparición de alteraciones morfológicas graves a pesar de presentar un sistema OXPHOS defectuoso como consecuencia de una delección en el mtDNA en alto nivel de heteroplasmia.

4.6. La delección en el mtDNA influye negativamente sobre la reprogramación y la diferenciación de las células iPS

En los diferentes experimentos de reprogramación llevados a cabo en esta tesis, obtuvimos dos clones de células iPS de PS1 con un 75 % de delección y un clon de PS2 *wild-type* a partir de fibroblastos con una heteroplasmia muy alta. Esta segregación de la heteroplasmia durante la reprogramación también fue observada por otros autores que generaron iPSCs portadoras de mutaciones y delecciones en el mtDNA (84,89,230), y se debería a la reducción del número de copias y a la expansión clonal de células que tiene lugar durante la reprogramación nuclear (231). Puesto que cada clon se obtiene de una única célula, la heteroplasmia estaría sometida a un importante cuello de botella, de modo que permitiría obtener líneas de células madre pluripotentes sanas derivadas del paciente para una potencial terapia celular. Lamentablemente, no siempre se consiguen clones con mtDNA *wild-type*, como en el caso de nuestra línea PS1, o en otros estudios publicados por otros autores (232).

Las células iPS son principalmente glucolíticas, en cambio, las células diferenciadas utilizan la fosforilación oxidativa para la producción de ATP, por lo que es esperable que la inhibición del sistema OXPHOS provoque un efecto negativo sobre la diferenciación (233). En este sentido, algunas líneas de células iPS portadoras de mutaciones en el mtDNA han manifestado dificultades para generar tipos celulares diferenciados y maduros (234). No obstante, también se ha descrito que células rho⁰, como las de neuroblastoma SH-SY5Y, carentes de mtDNA y con un sistema OXPHOS defectuoso, son capaces de diferenciarse correctamente a neurona en presencia de glucosa en exceso y uridina (131). A pesar de que nuestros resultados también demuestran que en esas condiciones de cultivo las células iPS portadoras de la delección común tienen capacidad de diferenciarse a las tres capas germinales y a determinados tipos celulares, el proceso se desarrolló con dificultad y manifestaron diferencias significativas en la expresión de marcadores de diferenciación con respecto a una línea control sin mutación en el mtDNA.

La anemia sideroblástica y la disfunción del páncreas exocrino son los principales síntomas que manifiestan los pacientes con síndrome de Pearson (88). Sin embargo, parece que la delección estaría presente de manera ubicua en el organismo, según los resultados obtenidos al analizar diferentes tejidos del paciente PS2 fallecido con esta enfermedad. Aunque el nivel de

heteroplasmia o las particularidades del tipo celular podrían determinar el fenotipo frente a una misma mutación (69), no se conocen los mecanismos por los cuales estos tejidos están mayoritariamente afectados. Por su parte, el *pool* de células madre hematopoyéticas (HSCs), localizadas en la médula ósea, se genera durante el desarrollo embrionario para llevar a cabo la hematopoyesis durante el resto de la vida (235). Las HSCs se mantienen quiescentes y tienden a producir energía mediante una glucólisis anaeróbica, ya que se localizan en ambientes con baja concentración de oxígeno (236). Cuando se activan, las células progenitoras son capaces de inducir todos los tipos de células sanguíneas en un proceso dependiente del sistema OXPHOS, por lo que un mal funcionamiento mitocondrial conlleva una proliferación y diferenciación aberrante de estas células (237). Quizás el ambiente de hipoxia y los bajos niveles de ROS podrían favorecer la expansión clonal de las moléculas de mtDNA delecionadas en las células HSCs de pacientes e inducir la aparición de las alteraciones hematopoyéticas. No obstante, es frecuente observar una reversión de la anemia durante los primeros años de vida de pacientes con síndrome de Pearson que simultáneamente experimentan una reducción de la heteroplasmia en sangre. Otros autores han propuesto que la recuperación del fenotipo observada en pacientes portadores de la mutación m.14674 T>C durante la infancia, estaría influenciada por mutaciones en genes nucleares (238). Aunque la reversión del fenotipo no es una característica frecuente de las patologías mitocondriales, comprender los mecanismos celulares que inducen este proceso permitiría desarrollar nuevas terapias y tratamientos (239). De forma análoga a nuestro estudio, Cherry *et al.* no observaron diferencias importantes en el número de unidades formadoras de colonias (CFU) tras la diferenciación hematopoyética de células iPS portadoras de deleción (89). Si bien, nosotros detectamos una menor capacidad de éstas para formar CFUs-GEMM, el tipo más grande y con mayor capacidad progenitora, a pesar de presentar un nivel de heteroplasmia por debajo del 30 %. Además, aunque el porcentaje de deleción inicial se situó por debajo del 50 %, éste se redujo durante la diferenciación lo que recordaría a la pérdida de heteroplasmia observada en sangre de pacientes con síndrome de Pearson.

Por otra parte, la afectación del páncreas exocrino no es un síntoma habitual observado en pacientes con otras patologías mitocondriales (240). Curiosamente, la insuficiencia del páncreas exocrino, junto con el daño pulmonar crónico, son las manifestaciones clínicas principales de la fibrosis quística, una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (241). Aunque está originada por mutaciones en el gen *CFTR* (del inglés, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), la afectación de las células secretoras del tejido pancreático cursa por la alteración de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y por el funcionamiento deficiente de la ETC, disminuyendo

los niveles de ATP disponibles (241,242). Además de la disfunción de la proteína CFTR, estas células presentan una menor actividad del complejo I mitocondrial y menor expresión del gen *MT-ND4* (241), normalmente implicado en las deleciones causantes del síndrome de Pearson. Quizás la afectación de genes del complejo I, como *MT-ND4*, podría subyacer tras la disfunción pancreática observada en ambas patologías. De hecho, la gran influencia de la deleción en este tejido se reflejó en los problemas observados durante esta tesis para la diferenciación de las células iPS PS1 con alto nivel de heteroplasmia a este tipo celular, procedimiento que no se ha descrito previamente. Además, también se observó atrofia en el estudio anatómo-patológico del tejido pancreático realizado tras el fallecimiento del paciente PS2.

Por otro lado, las células iPS portadoras de deleción fueron capaces de diferenciarse a neurona, como ya había sido descrito previamente por Russel *et al.* (84). Sin embargo, nuestro estudio evidenció que las neuronas mutantes mostraban diferencias significativas con una línea control, tanto en la morfología como en la expresión de diferentes marcadores de diferenciación analizados a nivel de mRNA y proteína. Además, no se observaron variaciones importantes en el porcentaje de heteroplasmia que se mantuvo alto, en contra de la polarización de la deleción observada por Russel *et al.* en las neuronas diferenciadas (84). Asimismo, los cardiomiocitos derivados de las iPSCs PS1, no fueron capaces de inducir latidos de manera espontánea, a diferencia de la línea control sin mutación, y mostraron niveles de expresión de marcadores de diferenciación significativamente inferiores. Se trata de un tejido con altos requerimientos energéticos, por lo que la importante reducción de los niveles de ATP mitocondrial en la línea mutante por la disfunción del sistema OXPHOS impediría la inducción de movimientos contráctiles característicos de los cardiomiocitos diferenciados. Aunque hasta el momento no se han publicado resultados sobre cardiomiocitos derivados de células iPS portadoras de deleción en el mtDNA, otros estudios realizados con mutaciones puntuales, como m.13513 G>A o m.3243 A>G, han revelado que la capacidad de diferenciación depende del nivel de heteroplasmia (232), y que la disfunción mitocondrial inhibe la maduración y la supervivencia de neuronas y cardiomiocitos derivados de iPSCs (234). Además, la diferenciación neuronal se acompañaría de un aumento de la muerte celular *in vitro*, fenómeno que no se observa *in vivo*, probablemente debido a la interacción de las neuronas con otros tipos celulares como los astrocitos, más dependientes de la glucólisis, y por tanto, menos afectados por el mal funcionamiento del sistema OXPHOS (234). En este sentido, el diferente entorno de la célula diferenciada *in vitro* e *in vivo* podría modificar el umbral patológico de la deleción, aumentando la tolerancia y permitiendo así el desarrollo de los diferentes tejidos de un paciente portador de deleción en el mtDNA de manera generalizada.

4.7. Posibles tratamientos para patologías causadas por deleciones en el mtDNA

El tratamiento de las patologías mitocondriales normalmente es inespecífico y paliativo, ya que se centra en reducir los síntomas para mejorar la calidad de vida de los pacientes, pero sin alcanzar un efecto definitivo (115). Por tanto, el desarrollo de terapias especializadas y personalizadas es uno de los principales objetivos de la investigación en este campo. Puesto que las patologías mitocondriales presentan fenotipos muy diversos, resulta esencial el desarrollo de modelos concretos o específicos para el estudio de tratamientos. Gracias a la disponibilidad de diferentes modelos celulares portadores de deleciones en el mtDNA, en esta tesis se ha podido realizar una aproximación *in vitro* de tratamientos propuestos para pacientes con patologías mitocondriales.

La dieta cetogénica es uno de los más prometedores y está basada en la restricción de carbohidratos para favorecer la movilización y el aporte energético de los lípidos y los cuerpos cetónicos. En el año 2004, Santra *et al.* describieron que el tratamiento *in vitro* con cuerpos cetónicos de cíbridos portadores de una deleción en el mtDNA de 1,9 kb, provocaba un cambio intra e intercelular de la heteroplasmia y un aumento del 10-20 % en la proporción del mtDNA completo (162). Posteriormente, demostramos que el tratamiento también conseguía reducir significativamente la heteroplasmia de la mutación m. 13094 T>C, causante de la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), en cíbridos y fibroblastos (163). Asimismo, otros autores han descrito que el tratamiento con β -hidroxibutarato (BHB) provoca un aumento de la biogénesis mitocondrial en fibroblastos humanos sin patología mitocondrial (160). Tras varios ciclos de tratamiento, nuestros modelos de fibroblastos y cíbridos PS también reflejaron una reducción progresiva y significativa del porcentaje de heteroplasmia, hasta alcanzar incluso niveles inferiores al umbral patológico establecido, independientemente del tamaño de la deleción. Además, a pesar de que las líneas PS1 y PS2 mostraron diferentes tendencias de variación de los niveles de mtDNA con el tratamiento, ambas experimentaron un incremento de las moléculas de mtDNA completas junto con la caída de la deleción, lo que podría conllevar una mejora de la función celular. A fin de confirmar este beneficio, sería interesante analizar si el tratamiento provoca un aumento de los niveles de ATP mitocondrial y del consumo de oxígeno en las células PS. No obstante, y a pesar de mostrar una mejora en la fuerza muscular tras 2 años y medio, pacientes de miopatía mitocondrial con oftalmoplejía progresiva lateral (PEO) que siguieron una dieta Atkins modificada (rica en grasas y baja en carbohidratos) mostraron fuertes dolores musculares y diferentes problemas que provocaron la finalización del estudio de forma prematura (165). En este sentido, observamos que el tratamiento con cuerpos cetónicos

también afectó considerablemente a la viabilidad celular de los fibroblastos PS. Por tanto, nuestros resultados y los de otros autores indicarían que la dieta cetogénica podría ser una estrategia de tratamiento útil para determinadas patologías mitocondriales, como el síndrome de Pearson, pero el protocolo para su aplicación debería ser estudiado de forma específica para reducir los efectos secundarios provocados en el paciente.

Por otro lado, el suplemento de ácido fólico ha sido propuesto por numerosos autores como estrategia para la mejora del fenotipo asociado a disfunción mitocondrial (152,153,243,244). Además, se ha demostrado que la deficiencia o la baja concentración de folato *in vitro* e *in vivo* provoca inestabilidad genómica que se manifiesta en la aparición de roturas e hipometilación en el DNA, deleciones en el mtDNA, apoptosis, etc (145). En un estudio realizado en ratas se observó que la privación de folato en la dieta durante cuatro semanas aumentaba significativamente la frecuencia de aparición de la deleción común en el mtDNA y disminuía el número de copias de mtDNA en diferentes tejidos (149,150). Sin embargo, nosotros no observamos la aparición de deleciones en fibroblastos control mantenidos durante un mes en medio de cultivo en ausencia de ácido fólico. No obstante, para elucidar posibles influencias del fondo genético y el tipo celular, sería interesante ampliar el estudio empleando mayor número de líneas control y modificando el tiempo de incubación. Por otro lado, el tratamiento prolongado con ácido folínico revirtió la leucoencefalopatía y normalizó los niveles de 5-MTHF en el fluido cerebroespinal de algunos pacientes con KSS (152,153). Sin embargo, aunque no se han descrito efectos secundarios negativos, no todos los pacientes tratados experimentaron una mejora del fenotipo (153), por lo que resulta imprescindible profundizar en el estudio de los efectos de esta vitamina para su empleo como tratamiento de patologías mitocondriales. En esta tesis se ha descrito como la adición de ácido fólico no induce una reducción pronunciada de la heteroplasmia de la deleción ni un aumento generalizados de los niveles de mtDNA completo, pero provoca un aumento de ATP mitocondrial en fibroblastos control y PS. Dada la participación de las vitaminas del tipo B en el metabolismo mitocondrial (146), y puesto que el déficit de ATP es la principal causa de las patologías mitocondriales, este tratamiento podría tener efectos beneficiosos en pacientes con síndrome de Pearson. Según nuestros resultados, el aumento de ATP no se debería a una mayor estabilidad del complejo V ni a una mayor expresión de genes codificados en el genoma mitocondrial, que sorprendentemente se reducen. Algunos autores han descrito una disminución de los niveles de ROS mediante el tratamiento con ácido fólico, por lo que sería interesante su estudio en células portadoras de deleción en el mtDNA (245). Por otro lado, la adición de otro antioxidante como el ácido ascórbico consiguió potenciar el incremento de ATP provocado por el ácido fólico en determinadas condiciones. Sin

embargo, no se profundizó en este estudio porque los resultados fueron muy variables y en la bibliografía se recogen efectos contradictorios del suplemento con esta vitamina (142). Además, se ha demostrado que el suplemento con ácido fólico durante el embarazo previene defectos del tubo neural en el feto, y en estudios realizados *in vitro*, se ha observado que la presencia de ácido fólico en exceso favorece la diferenciación de células madre neurales a neuronas frente a astrocitos (148). En ese sentido, observamos un incremento significativo de la expresión de *TUBB3* en neuronas diferenciadas a partir de células iPS portadoras de la delección común en presencia de ácido fólico en exceso (12 μ M). Aunque no detectamos una disminución de la heteroplasmia, sería interesante la realización de estudios funcionales para comprobar si el aumento de expresión de *TUBB3* se acompaña de una mejora en la actividad neuronal.

Por otra parte, el correcto balance de dNTPs en la mitocondria es un factor clave en el mantenimiento y la estabilidad del mtDNA, por lo que es común observar depleción y deleciones múltiples en células portadoras de mutaciones en genes implicados en las rutas de síntesis, como *TK2* o *DGOUK* (167). Numerosas publicaciones demuestran como el tratamiento con desoxirribonucleósidos consigue mejorar el fenotipo patológico en modelos *in vitro*, *in vivo* e incluso, en pacientes (167–169). En nuestro estudio, a pesar de no observar una disminución de la heteroplasmia en los fibroblastos PS tratados con desoxirribonucleósidos, las células experimentaron un incremento significativo de los niveles de mtDNA completo que podría aumentar la disponibilidad de cadenas respiratorias funcionales. Sin embargo, los resultados obtenidos no aclararon si este efecto se inducía por el suplemento de dNs o, simplemente por el mantenimiento de las células en estado de quiescencia, ya que en este estado las células no se dividen, por lo que todos los dNTPs disponibles se destinan a la síntesis de nuevo mtDNA. Para continuar con el estudio, sería de nuevo interesante analizar si el incremento de copias de mtDNA *wild-type* se produce en otros tipos celulares tras el tratamiento con dNs, y si éste incremento, como sería de esperar, provoca una mejora a nivel funcional.

4.8. Perspectivas futuras

El proyecto en el que se enmarca esta tesis tiene como objetivos principales el estudio de los mecanismos fisiopatológicos del síndrome de Pearson, y otras patologías causadas por deleciones en el mtDNA, y el desarrollo de posibles tratamientos. La diversidad de modelos celulares generados, junto con algunos de los resultados mostrados, permiten plantear nuevas estrategias para profundizar en los objetivos propuestos (figura 4.1).

En primer lugar, puesto que hemos observado deficiencias en la diferenciación de las células iPS PS1, queremos continuar analizando los mecanismos fisiopatológicos de la delección en cada uno de los tipos celulares generados, mediante la realización de estudios funcionales a nivel celular, y del sistema OXPHOS en particular. Esto nos permitirá conocer las consecuencias de la delección sobre la función de cardiomiocitos, células hematopoyéticas, neuronas y células secretoras del páncreas exocrino, y analizar de forma más precisa e individualizada el efecto de diferentes tratamientos sobre cada tipo celular, con el fondo genético nuclear y mitocondrial del paciente PS1. Entre estos tratamientos, destacamos el suplemento de ácido fólico como uno de los más prometedores, ya que además de inducir un aumento evidente del ATP mitocondrial, obtuvimos resultados interesantes en el estudio realizado sobre la diferenciación neuronal de células iPS PS1. Además, para una mejor validación de los resultados, se incluirán en los estudios un mayor número de clones tanto de líneas control como de mutantes.

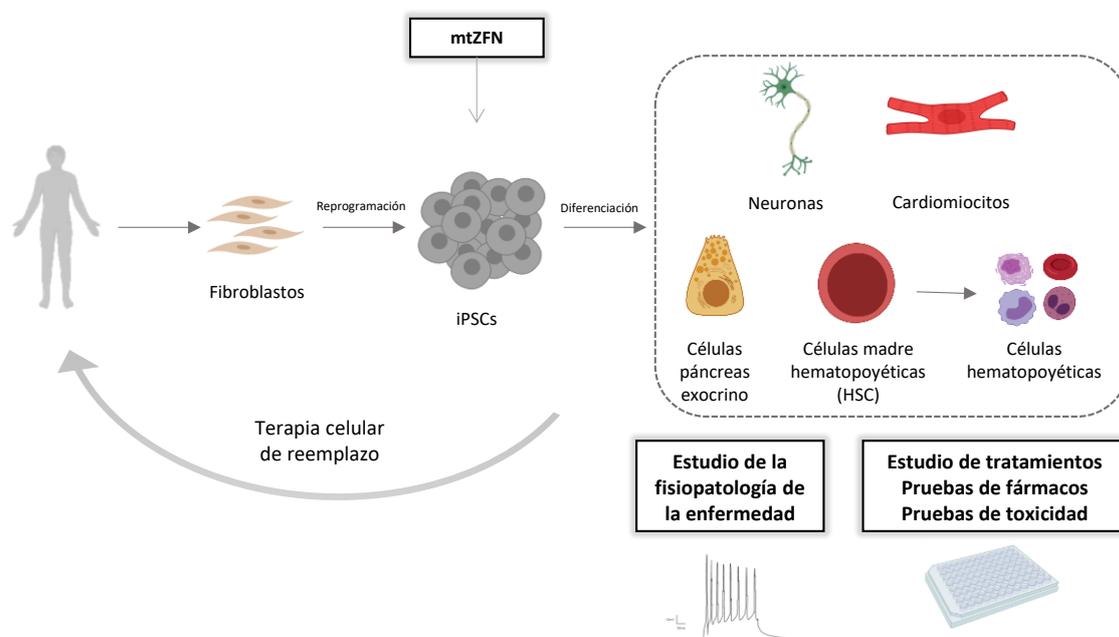


Figura 4.1 Representación esquemática de las perspectivas futuras del proyecto, basadas en las posibles aplicaciones de las células iPS generadas. Figura creada con BioRender.com.

Por otro lado, para tratar de perfeccionar estos estudios, nos planteamos la posibilidad de desarrollar un control isogénico de células iPS del paciente PS1. Para ello, emplearíamos herramientas de ingeniería genética mitocondrial, como los mtZFN específicos para la eliminación de las moléculas de mtDNA con delección común (173). Algunos autores ya han demostrado la posibilidad de manipular genéticamente el mtDNA en células iPS y ovocitos, como Yang *et al.* que consiguieron reducir la carga de mutación m.3243 A>G mediante el empleo de mitoTALENs específicos (246). Además de permitir alcanzar conclusiones más precisas sobre

Discusión

los beneficios de un tratamiento, estas líneas de iPSCs isogénicas ofrecen la posibilidad de desarrollar una terapia celular regenerativa.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han extraído de la realización de esta tesis doctoral son:

1. La presencia de una delección única en el mtDNA altera significativamente la función OXPHOS y la ultraestructura mitocondrial en los diferentes modelos celulares caracterizados, siendo el nivel de heteroplasmia un factor determinante sobre el fenotipo patológico observado.
2. La biogénesis mitocondrial no es un mecanismo general de respuesta frente a las deleciones en el mtDNA, ya que depende del fondo genético de cada línea, y del tipo celular y su perfil metabólico. No obstante, todos los modelos celulares experimentan un incremento significativo de la cantidad de mtDNA total, si bien la mayoría de las nuevas moléculas generadas presentan la delección por lo que no consiguen revertir el efecto patológico.
3. El umbral de heteroplasmia causante de efectos patológicos a nivel mitocondrial se sitúa en torno al 70 %, independientemente del tamaño de la delección.
4. La presencia de un alto porcentaje de delección reduce la capacidad de diferenciación de las células iPS a diferentes tipos celulares. Concretamente, se observa una reducción significativa de la expresión de marcadores de diferenciación y una alteración del fenotipo celular maduro en neuronas y cardiomiocitos. Además, a excepción de la diferenciación neuronal, el porcentaje de heteroplasmia disminuye durante la diferenciación a cardiomiocitos, células hematopoyéticas y células del páncreas exocrino.
5. El tratamiento de células portadoras de delección con ciclos sucesivos de cuerpos cetónicos, en concreto de β -hidroxibutarato, y períodos de recuperación, consigue reducir el nivel de heteroplasmia por debajo del umbral patológico y aumentar el número de copias de mtDNA completo.
6. El tratamiento con ácido fólico a una concentración de 12 μ M provoca una mejora de la función OXPHOS en células controles y mutantes, que se manifiesta en un aumento de la producción de ATP mitocondrial. Además, podría potenciar la diferenciación neuronal de las células portadoras de delección.

Conclusiones

7. La corrección de la anemia observada en un paciente PS correlaciona con la caída del porcentaje de deleción en sangre.
8. Todos los tejidos analizados de un paciente PS fallecido presentan una alta heteroplasmia y manifiestan alteraciones histológicas graves.

MATERIAL Y MÉTODOS

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y líneas celulares

En el presente trabajo se utilizaron muestras de diferentes tejidos de pacientes con deleciones en el mtDNA que fueron cedidas por diferentes hospitales y que se recogen en la tabla 6.1.

Tabla 6.1 Listado de las muestras de biológicas.

Muestra	Código paciente	Sexo	Tejido	Hospital de origen	Otros
1	2995	M	Varios	H. Miguel Servet	
2	3089	M	Varios	H. La Paz	
3	274	M	sangre	H. Vall d'Hebron	
4	358	F	sangre	H. Miguel Servet	
5	816	F	sangre	Clínica Pediátrica Catania	
6	2530	F	sangre	H. La Fe	
7	2712	M	sangre	H. Sant Joan de Déu	
8	2848	M	sangre	H. Miguel Servet	
9	3158	M	orina	U. Pablo de Olavide	
10	2531	F	sangre	H. La fe	Madre de 2530
11	2887	F	sangre	H. Miguel Servet	Madre de 2848
12	2968	F	sangre	H. Sant Joan de Déu	Madre de 2712
13	3229	F	sangre	Particular	Madre de 2995

Sin embargo, la mayor parte del trabajo de esta tesis se ha centrado en el estudio de dos pacientes con deleciones de diferente tamaño en el mtDNA, y de los que dispusimos de muestras de diferentes tejidos:

- Paciente 2995 (PS1): portador de la deleción común de 4977 pares de bases (8469-13447). Dispusimos de 5 muestras de sangre para el seguimiento de la heteroplasmia de la deleción a lo largo del tiempo, 1 muestra de orina, 1 muestra de mucosa bucal y fibroblastos.
- Paciente 3089 (PS2): portador de una deleción de 6514 pares de bases (6897-13411). Dispusimos de muestras de músculo, hígado, riñón, pulmón, páncreas, piel, grasa, bazo, cerebro y fibroblastos.

Además, también se utilizaron diferentes modelos celulares generados en el desarrollo de esta tesis para el estudio del síndrome de Pearson. El tipo de línea celular y su origen se recogen en la siguiente (tabla 6.2):

Tabla 6.2 Líneas celulares empleadas.

Células	Paciente	Nomenclatura	Origen
Fibroblastos	Control de 5 años	FbC 5a	Obtenidos de biopsias de piel de pacientes (apartado 6.3.9)
	Control de 1 mes	FbC 1m	
	2995	Fb PS1	
	3089	Fb PS2	
Osteosarcoma 143b rho ⁰		143b rho ⁰ o ρ ⁰	Línea tumoral derivada de osteosarcoma humano y carente de mtDNA
Cíbridos o híbridos transmitocondriales	2995	CIB PS1	Generadas a partir de la fusión de plaquetas o fibroblastos enucleados de pacientes con células rho ⁰ de osteosarcoma 143b (apartado 6.3.10)
	3089	CIB PS2	
Células pluripotentes inducidas humanas (hiPSC)	Control de 1 mes	iFb Control o iFbC	Generadas mediante la reprogramación de fibroblastos obtenidos de pacientes e individuos controles (apartado 6.3.12)
	2995	iFb PS1	
	3089	iFb PS2	

6.2. 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, Biological Industries, StemCell™ Technologies y Panreac®.

6.3. Cultivos celulares

6.3.1. Medios, reactivos, materiales y equipos de cultivo celular

En el cultivo de células se emplearon diferentes medios y suplementos: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 4,5 g/l (25 mM), DMEM 1 g/l (5 mM), DMEM libre de glucosa, *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI 1640 Medium) con y sin ácido fólico, tampón fosfato (PBS), suero fetal bovino (SFB) y suero fetal bovino dializado (dSFB) de Gibco™ ThermoFisher Scientific, y uridina, galactosa y piruvato de Sigma-Aldrich.

Durante la generación y el mantenimiento de las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) se utilizó además *KnockOut™* DMEM/F-12, *Dulbecco's* PBS (DPBS) sin calcio ni magnesio, suero fetal bovino (SFB) *ES Cell-Qualified*, *KnockOut™ Serum Replacement* (KSR), GlutaMAX™ -I, MEM aminoácidos no esenciales (NEAA), factor de crecimiento para fibroblastos básico humano recombinante (bFGF), medio y suplemento *Essential 8™* y *Essential 8™ Flex*,

fibroblastos embrionarios inactivados (ICR) de ratón, vitronectina truncada humana recombinante (VTN-N), Penicilina-Streptomina de Gibco™ ThermoFisher Scientific, β -mercaptoetanol y gelatina de Sigma-Aldrich, y *NutriStem*® *hPSC XF* de Biological Industries.

Además de éstos, para la diferenciación de las células iPS a los diferentes tipos celulares se empleó el medio PSC Neural Induction, medio Neurobasal™, DMEM/F-12 Advanced, DMEM/F-12 con HEPES, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF), suplemento StemPro™, suplemento B27™, suplemento N2, suplemento *CultureOne*™, proteína FGF7 recombinante humana (KGF), sustrato *CELLstart*™, proteína laminina natural de ratón, *Dulbecco's PBS* (DPBS) con calcio y magnesio de Gibco™ ThermoFisher Scientific; inhibidor ROCK Y27632, poli-L-ornitina, gel ECM, ácido ascórbico, Activina A, péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), ácido retinoico y nicotinamida de Sigma-Aldrich; Matrigel® apto para hESC de Corning®; y los kits de *STEMdiff*™ *Hematopoietic*, *STEMdiff*™ *Cardiomyocyte Differentiation and Maintenance* y *MethoCult*™ *SF* de StemCell™ Technologies.

Para la disociación de las células se utilizó *TrypLE*™ *Express* y *StemPro*™ *Accutase*™ de ThermoFisher Scientific y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de Biological Industries. Para la congelación de las células se empleó el crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich.

El material plástico estéril empleado (placas de cultivos, tubos Falcon, pipetas, criotubos, etc.) y los filtros de jeringa Acrodisc® GHP de 0,22 μ m de tamaño de poro utilizados para la esterilización de soluciones procedieron de TPP®. Se emplearon también jeringas de diferente volumen de la casa BD. Para el ensayo de formación de cuerpos embrioides se emplearon placas de 96 pocillos con fondo en V de Deltalab. Para el ensayo formador de colonias hematopoyéticas (CFU) se emplearon placas *SmartDish*™ de StemCell™ Technologies. El material de vidrio usado en la manipulación de las células se esterilizó a 121 °C en un autoclave durante 30 minutos a 1 atmósfera de presión.

El trabajo con líneas celulares fue realizado en campanas de flujo laminar vertical, modelos LaminAir y NU-437-400E de las marcas Holten y Nuaire, respectivamente. Las líneas celulares se mantuvieron durante su crecimiento en incubadores a 37°C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂, modelos DHD AutoFlow Incubator de la marca Nuaire. Las células se visualizaron en un microscopio invertido modelo DMIL, de la marca Leica. Para la obtención del pellet celular se empleó una centrifuga Allegra X-22 de Beckman Coulter.

6.3.2. Matrices de crecimiento

6.3.2.1. Gelatina

Las placas de cultivo cubiertas con gelatina (Sigma-Aldrich) se emplearon durante la generación de las líneas iPSCs y en alguna de las diferenciaciones realizadas. Para ello, se preparó una dilución al 0,1 % de gelatina en agua adecuada para cultivos celulares. Esta solución se esterilizó en el autoclave a 121 °C, 15psi durante 30 minutos y se conservó en nevera hasta su uso. Las placas de cultivo se recubrieron con el volumen adecuado de la solución de gelatina (1 ml en pocillos de placas de 6 pocillos, 0,2 ml en placas de 24 pocillos o 6 ml en placas de 100 mm de diámetro) y antes de su uso, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se retiró el volumen de gelatina sobrante.

6.3.2.2. MEFs (Fibroblastos embrionarios de ratón)

Las placas de cultivo con MEFs se emplearon durante la generación de las células iPS y para su mantenimiento durante los primeros pases. Se utilizaron los fibroblastos embrionarios de ratón irradiados de ThermoFisher Scientific. Estas placas se prepararon 1 o 2 días antes de su uso y requieren de un cubrimiento previo con gelatina siguiendo el protocolo del apartado 6.3.2.1. Una vez preparadas, se descongelaron los MEFs introduciendo el criotubo en el baño de agua a 37 °C hasta solo observar un cristal de hielo en el vial. Se pasó su contenido a un falcon de 15 ml, se añadió 1 ml de medio MEF (apartado 6.3.12) para recoger todo el contenido y se añadieron 4 ml de medio MEF al falcon con cuidado y pipeteando varias veces. Se recogieron 10 µl de suspensión celular para el conteo del número de células siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.5. Se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y se resuspendió el pellet en el volumen adecuado de medio MEF para sembrar aproximadamente 50 000 células por cm² para el cubrimiento de toda la superficie y asegurar la correcta adherencia de las colonias de células iPS.

6.3.2.3. Vitronectina

Para el mantenimiento de las células iPS, se cubrieron las placas de cultivo con vitronectina recombinante humana (VTN-N) de ThermoFisher Scientific, a una concentración final de 0,5 µg/cm². Para ello, se hizo una dilución 1:100 de VTN-N en DPBS sin calcio ni magnesio obteniendo el volumen adecuado al tamaño de la placa de cultivo empleada (1 ml en pocillos de placas de 6 pocillos o 6 ml en placas de 100 mm de diámetro), siguiendo las indicaciones del

fabricante. Antes de su empleo, se incubaron las placas con vitronectina a temperatura ambiente durante una hora y se retiró el volumen de vitronectina sobrante.

6.3.2.4. Gel ECM

Las placas de cultivo recubiertas con gel ECM de la casa comercial de Sigma-Aldrich se emplearon en algunas de las diferenciaciones realizadas. Para su preparación, se trabajó con material de cultivo frío (pipetas, placas de cultivo, falcon...). Se descongeló el gel a 2-8 °C durante una noche y se diluyó entre 1:2 y 1:3 en DMEM frío, repartiendo el volumen adecuado según el tamaño de la placa (1 ml en pocillos de placas de 6 pocillos o 6 ml en placas de 100 mm de diámetro). Antes de su empleo, se incubaron las placas durante al menos 1 hora a 37 °C.

6.3.2.5. Matrigel®

Las placas de cultivo recubiertas con Matrigel® de Corning® se emplearon en la diferenciación de las células iPS a cardiomiocitos. Para su manipulación, se trabajó con material de cultivo frío (pipetas, placas de cultivo, falcon...). Se descongeló el vial a 4 °C durante la noche y se prepararon alícuotas que se conservaron a -20 °C hasta su uso. Para la preparación de las placas, se disolvió en DPBS sin calcio ni magnesio, según el factor de dilución indicado por el fabricante. Posteriormente, se cubrió la superficie de las placas con el volumen adecuado (0,5 ml en pocillos de placas de 12 pocillos) y se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Antes de su empleo, se retiró cuidadosamente el volumen sobrante.

6.3.2.6. CELLStart™

Las placas de cultivo recubiertas con *CELLStart™* (ThermoFisher Scientific) se emplearon en la diferenciación neuronal, en concreto en la diferenciación de iPSCs a células madre neurales inducidas (iNSCs), y para el mantenimiento de estas últimas. Para su preparación, se realizó una dilución 1:50 o 1:100 de *CELLStart™* en DPBS con calcio y magnesio, y se cubrió la superficie de la placa con el volumen adecuado (1 ml en pocillos de placas de 6 pocillos o 6 ml en placas de 100 mm de diámetro). Se incubó a 37 °C durante 1 hora y se retiró el volumen sobrante justo antes de su utilización.

6.3.2.7. Laminina y poli-L-ornitina

Las placas de cultivo cubiertas con poli-L-ornitina y laminina se emplearon durante la diferenciación neuronal, en concreto en la diferenciación de células madre neurales inducidas (iNSC) a neuronas. En primer lugar, se recubrió la placa de cultivo con poli-L-ornitina (Sigma-

Aldrich) a una concentración de 20 µg/ml en agua apta para cultivos celulares, y se incubó durante 1 hora a 37 °C (o toda la noche a 4°C). Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua estéril y se añadió laminina (ThermoFisher Scientific) a una concentración de 10 µg/ml en agua apta para cultivos celulares. Se incubó durante 2 horas a 37 °C (o toda la noche a 4°C), se hizo un lavado con DPBS sin calcio ni magnesio, y se dejó sin secar hasta su uso. El volumen empleado se adaptó a la superficie de la placa (1 ml en pocillos de placas de 6 pocillos o 6 ml en placas de 100 mm de diámetro). Se retiró el DPBS justo antes del uso de las placas.

6.3.3. Mantenimiento de los cultivos celulares

Todas las manipulaciones de las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical en condiciones estériles. Las células se cultivaron en ausencia de antibióticos, salvo en algunos procedimientos específicos. El medio se cambió cada dos días en el caso de las líneas de fibroblastos y cíbridos, y diariamente en las células iPS.

Los fibroblastos se crecieron en DMEM 25 mM de glucosa suplementado con 10 % de SFB y uridina (50 µg/ml). Las líneas de cíbridos y las células 143b rho⁰ se mantuvieron en DMEM 25 mM de glucosa suplementado con 5 % de SFB y uridina (50 µg/ml). Para los estudios bioquímicos realizados en fibroblastos y cíbridos, las células se mantuvieron durante al menos 72 horas en medio DMEM 5 mM de glucosa suplementado con el porcentaje de SFB adecuado y uridina (50 µg/ml).

Para el mantenimiento de las líneas hiPSCs se crecieron en placas recubiertas con vitronectina (aparato 6.3.2.3) y se empleó el medio *NutriStem*[®] *hPSC XF* suplementado con uridina (50 µg/ml) y piruvato (hasta 110 µg/ml). También se emplearon los medios Essential 8[™] y Essential 8[™] Flex durante los primeros pases. Todos los medios empleados en el mantenimiento de células iPS se atemperaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Cuando las células alcanzaron aproximadamente un 80 % de confluencia se recogieron y sembraron en placas de cultivo nuevas, lo que se consideró un pase. Para ello, fibroblastos, cíbridos y células rho⁰, se lavaron con PBS para eliminar las proteínas del suero que inhiben el efecto de la tripsina y se incubaron con *TrypLE*[™] *Express* durante 2-3 min a 37 °C. Se comprobó con el microscopio invertido que las células estaban despegadas de la placa y se resuspendieron en un volumen de medio 5 veces mayor que el volumen de tripsina utilizado. A continuación, se recogieron en un falcon y se centrifugaron a 378 x g durante 5 min. Una vez obtenido el pellet, se procesó según el uso final.

Para las iPSCs, se lavaron con DPBS (sin calcio y magnesio) con cuidado para evitar que las células se despegaran, se lavaron con EDTA (0,5 mM) precalentado a 37 °C para retirar iones de Mg^{2+} y Ca^{2+} , y se añadió de nuevo EDTA (0,5 mM) durante 3-4 min a temperatura ambiente. Se retiró la solución de EDTA con cuidado y se añadió el volumen de medio adecuado, pipeteando 3-4 veces para recoger las colonias de células en un falcón de 15 ml con el volumen de medio necesario para la dilución deseada. Para resembrarlas, se añadió directamente el volumen adecuado a las placas preparadas con la matriz de crecimiento correspondiente. Para obtener el pellet, se centrifugaron a 200 x g durante 4 min.

6.3.4. Congelación y descongelación de células

Para la congelación celular se utilizaron criotubos de 2 ml resistentes al nitrógeno líquido. El pellet celular obtenido se resuspendió en medio de congelación. En el caso de los fibroblastos y cíbridos consiste en DMEM suplementado con 20 % de SFB y un 10 % de DMSO, y para las células iPS se suplementó el medio de crecimiento con 20 % de DMSO. A continuación, los criotubos se congelaron inmediatamente en un Mr.Frosty a -80 °C y tras 24 horas se pasaron al tanque de N_2 líquido donde se conservaron hasta su posterior utilización. El sistema de congelación Mr. Frosty consiste en un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isoamílico y que, al ser sometido a congelación, permite un descenso gradual de la temperatura de 1 °C/minuto, lo que favorece una buena conservación celular.

Para la descongelación se tomó un criotubo de células conservado en nitrógeno líquido, en el caso de las iPSCs se introdujo en el baño de agua a 37 °C hasta quedar un pequeño cristal, y el contenido de este se resuspendió en un tubo falcon de 15 ml con medio de cultivo previamente aatemperado. Los fibroblastos y cíbridos se centrifugaron a 378 x g durante 5 min y las iPSCs a 200 x g durante 4 min. El sobrenadante se aspiró para eliminar el DMSO, que resulta tóxico a temperatura ambiente, y el pellet de células obtenido se disgregó con medio de cultivo y sembró en una placa de cultivo adecuada.

6.3.5. Recuento celular

El recuento celular se realizó con el *Countess® Automated Cell Counter* (ThermoFisher Scientific) diseñado para el contaje de células (rango de concentraciones entre 1×10^4 y 1×10^7 células/ml) y la evaluación de su viabilidad utilizando la técnica estándar del azul tripán. El azul tripán es un colorante capaz de penetrar en las células muertas, ya que éstas presentan su membrana plasmática desestructurada. Así, se mezclaron 10 μ l de suspensión celular con la misma cantidad

de azul tripán y se pipetearon en el interior de la cámara desechable por duplicado, de manera que las células fueron contadas de forma automática.

6.3.6. Análisis de contaminación con *Mycoplasma* sp.

Periódicamente, se llevó a cabo el control de contaminación por micoplasma en las líneas celulares utilizadas. Para ello, se recogió una alícuota de 2 ml de medio de cultivo tras 48 horas de contacto con las células y se enviaron al servicio de cultivo celular del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud para su análisis mediante el kit *MycoAlert™ Mycoplasma Detection* de Lonza y el lector Synergy™ HT de BioTek.

6.3.7. Cariotipado de líneas celulares

El análisis citogénético fue realizado en el Laboratorio de Análisis Clínico (MDB) de Barcelona mediante la técnica de bandeo G con tinción Wright y, posteriormente, en el Centro de Análisis Genéticos Citogen de Zaragoza tras el envío de las células en cultivo desde nuestro laboratorio. En todos los casos se intentó analizar entre 20 y 30 metafases por línea celular. La cantidad de cromosomas cuantificados en cada línea celular se reportó como el número modal de las metafases analizadas.

6.3.8. Microscopía electrónica

Para visualizar las células por microscopía electrónica se sembraron a la densidad adecuada en cámaras Lab-Tek® de 8 pocillos de la marca Nunc®. Dicha densidad fue diferente entre las distintas líneas celulares, siendo la ideal entre 25 000 y 35 000 células/pocillo para los fibroblastos, 10 000 células/pocillo para los cíbridos y una confluencia de aproximadamente el 50 % para las iPSCs. Además, en el caso de los fibroblastos y los cíbridos, se mantuvieron previamente durante 72 horas en medio DMEM con glucosa 5 mM.

Para la visualización en el microscopio electrónico, se requirió una fijación previa. En primer lugar se eliminó el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS 0,1 M. El fijador usado fue glutaraldehído al 2,5 % en PB 0,1 M, con el que se incubaron las células durante 5 minutos a 37 °C. Tras este tiempo se sustituyó por glutaraldehído al 2,5 % fresco y se mantuvo durante 1-2 horas a 4 °C. Finalmente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PB 0,1 M y se conservaron las preparaciones en PB 0,1 M con 0,05 % de azida de sodio a 4 °C hasta su procesamiento y visualización. El PB (Tampón de fosfato) 0,2 M se compone de Na₂HPO₄ 0,2M (4X) y NaH₂PO₄ 0,2M (1X).

Las muestras fueron procesadas y visualizadas en el Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos de la Universidad de Zaragoza. Para la visualización se empleó un microscopio de transmisión JEOL 1010 a 80 KV y para la captura de imágenes se utilizó una cámara Gatan Bioscan.

6.3.9. Establecimiento del cultivo de fibroblastos a partir de una biopsia de piel

El cultivo primario de fibroblastos portadores de delección en el mtDNA y controles se estableció a partir del explante de biopsias de piel de pacientes en condiciones estériles, trabajando en campanas de flujo laminar vertical.

En primer lugar, se situó la biopsia en el medio de una placa de cultivo mediante unas pinzas estériles y se diseccionó en pequeñas piezas con dos bisturís. A continuación, con unas pinzas de punta fina, se distribuyeron las piezas de la biopsia de forma homogénea por toda la superficie de la placa, dejando aproximadamente 2 centímetros entre ellas. Antes de añadir el medio de cultivo, se esperaron aproximadamente 2 minutos para favorecer la adhesión de los explantes a la placa de cultivo. Las placas se introdujeron en el incubador a 37 °C y se visualizaron cada día bajo un microscopio óptico invertido, observando la expansión celular a partir de las células de la periferia del explante. Después de una semana, se comenzó a reemplazar el medio cada 2-3 días. Una vez que los fibroblastos alcanzaron la confluencia en la placa, se tripsinizaron y se sembraron en nuevas placas para su expansión y congelación.

6.3.10. Generación de cíbridos

Las líneas cíbridas utilizadas han sido generadas a partir de fibroblastos enucleados siguiendo el protocolo de Bayona-Bafaluy MP *et al.* (247).

Los fibroblastos se descongelaron según se indica en el apartado 6.3.4. Posteriormente, se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por pocillo. Tras 24 horas, se trataron las células con Actinomicina D (Sigma-Aldrich) a $0,5 \mu\text{g/ml}$ durante 15 horas. Se retiró el medio con droga y se lavaron las células con medio DMEM al 20 % de SFB durante 10 minutos.

Las células de osteosarcoma 143b rho⁰ (carentes de mtDNA) se tripsinizaron, contaron y resuspendieron en medio DMEM con 10 % de SFB a una concentración de 5×10^5 células/ml. Se sembraron aproximadamente 1×10^6 de células sobre los fibroblastos enucleados y se dejaron en contacto en el incubador a 37 °C durante 3 horas. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con medio DMEM sin SFB y se añadió 1 ml de polietilenglicol (PEG, de Sigma-Aldrich) al 50 %,

moviendo la placa durante 10 segundos y dejando la solución en contacto con las células durante 60 segundos. Se aspiró la solución y se hicieron 3 lavados con medio DMEM al 10 % de DMSO y un último lavado con DMEM. Finalmente, se añadió medio DMEM al 10 % SFB y uridina (50 µg/ml), y tras 48 horas de incubación, se tripsinizaron y sembraron en placas de 100 mm con el mismo medio. Para asegurar la correcta enucleación de los fibroblastos, se mantuvieron en paralelo algunos pocillos sin fusionar hasta confirmar su muerte.

Cuando la fusión celular alcanzó una confluencia del 100 %, las células se pasaron a dos placas de cultivo y cuando estas a su vez alcanzaron una alta confluencia (más del 80 %), una de ellas se congeló siguiendo el protocolo del apartado 6.3.4, y en la otra se añadió medio selectivo que consistió en medio DMEM con 4,5 g/L de glucosa suplementado con 10 % de SFB dializado y bromodesoxiuridina (100 µg/ml), sin uridina ni piruvato.

El proceso de selección de los híbridos se realizó aproximadamente durante 3 semanas. Durante ese tiempo el medio de cultivo fue renovado periódicamente. Terminado el tiempo de selección, se espera que solo sobrevivan las células que hayan incorporado el mtDNA de los fibroblastos enucleados. Después de este periodo las células deben recuperar sus niveles de mtDNA. Para ello, las células se cultivaron de manera que cada vez que una placa de cultivo alcanzó una confluencia cercana al 100 %, se dobló. Este proceso se repitió de 25 a 30 veces, hasta que se confirmó que los niveles de mtDNA eran normales y constantes.

Durante el proceso de recuperación de los niveles de mtDNA, se congeló un criotubo cada cierto número de doblajes. Alternativamente, también se tripsinizaron para obtener un pellet celular que se congeló a -20 °C y reservó para la extracción de DNA y posterior determinación de los niveles de mtDNA.

6.3.11. Selección clonal de híbridos con diferente porcentaje de heteroplasmia mediante dilución al límite

Una vez generados los híbridos, se procedió a generar clones portadores de diferentes niveles de heteroplasmia a partir de células únicas. Para ello, se recogieron las células de una placa de cultivo al 80 % de confluencia, se centrifugaron y se contaron. Para conseguir una dilución al límite con una buena eficiencia, se sembraron 2 o 4 células por cm², es decir, 300 o 400 células por placa de 150 mm de diámetro en medio DMEM con 5 % de SFB y uridina (50 µg/ml). Las células se distribuyeron correctamente por toda la placa y se mantuvieron a 37 °C renovando el medio una vez a la semana hasta observar la aparición de pequeños clones individuales bajo el microscopio óptico invertido. A continuación, se aislaron estos clones mediante el empleo de

anillos de clonaje de *Sigma-Aldrich*. Brevemente, se retiró el medio y se adicionaron 2-3 ml de PBS, se colocaron los anillos flanqueando los clones mediante la ayuda de unas pinzas estériles, se retiró el PBS del interior de los anillos y se incubaron con 200 µl de *TrypLE™ Express* durante 3-4 minutos. Seguidamente, se recogió el volumen de cada anillo mediante la adición de medio y se transfirieron a diferentes pocillos de placas de 24 pocillos con 0,5 ml de medio suplementado con penicilina-estreptomicina (1X). Cuando las células alcanzaron la confluencia, se tripsinizaron y el pellet obtenido se dividió en dos partes, una de ellas se sembró en un pocillo de placas de 6 pocillos, y la otra se conservó -20 °C para la extracción de DNA y la comprobación del porcentaje de heteroplasma.

6.3.12. Generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs) a partir de fibroblastos

Las células madre pluripotentes inducidas se generaron a partir de fibroblastos, de pase inferior a 4, mediante *Cytotune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit* de ThermoFisher Scientific, siguiendo las indicaciones del fabricante.

En primer lugar, se sembraron los fibroblastos por duplicado en medio MEF en placas de 6 pocillos a la densidad adecuada para tener entre 2×10^5 - 3×10^5 células por pocillo el día de la transducción. El medio MEF estaba compuesto por DMEM 25 mM de glucosa suplementado con 10 % de *SFB ES Cell-Qualified, MEM non-essential amino acids solution (1X)*, β-mercaptoetanol (100 µM) y uridina (50 µg/ml).

El día de la transducción (día 0), se contabilizaron las células en uno de los pocillos del duplicado de cada línea para calcular la cantidad de virus necesario en cada caso, siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez calculado, se descongelaron los tubos de *Cytotune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit* de uno en uno. Para ello, se introdujo el fondo del tubo en un baño de agua a 37 °C durante 5-10 segundos, se dejó descongelar a temperatura ambiente, se dio un pulso de centrifuga y se puso inmediatamente en hielo. Seguidamente, se añadió el volumen óptimo de cada tubo de *Cytotune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit* para cada línea en 1 ml de medio MEF atemperado a 37 °C y se mezcló por pipeteo. En menos de 5 minutos, se aspiró el medio de los pocillos, se añadió la mix a los pocillos correspondientes y se dejaron a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 horas. Tras este tiempo, se reemplazó el medio de cada pocillo por 2 ml de medio MEF fresco. Se repitió este procedimiento cada dos días (días 1, 3 y 5 tras la transducción).

En el día 7, se recogieron las células transducidas para sembrarlas sobre placas cubiertas con MEFs preparadas dos días antes siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.2. Para ello, se lavaron los pocillos una vez con DPBS sin calcio ni magnesio, se trataron con *TrypLE™ Express*

durante 1-3 minutos (a temperatura ambiente y sin sobrepasar el tiempo ya que las células son muy sensibles en este punto) y se recogieron en un tubo falcon de 15 ml con 2 ml de medio MEF. Se centrifugaron a 300 x g durante 4 minutos, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen adecuado de medio MEF para contabilizar el número de células (apartado 6.3.5). Se sembraron las células a cuatro densidades en placas de 6 pocillos (50 000, 100 000, 150 000 y 200 000 células por pocillo) para asegurar el éxito del protocolo en caso de un exceso de crecimiento, y se dejaron a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 horas. Los pellets de las células sobrantes no sembradas se guardaron a -80 °C para la extracción de RNA y la comprobación de la presencia de los vectores virales y del genoma de SeV mediante RT-PCR (apartado 6.5.5.3).

Al día siguiente, se aspiró el medio MEF y se sustituyó por medio iPSC, compuesto por *KnockOut™* DMEM/F-12 completado con 20 % de *KnockOut™ Serum Replacement* (KSR), *MEM non-essential amino acids solution* (1X), GlutaMAX-I (1X), β-mercaptoetanol (100 μM), penicilina/estreptomicina (1X) y suplementado con uridina (50 μg/ml), piruvato (la concentración de piruvato del medio *KnockOut™* DMEM/F-12 es 55 μg/ml, por lo que se añade hasta 110 μg/ml) y bFGF (4 ng/ml). El factor de crecimiento bFGF se añade fresco justo antes de ser usado. Posteriormente, el medio iPSC se reemplazó cada día y se monitorizó la evolución de las células observándolas diariamente bajo el microscopio.

A partir del día 21, se empezaron a observar colonias grandes y compactas. Para seleccionar las colonias reprogramadas se realizó una tinción *in vivo* de la proteína de membrana TRA-1-60 característica de células madre sin diferenciar, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.14.2. Para ello, se trabajó con los anticuerpos estériles *anti-TRA-1-60* y *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)* (tabla 6.3) de ThermoFisher Scientific. Para recoger las colonias reprogramadas, se colocaron las placas en un microscopio invertido de fluorescencia y se examinaron las colonias a un aumento de 10X. Con este aumento, se marcaron con rotulador en la parte inferior de la placa las colonias positivas para la tinción. Posteriormente, se introdujo un microscopio invertido en la campana de flujo y se esterilizó durante unos minutos mediante el tratamiento con radiación UV. Gracias a una cámara acoplada al microscopio, se pudo visualizar el cultivo en un monitor en tiempo real. Mediante una aguja de 1½ pulgadas y calibre 25, se cortó la colonia positiva en 5-6 partes en forma de cuadrícula y con una micropipeta con puntas de 200 μl, se transfirió cada una de las piezas cortadas en un nuevo pocillo de placas de 6 pocillos preparadas con MEFs (apartado 6.3.2.2) en medio iPSC o con vitronectina (apartado 6.3.2.3) en medio Essential 8™ completo. Se dejaron las placas durante 48 horas a 37°C y con 5 % de CO₂ sin reemplazar el medio, y posteriormente, se cambió el medio cada 24 horas.

Para obtener la línea estable de iPSCs sin presencia de los vectores virales, fue necesario hacer subclonajes de colonias durante al menos 5 pases. Se recogieron pellets celulares cada dos pases para comprobar la posible pérdida del vector viral siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.5.5.3. Estos pases se realizaron manualmente, dividiendo las colonias y pasando cada parte en un nuevo pocillo, como se ha indicado anteriormente. Durante el proceso, fue muy importante el correcto etiquetado de las colonias y de sus subclonajes, ya que es esencial para asegurar la independencia de los clones de cada línea celular, obtenidos al final del proceso.

Tras comprobar la pérdida del virus, se procedió a la expansión de los clones para su congelación y mantenimiento. Para ello, se picaron manualmente varias partes de colonias del mismo clon en un mismo pocillo cubierto con vitronectina y en medio Essential 8™ completo. Cuando se obtuvieron pocillos con un número abundante de colonias, se procedió al doblaje mediante EDTA 0,5 mM, tal y como se recoge en el apartado 6.3.3. Para cada línea celular se criopreservaron al menos 10 criotubos, y se comprobó la correcta descongelación de alguno de ellos.

Durante el subclonaje, se observó que en el caso de las líneas mutantes con delección en el mtDNA, se reducía el crecimiento de las células y se acababa perdiendo la línea. Tras tres experimentos independientes, se decidió sustituir el medio de crecimiento Essential 8™ completo de ThermoFisher Scientific por medio *NutriStem*® *hPSC XF* de Biological Industries, siguiendo lo sugerido por Russel *et al.* (84). Después de este cambio, se consiguió obtener dos clones de iPSC portadores de la delección común del mtDNA en un porcentaje de heteroplasmia del 75 %.

6.3.13. Diferenciación de células iPSC

6.3.13.1. Obtención de cuerpos embrioides a partir de iPSCs

Para la obtención de cuerpos embrioides se ha adaptó el protocolo de Galera *et al.* (179). Brevemente, a partir de una placa de 100 mm al 80 %, se recogieron las células iPS mediante la adición de EDTA al 0,5 mM, como se indica en el apartado 6.3.3, en un tubo de 15 ml con 12 ml de medio EB. El medio EB está compuesto por *KnockOut*™ DMEM/F-12 completado con 20 % de *KnockOut*™ *Serum Replacement* (KSR), *MEM non-essential amino acids solution* (1X), GlutaMAX-I (1X), β-mercaptoetanol (100 μM), penicilina/estreptomicina (1X) y suplementado con uridina (50 μg/ml) y piruvato (la concentración de piruvato del medio *KnockOut*™ DMEM/F-12 es 55 μg/ml, por lo que se añade hasta 110 μg/ml). Una vez recogidas, se pipetearon entre 10-12 veces y se sembraron 120 μl de suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con

fondo en forma de V de la casa Deltalab. Tras 2 o 3 días, se transfirieron a una placa no tratada de 100 mm con 3 ml de medio EB para su crecimiento en suspensión. Después de 3 o 4 días, se recogió todo el volumen y se repartieron los cuerpos en diferentes placas de cultivo según la diferenciación a llevar a cabo.

6.3.13.2. Diferenciación de células iPS a las tres capas germinales

6.3.13.2.1. Endodermo

Para la diferenciación a la capa germinal de endodermo, los cuerpos embrioides generados según el protocolo del apartado 6.3.13.1 se transfirieron a placas de 6 pocillos cubiertas con gelatina al 0,1 % siguiendo lo indicado en el apartado 6.3.2.1.

Al día siguiente, se cambió a medio de diferenciación a endodermo y se mantuvo durante 3 semanas, renovándolo cada 2 días. Este medio se compone de medio *KnockOut™* DMEM/F-12 suplementado con 20 % de SFB, *MEM non-essential amino acids solution* (1X), GlutaMAX-I (1X), β -mercaptoetanol (100 μ M), uridina (50 μ g/ml), piruvato (hasta 110 μ g/ml) y penicilina/estreptomicina (1X).

6.3.13.2.2. Mesodermo

Para la diferenciación a la capa germinal de mesodermo, células iPS en cultivo (al 60-80 % de confluencia) se mantuvieron durante 3 semanas en medio de diferenciación a mesodermo, renovándolo cada 2 días. Este medio se basa en el medio EB (apartado 6.3.13.1) suplementado con 100 μ M de ácido ascórbico.

6.3.13.2.3. Ectodermo

Para la diferenciación a la capa germinal de endodermo, los cuerpos embrioides generados según el protocolo del apartado 6.3.13.1 se transfirieron a placas de 6 pocillos cubiertas con gel ECM, siguiendo lo indicado en el apartado 6.3.2.4.

Al día siguiente, se cambió a medio de diferenciación a ectodermo y se mantuvo durante 3 semanas, renovándolo cada 2 días. Este medio se basa en medio *KnockOut™* DMEM/F-12 y medio neurobasal en una proporción 1:1, completados con los suplementos N2 (1X) y B27 (1X), *MEM non-essential amino acids solution* (1X), GlutaMAX-I (1X), β -mercaptoetanol (100 μ M), uridina (50 μ g/ml), piruvato (110 μ g/ml) y penicilina/estreptomicina (1X).

6.3.13.3. Diferenciación específica de las células iPS a distintos tipos celulares

6.3.13.3.1. Diferenciación hematopoyética

La diferenciación de células iPS a células progenitoras hematopoyéticas se llevó a cabo con el kit *STEMdiff™ Hematopoietic* de STEMCELL™ Technologies, siguiendo las indicaciones del fabricante. En este caso, el proceso está dividido en dos fases: diferenciación de células iPS a mesodermo y la generación de células progenitoras hematopoyéticas.

En primer lugar, las iPSCs se sembraron en placas de 6 pocillos, cubiertos previamente con gel ECM (apartado 6.3.2.4), a una densidad adecuada para obtener entre 16 y 40 colonias por pocillo en el comienzo de la diferenciación. Para iniciarla, se añadió el medio A de diferenciación, compuesto por medio basal hematopoyético, suplemento A (1X), uridina (50 µg/ml) y penicilina/estreptomicina (1X). Dos días después, se reemplazó con medio A fresco. Al día siguiente, se inició la segunda fase del proceso de diferenciación mediante la adición del medio B, compuesto por medio basal, suplemento B (1X), uridina (50 µg/ml) y penicilina/estreptomicina (1X). Este medio se mantuvo durante 9 días, y cada 2 días se reemplazó la mitad del volumen. A partir del séptimo día, pueden aparecer células progenitoras flotantes por lo que el medio se cambió cuidadosamente con la placa de cultivo en posición horizontal. A tiempo final, el 75 % de las células progenitoras hematopoyéticas se localizan en suspensión. No obstante, como las células adherentes pueden representar hasta un 25 % de células progenitoras hematopoyéticas, también se recogieron para el análisis de marcadores de diferenciación y del porcentaje de heteroplasma. Para ello, se incubaron durante 20 minutos a 37 °C con *StemPro™ Accutase™* atemperada.

6.3.13.3.1.1. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU)

Las células progenitoras hematopoyéticas tienen la capacidad de formar colonias hematopoyéticas mediante un ensayo CFU, que pueden ser cuantificadas y analizadas.

Para la realización de este ensayo, se empleó el medio *MethoCult™* completo de STEMCELL™ Technologies. Tras su descongelación a temperaturas suaves, se agitó durante 1-2 minutos y se dejó reposar durante 5 minutos para favorecer la desaparición de burbujas. Posteriormente, se prepararon alícuotas de 4 ml en tubos falcon de 15 ml, mediante una jeringa y una aguja estéril de calibre 16 con punta roma. Estas alícuotas se conservaron a -20 °C hasta su uso. Además, para la realización de este ensayo se emplearon las placas de cultivo *SmartDish™* de STEMCELL™

Technologies, que carecen de menisco donde puedan incrustarse colonias y disponen de espacios entre los pocillos para añadir agua estéril y aumentar la humedad del cultivo.

Las células progenitoras hematopoyéticas en suspensión, obtenidas tras la diferenciación descrita en el apartado anterior, se recogieron en tubo falcon de 15 ml. Posteriormente, se adicionó 1 ml de medio DMEM/F-12 con HEPES a cada pocillo y se pipeteó varias veces con fuerza para recoger las células que hubieran podido quedar. Este proceso se realizó dos veces. A continuación, se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en el volumen adecuado de medio IMDM con 2 % de SFB para su conteo. Se sembraron entre 7000 y 8000 células por pocillo, para lo cual se preparó una dilución 10X de células en medio Methocult™ y se distribuyó el volumen adecuado en cada pocillo mediante una jeringa. Tras distribuir correctamente la mezcla por la superficie de los pocillos, se añadió agua estéril en las zonas destinadas a ello, y se introdujo la placa en el incubador a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 14-16 días.

El conteo de las CFUs se llevó a cabo mediante su visualización en un microscopio óptico invertido con un objetivo de aumento 40X o 100X. Además, se acopló a la placa una cuadrícula para facilitar el conteo de las colonias. Cada una de las CFUs se representan en la figura 6.1 y se pueden identificar según las siguientes características:

- CFU-GEMM (granulocito, eritrocito, macrófago y megacariocito): es una colonia progenitora grande y multipotencial, que contiene más de 500 células de eritroblastos y de al menos otros dos linajes.
- CFU-GM (granulocito y macrófago): es una colonia con al menos 40 granulocitos, macrófagos o ambos. Puede contener miles de células organizadas en una o varias agrupaciones.
- BFU-E (eritrocitos): es una colonia compuesta por más de 200 eritroblastos organizados en uno o varios grupos. Requiere de eritropoyetina (EPO) y citoquinas para su crecimiento óptimo, y se considera la forma inmadura de las CFU-E.
- CFU-E (eritrocitos): es una colonia que contiene entre 8 y 200 eritroblastos organizados en uno o dos grupos. Se consideran células progenitoras de eritrocitos maduras que requieren de EPO para su diferenciación.

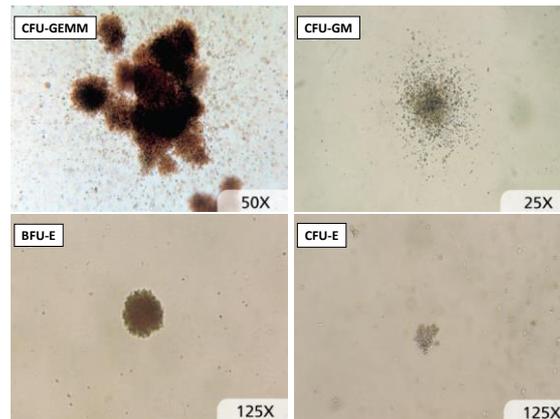


Figura 6.1 Imágenes representativas de los diferentes tipos de CFU.

6.3.13.3.2. Diferenciación a células del páncreas exocrino

La diferenciación de iPSCs a células del páncreas exocrino se realizó adaptando el protocolo descrito por Sharisawa *et al.* (203). El proceso se divide en cuatro fases: generación de cuerpos embrioides, diferenciación a endodermo definitivo, inducción de progenitores pancreáticos y obtención de células exocrinas.

Para la primera fase de generación de cuerpos embrioides, se siguió el protocolo descrito en el apartado 6.3.13.1. Los EB obtenidos se repartieron en placas de 6 cubiertas previamente con gelatina (apartado 6.3.2.1), y se dejaron toda la noche a 37 °C hasta adherirse a la matriz. Posteriormente, se reemplazó el medio EB por medio EB-SFB (misma composición que el medio EB pero sustituyendo el KSR por SFB) suplementado con activina A (100 ng/ml).

Para continuar con la diferenciación a endodermo definitivo, 24 horas después se retiró y se añadió medio EB-SFB fresco. Tras 6 horas, se sustituyó por medio EB-SFB suplementado con ácido retinoico (1 μ M) hasta el día siguiente.

La inducción de las células progenitoras pancreáticas se inicia al tratar los EB durante 3 días con KGF (15 ng/ml) en medio DMEM/F-12 con los suplementos N2 (1X) y B27 (1X), uridina (50 μ g/ml) y penicilina/estreptomicina (1X). Finalmente, para favorecer la diferenciación a células pancreáticas exocrinas, se adicionó al medio anterior GLP-1 (100 ng/ml) y nicotinamida (10 mM), y se renovó cada 3 días durante al menos 8 días.

6.3.13.3.3. Diferenciación neuronal

La diferenciación de las células iPS a neuronas se llevó a cabo adaptando el protocolo de Soeda *et al.* (205). El proceso se divide en dos fases: diferenciación de iPSCs a células madre neural inducidas (iNSC), y diferenciación de éstas a neurona.

Para la primera fase de diferenciación, las células iPS se sembraron en placas de 6 pocillos cubiertas previamente con vitronectina (apartado 6.3.2.3) en medio de crecimiento normal, para conseguir una confluencia al inicio de la diferenciación del 15-25 % en las líneas control, y del 40 % en las mutantes. Al día siguiente, tras confirmar esa confluencia, se cambió a medio de inducción neural compuesto por medio neurobasal, suplemento de inducción neural (1X), uridina (50 µg/ml) y penicilina/estreptomicina (1X). Este medio se renovó cada dos días durante 7 días. A partir del cuarto día, se dobló el volumen de medio para conseguir la menor muerte celular posible. Tras 7 días, las iNSC primitivas se recogieron con EDTA 0,5 mM en un tubo de 15 ml (apartado 6.3.3) y se centrifugaron a 200 x g durante 4 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en el volumen adecuado de medio de expansión neural para el conteo de células (apartado 6.3.5), y se dividió el pellet según el objetivo del estudio. El medio de expansión neural se compone de medio neurobasal y medio *Advanced* DMEM/F-12 en una proporción 1:1, suplemento de inducción neural (1X), uridina (50 µg/ml) y penicilina/estreptomicina (1X). Para continuar con la diferenciación, las iNSCs se sembraron con este medio en placas cubiertas previamente con *CELLStart*[™] (apartado 6.3.2.6) a la densidad celular adecuada: entre 40 000 y 50 000 células/cm² en las líneas controles, y aproximadamente 75 000 células/cm² en las líneas portadoras de delección. Para favorecer la viabilidad celular, se incubaron con inhibidor de ROCK Y27632 (5 µM) durante la primera noche. Tras 24 horas, se renovó el medio y se repitió cada dos días hasta que las iNSC alcanzaron la confluencia (normalmente cuatro días después).

Para la segunda fase de la diferenciación, se sembraron 50 000 células/cm² de las líneas control y entre 80 000 y 100 000 células/cm² de las líneas mutantes en medio StemPro y placas cubiertas previamente con poli-L-ornitina y laminina (apartado 6.3.2.7). Para recoger las iNSC, se retiró el medio, se lavaron las células una vez con DPBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, y se incubaron durante 5-8 minutos a 37 °C con *StemPro*[™] *Accutase*[™] atemperada. Tras este tiempo, se recogieron en un tubo de 15 ml y se añadió DPBS a las placas para recuperar el mayor número de células. A continuación, se centrifugaron a 300 x g durante 4 minutos, se aspiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en DPBS y se centrifugaron de nuevo. El pellet obtenido se resuspendió en medio StemPro completo para el conteo de células, y se dividió según el estudio posterior a realizar. El medio StemPro completo se compone de *KnockOut*[™] DMEM/F-12, suplemento

neural StemPro (1X), factores de crecimiento EGF y bFGF (100 ng/μl, cada uno), GlutaMAX-I (1X), uridina (50 μg/ml) y penicilina/estreptomicina (1X). Tras dos días en este medio, se reemplazó por el medio de diferenciación neural compuesto por medio neurobasal, suplemento B27™, suplemento *CultureOne*™, GlutaMAX-I (1X), ácido ascórbico (200 μM), uridina (50 μg/ml) y penicilina/estreptomicina (1X). Este medio se renovó cada 3 días durante 1 semana.

6.3.13.3.4. Diferenciación a cardiomiocitos

La diferenciación de iPSCs a cardiomiocito se realizó con el kit *STEMdiff™ cardiomyocyte Differentiation and Maintenance* de STEMCELL™ Technologies, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Previamente, las iPSCs se sembraron en cultivos de células individuales. Para ello, se recogieron en un falcon de 15 ml siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.3, se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió en el volumen adecuado de medio para el conteo de células (apartado 6.3.5). Se realizó la dilución correspondiente en medio de crecimiento normal para sembrar aproximadamente 170 000 células por pocillo en placas de 12 pocillos recubiertos previamente con Matrigel™ (apartado 6.3.2.5). A este medio se le adicionó el inhibidor de ROCK Y27632 (10 μM) durante la primera noche, para favorecer la viabilidad celular.

Posteriormente, el cultivo se mantuvo hasta alcanzar una confluencia superior al 95 %. En este momento, se reemplazó el medio de mantenimiento por el medio de diferenciación A, compuesto por medio basal de diferenciación, 10 % de suplemento A, Matrigel™ (en dilución 1:100) y penicilina/estreptomicina (1X). Tras 48 horas, se retiró y se sustituyó por el medio de diferenciación B, compuesto por medio basal de diferenciación, 10 % de suplemento B y penicilina/estreptomicina (1X). Dos días después, se cambió por el medio de diferenciación C, compuesto por medio basal de diferenciación, 10 % de suplemento C y penicilina/estreptomicina (1X), y se renovó a las 48 horas. El octavo día tras el inicio de la diferenciación, se reemplazó el medio de diferenciación C por el de mantenimiento (compuesto por medio basal de mantenimiento, 2 % de suplemento de mantenimiento y penicilina/estreptomicina (1X)), y se mantuvo durante 7 días, sustituyéndolo con medio fresco cada 2 días. Durante toda la diferenciación se añadió 1 ml de cada medio por pocillo.

6.3.14. Inmunofluorescencia de cultivos celulares

Durante el desarrollo de esta tesis se han realizado técnicas de inmunofluorescencia con células fijadas y con células iPS vivas. Los anticuerpos empleados se detallan en la siguiente tabla (tabla 6.3):

Tabla 6.3 Anticuerpos empleados en técnicas de inmunofluorescencia con células fijadas y células iPS vivas.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Dilución	Tiempo y temperatura de incubación
Oct-4	Abcam	Conejo	1:200	1 hora, temperatura ambiente
SOX-2	Abcam	Conejo	1:200	1 hora, temperatura ambiente
NANOG	Abcam	Conejo	1:100	1 hora, temperatura ambiente
TRA-1-60	Merck	Ratón	1:150	1 hora, temperatura ambiente
TUBB3	Abcam	Conejo	1:500	toda la noche, 4 °C
Nestina	Abcam	Ratón	1:500	toda la noche, 4 °C
SMA	Abcam	Ratón	1:400	1 hora, temperatura ambiente
AFP	Abcam	Ratón	1:200	toda la noche, 4 °C
α-amilasa pancreática	Abcam	Conejo	1:100	toda la noche, 4 °C
Alexa Fluor™ 594 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Abcam	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente
Alexa Fluor™ 594 goat anti-mouse IgG (H+L)	Abcam	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente
Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Abcam	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente
Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Abcam	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente

6.3.14.1. Inmunofluorescencia de células fijadas

Para realizar la inmunofluorescencia de células fijadas, el cultivo celular se lavó con PBS y se fijó con paraformaldehído al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con PBS y se permeabilizaron con el detergente Triton X-100 al 0,1 % durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un bloqueo para evitar uniones inespecíficas con una solución de BSA al 5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario, diluido a la concentración adecuada en PBS al 0,1 % de Triton X-100 y 1 % de BSA, se incubó 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en función del anticuerpo empleado (tabla 6.3). Tras este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS y se incubó el anticuerpo secundario, preparado a una dilución 1:1000 en PBS al 0,1 % de Triton X-100 y 0,1 % de BSA, durante 1 hora, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalmente, las células se incubaron con una solución de DAPI 1:1000 en PBS, durante 10 minutos y a temperatura ambiente, para teñir los núcleos celulares.

Para descartar la existencia de uniones inespecíficas, en todos los casos se realizó paralelamente un control de anticuerpo secundario, siguiendo el mismo procedimiento pero sustituyendo la incubación con el anticuerpo primario por PBS.

6.3.14.2. Inmunofluorescencia de células vivas sin fijar

Para realizar la inmunofluorescencia con células iPS vivas sin fijar con el anticuerpo anti TRA-1-60, se lavaron una vez las células con medio *KnockOut™* DMEM/F-12 atemperado, y se añadió el anticuerpo primario diluido adecuadamente en este mismo medio. Tras una hora de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se realizaron 3 lavados con el medio. El anticuerpo secundario se diluyó 1:1000 en medio *KnockOut™* DMEM/F-12 y se incubó durante una hora a 37 °C y 5 % de CO₂. Finalmente, se realizaron 3 lavados con el medio y se visualizaron las células (en DPBS si es poco tiempo o en medio *KnockOut™* DMEM/F-12 para tiempos de visualización largos).

También se realizó la tinción *Alkaline Phosphatase Live Stain* de ThermoFisher Scientific, en células iPS vivas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron con el reactivo (1X) en medio *KnockOut™* DMEM/F-12 durante 20-30 minutos a 37 °C tras haber realizado dos lavados de 2-3 minutos con el mismo medio. Tras este tiempo, y antes de la visualización, se realizaron con cuidado dos nuevos lavados de 5 minutos con medio.

Las preparaciones se visualizaron hasta 30-90 minutos después a través de la estación de imagen EVOS® FLoid®Cell Imaging Station de ThermoFisher Scientific. El sistema permite tomar las imágenes de la propia placa de cultivo.

6.3.15. Tratamientos con medios de cultivo específicos

6.3.15.1. Tratamiento con cuerpos cetónicos

Los fibroblastos y cíbridos portadores de delección se sometieron a un tratamiento con medio libre de glucosa y con cuerpos cetónicos como fuente de energía, para comprobar su efecto sobre la heteroplasmia de la delección y el número de copias de mtDNA.

Para el estudio se adaptó el protocolo propuesto por Santra *et al.* (162). Previamente, se prepararon las soluciones stock de acetoacetato (AA) y DL- β -hidroxibutarato (BHB) a 500 mM en agua estéril. Se utilizó medio DMEM libre de glucosa suplementado con uridina (50 μ g/ml), SFB al 5 % para los cíbridos y al 10 % para los fibroblastos, y cuerpos cetónicos a una concentración de 5 mM. Paralelamente, se crecieron células en medio de mantenimiento normal (DMEM con glucosa 25 mM, SFB y uridina) como control negativo, para poder valorar de forma más precisa el efecto del tratamiento.

Las células se trataron durante 5 días con acetoacetato, DL- β -hidroxibutarato o con la combinación de ambos y, posteriormente, se sustituyó por medio de mantenimiento durante 10 días para su recuperación. Se cambió el medio cada 48 horas.

Para el estudio del efecto de un tratamiento prolongado con cuerpos cetónicos, se realizaron tres tandas sucesivas de 5 días de tratamiento con 10 días de recuperación (medio de mantenimiento).

6.3.15.2. Tratamiento con ácido fólico

Se estudió el efecto del ácido fólico sobre la heteroplasmia de la delección, el número de copias de mtDNA y la función OXPHOS, a través de la medida de la producción del ATP mitocondrial, en fibroblastos PS. En paralelo, se analizó también el efecto sobre la línea de fibroblastos control de 1 mes.

Para el ensayo, se preparó previamente una solución stock de ácido fólico a 10 mM en NaHCO₃ (10 g/l). Se utilizó medio RPMI 1640 sin ácido fólico suplementado con uridina (50 μ g/ml), piruvato (50 g/l), SFB dializado al 10 % y ácido fólico a distintas concentraciones (0, 50 nM, 200 nM, 12 μ M y 500 μ M). Antes de su utilización, se ajustó el pH a 7,4 (150). Se sembraron 5000 células por cm² 24 horas antes de iniciar el tratamiento. Se trataron con el medio específico durante 15 días, renovando el medio cada 48 horas.

También se comprobó el efecto del tratamiento combinado del ácido fólico con otro antioxidante como el ácido ascórbico. Para ello, se preparó el medio con distintas concentraciones de ácido fólico y se adicionó ácido ascórbico (100 μ M). La solución stock de ácido ascórbico se preparó a 200 mM en agua apta para cultivos. Tras la preparación del medio completo, se ajustó el pH a 7,4. Las células se sembraron y mantuvieron de forma similar a lo descrito previamente.

6.3.15.2.1. Tratamiento con medio restrictivo sin ácido fólico

Por otro lado, se estudió la posible aparición de deleciones en el mtDNA en condiciones de ausencia prolongada de ácido fólico. Para ello, los fibroblastos control de 1 mes se mantuvieron en medio RPMI 1640 sin ácido fólico y 10 % de SFB dializado durante un mes, renovando el medio cada 2-3 días y resemebrando las células cuando la confluencia alcanzaba el 80 %.

6.3.15.3. Tratamiento con desoxirribonucleósidos

Se realizaron ensayos para comprobar el efecto del tratamiento con desoxirribonucleósidos sobre la heteroplasma de la deleción y los niveles de mtDNA por célula. Además de las dos líneas de fibroblastos portadoras de deleción, se trataron fibroblastos control de 1 mes y una línea mutante de la enzima timidina quinasa 2 (TK2), como control positivo.

El estudio se realizó adaptando el protocolo descrito por Cámara *et al.* (2014) (168). En primer lugar, se sembraron 5000 células por cm^2 y se crecieron durante 10 días en medio de crecimiento normal (medio DMEM con 25 mM glucosa suplementado con 10 % de SFB y uridina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, se mantuvieron 2 días en quiescencia mediante la sustitución del SFB por suero dializado y reduciéndolo al 0,1 %. En paralelo, se realizó el estudio provocando previamente depleción del mtDNA mediante la adición de bromuro de etidio (50 ng/ml) durante este tiempo. Finalmente, los fibroblastos se trataron durante 12 días con el medio de quiescencia sin uridina, para evitar la alteración de la ruta de salvamento de pirimidinas, y suplementado con los cuatro desoxirribonucleósidos (dT, dC, dA y dG), de la casa comercial Sigma-Aldrich, a una concentración de 50 μM cada uno.

6.3.16. Terapia génica mediante mtZFN

Durante la estancia en el laboratorio del Dr. Minczuk, en el *MRC-Mitochondrial Biology Unit* de la Universidad de Cambridge, se realizaron ensayos de transfección de cíbridos portadores de la

deleción común con mtZFN (del inglés, *mitochondrially targeted zincfinger-nucleases*) diseñados para disminuir los niveles de heteroplasmia de la deleción común en el mtDNA (248).

Se emplearon los plásmidos R13 y R8 diseñados por el grupo del Dr. Minczuk, que codifican mtZFN específicos con capacidad de introducirse en la mitocondria e hibridar con las secuencias flanqueantes de la deleción para generar una rotura de doble hebra. Los mtZFN están acoplados a dominios *FokI* de nucleasas que requieren de su dimerización para inducir una rotura. Además, contienen secuencias codificantes de proteínas fluorescentes (plásmido R13 con mCherry y R8 con eGFP).

Para ello, se sembraron $4,5 \times 10^6$ células en frascos de 75 cm² con medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, uridina (50 µg/µl) y penicilina-estreptomicina (1X) para alcanzar un confluencia del 70-90 % al día siguiente. Si la densidad celular era adecuada, se procedió a la transfección en las diferentes condiciones resumidas en la tabla 6.4, de modo que la cantidad de DNA plasmídico disponible para la transfección fuera similar en todas las condiciones. En primer lugar, los plásmidos se diluyeron en 1 ml de medio Opti-MEM™, de ThermoFisher Scientific, para una cantidad total de DNA de 10 µg. Paralelamente, se preparó la mezcla del reactivo *Lipofectamine™* 2000, de ThermoFisher Scientific, en medio Opti-MEM™ a una dilución 1:10. A continuación, se mezclaron ambas diluciones en una proporción 1:1, se homogenizó bien con la ayuda de un vórtex y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el medio de cultivo de los frascos y se añadió la mezcla sobre las células que se incubaron a 37 °C durante 6 horas. Tras este tiempo, se reemplazó con medio fresco y se mantuvieron en el incubador a 37 °C toda la noche.

Tabla 6.4 Condiciones de transfección realizadas según los plásmidos empleados.

Condiciones de transfección (plásmidos)						
Control sin tratamiento	mCherry	eGFP	mCherry +	R13 +	R8 +	R8 +
			eGFP	mCherry	eGFP	R13

Al día siguiente, se observaron los frascos bajo un microscopio invertido de fluorescencia para confirmar la presencia de las proteínas fluorescentes en las células, y se recogieron las células por tripsinización y centrifugación en un falcon de 15 ml. El pellet obtenido se resuspendió en 750 µl de PBS, se pasaron por un colador y se transfirieron a un tubo especial de citómetro. La suspensión celular se procesó por un citómetro separador de modo que se recogieron las células positivas para el doble marcaje fluorescente por las proteínas mCherry y eGFP. Seguidamente, se sembraron 30 000 células de cada condición en pocillos de placas de 6 pocillos y se incubaron

a 37 °C durante 10 días para permitir su expansión. Tras este tiempo, se recogieron y se procedió a la extracción del DNA total y la cuantificación de la heteroplasmia por qPCR.

6.4. Histoquímica

Las preparaciones y tinciones realizadas en varios tejidos del paciente PS2 fueron realizadas por el servicio de anatomía patológica del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Las tinciones realizadas fueron de Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Gomori.

6.5. Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

6.5.1. Aislamiento de DNA total a partir de muestras biológicas o cultivos celulares

6.5.1.1. Extracción de DNA total de células en cultivo

El DNA total a partir de células en cultivo se extrajo utilizando el kit *Cells and Tissue DNA Isolation*, en la versión normal y micro, de Norgen Biotek Corp. y el kit *SPEEDTOOLS DNA Extraction* de Biotools. Antes de la extracción, las células en cultivo se recogieron por tripsinización y posterior centrifugación. El pellet obtenido se lavó una vez con PBS y se congeló a -20 °C. En la extracción se siguieron las indicaciones del fabricante para células en cultivo crecidas en monocapa.

6.5.1.2. Extracción de DNA total de muestras de sangre

La sangre se transfirió a un tubo de centrifuga y se enrasó con el volumen necesario de tampón TE (Tris-HCl 0,5 M pH=8 y EDTA 0,5 M, en proporción 20:5) previamente enfriado. Los tubos se agitaron suavemente y se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el sedimento obtenido se resuspendió de nuevo en 15 ml de tampón TE agitándolo mediante el vórtex. Una vez resuspendido, se completó el volumen del tubo y se centrifugó nuevamente a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C. Este lavado se repitió hasta que se obtuvo un sedimento blanco, compuesto principalmente por leucocitos, y se resuspendió en 3 ml de TE. Las células se lisaron mediante la adición de 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 32 µl de SDS al 25 %, se mezcló con ayuda de un vórtex y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Posteriormente, los ácidos nucleicos se extrajeron con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Fenol-IAC 25:25:1). En primer lugar, se añadieron 200 µl de acetato amónico 7,5 M, y seguidamente, se transfirió todo el volumen a un tubo falcon de 50 ml. A continuación, se añadió un volumen de Fenol-IAC, se agitó mediante un vórtex para que ambas fases, acuosa y

fenólica, se mezclaran de forma homogénea, y se centrifugó a 1050 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Separadas las dos fases, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se repitió de nuevo el proceso. A continuación, se recogió la fase acuosa, se añadió un volumen igual de una mezcla de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1), para retirar los restos de fenol, se agitó y se centrifugó a 1050 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos, presentes en la fase acuosa, se precipitaron por adición de dos volúmenes de etanol frío y agitando manualmente hasta obtener un ovillo de DNA precipitado, que se recogió en un eppendorf estéril. En caso de no obtener un ovillo, el volumen total se alicuotó en eppendorfs de 1,5 ml y se dejó toda la noche a -20 °C o durante 1 hora a -80 °C. Posteriormente, se centrifugó a 16 000 x g durante 30 min a 4 °C y se eliminó el etanol. Finalmente, el pellet obtenido se secó mediante un concentrador en vacío *SpeedVac*, de ThermoFisher Scientific, a 45 °C durante 5-10 minutos y se resuspendió en agua pura libre de DNAsas dejándolo toda la noche en agitación y a 37 °C.

6.5.1.3. Extracción de DNA total de muestras de otros tejidos

Para la extracción de DNA de otros tejidos se pulverizó una porción en un mortero de porcelana con N₂ líquido o se disgregó con una cuchilla sobre papel de aluminio. Posteriormente, se transfirió a un tubo eppendorf preparado con 500 µl de RSB 1x (Tris-HCL 10 mM pH=7,4, NaCl 10 mM y EDTA 25 Mm), 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 20 µl de SDS al 25 %, se mezcló con ayuda de un vórtex y se incubó en agitación durante toda la noche a 37 °C.

A continuación, se añadió un volumen de Fenol-IAC (25:25:1), se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos. Se recogió la fase acuosa y se añadió un volumen similar de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1), se mezcló con vórtex y se centrifugó de nuevo a 600 x g durante 5 minutos. Se recogió la fase acuosa, se añadieron dos volúmenes de etanol frío y se agitó hasta que se precipitó el DNA. El ovillo obtenido se pasó a un nuevo eppendorf estéril. En caso de no obtener un precipitado, se procedió igual que en el apartado 6.5.1.2.

Para la extracción de DNA de muestras de orina, se centrifugó la muestra a 1500 x g y a 4 °C durante 15 minutos, se resuspendió el pellet en TE y se centrifugó de nuevo. Posteriormente se procedió con el protocolo de extracción de columnas de la versión micro del kit *Cells and Tissue DNA Isolation* de Norgen Biotek Corp.

6.5.2. Aislamiento de RNA total a partir de células en cultivo

El RNA total a partir de células en cultivo se extrajo utilizando el *kit NucleoSpin RNA II* de Macherey-Nagel. Antes de la extracción, las células en cultivo se recogieron por tripsinización y centrifugación. A continuación, se realizaron dos lavados del pellet celular con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación. Una vez obtenido el pellet celular limpio, se congeló a -80 °C. En el momento de la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante.

6.5.3. Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

La cantidad de ácidos nucleicos obtenidos se determinó utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop* (ND-1000). Se realizó una lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm de longitud de onda, utilizando un volumen de 2 µl de muestra. En primer lugar se realizaron dos blancos con agua estéril, la segunda de ellas para fijar el valor del blanco. Posteriormente, se añadieron las muestras de DNA o RNA a cuantificar y se obtuvieron los valores de concentración de ácidos nucleicos, ya calculados por el programa. Los ratios de absorbancia a 260/280 nm y 230/280 nm sirven para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos, considerándose un valor óptimo un ratio entre 1,8-2 y 2-2,2 respectivamente.

6.5.4. Retrotranscripción de RNA total

El cDNA monocatenario se obtuvo mediante el *kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* de Roche, a partir del RNA total extraído de células en cultivo (apartado 6.5.2). Para ello, se cargó 1 µg de RNA, o 10 µl si la concentración no era suficiente, junto con los reactivos necesarios en un volumen final de 20 µl (tabla 6.5).

Tabla 6.5. Mezcla de reacción para la retrotranscripción del RNA a cDNA.

Componente	Concentración	Volumen (µl)
Transcriptasa reversa	20 U/µl	0,5
Tampón de reacción	5X	4
Inhibidor de RNAsas	40 U/µl	0,5
dNTPs	10 mM	2
Random hexamer primer	600 µM	2
RNA	0,1 µg/µl	10
H₂O	-	Hasta 20 µl

Una vez preparada la mezcla de reacción, se llevaron a cabo los siguientes ciclos de temperatura a distintos tiempos en el termociclador Veriti™ de Applied Biosystems™: 25 °C – 10 min, 55 °C – 30 min y 85 °C – 5 min. El cDNA obtenido se cuantificó y se conservó a -20 °C hasta su uso.

6.5.5. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de 100-150 ng de DNA total o cDNA. Para comprobar la ausencia de contaminación durante la preparación de los reactivos, en cada experimento se preparó un tubo adicional que contenía la mezcla de reacción, pero sin DNA (blanco).

Las condiciones de la PCR varían en función de las características de la región de DNA que se desea amplificar y de la enzima DNA polimerasa utilizada.

6.5.5.1. Amplificación del DNA mitocondrial completo (PCR Larga)

Para la amplificación completa del DNA mitocondrial, se partió de 100-150 ng de DNA total extraído y se empleó la mezcla de reacción indicada en la tabla 6.6, con tres parejas de oligonucleótidos que se describen en la tabla 6.7: LONG L ELENA y LONG H ELENA, ND2 LONG L y LONG H, y COX-F y LONG H. Todos los reactivos fueron de la casa comercial ThermoFisher Scientific.

Tabla 6.6. Mezcla de reacción para la amplificación completa del mtDNA mediante PCR.

Componente	Concentración	Volumen (μl)
Phusion Master MIX with GC Buffer	2X	12,5
Oligonucleótido H	25 μM	0,5
Oligonucleótido L	25 μM	0,5
DNA	100-150 ng/μl	1
H₂O	-	hasta 25

Tabla 6.7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación completa del mtDNA.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición de hibridación en el mtDNA (5'→3')	Amplicón (pb)	
LONG L ELENA	ACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG	1482-1516	16268	
LONG H ELENA	ACCGCCAGGTCCTTTGAGTTTTAAGCTGTGGCTCG	1146-1180		
ND2 LONG L	TTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTACTC	4471-4501	12026	10200
LONG H	CGGATACAGTTCACTTTAGCTACCCCCAAGTG	16465-16496		
COX-F (L)	TTAGCAGGGAAGTACTCCCA	6297-6316		

Los ciclos de temperaturas llevados a cabo en el termociclador fueron los siguientes: 98 °C – 30 s, 30 ciclos de 98 °C – 10 s y 72 °C – 8:15 min, y 72 °C – 10 min, 4 °C – 20 min y 20 °C – ∞.

Para su comprobación se empleó un gel de agarosa del 0,8 % preparado según el protocolo del apartado 6.5.6 y se empleó el marcador *DNA molecular Weight Marker II* (de 0.12 a 23.1 kpb) de Roche.

6.5.5.2. Amplificación del DNA mitocondrial en fragmentos para su secuenciación

Para la secuenciación completa del DNA mitocondrial, se amplificaron 8 fragmentos solapantes. La mezcla de reacción y los oligonucleótidos empleados para cada uno de los fragmentos se recogen en la tabla 6.8 y tabla 6.9, respectivamente. Para la mezcla de reacción se empleó el *EmeraldAmp® Max PCR Master Mix* de la casa comercial Takara y los oligonucleótidos de ThermoFisher Scientific. Para una amplificación óptima de los fragmentos de secuenciación, se partió de 1 µl de amplificado de PCR Larga con los oligonucleótidos LONG H ELENA y LONG L ELENA (apartado 6.5.5.1) en el caso de F2, F3, F4, F5, F6 y F7; y de 100-150 ng del DNA total original de la muestra en el caso de los fragmentos F1 y F8.

Tabla 6.8. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los fragmentos de mtDNA para la secuenciación completa.

Componente	Concentración	Volumen (µl)
EmeraldAmp® Max PCR Master Mix	2X	12,5
Oligonucleótido H	25 µM	0,5
Oligonucleótido L	25 µM	0,5
DNA	amplificado PCR Larga o 100-150 ng/µl	1
H₂O	-	hasta 25

Tabla 6.9. Fragmento solapantes y oligonucleótidos para la secuenciación completa del mtDNA.

Fragmento	Nombre	Hebra	Secuencia (5'→3')	Amplificación (pb)	T _m (°C)
F1	hmtL 569	L	AACCAAACCCCAAGACACC	2452	66
	hmtH 2982	H	CTGATCCAACATCGAGGTCG		
F2	hmtL 2797	L	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	2417	60
	hmtH 5174	H	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG		
F3	hmtL 5061	L	AGCAGTTCTACCGTACAACC	2476	60
	hmtH 7497	H	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC		
F4	hmtL7336	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	2524	60
	hmtH 9819	H	GCCAATAATGACGTGAAGTCC		
F5	hmtL 9611	L	TCCCACTCCTAACACATCC	2539	60
	hmtH 12111	H	AAACCCGGTAATGATGTCGG		
F6	L1L	L	TACTCTTCAATCAGCCACAT	2811	60
	hmtH 14559	H	GATTGTTAGCGGTGTGGTTCG		
F7	hmtL 14130	L	TCTTCCCACTCATCCTAACCC	2590	60
	hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG		
F8	hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1643	66
	hmtH 626	H	TTTATGGGGTGATGTGAGCC		

Los ciclos de temperaturas llevados a cabo en el termociclador fueron los siguientes: 94 °C – 5 min, 35 ciclos de 94 °C – 45 s, T_m – 30 s y 72 °C – 3 min, y 72 °C – 5 min, 4 °C – ∞.

Para su comprobación se empleó un gel de agarosa del 1 % preparado según el protocolo del apartado 6.5.6 y se empleó el marcador *DNA molecular Weight Marker VII* (de 0.37 a 8 kpb) Roche.

6.5.5.3. Amplificación de secuencias específicas de los vectores CytoTune™ para la detección de la presencia del virus en células iPS

Para analizar la presencia de los vectores virales *CytoTune™* en células iPS se partió de RNA total extraído de pellet celular según el protocolo descrito en el apartado 6.5.2. Como el virus SEV es un virus portador de RNA se requiere la retrotranscripción para detectar su presencia en la muestra. Por ello, se realizó un reacción de retrotranscripción (apartado 6.5.4) para la obtención de cDNA total, y con él, se llevó a cabo una PCR con los oligonucleótidos específicos recogidos en la tabla 6.10.

Tabla 6.10. Nombre, secuencia y tamaño de amplicón obtenido para la detección de SeV virus.

	Hebra	Secuencia (5'→3')	Amplicón (pb)
SeV	F	GGATCACTAGGTGATATCGAGC*	181
	R	ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC*	
KOS	F	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC	528
	R	ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
Klf4	F	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC	410
	R	AATGTATCGAAGGTGCTCAA*	
c-Myc	F	TAAGTACTAGCAGGCTTGTCG*	532
	R	TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG	

*Oligonucleótidos que reconocen parte del genoma de SeV.

Los ciclos de temperaturas llevados a cabo en el termociclador fueron los siguientes: 94 °C – 5 min, 35 ciclos de 95 °C – 30 s, 55°C – 30 s y 72 °C – 30 s, y 72 °C – 5 min, 4 °C – ∞.

Para su comprobación se realizó una electroforesis en gel de agarosa del 2 %, preparado según el protocolo descrito en el apartado 6.5.6, y se empleó el marcador *DNA molecular Weight Marker VIII* (de 19 a 1114 pb) de Roche.

6.5.6. Separación electroforética de ácidos nucleicos mediante geles de agarosa

Para comprobar la amplificación del material genético por PCR se utilizaron geles horizontales de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La agarosa se disolvió en tampón TBE (Tris 50 mM, Ácido Bórico 50 mM, EDTA-Na 1 mM, pH 8,3) calentado la mezcla en un horno microondas, a un porcentaje de entre 0,5 y 2,5 de agarosa, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. A esta solución se le añadió el bromuro de etidio (1 µg/ml) y se dejó gelificar en las camas de 50 o 100 ml de la marca Bio-Rad.

La carga de las muestras se realizó mezclando 5 µl de los productos de amplificación con unos 2 µl de tampón de carga (Ficoll 400 al 15 %, azul de bromofenol al 0,2 %, en tampón TBE). Se confirmó el tamaño de las bandas utilizando marcadores de peso molecular de hasta 1, 8 o 23 Kb (Roche). La separación electroforética se llevó a cabo a 100 V durante 30-60 minutos, en función de la separación deseada. El resultado se visualizó tras la exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta (Gel Doc™, Bio-Rad).

6.5.7. Secuenciación del mtDNA

Tras comprobar la correcta amplificación de cada fragmento por electroforesis se purificaron las muestras. Para ello, se mezclaron 6 µl de ExoSAP-IT™ Express (exonucleasa I y fosfatasa alcalina), de Applied Biosystems, con 15 µl de muestra (2 µl de reactivo por cada 5 µl de DNA), y se programó el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos: 37 °C – 4 min, 80 °C – 1 min y 4 °C – ∞.

Posteriormente, las muestras se enviaron al servicio de secuenciación automática en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Para la secuenciación completa del mtDNA se emplearon los oligonucleótidos utilizados para la amplificación (tabla 6.9) y otros específicos de cada uno de los fragmentos amplificados.

Para analizar las secuencias recibidas se utilizó el software Sequencher v 4.1.4. Este programa permite el alineamiento de varias secuencias y detectar cambios en las mismas, ya sean cambios de base, deleciones o inserciones. Se alinearon todas las secuencias (solapantes entre sí) con la secuencia de referencia del mtDNA completo (NC_012920) y analizaron los polimorfismos presentes las muestras. Las variantes en el mtDNA de la muestra se compararon con un árbol filogenético que incluye más de 20 000 secuencias (249,250).

6.5.8. Determinación del límite de las deleciones

Para delimitar las deleciones se partió de un amplificado de PCR Larga, normalmente de los obtenidos mediante las parejas de oligonucleótidos ND2 LONG L y LONG H, y COX-F y LONG H (apartado 6.5.5.1). Posteriormente, se digirió el amplificado mediante diferentes enzimas de restricción con distintas posiciones de corte en las condiciones de temperatura y tiempo recomendadas, y se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comparar el patrón de bandas con una muestra control sin deleción (apartado 6.5.6). Si la secuencia de corte está implicada en la deleción, la enzima de restricción no actuará. De este modo se determinó de manera aproximada el tamaño y los límites de las deleciones. Seguidamente, se llevó a cabo una PCR con el DNA de la muestra problema, la mezcla de reacción descrita en la tabla 6.11 y con oligonucleótidos específicos que hibridarán en las regiones flanqueantes de la deleción, DC para la deleción de paciente PS1, y D2 para la deleción del paciente PS2 (tabla 6.12). Finalmente, se procedió a la secuenciación del fragmento siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.5.7.

Tabla 6.11 Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las región flanqueante de la deleción.

Componente	Concentración	Volumen (µl)
Tampón (Tris 100 mM, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, pH=8,3)	10X	5
dNTPs	10 mM (cada uno)	1
Oligonucleótido H	25 µM	0,5
Oligonucleótido L	25 µM	0,5
Taq polimerasa Roche	5 U/µl	0,25
DNA	amplificado PCR Larga	1
H₂O	-	hasta 25

Tabla 6.12 Oligonucleótidos empleados para amplificar y delimitar las deleciones.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Amplicón (pb)	Tm (°C)
DC-H	TAGCGATGAGAGTAATAGATA	2327	62
DC-L	CTACCCCTCTAGAGCCCAC		
D2-H	ACCTCAACACCACCTTCTTC	1393	66
D2-L	ATTGAGGAGTATCCTGAGGC		

6.5.9. Determinación del genotipo mitocondrial

El genotipo o haplogrupo mitocondrial se determinó comprobando la presencia o ausencia de determinados polimorfismos tras la secuenciación completa del mtDNA. En todos los casos se siguió un esquema preestablecido de búsqueda de los polimorfismos (figura 6.2), basado en la abundancia de los mismos dentro de la población (251).

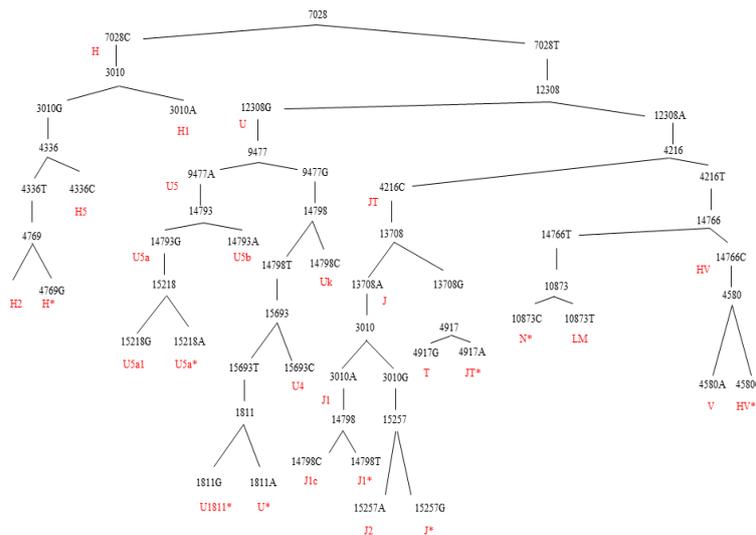


Figura 6.2 Esquema de la estrategia de determinación del genotipo mitocondrial. Polimorfismos (negro) y genotipos mitocondriales (rojo).

6.5.10. Huella genética

El AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit de ThermoFisher Scientific es un ensayo multiplex de repeticiones cortas en tándem (STR, del inglés Short Tandem Repeat) que amplifica 15 loci de repetición de tetranucleótidos y el marcador determinante de género Amelogenina, en una única reacción de PCR. Entre ellos se encuentran los 13 loci requeridos por el CODIS (Combined DNA Index System) y dos más adicionales (D2S1338 y D19S433) (252).

Para las muestras analizadas, se enviaron 100 ng de DNA extraído a partir del cultivo celular a la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, donde se llevaron a cabo los análisis.

6.5.11. Cuantificación del porcentaje de heteroplasma de deleciones

La medida del porcentaje de heteroplasma de deleciones se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real con sondas TaqMan® y la técnica de hibridación Southern blot.

6.5.11.1. Cuantificación del porcentaje de heteroplasma de deleciones mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La medida del porcentaje de heteroplasma mediante sondas TaqMan® consiste en la determinación simultánea del número de copias de dos genes mitocondriales, uno de ellos implicado en la deleción (fluoróforo FAM) y el gen *MT-RNR1* (fluoróforo VIC) localizado en una región muy conservada del mtDNA. De esta forma, en mtDNA completo habrá las mismas copias de ambos genes, sin embargo en una muestra con deleción, habrá menos copias del gen implicado en la deleción que de *MT-RNR1*. La diferencia entre ambas sondas relativizada a una muestra control sin deleción nos dará el porcentaje de heteroplasma de la muestra. El control y cada muestra estudiada se cargó por triplicado. En cada análisis se añadió un blanco, para asegurar el buen estado de los reactivos, y un control positivo de muestra con deleción conocida.

Para la cuantificación de la heteroplasma en muestras con una deleción delimitada, se analizó un gen implicado en la misma y otro no implicado, como control negativo interno de cada muestra. En el caso de las líneas celulares de los dos pacientes Pearson con los que se ha trabajado en el desarrollo de esta tesis, se analizaron los genes *MT-ND1* (no incluido en la deleción) y el gen *MT-ND4* (incluido en la deleción). Éstos se seleccionaron tras analizar el óptimo rendimiento de la técnica con varios genes mitocondriales localizados en diferentes zonas del genoma, como *MT-CO1*, *MT-CO3*, *MT-ND6* y *MT-CYB* (tabla 6.13).

Tabla 6.13. Sondas Taqman®, de ThermoFisher Scientific, empleadas para la cuantificación de la heteroplasmia de deleciones.

Nombre de la Sonda/Gen	Gen Mitocondrial	Fluoróforo
MT-ND1	NADH deshidrogenasa 1	FAM
MT-ND4	NADH deshidrogenasa 4	FAM
MT-ND6	NADH deshidrogenasa 6	FAM
MT-CO1	Citocromo C oxidasa 1	FAM
MT-CO3	Citocromo C oxidasa 3	FAM
MT-CYB	Citocromo b	FAM
MT-RNR1	12S RNA	VIC

La reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo a partir de 10-15 ng de DNA total de cada muestra. Se prepararon diluciones en agua estéril libre de DNAsas de cada una de las muestras a la concentración adecuada (2-3 ng/μl) para cargar la misma cantidad de DNA (10-15 ng) y el mismo volumen (5 μl) en la reacción. A continuación se muestran los volúmenes de la mezcla de reacción (tabla 6.14):

Tabla 6.14. Mezcla de reacción para cuantificar el porcentaje de heteroplasmia de una deleción

Componente	Concentración	Volumen (μl)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2X	10
Sonda MT-GEN (FAM)	20X	1
Sonda MT-RNR1 (VIC)	20X	1
DNA	2-3 ng/μl	5
Agua estéril	-	3

Las reacciones tuvieron lugar en el StepOne™ System de Applied Biosystems con las siguientes condiciones universales: 50 °C – 2 min, 95 °C – 10 min, y 40 ciclos de 95 °C – 15 s 60 °C – 1 min.

Los resultados se analizaron en el programa StepOne v2.3. Los cálculos realizados para la obtención del porcentaje de heteroplasmia, relativo a una muestra control sin deleción, se detallan a continuación:

$$\Delta Ct = Ct_{R1} - Ct_{gen\ analizado}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{control}$$

$$B = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

$$C = B * 100$$

$$Heteroplasmia (\%) = 100 - C$$

6.5.11.2. Cuantificación del porcentaje de heteroplasmia de deleciones mediante Southern blot

Para medir el porcentaje de heteroplasmia mediante Southern blot, es necesario tener el DNA mitocondrial total linealizado. Para ello, se incubó el DNA total con la enzima de restricción PvuII que genera un corte en la posición 2652 del mtDNA. Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl que contenían 4 µg de DNA, 2 µl de RNAsa libre de DNAsa, 5 µl del tampón de incubación (10X) correspondiente al enzima, 2 µl de espermidina 50 mM y 2 µl de la enzima de restricción (10 U/µl). Se incubó a 37 °C durante 6 horas o durante toda la noche. Tras este tiempo, se paró la digestión y se precipitó el DNA con 2 µl de NaCl 5 M, 100 µl de etanol frío y 4 µl de tRNA de levadura, de la casa comercial Sigma-Aldrich, a -20 °C toda la noche o a -70 °C durante 1 hora. A continuación, se centrifugó a 15 700 x g durante 30 minutos a 4 °C, se decantó y se secó el pellet en un concentrador en vacío *SpeedVac* a 45 °C durante 5-10 minutos. Finalmente, se resuspendió en 10 µl de agua pura y se dejó en agitación a 37 °C durante al menos 15 minutos.

Para la separación de los fragmentos de DNA, se empleó un gel de poco grosor al 0,7 % de agarosa, realizado según el protocolo del apartado 6.5.6, y se cargó todo el volumen de las muestras con una gota de tampón de carga. También se cargaron en la primera calle 15 µl del marcador *DNA Molecular Weight Marker II DIG-labeled*, de 23 kb marcado con digoxigenina, de Roche. La electroforesis se realizó a 40 V durante los primeros 15 minutos para facilitar la entrada de las muestras en el gel y posteriormente, a 100 V durante 3-4 horas.

Una vez finalizada la electroforesis, se transfirió el DNA a membranas de nylon *GE Healthcare Amersham™ Hybond™-N* mediante un aparato de transferencia en vacío (*Vacuum Blotting* de Pharmacia). Brevemente, se trató la membrana durante 5 minutos con agua destilada y se humedeció el aparato. Se colocó la membrana debajo de una máscara de plástico y seguidamente, el gel sobre ella. Se cerró el aparato y se conectó a una bomba de vacío hasta alcanzar los 50 mbar. Una vez alcanzado, se añadieron diferentes soluciones sobre el gel para realizar la transferencia del DNA. Primero se incubó con la solución de despurinización (HCl 0,25 M) durante 7 minutos, se retiró y se añadió la solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M) durante otros 7 minutos. A continuación, se eliminó y se incubó otros 7 minutos con la solución de neutralización (TRIS 1 M, NaCl 1,5 M, pH=7,5). Una vez finalizado el tratamiento, se añadió la solución de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato Trisódico 0,3 M, pH=7-7,2) sobre el gel hasta cubrir todo el sistema. Se incubó durante 30 minutos y se retiró todo el líquido. Concluida la transferencia, levantamos una esquina del gel y apagamos el vacío. Para comprobar

que la transferencia había sido correcta, se confirmó la ausencia de DNA en el gel mediante su visualización bajo una fuente de radiación UV. La membrana transferida, se lavó con SSC 2X durante 5 minutos y se dejó secar al aire. Finalmente, los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana mediante radiación ultravioleta en un *UV Crosslinker* con una energía de 120 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, por ambas caras.

Para realizar el análisis de deleciones, es necesario incubar la membrana con una sonda que hibrida con una región del mtDNA conservada, es decir, una zona que habitualmente no se encuentra delecionada como la del gen *MT-RNR2*. Por tanto, la sonda se unirá tanto al genoma normal como al genoma delecionado, de forma que si un paciente posee reorganizaciones del mtDNA, deleciones o duplicaciones, además del mtDNA normal, presentará bandas de distintos tamaños. El porcentaje de deleción presente en la muestra se determina mediante densitometría de las bandas encontradas mediante el software *Gel-Pro Analyzer*.

Para la hibridación de la sonda, se colocó la membrana en un tubo de hibridación con la solución de prehibridación (Na_2HPO_4 0,25M (pH=7,2), EDTA 1 mM, SDS al 20 % y el agente de bloqueo *Blocking Reagent*, de Roche, al 0,5 %) precalentada y se incubó en un horno giratorio durante 2 horas a 68 °C. A continuación, se retiró la solución de prehibridación y se añadió la solución de hibridación, compuesta de 0,1 ml de solución de prehibridación/ cm^2 de membrana a la que se le había añadido la sonda no radiactiva, previamente desnaturalizada en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y enfriada rápidamente (2,5 ng DNA marcado/ml solución), y se dejó incubando a 68 °C durante toda la noche. Finalizada la hibridación, se realizaron 3 lavados de la membrana de 20 minutos con 50 ml de tampón de lavado precalentado (Na_2HPO_4 20 mM, EDTA 1mM, SDS al 1%) en el mismo tubo y a 68 °C en el horno giratorio. La solución de hibridación con la sonda se recicló varias veces, conservándose a -20 °C.

La detección de la hibridación se realizó mediante ensayo inmunoenzimático. Para ello, se realizaron una serie de lavados de las membranas en bandejas pequeñas colocadas en un balancín a temperatura ambiente. Primero, se trataron durante 5 minutos con tampón T1 (ácido maléico 0,1 M, NaCl 3 M, Tween 20 al 0,3 %, pH=8 con NaOH). Seguidamente, se incubó durante 1 hora en tampón de bloqueo T2 (ácido maléico 10 mM, NaCl 0,3 M, Tween 20 al 0,03 %, agente de bloqueo al 0,5 %, pH=8). A continuación, se añadió el tampón T3 (compuesto por el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina *Anti-Digoxigenina-AP Fab fragments* de Roche, en tampón T2, a una dilución 1:15000) y se incubó durante 30 minutos. Después, se eliminó el exceso de anticuerpo realizando 4 lavados de 10 minutos con tampón T1. Posteriormente, se equilibró la membrana durante 20 minutos con tampón de detección T4 (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl_2

50 mM, pH=9,5), y seguidamente se incubó en 30 ml de solución con sustrato fluorescente (*CDP-Star*[®] de Roche). Esta dilución se preparó con tampón T4 (dilución 1:200) y se incubó con la membrana durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocó la membrana en un plástico transparente y se expuso con placas autoradiográficas *Amersham Hyperfilm*[™] de GE Healthcare Limited durante diferentes tiempos (3-20 minutos).

6.5.12. Cuantificación del número de copias del mtDNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La medida de los niveles de mtDNA se basó en la técnica de sondas TaqMan[®] que consiste en la determinación simultánea del genoma mitocondrial y el nuclear. La sonda mitocondrial (fluoróforo FAM) está diseñada para que hibride en una zona muy conservada del mtDNA (en el gen *MT-RNR1*), mientras que la nuclear (fluoróforo VIC) lo hace en el gen de la *RNAsa P*, que se encuentra en monocopia en el genoma haploide.

Para la cuantificación, se interpolaron los datos en una recta patrón generada mediante diluciones seriadas (1/3, 1/9, 1/27 y 1/81, en tampón Tris-HCl 10 mM pH = 8,5) de una mezcla inicial de dos plásmidos con 9×10^6 copias del gen *MT-RNR1* y 9×10^4 copias del gen nuclear de la *RNAsa P* (253).

La reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo a partir de 10-15 ng de DNA total de cada muestra. Se prepararon diluciones en agua estéril libre de DNAsas de cada una de las muestras a la concentración adecuada (2-3 ng/ μ l) para cargar la misma cantidad de DNA (10-15 ng) y el mismo volumen (5 μ l) en la reacción. A continuación, se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y de la sonda FAM (tabla 6.15), así como los volúmenes de los reactivos empleados en la reacción (tabla 6.16). Para la detección del gen de la *RNAsa P*, se empleó el reactivo *TaqMan*[™] *RNase P assay* marcado con el fluoróforo VIC, de ThermoFisher Scientific.

Tabla 6.15. Oligonucleótidos y sonda FAM empleados para cuantificar el número de copias del mtDNA y su temperatura de hibridación (T_m).

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
12S-L (directo)	CCACGGGAAACAGCATGTATT	58,4
12S-H (reverso)	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2
Sonda MT-FAM	FAM-TGCCAGCCACCGCG	69,3

Tabla 6.16. Mezcla de reacción para cuantificar el número de copias de mtDNA.

Componente	Concentración	Volumen (μ l)
TaqMan® Gene Expression MasterMix	2X	10
Oligo 12S-L	5 μ M	0,5
Oligo 12S-H	5 μ M	0,5
Sonda MT-FAM	10X	0,5
RNAse P (VIC)	20X	1
DNA	2-3 ng/ μ l	5
Agua estéril	-	2,5

Las reacciones se llevaron a cabo en el StepOne™ System de Applied Biosystems con condiciones similares a las del apartado 6.5.11.1. Los resultados se analizaron en el programa StepOne v2.3 y se expresaron como Δ Ct entre la sonda mitocondrial y la nuclear.

6.5.13. Medida de expresión de transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación de los niveles de mRNA de los distintos genes estudiados se llevó a cabo mediante la técnica de sondas TaqMan® utilizando como molde RNA extraído de células en cultivo (apartado 6.5.2) o cDNA previamente sintetizado (apartado 6.5.4). En cada caso, los genes estudiados se determinaron mediante sondas marcadas con fluoróforo FAM, y simultáneamente, se amplificó y detectó un gen constitutivo o de referencia mediante sondas marcadas con fluoróforo VIC. Las sondas utilizadas para la cuantificación de la expresión de genes nucleares y mitocondriales se detallan en la tabla 6.17. Como referencia se detectó el gen nuclear *GAPDH* en cuantificaciones de genes nucleares y el gen ribosómico nuclear *18S* en cuantificaciones de genes mitocondriales.

Tabla 6.17 Sondas Taqman®, de ThermoFisher Scientific, empleadas para la cuantificación de la expresión de diferentes genes nucleares y mitocondriales.

Nombre de la Sonda/Gen	Proteína codificada	Fluoróforo
TUBB3	B-III Tubulina	FAM
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2	FAM
NES	Nestina	FAM
TNNT2	Troponina T2 cardíaca	FAM
NKX2.5	Factor de transcripción NKX2-5	FAM
PPARGC1A	PGC-1 α	FAM
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A	FAM
TWNK	Helicasa Twinkle del mtDNA	FAM
SSBP1	Proteína de unión a DNA de cadena única	FAM
POLG2	DNA polimerasa γ 2 (subunidad accesoria)	FAM
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	VIC
MT-ND1	NADH deshidrogenasa 1	FAM
MT-ND4	NADH deshidrogenasa 4	FAM
MT-ND6	NADH deshidrogenasa 6	FAM
MT-COI	Citocromo C oxidasa 1	FAM
MT-ATP6	ATP sintasa 6	FAM
MT-CYB	Citocromo b	FAM
18S rRNA		VIC

Las reacciones tuvieron lugar en el StepOne™ System de Applied Biosystems. Los resultados se analizaron en el programa StepOne v2.3 y se expresaron como ΔC_t entre el gen de interés y el de referencia, y posteriormente se relativizaron a la muestra control para obtener el porcentaje relativo de expresión.

6.5.13.1. A partir de cDNA

La cantidad de cDNA para cada reacción fue 100 ng en 1 μ l. Los reactivos necesarios para la amplificación se muestran a continuación (tabla 6.18) y las condiciones utilizadas para la reacción fueron las siguientes: 50 °C – 2 min, 95 °C – 10 min, y 40 ciclos de 95 °C – 15 s y 60 °C – 1 min.

Tabla 6.18. Mezcla de reactivos para la determinación de la expresión de genes a partir de cDNA.

	Concentración	Volumen (μ l)
TaqMan Universal PCR Master Mix	2X	10
Sonda gen a estudiar (FAM)	20X	1
Sonda 18S (VIC)	20X	1
cDNA	100 ng/ μ l	1
H₂O estéril	-	7

6.5.13.2. A partir de RNA

La cantidad de RNA para cada reacción fue entre 10 y 1000 ng en 2 μ l. Los reactivos necesarios para la amplificación se muestran a continuación (tabla 6.19) y las condiciones utilizadas para la reacción fueron las siguientes: 48 °C – 15 min, 95 °C – 10 min y 40 ciclos de 95 °C – 15 s y 60 °C – 1 min.

Tabla 6.19. Mezcla de reactivos para determinar la expresión de genes a partir de RNA.

	Concentración	Volumen (μ l)
TaqMan® RT-PCR Mix	2X	10
TaqMan® RT Enzyme mix	40X	0,5
Sonda gen a estudiar (FAM)	20X	1
Sonda 18S (VIC)	20X	1
RNA	5-500 ng/ μ l	2
H ₂ O estéril	-	5,5

6.6. Manipulación y análisis de proteínas

6.6.1. Extracción de proteínas

6.6.1.1. Extracción de proteínas de líneas celulares para Western blot

Para analizar la cantidad de proteínas por Western blot se partió de placas de células en cultivo a una confluencia del 80 % o menor, se tripsinizaron y centrifugaron 5 min a 378 x g (las iPSCs y las células diferenciadas se centrifugaron a 200 y a 300 x g, respectivamente). El pellet celular resultante se lavó con 1 ml de PBS y tras otra centrifugación se resuspendió en un volumen adecuado (25-100 μ l), según el tamaño del pellet, de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH = 7,4, NaCl 50 mM, deoxicolato de sodio al 0,5 %, EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 1 %) autoclavado, añadiendo un cóctel de inhibidores de proteasas (1X) de Sigma-Aldrich. A continuación, la muestra se incubó en una noria giratoria durante 15 min a 4 °C, para favorecer la rotura de las membranas celulares mediante el detergente y se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 15700 x g para eliminar los restos celulares. Finalmente se recuperó el sobrenadante en un nuevo eppendorf y se congeló a -80 °C hasta su uso.

6.6.1.2. Extracción de proteínas de líneas celulares para Blue native-PAGE (BN-PAGE)

Se analizó la actividad en gel de los subcomplejos mitocondriales mediante la técnica de Blue Native-PAGE, con extracción previa de mitoplastos. Para ello, se partió de aproximadamente 3

millones de células recogidas de varias placas de 150 mm a una confluencia del 80 % o menor. El pellet obtenido tras la tripsinización y centrifugación durante 5 minutos a 378 x g, se congeló a -80 °C.

Para la extracción de mitoplastos, el pellet se descongeló en hielo y se lavó 2 veces con 200 µl de PBS frío y centrifugando a 8000 x g durante 5 min y a 4 °C. Una vez lavado, el pellet se resuspendió de nuevo en 200 µl de PBS frío, se adicionó un volumen igual de digitonina (a 8 mg/ml en PBS) y se incubó durante 10 min en hielo. A continuación, se añadió 1 ml de PBS frío, se centrifugó a 10 000 x g durante 5 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Este paso se realizó dos veces. Finalmente, el pellet obtenido se congeló de nuevo a -80 °C.

La extracción de proteínas de los mitoplastos se completó inmediatamente antes de realizar la electroforesis en geles no desnaturizantes (apartado 6.6.3.2). Para ello, se descongeló el pellet en hielo, se resuspendió en 75 µl de ácido aminocaproico 1,5 M y Bis-Tris/HCl pH=7, se añadió 7,5 µl de DDM (n-dodecil-β-D-maltósido) al 10 % y se incubó durante 5 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 16 000 x g durante 30 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Antes de cargar la muestra en el gel, se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

6.6.2. Determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Bradford

La medida de la cantidad de proteínas totales presente en un homogenado celular se realiza mediante una reacción colorimétrica, empleando el reactivo de Bradford.

Para ello, se construyó una recta patrón mediante diferentes diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) generadas a partir de una solución de concentración conocida (1 mg/ml): 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg de proteína por ml. Se cargaron 10 µl de cada una de las diluciones por triplicado en una placa de 96 pocillos, al igual que de cada una de las muestras diluidas de tal manera que su valor de absorbancia se encontrara en el centro de la recta de calibrado. El reactivo de Bradford (Bio-Rad) se diluyó 1:5 en agua destilada y se añadieron 200 µl sobre cada pocillo. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegida de la luz, se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

Para calcular la concentración de proteína en las muestras se interpolaron los valores de absorbancia en la ecuación de la recta obtenida, teniendo en cuenta la dilución realizada.

6.6.3. Electroforesis de proteínas

6.6.3.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación electroforética de proteínas extraídas a partir de pellets celulares se realizó en geles de poliacrilamida que permiten la separación de las mismas en función de su peso molecular.

Para la electroforesis de proteínas y su posterior inmunodetección por Western blot se utilizaron los geles comerciales de gradiente 4-15 % *Mini-PROTEAN® TGX™ gels* de Bio-Rad. Una vez colocado el gel en la cubeta, se retiró el peine y se lavaron los pocillos con tampón de electroforesis 1X (Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1 %). Las muestras se mezclaron con el tampón de carga 4X (Glicerol 20 %, Tris-HCl 0,16 M pH 6,8, EDTA 20 Mm, SDS 8 %, azul de bromofenol 0,4 %, β -mercaptoetanol 4 %) y se desnaturalizaron durante 5 min a 100 °C.

A continuación, se cargaron en el gel entre 20 y 60 μ g de proteínas totales. La electroforesis se realizó con el tampón de electroforesis 1X a 50 V hasta que las muestras salieron de los pocillos y a continuación, se mantuvo a un voltaje constante de 200 V hasta que se alcanzó la parte inferior del gel.

6.6.3.2. Electroforesis de proteínas en geles no desnaturalizantes (Blue Native-PAGE)

La separación electroforética de proteínas extraídas a partir de enriquecido mitocondrial se realizó con el sistema de Life Technologies *NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System*, que permite la separación de las proteínas sin desnaturalizar en función de su tamaño. El principio de esta técnica es que el colorante Coomassie es un sustituto para la unión al detergente, de manera que los complejos proteicos pasan a estar cargados (el colorante tiene carga negativa) y no en forma de micelas con el detergente. Así, se puede estimar el peso molecular del complejo proteico, lo que normalmente no es posible debido a la unión del detergente. Esto permite la conservación de la estructura nativa y de la actividad de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS. Concretamente, se emplearon los geles *NativePAGE™* de gradiente 3-12 % para analizar la actividad del complejo V mitocondrial.

Antes de cargar las muestras, se retiró el peine del gel y se lavaron los pocillos varias veces con la solución de cátodo claro (tabla 6.20). A continuación, se colocaron los geles en el sistema *XCell™SureLock™*, de Life Technologies, y se dejaron los pocillos llenos con la misma solución

para cargar las muestras. Se empleó la solución de cátodo claro ya que se observó mayor rendimiento en el análisis de la actividad del complejo V.

Se cargaron entre 40-50 µg de proteína, que previamente se mezclaron con el tampón de carga *NativePAGE 5% G-250 Sample Additive* (incluido en el *NativePAGE Sample Prep Kit*, de Life Technologies) en una proporción ¼ de la concentración de detergente en la muestra. En los pocillos que quedaron vacíos, se añadió también tampón de carga. La electroforesis se llevó a cabo a 4 °C y se fueron modificando las condiciones del voltaje y el tampón de electroforesis durante el proceso, para favorecer la migración de las muestras. En primer lugar, el gel se corrió a 100 V hasta que las muestras avanzaron ¼ del recorrido. Seguidamente, se sustituyó el tampón de cátodo claro por el tampón de ánodo (tabla 6.20) y se subió el potencial a 150 V. A mitad del recorrido, se incrementó hasta 200 V, y a los ¾ hasta 250 V hasta que las muestras llegaron al final. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a medir la actividad de los complejos mitocondriales sobre el gel (apartado 6.7.3).

Tabla 6.20. Composición de los tampones empleados en electroforesis BlueNative-PAGE del sistema *NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel*.

Tampón	Composición
Tampón del cátodo claro (1X)	10 mL de Running Buffer (20X), 1 ml de Cathode Buffer Additive (20X), 189 ml de agua destilada
Tampón del ánodo (1X)	50 ml de Running Buffer (20X), 950 ml de agua destilada

6.6.4. Transferencia a membranas PVDF desde geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la transferencia de proteínas a membranas PVDF se utilizó el sistema de transferencia *Trans-Blot® Turbo™* siguiendo las instrucciones del equipo. El programa usado fue el MIXED MW (durante 7 minutos a 2,5 A y hasta 25 V), indicado para proteínas de 5 a 150 kDa.

6.6.5. Inmunodetección de proteínas en membranas PVDF

6.6.5.1. Incubación con anticuerpos primario y secundario

La membrana PVDF ya transferida, se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) en PBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente, o bien toda la noche en la cámara fría. El anticuerpo primario se incubó en PBS-Tween 1X (PBS-T), con leche desnatada al 1 %, en las condiciones de temperatura y tiempo adecuado (tabla 6.21).

Transcurrido este tiempo, se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 min con PBS-T, para arrastrar posibles restos de anticuerpo primario. Seguidamente, se incubó la membrana durante

1 h con el anticuerpo secundario adecuado (según el método de detección, apartado 6.6.5.2) en PBS-T al 0,1 % de leche desnatada en polvo.

Después de esto, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con PBS-T para eliminar las trazas de anticuerpo secundario y se procedió a la detección, tal y como se explica en el apartado 6.6.5.2. En el caso de realizar la detección por el sistema Odyssey® (apartado 6.6.5.2.2), se realizaron los últimos lavados en PBS 1X y agua destilada. Los anticuerpos empleados para Western blot y la dilución empleada se recogen en la siguiente tabla (tabla 6.21):

Tabla 6.21. Anticuerpos empleados y condiciones de trabajo para detección de proteínas mediante Western blot.

Anticuerpo	Casa comercial	Especie	Dilución	Tiempo y temperatura de incubación
LC3B	Sigma	Conejo	1:1000	toda la noche, 4 °C
TUBB3	Abcam	Conejo	1:1000	toda la noche, 4 °C
cTnT	Abcam	Ratón	1:500	1 hora, temperatura ambiente
GAPDH	Abcam	Ratón	1:1000	1 hora, temperatura ambiente

6.6.5.2. Detección de proteínas

6.6.5.2.1. Detección de proteínas mediante el método clásico

La membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente del kit *SuperSignal®West Pico IgG Detection Kit* de ThermoFisher Scientific. La luminiscencia de dicha reacción se detectó mediante una placa autoradiográfica *Amersham Hyperfilm™* de GE Healthcare Limited y su posterior revelado. En ocasiones, también se detectó mediante el capturador de imagen *Amersham™ Imager 600* de GE Healthcare Life Science, tras la incubación de la membrana durante unos minutos con el kit *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate*. 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 con el programa ImageJ, y las imágenes obtenidas con el capturador de imagen se cuantificaron con el programa ImageQuant TL 1D v8.1.

6.6.5.2.2. Detección de proteínas mediante el sistema Odyssey®

El sistema de imágenes Odyssey® utiliza dos canales fluorescentes infrarrojos (700 y 800 nm) para la detección y análisis simultáneo de proteínas. Las membranas fueron escaneadas y procesadas según los requerimientos del equipo. Una vez obtenidas las imágenes las bandas fueron cuantificadas con el programa ImageJ.

6.6.5.3. Reutilización de membranas

Para reutilizar una membrana después de la detección, se incubó con solución de *Stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2 %, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) a 58 °C durante 20-30 min. Seguidamente, se realizaron dos lavados de 10 min a temperatura ambiente con PBS-T para eliminar las trazas de solución de *stripping*, y se procedió a la siguiente inmunodetección repitiendo los procesos anteriormente descritos.

6.7. Estudios funcionales del sistema de fosforilación oxidativa

6.7.1. Determinación de la actividad enzimática de la Citrato Sintasa

La actividad citrato sintasa se mide como el incremento en la absorbancia a 412 nm que se produce debido a la formación de la forma aniónica del ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras añadir oxalacetato como iniciador de la reacción (254).

6.7.1.1. Preparación de las muestras

Para cuantificar la actividad de la citrato sintasa se partió de un pellet conservado a -80 °C, obtenido de placas de células en cultivo a una confluencia del 80 % o menor o de células recogidas tras la medida del consumo de oxígeno con un oxígrafo de alta resolución (apartado 6.7.5). Tras descongelar el pellet en hielo, se resuspendió en el volumen adecuado (50 μl por cada millón y medio de células) de tampón fosfato potásico 10 mM pH=7,4. Seguidamente, se congeló la suspensión celular en Nitrógeno líquido y se descongeló rápidamente a 37 °C, procedimiento que se repitió tres veces. Finalmente, se midió la concentración de proteína por el método de Bradford (apartado 6.6.2) y se conservó a -80 °C hasta su uso. En algunas ocasiones, la actividad se midió a partir de proteínas extraídas para la medida de complejo IV según el protocolo descrito en el apartado 6.7.2.1.

6.7.1.2. Determinación de la actividad enzimática de la citrato sintasa

Para la determinación de la actividad, se preparó un mix de reacción con los componentes que se muestran en la tabla 6.22. Tanto el DTNB (ácido 2-nitrobenzoico) como el oxalacetato se prepararon en fresco, mientras que el acetyl-CoA se almacenó alicuotado a -80 °C. Se añadieron 185 μl de esta mezcla en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y 5 μl de cada extracto proteico objeto de estudio.

Tabla 6.22. Mezcla de reacción para la medida de actividad de enzima citrato sintasa.

Componente	Concentración	Volumen (µl)
Tris-HCl, pH 8	1 M	15
DTNB (en Tris-HCl, pH 8, 10 mM)	1 mM	20
Tritón X-100	10 %	2
Acetil-CoA	7 mg/ml	2
Muestra	~ 5 mg/ml	5
H ₂ O	-	146

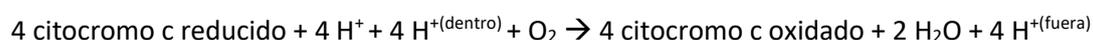
Por último se añadieron 10 µl de oxalacetato, preparado a una concentración de 50 mM en agua destilada. Esta adición se realiza automáticamente con el pipeteador programable del aparato NOVOSTAR (BMG Labtech), de modo que las medidas comienzan cuando empieza la reacción. La medida de absorbancia se realiza a 412 nm durante 5 minutos a 30 °C, con la cinética mínima que permita el aparato.

La actividad de citrato sintasa obtenida (pendiente de la recta en mOD/min) se divide por la cantidad total de proteínas en µg (calculada anteriormente por el método de Bradford) para obtener la actividad específica.

6.7.2. Determinación de la actividad enzimática y cantidad del complejo IV de la cadena respiratoria (CIV)

Se midieron los niveles del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial como indicador de la presencia y funcionalidad del sistema OXPHOS, utilizando para ello el *Complex IV Human Duplexing (Activity + Quantity) Microplate Assay Kit* de MitoSciences (Abcam).

El complejo IV se inmunocaptura en la placa de 96 pocillos suministrada con el kit y su actividad se determina colorimétricamente, siguiendo la oxidación del citocromo c reducido por disminución de la absorbancia a 550 nm, según la siguiente reacción:



En los mismos pocillos la cantidad de enzima se mide añadiendo un anticuerpo específico del complejo IV conjugado con fosfatasa alcalina. Esta fosfatasa transforma un sustrato incoloro en un producto de color amarillo que absorbe a 405 nm. La reacción tiene lugar de forma proporcional entre el tiempo y la cantidad de proteína capturada en los pocillos.

6.7.2.1. Preparación de las muestras

Para la medida de la actividad y cantidad del complejo IV, se recogieron las células con el método adecuado según el modelo celular, y el pellet obtenido, tras un lavado con PBS (o DPBS), se resuspendió en la solución 1 suministrada por el kit. A continuación, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (apartado 6.6.2), que fue posteriormente ajustada a 5 mg/ml con esta misma solución (concentración recomendada por la casa comercial para una correcta acción del detergente).

A continuación, se añadió detergente en una dilución 1:10 con respecto al volumen total de la muestra y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 20 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Con dicho sobrenadante se realizó un segundo Bradford para determinar la concentración exacta de proteínas. Finalmente, la concentración de proteínas se ajustó mediante la dilución adecuada de las muestras y según el modelo celular: en fibroblastos y células iPS, se ajustó a 0,1 µg/µl (20 µg/200 µl), y en el caso de los híbridos, se ajustó a 0,05 µg/µl (10 µg/200 µl).

6.7.2.2. Determinación de la actividad y cantidad de CIV

Para la determinación de la actividad y cantidad del CIV, se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial.

Brevemente, se añadieron 200 µl de las muestras en cada pocillo a la concentración adecuada en cada caso, cada una de ellas por triplicado, incluyendo también un triplicado sin proteínas (blanco). Tras 3 horas de incubación, se añadió el sustrato (citocromo c) y se llevó a cabo la medida espectrofotométrica. En los inicios de la reacción la absorbancia a 550 nm decrece linealmente, de forma proporcional a la cantidad de citocromo c que se oxida. Para determinar la actividad en la muestra, se calcula la pendiente de dicha recta (utilizando el software del lector de placas) expresada en mOD/min, y se compara con la obtenida en los controles.

Tras medir la actividad, se realiza la medida de la cantidad de complejo IV en la misma placa. Para ello, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo primario de detección y posteriormente otra hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con fosfasa alcalina, que convertirá el sustrato incoloro en amarillo a 405 nm. La cantidad de complejo IV se expresa como cantidad relativa respecto a una muestra control, restando la absorbancia inicial de la final (en el rango de respuesta lineal).

6.7.3. Medida de la actividad de los complejos respiratorios en gel

La actividad de los complejos respiratorios del sistema OXPHOS se puede medir en gel ya que la electroforesis en geles no desnaturizantes Blue Native-PAGE permite mantener la forma activa de los complejos (apartado 6.6.3.2). En concreto, se realizó la detección catalítica del complejo V.

En primer lugar, tras la electroforesis, se equilibró el gel con el tampón de equilibrado (Tris 34 mM, glicina 270 mM pH=7,8 y MgSO₄ 14 mM en agua libre de fosfatos) durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió la solución de detección específica para el complejo V, compuesta por ATP 8 mM y acetato de plomo al 0,2 %, y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Para preparar la solución de detección, se añadió en primer lugar el nitrato de plomo al 0,2 % (p/v) en el tampón de equilibrado y se filtró en caso de observar la aparición de precipitados. Seguidamente, se preparó una disolución previa 100 mM de ATP en un pequeño volumen de la disolución anterior, y se adicionó el volumen correspondiente para obtener el tampón completo con 8 mM de ATP. Finalmente, se procedió al escaneado del gel.

6.7.4. Determinación de niveles de ATP mitocondrial

Para la determinación de los niveles de ATP mitocondrial se empleó *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay* y se relativizó al número de células cuantificado mediante el reactivo *CellTiter-Blue[®] Reagent*, ambos de la casa comercial Promega. La medida se realizó en placas de 96 pocillos de fondo blanco de la casa comercial Nunc.

Aproximadamente 14 horas antes de la medida, se sembraron las células en las placas de 96 pocillos a una densidad adecuada según el tipo celular, ya que tienen tasas de crecimiento diferentes y se quiso evitar un exceso de confluencia de estas. Los fibroblastos se sembraron a una densidad de 20 000 células por pocillo y los cíbridos a una densidad de 10 000 células por pocillo. La medida de ATP y número de células se realizaron en diferentes pocillos sembrados a la misma densidad y al mismo tiempo.

Para medir el número de células, en condiciones estériles, se lavaron los pocillos 2 veces con PBS y se incubaron las células durante 2 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ con 100 µl por pocillo de medio DMEM free sin suero y suplementado con piruvato (1 mM), y 20 µl de reactivo *CellTiter-Blue[®] Reagent* por pocillo. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia excitando a 550 nm mediante el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

Para medir el ATP mitocondrial, en condiciones estériles, se lavaron los pocillos 2 veces con PBS y se incubaron las células durante 2 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ con 100 µl por pocillo de medio DMEM free sin suero y suplementado con 2-desoxi-D-glucosa (5 mM), para bloquear la glucólisis, y piruvato (1 mM). Transcurrido este tiempo, se añadió 100 µl de la mezcla de los reactivos *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*, previamente mezclados y estabilizados, y se incubó durante 10 minutos. Para la medida, se realizó previamente una agitación de la placa, favoreciendo el lisado de las células, y se midió la luminiscencia en el lector de placas NOVOstar (BMG Labtech).

Se adaptó el protocolo para medir el ATP mitocondrial en células iPS, ya que tienden a diferenciarse cuando se siembran como células individuales. Por ello, se trabajó con placas de 100 mm con menos del 80 % de confluencia. Las células se incubaron durante 2 horas con los medios y reactivos necesarios para la medida de ATP mitocondrial, descritos previamente. Transcurrido este tiempo, se recogieron las células, se contaron (apartado 6.3.5) y se diluyeron para obtener una suspensión celular con 1500-2000 células/ml, de la que se sembraron 100 µl por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo blanco. Sobre ellas, se añadieron 100 µl por pocillo de la mezcla de los reactivos *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*, previamente mezclados y estabilizados. Se incubó la placa durante 10 minutos y se procedió a la medida. Los datos obtenidos se expresaron como cantidad de ATP mitocondrial por célula.

6.7.5. Consumo de oxígeno en células intactas

El consumo de oxígeno se midió con un oxígrafo de alta resolución (Oroboros®), asociado al software DatLab utilizado para la adquisición y análisis de datos. Antes de cada medida se realizó una calibración en medio de cultivo sin suero.

Para esta técnica se partió de células con una confluencia de hasta el 80 %, que se recogieron con el método adecuado según el modelo celular y se centrifugaron a 378 x g durante 5 min para fibroblastos y cíbridos, y a 200 x g durante 4 min para células iPS. A continuación, se contaron y el pellet celular obtenido se diluyó para obtener 1 x 10⁶ células/ml en 2 ml (volumen empleado en la cámara de medida del oxígrafo). Después de introducir la muestra, se cerró la cámara, y una vez que se estabilizó el flujo, se obtuvo la denominada respiración endógena o basal.

Seguidamente, se determinó la respiración filtrante añadiendo oligomicina a 20 nM en la cámara, que inhibe la ATP sintasa o complejo V, y posteriormente, la respiración desacoplada añadiendo el desacoplante FCCP en concentraciones crecientes hasta alcanzar la respiración

máxima de la línea. Por último, se determinó la respiración no dependiente de la cadena adicionando KCN a 5 mM, que inhibe el complejo IV.

Las determinaciones de consumo de oxígeno se realizaron en al menos tres experimentos independientes y se alternaron las cámaras de medida para evitar errores que derivaran de la variación de las mismas.

6.7.6. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante citometría de flujo

El proceso de generación de ROS puede cuantificarse mediante el compuesto 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), que detecta y cuantifica el H₂O₂ producido intracelularmente. La detección se basa en la conversión de la sonda no fluorescente (DCFH-DA) en un compuesto altamente fluorescente (DCF). Primero, la DCFH-DA atraviesa la membrana celular y es desacetilada por esterasas para formar la DCFH, que queda retenida en las células. Después, la DCFH se convierte en la DCF por la acción del peróxido de hidrógeno, gracias a la acción de la peroxidasa (255).

Se sembraron 50 000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, y se mantuvieron durante 72 horas en medio DMEM con 5 mM de glucosa, suplementado con 5 % SFB y uridina (50 µg/ml). Para la medida, se lavaron los pocillos con PBS y se incubaron las células con una solución 20 µM de DCFH-DA en *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS), de Gibco®, durante 30 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, se lavó con PBS y se recogieron las células tripsinizándolas y centrifugándolas a 378 x g durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de HBSS, y se midió la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 mediante el citómetro de flujo *Cytomics FC 500* de Beckman Coulter. En cada experimento se utilizó como control positivo de la producción de ROS células tratadas durante 24 horas con menadiona 10 µM en HBSS.

Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando el programa informático Weasel.

6.7.7. Medida de la superficie de membrana interna mitocondrial mediante citometría de flujo

Para realizar la medida de superficie de membrana interna mitocondrial se utilizó la sonda Naranja Nonil de Acridina (NAO), que se une a la cardiolipina (lípidos característicos de la membrana interna mitocondrial) de forma directamente proporcional a su cantidad.

Se sembraron 50 000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, y se mantuvieron durante 72 horas en medio DMEM con 5 mM de glucosa, suplementado con 5 % SFB y uridina (50 µg/ml). Para la medida, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se incubaron las células con una solución de NAO a una concentración de 1 µM en HBSS durante 10 minutos a 37 °C y 5 % CO₂. Tras este tiempo, se lavó con PBS y se recogieron las células tripsinizándolas y centrifugándolas a 378 x g durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de HBSS, y se midió la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 mediante el citómetro de flujo *Cytomics FC 500* de Beckman Coulter.

Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando el programa informático Weasel.

6.7.8. Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo

Para realizar la medida del potencial de membrana interna mitocondrial se utilizó DiOC₆(3) (yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina), un catión lipofílico que se acumula en el interior de orgánulos en función de su carga.

Se sembraron 50 000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, y se mantuvieron durante 72 horas en medio DMEM con 5 mM de glucosa, suplementado con 5 % SFB y uridina (50µg/ml). Para la medida, se recogieron las células mediante tripsinización y se centrifugaron a 378 x g durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de una solución 20 nM de DiOC₆ en HBSS y se incubó durante 15 minutos a 37°C y protegido de la luz. Tras este tiempo, se midió la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 mediante el citómetro de flujo *Cytomics FC 500* de Beckman Coulter.

Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando el programa informático Weasel.

6.8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa STATVIEW versión 6.0 y los gráficos se diseñaron con GraphPad Prism versión 5. Cuando fue posible, se analizó la normalidad de las variables. En la mayoría de los estudios realizados con células se empleó el test no paramétrico U de Mann Whitney. Los valores representados en las gráficas fueron los de las medias ± su desviación estándar. Se consideró significativo una p menor de 0,05.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*. 1967.
2. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(4):204–24.
3. Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *Journal of Cell Biology*. 2006;175(2):237–47.
4. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*. 2012.
5. Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: Tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microscopy Research and Technique*. 1994;27(4):278–83.
6. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*. 2000.
7. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO Journal*. 2002;21(7):1616–27.
8. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *The Journal of cell biology*. 1966;30(2):269–97.
9. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(9):4892–9.
10. Lackner LL. Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biology*. 2014.
11. Acin-Perez R, Enriquez JA. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2014;1837(4):444–50.
12. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010.
13. Elston T, Wang H, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*. 1998.
14. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence

- and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457–65.
15. van den Ameele J, Li AYZ, Ma H, Chinnery PF. Mitochondrial heteroplasmy beyond the oocyte bottleneck. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2020;97:156–66.
 16. Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*. 1981;290(5806):470–4.
 17. Nissanka N, Minczuk M, Moraes CT. Mechanisms of Mitochondrial DNA Deletion Formation. *Trends in Genetics*. 2019;35(3):235–44.
 18. Robberson DL, Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(3):737–41.
 19. Kasamatsu H, Vinograd J. Harumi Kasamatsu and Jerome Vinograd. *Annual review of biochemistry*. 1974;43:695–719.
 20. Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled Leading-and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA eubacteria. Replication of the H strand on this model is proposed to initiate at a single site (OH), and to proceed unidirectionally until two-thirds of the way around the These. *Cell*. 2000;100(5):515–24.
 21. Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, et al. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO Journal*. 2006;25(22):5358–71.
 22. McKinney EA, Oliveira MT. Replicating animal mitochondrial DNA. *Genetics and Molecular Biology*. 2013;36(3):308–15.
 23. Suomalainen A, Battersby BJ. Mitochondrial diseases: The contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(2):77–92.
 24. O'Brien TW. Properties of Human Mitochondrial Ribosomes. *IUBMB Life*. 2003;55(9):505–13.
 25. Sun X, John JCS. The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis. *Biochemical Journal*. 2016;473(19):2955–71.

26. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999.
27. Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, et al. Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(51).
28. Latorre-Pellicer A, Lechuga-Vieco AV, Johnston IG, Hämäläinen RH, Pellico J, Justo-Méndez R, et al. Regulation of Mother-to-Offspring Transmission of mtDNA Heteroplasmy. *Cell Metabolism*. 2019;30(6):1120-1130.e5.
29. Shanske S, Tang Y, Hirano M, Nishigaki Y, Tanji K, Bonilla E, et al. Identical Mitochondrial DNA Deletion in a Woman with Ocular Myopathy and in Her Son with Pearson Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;71(3):679–83.
30. Zinovkina LA. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83(3):233–49.
31. Kauppila JHK, Stewart JB. Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2015;1847(11):1354–61.
32. Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity - Critical analysis and update. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(5).
33. St. John JC. Mitochondrial DNA copy number and replication in reprogramming and differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2016;52:93–101.
34. Montoya J, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2009;1787(5):476–783.
35. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, et al. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(17):3343–53.
36. Chabi B, Adhietty PJ, Ljubicic V, Hood DA. How is mitochondrial biogenesis affected in mitochondrial disease? *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2005;37(12):2102–10.

37. Uittenbogaard M, Chiaramello A. Mitochondrial Biogenesis: A Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 2014;20(35):5574–93.
38. Malik AN, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*. 2013;13(5):481–92.
39. Bouchez C, Devin A. Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells*. 2019;8(4):287.
40. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, Maresca A, Pisano A, Valentino ML, et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014;137(2):335–353.
41. Iommarini L, Maresca A, Caporali L, Valentino ML, Liguori R, Giordano C, et al. Revisiting the issue of mitochondrial dna content in optic mitochondrial neuropathies. *Neurology*. 2012;79(14):1517–9.
42. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchi E, Zani M, et al. Induction of Mitochondrial Biogenesis Is a Maladaptive Mechanism in Mitochondrial Cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(14):1362–9.
43. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*. 2013;20(1):31–42.
44. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. The art of mitochondrial maintenance. 2018;28(4):170–85.
45. Yoo SM, Jung YK. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Molecules and Cells*. 2018;41(1):18–26.
46. Dombi E, Mortiboys H, Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;25(40):5597–612.
47. Ruiz-Pesini E, Emperador S, López-Gallardo E, Hernández-Ainsa C, Montoya J. Increasing mtDNA levels as therapy for mitochondrial optic neuropathies. *Drug Discovery Today*. 2018.
48. Baker N, Patel J, Khacho M. Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and

- supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion*. 2019;49:259–68.
49. Chan DC. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2020;15:235–59.
 50. Nicholls TJ, Gustafsson CM. Separating and Segregating the Human Mitochondrial Genome. *Trends in Biochemical Sciences*. 2018;43(11):869–81.
 51. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*. 2018;62(3):341–60.
 52. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley IV CA, Ramalho-Santos J, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS ONE*. 2011;6(6).
 53. Folmes CD, Nelson TJ, Terzic A. Energy metabolism in nuclear reprogramming. *Biomarkers in Medicine*. 2011;5(6):715–29.
 54. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metabolism*. 2013;18(3):325–32.
 55. Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency- dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metabolism*. 2012;14(2):264–71.
 56. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2009.
 57. Kelly RDW, Sumer H, McKenzie M, Facucho-Oliveira J, Trounce IA, Verma PJ, et al. The Effects of Nuclear Reprogramming on Mitochondrial DNA Replication. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2013;9(1):1–15.
 58. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metabolism*. 2013;18(3):325–32.
 59. Montoya Villarroya J, Emperador Ortiz S, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E. Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial. 4th ed. Sanjurjo P, Baldellou A, editors. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades*

- metabólicas hereditarias. 2014. 773–790 p.
60. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2019.
 61. Samuels DC, Schon EA, Chinnery PF. Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends in Genetics*. 2004;20(9):393–8.
 62. Sadikovic B, Wang J, El-Hattab A, Landsverk M, Douglas G, Brundage EK, et al. Sequence homology at the breakpoint and clinical phenotype of mitochondrial DNA deletion syndromes. *PLoS ONE*. 2010;5(12).
 63. Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(20):7952–6.
 64. Persson Ö, Muthukumar Y, Basu S, Jenninger L, Uhler JP, Berglund AK, et al. Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions. *Nature Communications*. 2019;10(1).
 65. Nissanka N, Bacman SR, Plastini MJ, Moraes CT. The mitochondrial DNA polymerase gamma degrades linear DNA fragments precluding the formation of deletions. *Nature Communications*. 2018;9(1).
 66. Peeva V, Blei D, Trombly G, Corsi S, Szukszto MJ, Rebelo-Guiomar P, et al. Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery. *Nature Communications*. 2018;9(1):1–11.
 67. Fukui H, Moraes CT. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Human Molecular Genetics*. 2009;18(6):1028–36.
 68. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochemical Journal*. 2003;370(3):751–62.
 69. Pitceathly RDS, Rahman S, Hanna MG. Single deletions in mitochondrial DNA - Molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. *Neuromuscular Disorders*. 2012;22(7):577–86.
 70. Tang Y, Schon EA, Wilichowski E, Vazquez-Memije ME, Davidson E, King MP.

- Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): New insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression. *Molecular Biology of the Cell*. 2000;11(4):1471–85.
71. Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, et al. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *The Lancet*. 2004;364:592–6.
 72. Grady JP, Campbell G, Ratnaik T, Blakely EL, Falkous G, Nesbitt V, et al. Disease progression in patients with single, large-scale mitochondrial DNA deletions. *Brain*. 2014;137(2):323–34.
 73. Yamashita S, Nishino I, Nonaka I, Goto YI. Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single large-scale mitochondrial DNA deletions. *Journal of Human Genetics*. 2008;53(7):598–606.
 74. Kowald A, Kirkwood TBL. Resolving the enigma of the clonal expansion of mtDNA deletions. *Genes*. 2018;9(3).
 75. Jeppesen TD, Duno M, Vissing J. Mutation Load of Single, Large-Scale Deletions of mtDNA in Mitotic and Postmitotic Tissues. *Frontiers in Genetics*. 2020;11:1–6.
 76. Rocha MC, Rosa HS, Grady JP, Blakely EL, He L, Romain N, et al. Pathological mechanisms underlying single large-scale mitochondrial DNA deletions. *Annals of Neurology*. 2018;83(1):115–30.
 77. López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. CPEO and KSS differ in the percentage and location of the mtDNA deletion. *Mitochondrion*. 2009;9(5):314–7.
 78. Campbell G, Krishnan KJ, Deschauer M, Taylor RW, Turnbull DM. Dissecting the mechanisms underlying the accumulation of mitochondrial DNA deletions in human skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(17):4612–20.
 79. Wallace DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American*. 1997.
 80. Theurey P, Pizzo P. The aging mitochondria. *Genes*. 2018;9(1).
 81. Sreedhar A, Aguilera-Aguirre L, Singh KK. Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell Death and Disease*. 2020;11(6).

Bibliografía

82. Rango M, Bresolin N. Brain mitochondria, aging, and Parkinson's disease. *Genes*. 2018;9(5).
83. Diaz F. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(21):4626–33.
84. Russell OM, Fruh I, Rai PK, Marcellin D, Doll T, Reeve A, et al. Preferential amplification of a human mitochondrial DNA deletion in vitro and in vivo. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–10.
85. Grey ADNJ De. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *Bioessays*. 1997;19(2):161–7.
86. Holt IJ, Speijer D, Kirkwood TBL. The road to rack and ruin: Selecting deleterious mitochondrial DNA variants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369(1646).
87. Moraes CT, Schon EA, DiMauro S, Miranda AF. Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;160(2):765–71.
88. Farruggia P, Di Marco F, Dufour C. Pearson Syndrome. *Medico e Bambino*. 2018;37(6):371–7.
89. Cherry ABC, Gagne KE, McLoughlin EM, Baccei A, Gorman B, Hartung O, et al. Induced pluripotent stem cells with a mitochondrial dna deletion. *Stem Cells*. 2013;31(7):1287–97.
90. DiMauro S, Schon EA, Salvatore D, A SE, DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *New England Journal of Medicine*. 2003 Jun 26;348(26):2656–68.
91. Hayashi JI, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto YI, Nonaka I. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(23):10614–8.
92. Comte C, Tonin Y, Heckel-Mager AM, Boucheham A, Smirnov A, Auré K, et al. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic

- mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(1):418–33.
93. Katada S, Mito T, Ogasawara E, Hayashi J-I, Nakada K. Mitochondrial DNA with a Large-Scale Deletion Causes Two Distinct Mitochondrial Disease Phenotypes in Mice. *Genes|Genomes|Genetics*. 2013;3(9):1545–52.
94. Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, et al. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *European Journal of Biochemistry*. 1998;257(1):192–201.
95. Pallotti F, Baracca A, Hernandez-Rosa E, Walker WF, Solaini G, Lenaz G, et al. Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochemical Journal*. 2004;384(2):287–93.
96. Bourgeron T, Chretien D, Rotig A, Munnich A, Rustin P. Fate and expression of the deleted mitochondrial DNA differ between human heteroplasmic skin fibroblast and Epstein-Barr virus-transformed lymphocyte cultures. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(26):19369–76.
97. Frazier AE, Thorburn DR, Compton AG. Mitochondrial energy generation disorders: Genes, mechanisms, and clues to pathology. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(14):5386–95.
98. Moro L. Mitochondria at the Crossroads of Physiology and Pathology. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(6):1971.
99. López-Gallardo E, Emperador S, Solano A, Llobet L, Martín-Navarro A, López-Pérez MJ os., et al. Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations. *Human molecular genetics*. 2014;23(23):6191–200.
100. Jou MJ, Peng TI, Wu HY, Wei YH. Enhanced generation of mitochondrial reactive oxygen species in cybrids containing 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1042(5):221–8.
101. Sorrentino V, Menzies KJ, Auwerx J. Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2018;58(1):353–89.
102. Liemburg-Apers DC, Schirris TJJ, Russel FGM, Willems PHGM, Koopman WJH.

- Mitochondrial Dysfunction Triggers a Rapid Compensatory Increase in Steady-State Glucose Flux. *Biophysical Journal*. 2015;109(7):1372–86.
103. Reichmann H, Vogler L, Seibel P. Ragged Red or Ragged Blue Fibers. *European Neurology*. 1996;36 (2):98–102.
104. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2017;23(1):5–22.
105. 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 Research Notes*. 2018;11(1):1–4.
106. Vasileiou P, Evangelou K, Vlasis K, Fildis G, Panayiotidis M, Chronopoulos E, et al. Mitochondrial Homeostasis and Cellular Senescence. *Cells*. 2019;8(7):686.
107. Liu HM, Tsai LP, Chien YH, Wu JF, Weng WC, Peng SF, et al. A novel 3670-base pair mitochondrial DNA deletion resulting in multi-systemic manifestations in a child. *Pediatrics and Neonatology*. 2012;53(4):264–8.
108. Komulainen T, Hautakangas MR, Hinttala R, Pakanen S, Vähäsarja V, Lehenkari P, et al. Mitochondrial DNA depletion and deletions in paediatric patients with neuromuscular diseases: Novel phenotypes. In: *JIMD Reports*. 2015.
109. Molnar MJ, Kovacs GG. Mitochondrial diseases. 1st ed. Vol. 145, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 147–55.
110. Vincent AE, Ng YS, White K, Davey T, Mannella C, Falkous G, et al. The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Scientific Reports*. 2016;6:1–12.
111. Paulina Felczak, Eliza Lewandowska, Iwona Stępnik, Monika Ołdak, Agnieszka Pollak, Urszula Lechowicz, Elżbieta Pasennik, Tomasz Stępień TW-B. Pathology of Mitochondria in MELAS Syndrome: An Ultrastructural Study. *Polish journal of pathology*. 2017;68(2):173–81.
112. Pearson HA, Lobel JS, Kocoshis SA, Naiman JL, Windmiller J, Lammi AT, et al. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors

- and exocrine pancreatic dysfunction. *The Journal of Pediatrics*. 1979;95(6):976–84.
113. Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM, et al. Mitochondrial Dna Deletion in Pearson’S Marrow/Pancreas Syndrome. *The Lancet*. 1989;333(8643):902–3.
 114. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of Neurology*. 2015;77(5):753–9.
 115. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:1–23.
 116. Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Annals of Neurology*. 2000;48(2):188–93.
 117. Gagne KE, Ghazvinian R, Yuan D, Zon RL, Storm K, Mazur-popinska M, et al. Pearson marrow pancreas syndrome in patients suspected to have Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2014;124(3):437–41.
 118. Williams TB, Daniels M, Puthenveetil G, Chang R, Wang RY, Abdenur JE. Pearson syndrome: Unique endocrine manifestations including Neonatal Diabetes and adrenal insufficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;106(1):104–7.
 119. Chen XY, Zhao SY, Wang Y, Wang D, Dong CH, Yang Y, et al. A novel mitochondrial DNA deletion in a patient with Pearson syndrome and neonatal diabetes mellitus provides insight into disease etiology, severity and progression. *Mitochondrial DNA*. 2016;27(4):2492–5.
 120. Crippa BL, Leon E, Calhoun A, Lowichik A, Pasquali M, Longo N. Biochemical abnormalities in Pearson syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*. 2015;167(3):621–8.
 121. Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Iwano R, Asakura Y, Tanaka Y, et al. Clinical manifestations and enzymatic activities of mitochondrial respiratory chain complexes in Pearson marrow-pancreas syndrome with 3-methylglutaconic aciduria: a case report and literature review. *European Journal of Pediatrics*. 2015;174(12):1593–602.
 122. Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, et al.

- FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *The Lancet Neurology*. 2011;10(9):806–18.
123. Goldstein A, Falk MJ. Mitochondrial DNA Deletion Syndromes. *GeneReviews*. 2007.
124. Viscomi C, Zeviani M. MtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2017;40(4):587–99.
125. Van Den Ouweland JMW, De Klerk JBC, Van De Corput MP, Dirks RW, Raap AK, Scholte HR, et al. Characterization of a novel mitochondrial DNA deletion in a patient with a variant of the Pearson marrow-pancreas syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2000;8(3):195–203.
126. Van De Corput MPC, Van Den Ouweland JMW, Dirks RW, 'T Hart LM, Bruining GJ, Maassen JA, et al. Detection of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts of patients with Pearson's syndrome by two-color fluorescence in situ hybridization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997;45(1):55–61.
127. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. 1989.
128. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biology*. 2014;2(1):619–31.
129. Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, et al. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *European Journal of Biochemistry*. 1998;257(1):192–201.
130. Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ. Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(14):6562–6.
131. Iglesias E, Bayona-Bafaluy MP, Pesini A, Garrido-Pérez N, Meade P, Gaudó P, et al. Uridine Prevents Negative Effects of OXPHOS Xenobiotics on Dopaminergic Neuronal Differentiation. *Cells*. 2019;8(1407).
132. Spelbrink JN, Zwart R, Van Galen MJM, Van den Bogert C. Preferential amplification and phenotypic selection in a population of deleted and wild-type mitochondrial DNA in cultured cells. *Current Genetics*. 1997;32(2):115–24.

133. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
134. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
135. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):521–31.
136. Prigione A, Lichtner B, Heiner K, Eduard A. S, Mirjam W, Lehrach H, et al. Human Induced Pluripotent Stem Cells Harbor Homoplasmic and Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations While Maintaining Human Embryonic Stem Cell-like Metabolic Reprogramming. *Stem Cells*. 2011;29(9):1338–48.
137. Van Haute L, Spits C, Geens M, Seneca S, Sermon K. Human embryonic stem cells commonly display large mitochondrial DNA deletions. *Nature Biotechnology*. 2013;31(1):20–3.
138. Torraco A, Peralta S, Iommarini L, Diaz F. Mitochondrial diseases part I: mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects on respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion*. 2015;21:76–91.
139. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto YI, Nonaka I, et al. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature Genetics*. 2000;26(2):176–81.
140. Nakada K, Hayashi JI. Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Experimental Animals*. 2011;60(5):421–31.
141. Garone C, Viscomi C. Towards a therapy for mitochondrial disease: An update. *Biochemical Society Transactions*. 2018;46(5):1247–61.
142. Wesselink E, Koekkoek WAC, Grefte S, Witkamp RF, van Zanten ARH. Feeding mitochondria: Potential role of nutritional components to improve critical illness convalescence. *Clinical Nutrition*. 2019;38(3):982–95.
143. Hirano M, Emmanuele V, Quinzii CM. Emerging therapies for mitochondrial diseases.

- Essays in Biochemistry. 2018;62(3):467–81.
144. Khan NA, Auranen M, Paetau I, Pirinen E, Euro L, Forsström S, et al. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(6):721–31.
 145. Fenech M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012;733(1–2):21–33.
 146. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;163(1–2):113–32.
 147. Ormazabal A, Casado M, Molero-Luis M, Montoya J, Rahman S, Aylett SB, et al. Can folic acid have a role in mitochondrial disorders? *Drug Discovery Today*. 2015;20(11):1349–54.
 148. Luo S, Zhang X, Yu M, Yan H, Liu H, Wilson JX, et al. Folic Acid Acts Through DNA Methyltransferases to Induce the Differentiation of Neural Stem Cells into Neurons. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013;66(3):559–66.
 149. Chou YF, Yu CC, Huang RFS. Changes in mitochondrial DNA deletion, content, and biogenesis in folate-deficient tissues of young rats depend on mitochondrial folate and oxidative DNA injuries. *Journal of Nutrition*. 2007;137(9):2036–42.
 150. Chang CM, Yu CC, Lu H Te, Chou YF, Huang RFS. Folate deprivation promotes mitochondrial oxidative decay: DNA large deletions, cytochrome c oxidase dysfunction, membrane depolarization and superoxide overproduction in rat liver. *British Journal of Nutrition*. 2007;97(5):855–63.
 151. Spector R, Johanson CE. Choroid plexus failure in the Kearns-Sayre syndrome. *Cerebrospinal Fluid Research*. 2010;7:2–4.
 152. Pineda M, Ormazabal A, López-Gallardo E, Nascimento A, Solano A, Herrero MD, et al. Cerebral folate deficiency and leukoencephalopathy caused by a mitochondrial DNA deletion. *Annals of Neurology*. 2006;59(2):394–8.
 153. Quijada-Fraile P, O'Callaghan M, Martín-Hernández E, Montero R, Garcia-Cazorla À, de

- Aragón AM, et al. Follow-up of folinic acid supplementation for patients with cerebral folate deficiency and Kearns-Sayre syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 2014;9:217.
154. Jain IH, Zazzeron L, Goli R, Alexa K, Schatzman-Bone S, Dhillon H, et al. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science*. 2016;352(6281):54–61.
155. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell*. 2010;40(2):294–309.
156. Filograna R, Koolmeister C, Upadhyay M, Pajak A, Clemente P, Wibom R, et al. Modulation of mtDNA copy number ameliorates the pathological consequences of a heteroplasmic mtDNA mutation in the mouse. *Science Advances*. 2019;5(4).
157. Viscomi C, Bottani E, Zeviani M. Emerging concepts in the therapy of mitochondrial disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2015;1847(6–7):544–57.
158. Bielas J, Herbst A, Widjaja K, Hui J, Aiken JM, McKenzie D, et al. Long term rapamycin treatment improves mitochondrial DNA quality in aging mice. *Experimental Gerontology*. 2018;106:125–31.
159. Kang HC, Lee YM, Kim HD, Lee JS, Slama A. Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia*. 2007;48(1):82–8.
160. Hasan-Olive MM, Lauritzen KH, Ali M, Rasmussen LJ, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. A Ketogenic Diet Improves Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics via the PGC1 α -SIRT3-UCP2 Axis. *Neurochemical Research*. 2019;44(1):22–37.
161. Newman JC, Verdin E. β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual Review of Nutrition*. 2017;37(1):51–76.
162. Santra S, Gilkerson RW, Davidson M, Schon EA. Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Annals of Neurology*. 2004;56(5):662–9.
163. Emperador S, López-Gallardo E, Hernández-Ainsa C, Habbane M, Montoya J, Bayona-Bafaluy MP, et al. Ketogenic treatment reduces the percentage of a LHON heteroplasmic mutation and increases mtDNA amount of a LHON homoplasmic mutation. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2019;14(1):4–9.

Bibliografía

164. Ahola-Erkkilä S, Carroll CJ, Peltola-Mjösund K, Tulkki V, Mattila I, Seppänen-Laakso T, et al. Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(10):1974–84.
165. Ahola S, Auranen M, Isohanni P, Niemisalo S, Urho N, Buzkova J, et al. Modified Atkins diet induces subacute selective ragged-red-fiber lysis in mitochondrial myopathy patients. *EMBO Molecular Medicine*. 2016;8(11):1234–47.
166. El-Hattab AW, Zarante AM, Almannai M, Scaglia F. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017;122(3):1–9.
167. Cámara Y, González-Vioque E, Scarpelli M, Torres-Torronteras J, Martí R. Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA. *Drug Discovery Today*. 2013;18(19–20):950–7.
168. Cámara Y, González-Vioque E, Scarpelli M, Torres-Torronteras J, Caballero A, Hirano M, et al. Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(9):2459–67.
169. Domínguez-González C, Madruga-Garrido M, Mavillard F, Garone C, Aguirre-Rodríguez FJ, Donati MA, et al. Deoxynucleoside Therapy for Thymidine Kinase 2–Deficient Myopathy. *Annals of Neurology*. 2019;86(2):293–303.
170. Perales-Clemente E, Bayona-Bafaluy MP, Pérez-Martos A, Barrientos A, Fernández-Silva P, Enriquez JA. Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(48):18735–9.
171. Gammage PA, Rorbach J, Vincent AI, Rebar EJ, Minczuk M, Gaude E, et al. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. *Current Opinion in Structural Biology*. 2018;6(16):458–66.
172. Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, Bosch DE, Kotrys A V., Raguram A, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*. 2020;583(7817):631–7.
173. Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, Costa ASH, Gaude E, Powell CA, et al.

- Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;24(11):458–66.
174. Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, Costa ASH, Gaude E, Powell CA, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nature Medicine*. 2018;24(11):1691–5.
175. Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira C V., Nissanka N, Miranda M, Pinto M, et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nature Medicine*. 2018;24(11):1696–700.
176. Navarro-Sastre A, Tort F, Garcia-Villoria J, Pons MR, Nascimento A, Colomer J, et al. Mitochondrial DNA depletion syndrome: New descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;107(3):409–15.
177. Alvarez-Mora MI, Podlesniy P, Gelpi E, Hukema R, Madrigal I, Pagonabarraga J, et al. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: Regional decrease of mitochondrial DNA copy number relates to clinical manifestations. *Genes, Brain and Behavior*. 2019;18(5):e12565.
178. Montes R, Romero T, Cabrera S, Ayllon V, Lopez-Escamez JA, Ramos-Mejia V, et al. Generation and characterization of the human iPSC line PBMC1-iPS4F1 from adult peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Research*. 2015;15(3):614–7.
179. Galera T, Zurita F, González-Páramos C, Moreno-Izquierdo A, Fraga MF, Fernández AF, et al. Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. *Stem Cell Research*. 2016;16(1):63–6.
180. Sochacki J, Devalle S, Reis M, de Moraes Maciel R, da Silveira Paulsen B, Brentani H, et al. Generation of iPSC cell lines from schizophrenia patients using a non-integrative method. *Stem Cell Research*. 2016;17(1):97–101.
181. Zurita F, Galera T, González-Páramos C, Moreno-Izquierdo A, Schneiderat P, Fraga MF, et al. Generation of a human iPSC line from a patient with a defect of intergenomic communication. *Stem Cell Research*. 2016;16(1):120–3.

Bibliografía

182. Yu M, Selvaraj SK, Liang-Chu MMY, Aghajani S, Busse M, Yuan J, et al. A resource for cell line authentication, annotation and quality control. *Nature*. 2015;520(7547):307–11.
183. Mamaeva SE. Karyotypic evolution of cells in culture: A new concept. *International Review of Cytology*. 1997;178:1–40.
184. Martin U. Genome stability of programmed stem cell products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017;120:108–17.
185. Na J, Baker D, Zhang J, Andrews PW, Barbaric I. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. *Protein and Cell*. 2014;5(8):569–79.
186. Weissbein U, Benvenisty N, Ben-David U. Genome maintenance in pluripotent stem cells. *Journal of Cell Biology*. 2014.
187. Hao H, Morrison LE, Moraes CT. Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Human Molecular Genetics*. 1999;
188. Larsen S, Díez-Sánchez C, Rabøl R, Ara I, Dela F, Helge JW. Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2014;1837(2):226–31.
189. Chen A, Raule N, Chomyn A, Attardi G. Decreased Reactive Oxygen Species Production in Cells with Mitochondrial Haplogroups Associated with Longevity. *PLoS ONE*. 2012;7(10):1–10.
190. Fang H, Zhang F, Li F, Shi H, Ma L, Du M, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of osteoarthritis by altering mitochondrial function and intracellular mitochondrial signals. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(4):829–36.
191. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero Í, López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, et al. Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(8):1216–22.
192. Garrabou G, Soriano, Pinós T, Casanova-Mollà J, Pacheu-Grau D, Morén C, et al. Influence of mitochondrial genetics on the mitochondrial toxicity of linezolid in blood cells and skin

- nerve fibers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(9):1–14.
193. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *Journal of Physiology*. 2012;590(14):3349–60.
194. Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genetics*. 2001;28(3):211–2.
195. Longley MJ, Clark S, Man CYW, Hudson G, Durham SE, Taylor RW, et al. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase γ subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *American Journal of Human Genetics*. 2006;78:1026–34.
196. Del Dotto V, Ullah F, Di Meo I, Magini P, Gusic M, Maresca A, et al. SSBP1 mutations cause mtDNA depletion underlying a complex optic atrophy disorder. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130(1):108–25.
197. Kullar PJ, Gomez-Duran A, Gammage PA, Garone C, Minczuk M, Golder Z, et al. Heterozygous SSBP1 start loss mutation co-segregates with hearing loss and the m.1555A>G mtDNA variant in a large multigenerational family. *Brain*. 2018.
198. Wallace DC. Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*. 1992;256(5057):628–32.
199. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542–5.
200. Wallace DC. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annual Review of Genetics*. 2005.
201. Kronstein-wiedemann R, Tonn T. Colony Formation: An Assay of Hematopoietic Progenitor Cells. *Methods in Molecular Biology*. 2019;2017:29–40.
202. Salvatore D, A SE, DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *New England Journal of Medicine*. 2003 Jun 26;348(26):2656–68.
203. Shirasawa S, Yoshie S, Yue F, Ichikawa H, Yokoyama T, Nagai M, et al. Pancreatic exocrine enzyme-producing cell differentiation via embryoid bodies from human embryonic stem

- cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;410(3):608–13.
204. Sastre J, Sabater L, Aparisi L. Fisiología de la secreción pancreática. *Gastroenterology and Hepatology*. 2005;28(Supl 2):3–9.
205. Soeda S, Saito R, Fujita N, Fukuta K, Taniura H. Neuronal differentiation defects in induced pluripotent stem cells derived from a Prader-Willi syndrome patient. *Neuroscience Letters*. 2019;703:162–7.
206. Broomfield A, Sweeney MG, Woodward CE, Fratter C, Morris AM, Leonard J V., et al. Paediatric single mitochondrial DNA deletion disorders: an overlapping spectrum of disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2015;38(3):445–57.
207. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi G Pietro, et al. Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. *Journal of Neurology*. 2015;262(5):1301–9.
208. Chou YF, Huang RFS. Mitochondrial DNA deletions of blood lymphocytes as genetic markers of low folate-related mitochondrial genotoxicity in peripheral tissues. *European Journal of Nutrition*. 2009;48(7):429–36.
209. Fenech MF. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention: Current status and a road map to the future. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010;91(suppl):1438S-1454S.
210. Hussain T, Mulherkar R. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2012;1(2):75–87.
211. Spelbrink JN, Van Oost BA, Bogert C Van Den. The relationship between mitochondrial genotype and mitochondrial phenotype in lymphoblasts with a heteroplasmic mtDNA deletion. *Human Molecular Genetics*. 1994;3(11):1989–97.
212. Benam KH, Dauth S, Hassell B, Herland A, Jain A, Jang KJ, et al. Engineered in vitro disease models. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015;10:195–262.
213. Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Kosik KS, Lopera F, Jimenez-Del-Rio M. iPSCs-derived nerve-like cells from familial Alzheimer’s disease PSEN 1 E280A reveal increased amyloid-beta levels and loss of the Y chromosome. *Neuroscience Letters*. 2019;703:111–8.

214. Ronen D, Benvenisty N. Sex-dependent gene expression in human pluripotent stem cells. *Cell Reports*. 2014;8(4):923–32.
215. Larsson NG, Holme E, Kristiansson B, Oldfors A, Tulinius M. Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in kearns-sayre syndrome. *Pediatric Research*. 1990.
216. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International Journal of Radiation Biology*. 2019;95(7):912–9.
217. Shoubridge EA, Karpatis G, Hastings KEM. Deletion mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal muscle fiber segments in mitochondrial disease. *Cell*. 1990.
218. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2015.
219. Durham SE, Samuels DC, Cree LM, Chinnery PF. Normal levels of wild-type mitochondrial DNA maintain cytochrome c oxidase activity for two pathogenic mitochondrial DNA mutations but not for m.3243A→G. *American Journal of Human Genetics*. 2007;81(1):189–95.
220. James AM, Wei YH, Pang CY, Murphy MP. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochemical Journal*. 1996;1(318 (Pt 2)(Pt 2)):401–7.
221. Martínez-reyes I, Diebold LP, Kong H, Schieber M, Hensley CT, Mehta MM, et al. TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Mol Cell*. 2016;61(2):199–209.
222. Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999.
223. Peng TI, Yu PR, Chen JY, Wang HL, Wu HY, Wei YH, et al. Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of*

- Disease. 2006;1762(2):241–55.
224. Martínez-Romero Í, Herrero-Martín MD, Llobet L, Emperador S, Martín-Navarro A, Narberhaus B, et al. New MT-ND1 pathologic mutation for Leber hereditary optic neuropathy. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2014;42(9):856–64.
 225. Niu R, Yoshida M, Ling F. Increases in mitochondrial DNA content and 4977-bp deletion upon ATM/Chk2 checkpoint activation in hela cells. *PLoS ONE*. 2012;7(7):1–10.
 226. Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*. 2007;7(1–2):106–18.
 227. Vincent AE, Turnbull DM, Eisner V, Hajnóczky G, Picard M. Mitochondrial Nanotunnels. *Trends in Cell Biology*. 2017;27(11):787–99.
 228. Paumard P. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO Journal*. 2002;21(3):221–30.
 229. Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(4):721–33.
 230. Hämäläinen RH, Manninen T, Koivumäki H, Kislin M, Otonkoski T, Suomalainen A. Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(38):1–9.
 231. Folmes CDL, Ma H, Mitalipov S, Terzic A. Mitochondria in Pluripotent Stem Cells: Stemness Regulators and Disease Targets. *Curr Opin Genet Dev*. 2016;38:1–7.
 232. Galera-Monge T, Zurita-Díaz F, Garesse R, Gallardo ME. The mutation m.13513G>A impairs cardiac function, favoring a neuroectoderm commitment, in a mutant-load dependent way. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(11):19511–22.
 233. Seo BJ, Yoon SH, Do JT. Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12).
 234. Yokota M, Hatakeyama H, Ono Y, Kanazawa M, Goto YI. Mitochondrial respiratory

- dysfunction disturbs neuronal and cardiac lineage commitment of human iPSCs. *Cell Death and Disease*. 2017;8(1):e2551-11.
235. Fernández KS, de Alarcón PA. Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. *Pediatric Clinics of North America*. 2013;60(6):1273–89.
236. Vannini N, Girotra M, Naveiras O, Nikitin G, Campos V, Giger S, et al. Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. *Nature Communications*. 2016;7:1–9.
237. Hu M, Wang J. Mitochondrial metabolism and the maintenance of hematopoietic stem cell quiescence. *Current Opinion in Hematology*. 2019;26(4):228–34.
238. Hathazi D, Griffin H, Jennings MJ, Giunta M, Powell C, Pearce SF, et al. Metabolic shift underlies recovery in reversible infantile respiratory chain deficiency. *The EMBO Journal*. 2020;1–19.
239. Boczonadi V, Bansagi B, Horvath R. Reversible infantile mitochondrial diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2015;38(3):427–35.
240. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. Vol. 348, *New England Journal of Medicine*. 2003. p. 2656–68.
241. Valdivieso AG, Santa-Coloma TA. CFTR activity and mitochondrial function. *Redox Biology*. 2013;1(1):190–202.
242. Madácsy T, Pallagi P, Maleth J. Cystic Fibrosis of the Pancreas: The Role of CFTR Channel in the Regulation of Intracellular Ca²⁺ Signaling and Mitochondrial Function in the Exocrine Pancreas. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:1–11.
243. Delhey L, Nur Kilinc E, Yin L, Slattery J, Tippett M, Rose S, et al. The Effect of Mitochondrial Supplements on Mitochondrial Activity in Children with Autism Spectrum Disorder. *Journal of Clinical Medicine*. 2017;6(2):18.
244. Ramaekers VT, Wels J, Sequeira JM, Quadros E V., Blau N. Mitochondrial complex I encephalomyopathy and cerebral 5-methyltetrahydrofolate deficiency. *Neuropediatrics*. 2007;38(4):184–7.

245. Lai KG, Chen CF, Ho C Te, Liu JJ, Liu TZ, Chern CL. Novel roles of folic acid as redox regulator: Modulation of reactive oxygen species sinker protein expression and maintenance of mitochondrial redox homeostasis on hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*. 2017;39(6).
246. Yang Y, Wu H, Kang X, Liang Y, Lan T, Li T, et al. Targeted elimination of mutant mitochondrial DNA in MELAS-iPSCs by mitoTALENs. *Protein and Cell*. 2018;9(3).
247. Bayona-Bafaluy MP. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(0) cells. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(16):e98.
248. Gammage PA, Rorbach J, Vincent AI, Rebar EJ, Minczuk M. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(4):458–66.
249. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*. 1999;23(2):147.
250. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*. 2009;30(2):e386-394.
251. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *American Journal of Human Genetics*. 2000;67(3):682–96.
252. Budowle B, Allen RC. Analysis of amplified fragment-length polymorphisms (VNTR/STR loci) for human identity testing. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 1998;98:155–71.
253. Andreu AL, Martinez R, Marti R, García-Arumí E. Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion*. 2009;9(4):242–6.
254. Faloon GR, Srere PA. Escherichia Coli Citrate Synthase. Purification Effect of Potassium on Some Properties. *Biochemistry*. 1969;8(11):4497–503.
255. Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994;55(2):253–8.

ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO 1

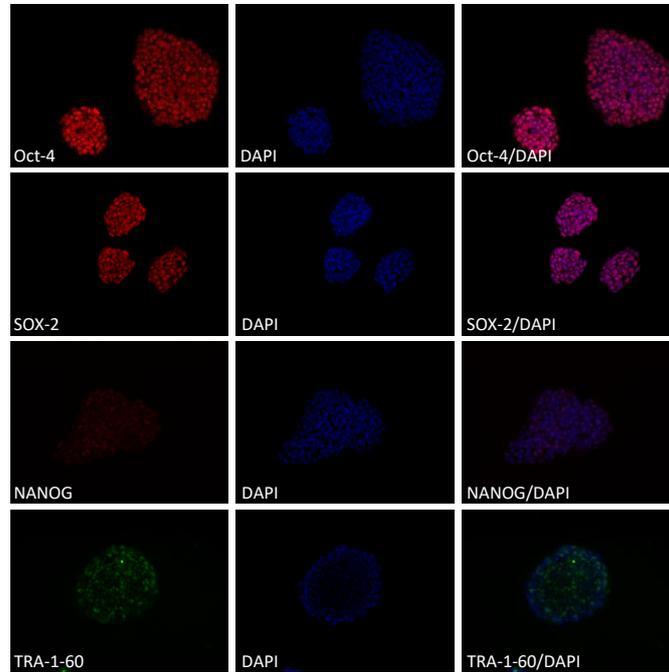


Figura 8.1 Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia de la línea iFb Control clon G. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X. Se observan en azul los núcleos celulares (DAPI).

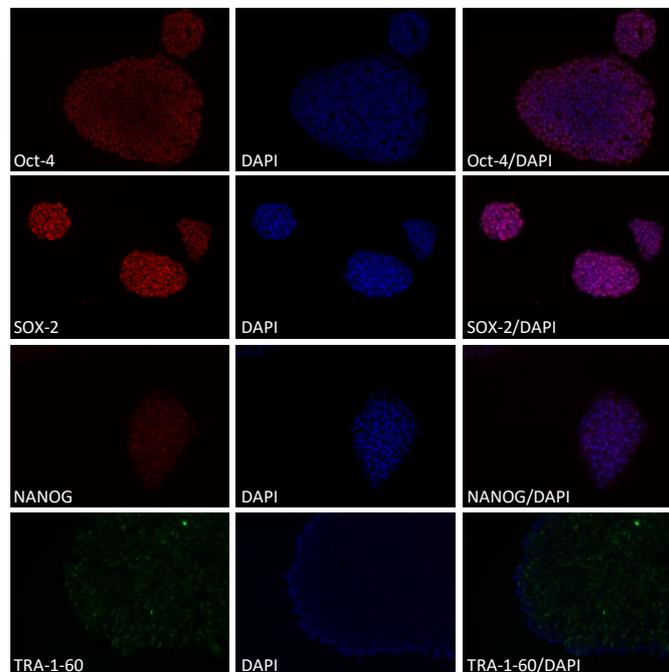


Figura 8.2 Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia de la línea iFb Control clon A. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X. Se observan en azul los núcleos celulares (DAPI).

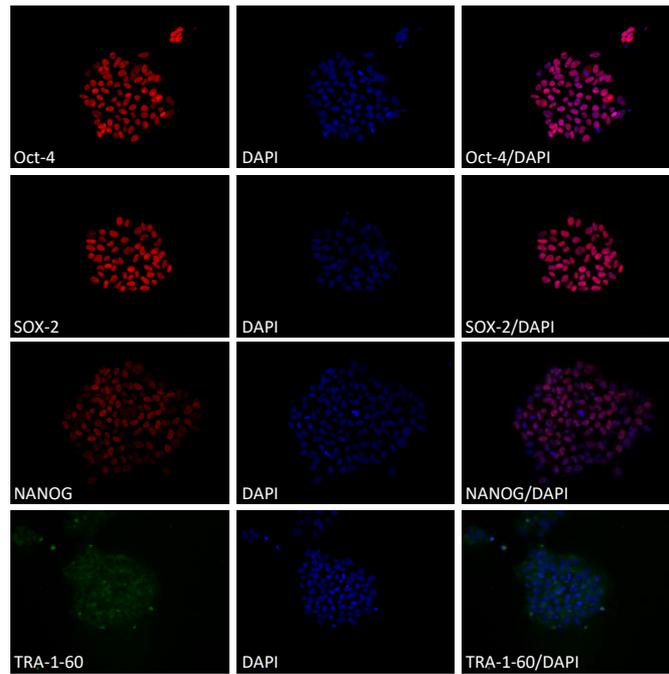


Figura 8.3 Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia de la línea iFb PS1 clon 10. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X. Se observan en azul los núcleos celulares (DAPI).

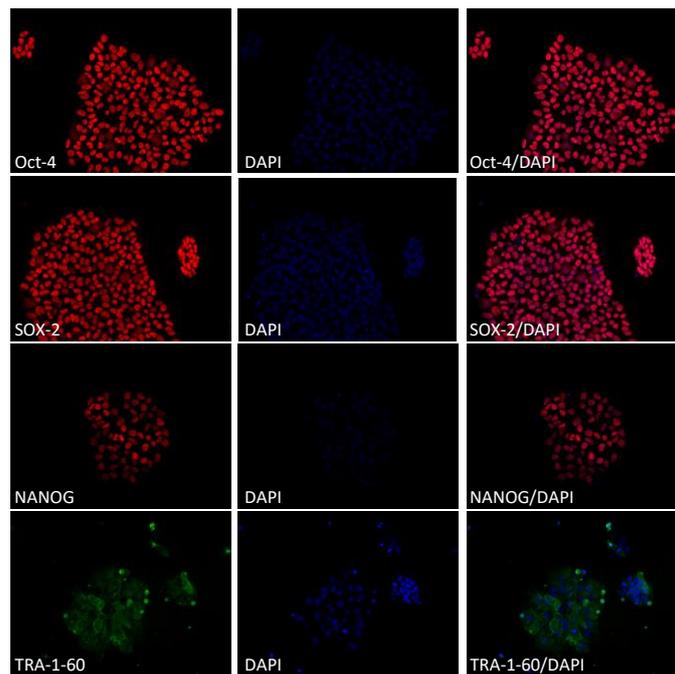


Figura 8.4 Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia de la línea iFb PS1 clon 11. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X. Se observan en azul los núcleos celulares (DAPI).

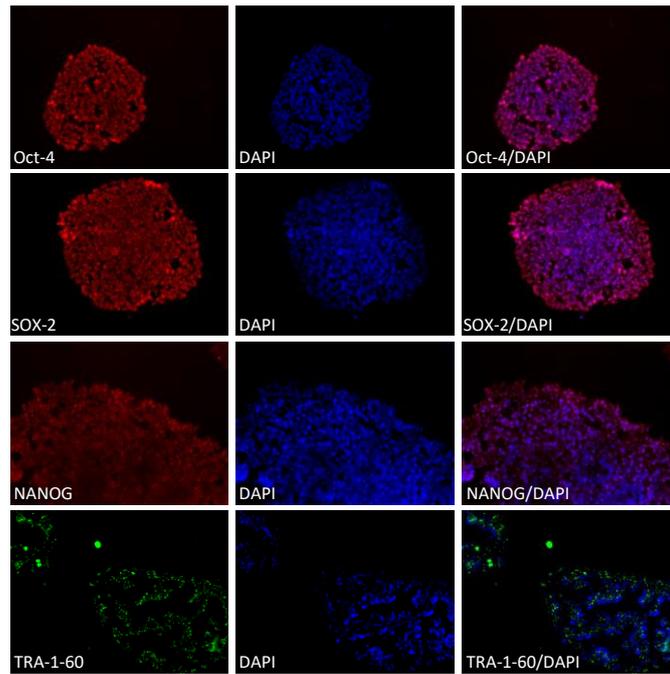


Figura 8.5 Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia de la línea iFb PS2. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X.

ANEXO 2

Tabla 8.1 Polimorfismos mitocondriales encontrados en las líneas celulares generadas y caracterizadas.

Gen mtDNA	Fb Control 5a	Fb Control 1m	iPSC Fb Control clones V, G y A	FbPS1	iPSC Fb PS1 clones 10 y 11	CIB PS1 (4 clones)	FbPS2	iPSC Fb PS2	CIB PS2 (4 clones)
MT-ND1	A3720G								
MT-ND2	A4769G A5390G T5426C	T4733C A4769G			A4769G			T4703C A4769C	
MT-ND4L								A10506G T10604C	
MT-ND4	G10876A C11197T A11467G G11719A T11732C							A11467G G11719A	
MT-ND5	G12372A T13020C T13734C							G12372A A12834G C13934T A14139G C14766T A15326G T15454C	
MT-CYB	A15326G	A15326G			A15326G C15833T				
MT-CO1	C6045T T6152C A6494G C7028T T7270C							C6518T C7028T	
MT-CO3	T9905C				T9482C			G9266A	
MT-ATP6	A8860G	A8860G			A8803T A8860G			A8860G	
MT-RNR1	A750G A1438G	A750G A1438G			A750G A1438G			T710C A750G A1438G G1709A A1811G A2294G A2706G G3010A	
MT-RNR2	A1811G A2706G C3116T	G3010A							
MT-DLOOP	A73G T152C T217C A263G ins315C C340T A508G ins523C ins524A A16051G G16129C A16182C A16183C T16189C T16362C T16519C C16527T	A200G A263G ins310C ins315C G16129A T16519C			A263G ins315C C456T del514C del515A T16304C			A73G C150T A263G ins315C A385G A16343G G16390A T16519C	
MT-tRNAs	T5806C (Cys) A12308G (Leu) A15907G (Thr)				T4336C (Gln)			A12308G (Leu)	