



Departamento de Estomatología

Facultad de Odontología

Universidad de Sevilla

Tesis Doctoral

Implicación de la mitocondria y del
complejo NLRP3-inflamasoma en la
fisiopatología de la fibromialgia

Mario David Cordero Morales

Sevilla, 2015



Departamento de Estomatología

Facultad de Odontología

Universidad de Sevilla

Implicación de la mitocondria y del complejo NLRP3-inflamasoma en la fisiopatología de la fibromialgia

Memoria de tesis presentada por Mario David Cordero Morales, Graduado en Nutrición Humana y Dietética por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, para optar al GRADO DE DOCTOR

Los directores

Pedro Bullón Fernández

José Antonio Sánchez Alcázar

Sevilla, a 26 de Octubre de 2015



D. PEDRO BULLÓN FERNÁNDEZ, DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y CATEDRÁTICO DE MEDICINA ORAL DEL DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

Y

D. JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ ALCÁZAR, DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMAN

que **Don Mario David Cordero Morales**, graduado en Nutrición Humana y Dietética por la Universidad Pablo de Olavide, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Implicación de la mitocondria y del complejo NLRP3-inflamasoma en la fisiopatología de la fibromialgia” y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor.

Para que conste, firman la presente en Sevilla, a 26 de Octubre de 2015

Dr. Pedro Bullón Fernández

Dr. José Antonio Sánchez Alcázar

**“Si hay algo en nosotros
verdaderamente divino, es la voluntad.
Por ella afirmamos la personalidad,
templamos el carácter, desafiamos la
adversidad, reconstruimos el cerebro y
nos superamos diariamente”**

Santiago Ramón y Cajal

Y al final.....lo conseguí

AGRADECIMIENTOS

Dicen que podemos ser y hacer todo aquello que nos proponamos, la cuestión es cómo y cuándo. El tiempo pasa y la vida nos pone obstáculos que vamos superando con mayor o menor éxito. Mi padre siempre decía que confiaba en esta cabecita loca y que podría hacer todo lo que me propusiera, pero tenía que luchar por ello y trabajar con constancia.

Tengo grabado en mi memoria los recuerdos de mi infancia en mi Triana del alma, de muy pequeño capturando insectos en la vía de mi barriada para mi colección, observando los pájaros y tomando notas, construyendo un terrario con mi padre para observar las lagartijas que cogía en los jardines. Aún recuerdo, cuando mi hermana Mari Carmen, me regaló con uno de sus primeros sueldos un conjunto de pipetas, matraces, probetas y tubos de ensayo que conseguimos en una farmacia para poder hacer mis “experimentos”, y es que el Quimicefa se me quedaba pequeño. Y para esto, mi padre nuevamente, me ayudaba a construir una gradilla con paneles de madera de manualidades. Siempre quise ser científico, siempre tuve la necesidad de explorar, aprender y descubrir. Y a pesar de que en vez de dedicarme a estudiar, se me pasaba el tiempo haciendo estas cosas mi padre confió en mí.

Y ahora, por fin después de muchas cosas en la vida, ha llegado el final, el doctorado. El final y el principio, por supuesto. Y son muchas las personas que han pasado por este periodo de mi vida. Mi profesor, Juan Gonzáles, del Instituto Vicente Aleixandre, quién me dejaba ir al laboratorio de prácticas en el BUP porque supo ver la vocación científica en mí.

Tras un silencio en mi vida, pasé a estudiar el módulo de técnico de laboratorio, un periodo de mi vida en el que me comí los libros y resurgió en mí ese afán por comerme el mundo y ya no pude parar; la prueba de mayores de 25, entrar en medicina, las prácticas en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, el cambio de carrera, el master.....Y tanta gente que pasó por mi vida!!!! Tengo por ello que agradecer tantas cosas, al grupo de Plácido Navas, con quién hice las prácticas, y aprendí tanto, conocí a los jóvenes futuros científicos, Gloria, María, Mariví, José, a los jefes, Guillermo, Carlos, Juan Carlos, Emilio, Claudio,..... A mis compañeras de armas, Ángela, quién me acompañó desde el primer día de entrada en el laboratorio, a M^a Ángeles, con quien formé un estupendo equipo. Ángel Carrión, aún nos queda camino que recorrer en nuestros proyectos. Y allí conocí a mi maestro y codirector de la tesis, José Antonio, alias el súper.

Tú fuiste primero jefe, después maestro, ahora compañero de armas, pero siempre amigo, gracias Súper.

Un día apareció en mi vida otra persona, Pedro Bullón, mi otro codirector y también amigo por siempre. Contigo aprendí que el trabajo no pesa cuando realmente te enamora y hay pasión, y supiste ver en mí alguien por quien aportar y confiar, y eso llega muy adentro, créeme.

A mi maestro de artes marciales Kim, quién forjó un luchador incansable por aquello en lo que creo, por mis ideales de vida y creencias y por inculcarme que, como él decía, un cinturón negro es un guerrero y puede conseguirlo todo en la vida.

A mis amigos de Triana, de mi infancia, por hacerme pasar una vida llena de diversión, risas y aventuras y dadme un motivo para estar orgulloso de la amistad, Juanma (con quién crecí y me dio siempre lo mejor de la amistad), Juaki (mi pareja de hecho, y de aventuras), Iván (y esa paciencia y lealtad a su grupo), Ale (que no dejaba de bajar de la academia para estar con su gente), Pichi (quién siempre sabe animarnos), Viejo (nuestro árbitro), Rafa (el animal que a pesar de ser tan bruto eres un amigo fiel), Camas (siempre estás presente donde quiera que estés), Casau (que nunca dejó pasar un minuto sin sentarse con nosotros), Cacereño (siempre tienes una historia para alegrarnos la vida), Carlitos (mi compi del nocturno), Jorge (siempre te acuerdas de mí, donde quiera que estemos), Barat (nunca dejé de divertirme a tu lado), Navarro (cada día veo más la gran persona que eres) y los que se fueron incorporando y aportando esa riqueza que siempre nos ha caracterizado como Raulito, Isra y Mon que me habéis dado motivos para alegrarme cada día de conoceros. Y las niñas (Reyes, Mirian, M^a Ángeles, Esther, Vicki) por supuesto, no os pongáis celosas!!!!

Aquellos amigos que en un momento dado entraron en mi vida, y vivieron conmigo esta carrera de fondo: Anabel y Guille (lo hemos pasado bien ehh!), Maurizio y Pepe Quiles, gracias a esa comida un día de navidad di el salto de carrera y aquí estamos, gracias por esa gran idea, y ese apoyo incondicional. A Lucía y su sonrisa y mi equipo, Lourdes, Fabiola, Diego, Lucho, Rafa, y Ángel, que cada día comparten el amor a la ciencia.

A mi Triana, mi barrio, que siempre te llevo por bandera, vaya donde vaya, esté donde esté, tú me haces ser lo que soy y sentirme orgulloso.

Y llega el momento, mi familia, mi madre, mis hermanas Mari Carmen y Mari Luz, siempre me apoyasteis y sentisteis orgullosas de mí, gracias por estar ahí siempre. Mi cuñado, Juan Carlos, que me vistes crecer y me acompañaste en cada una de las situaciones por las que esta familia pasó, buenas y malas. Mis niñas, Débora y Ana, jamás podréis cuantificar cuanto os quiero y significáis para mí. Siempre estaré ahí, para vosotros, siempre. Mi nuevo cuñado, le diste a mi hermana una ilusión, y ya eres parte de mi familia. Mi otra familia, Manolo y Ani, mis suegros, José Y M^a José, Paco y Anabel mis cuñados y mis sobrinos Gabi, Aitor e Izan, por confiar en mí y sentirnos orgullosos día tras día.

Pero, hay alguien importante en mi vida que me ha motivado día a día y merecen una especial atención: mi padre, que no solo fuiste mi referente como persona, y confiaste en mi hasta tu marcha, sino que precisamente tu marcha y enfermedad fueron las que me motivaron a trabajar duramente por la gente que sufre. Cada idea que surge en mí, la inspiras tú.

Y por último, Ely, mi mujer. Cariño, eres la luz que alumbra mi vida, mi pasión, mi compañera en la vida y en la ciencia y mi refugio. Todo esto, absolutamente todo, te lo debo a ti, porque me supiste animar, inspirar, apoyar y querer con todos mis defectos. Hemos pasado de todo en esta vida, pero nunca hemos dejado de luchar juntos, como un equipo, sin miedo, y así seguiremos, y lo conseguiremos, cada uno de nuestros proyectos porque a tu lado me hago el hombre más fuerte y feliz del mundo. Te quiero mi amor.

ÍNDICE

Resumen	
Abreviaturas	1
1. Introducción	7
1.1. La mitocondria	7
1.2. Mitocondria y estrés oxidativo	13
1.3. Enfermedades mitocondriales	14
1.4. Inflamación e inflammasoma	18
1.5. La fibromialgia	22
1.5.1. Disfunción mitocondrial en la fibromialgia	23
2. Objetivos	31
3. Material y métodos	35
3.1. Pacientes	35
3.2. Reactivos	36
3.3. Cultivos de Fibroblastos	37
3.4. Líneas celulares	37
3.4.1. Líneas de fibroblastos de fibromialgia	37
3.4.2. Líneas de fibroblastos de enfermedades mitocondriales	37
3.5. Muestras de sangre	38
3.6. Aislamiento de PBMC mediante Ficoll-Paque™ PLUS	38
3.7. Obtención de muestras biológicas	39
3.8. Generación de cíbridos trans-mitocondriales	40
3.9. Extracción de CoQ de muestras biológicas	41
3.10. Extracción de ADN	42
3.11. Determinación de los niveles de CoQ por HPLC	43
3.12. Análisis enzimático de la Cadena respiratoria mitocondrial (CRM)	43
3.12.1. Preparación de fibroblastos para determinación de la CRM	43
3.12.2. Análisis enzimático de la CRM a partir de homogenados de fibroblastos	44
3.12.3. Citrato sintasa	44
3.12.4. Complejo I: NADH CoQ Oxidorreductasa	45
3.12.5. Complejo II: Succinato deshidrogenasa	45
3.12.6. Complejo III: DBH2-Citocromo C Oxidorreductasa	46
3.12.7. Complejo I+III: NADH-Citocromo C reductasa	47

3.12.8. Complejo II+III: Succinato-Citocromo C- reductasa-----	48
3.12.9. Complejo IV: Citocromo C oxidasa-----	48
3.13. Análisis de proteínas mediante Western Blot-----	49
3.13.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford-----	49
3.13.2. SDS-Page y Western Blot-----	49
3.13.3. Inmunodetección con anticuerpos y electrotransferencia-----	50
3.14. Amplificación por PCR y secuenciación -----	50
3.15. Niveles de IL-1 β e IL-18-----	51
3.16. Niveles de ATP-----	52
3.17. Cuantificación de ADNmt-----	53
3.18. Genotipado de la mutación en pacientes y cíbridos -----	53
3.19. Producción mitocondrial de ROS-----	54
3.20. Determinación de la peroxidación lipídica-----	54
3.21. Cuantificación de la tasa de proliferación celular-----	55
3.22. Determinación de los niveles de daño oxidativo del ADN por 8-hidroxideoxiguanosina-----	55
3.23. Tasa de consumo de oxígeno (OCR)-----	56
3.24. Análisis de la estructura y la secuencia de conservación-----	57
3.25. Análisis estadístico-----	57
4. Resultados-----	61
LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO NLRP3-INFLAMASOMA ES INDUCIDA POR LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE LOS PACIENTES CON FM.	
4.1. Disfunción mitocondrial en PBMC de pacientes con FM-----	62
4.2. Estrés oxidativo en PBMC de los pacientes con FM-----	66
4.3. Activación del complejo inflammasoma por el estrés oxidativo involucrados en el dolor de la FM-----	66
4.4. La inducción de deficiencia de CoQ ₁₀ produce la activación del inflammasoma-----	74
FISIOPATOLOGÍA DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN FIBROBLASTOS DE FIBROMIALGIA	
4.5. Metabolismo mitocondrial en fibroblastos de pacientes con FM-----	77
4.6. Niveles de estrés oxidativo en los fibroblastos de pacientes con FM-----	85

**UNA MUTACIÓN EN EL GEN CITOCROMO B DEL ADN MITOCONDRIAL
EN UNA FAMILIA CON FIBROMIALGIA SE ASOCIA CON LA ACTIVACIÓN
NLRP3 – INFLAMASOMA**

4.7. Análisis de ADNmt de pacientes con FM-----	91
4.8. Análisis molecular de la mutación encontrada-----	94
4.9. Análisis de la estructura y secuencia de aminoácidos-----	97
4.10. Estudios fisiopatológicos-----	99
4.11. Activación del complejo NLRP3-inflamasoma-----	103
5. Discusión-----	117
6. Conclusiones-----	131
7. Bibliografía-----	135
8. Producción-----	151
ANEXOS-----	153

RESUMEN

La fibromialgia (FM) es un síndrome de dolor crónico generalizado de alta prevalencia mundial que supone un verdadero enigma clínico dado su heterogeneidad y su desconocida etiología. Su fisiopatología ha sido ampliamente investigada y se han propuesto varias hipótesis biológicas entre las cuales, la inflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo han mostrado una gran implicación. Nuestro estudio ha profundizado en el papel de la disfunción mitocondrial mediante el uso de un modelo *in vitro* utilizado para el estudio de las patologías mitocondriales. Para ello, hemos usado fibroblastos de piel mediante los cuales, hemos descrito una deficiencia de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, una deficiencia de CoQ₁₀, así como un incremento del daño oxidativo. Además, esta disfunción mitocondrial provocada la activación de un complejo multiproteico denominado, complejo NLRP3-inflamasoma el cual, es responsable de la inflamación sistémica.

Por otro lado, muchos de los síntomas asociados con las enfermedades mitocondriales, como intolerancia al ejercicio, fatiga, miopatía están presentes en muchos pacientes con FM que presentan disfunción mitocondrial. En este estudio, mostramos una mutación en el gen citocromo b del ADN mitocondrial (ADNmt) en una familia con FM y la implicación del complejo NLRP3-inflamasoma en varias mutaciones mitocondriales. Tras la secuenciación de ADNmt de varios pacientes con FM, encontramos una mutación mitocondrial homoplásmica m.15804T > C en el gen mtCYB en un paciente transmitida por vía materna, que aparece en todos miembros de la familia con el diagnóstico de FM. La mutación estaba presente en varios tejidos de la paciente. Los fibroblastos de piel de la paciente mostraron disfunción mitocondrial y estrés oxidativo asociado a la activación del complejo NLRP3-inflamasoma así como una mejora del metabolismo celular tras la inhibición del complejo inflamasoma o la suplementación con CoQ₁₀. Los híbridos trans-

mitocondriales que portaban la mutación m.15804T> C mostraron las alteraciones fisiopatológicas observadas en los fibroblastos de la paciente con FM. Interesantemente, la activación del complejo NLRP3-inflamasoma también se observó en líneas de fibroblastos derivados de pacientes con otras enfermedades mitocondriales como Miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS), Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF) y Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON). En este trabajo mostramos por primera vez una mutación en el ADNmt responsable de la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la activación inflamatoria asociado con una familia con diagnóstico de FM. Sobre la base de nuestros datos, se propone el análisis de secuencias del ADNmt en pacientes con FM con evidencias de herencia materna como una posible herramienta de diagnóstico. Además, la activación NLRP3-inflamasoma como consecuencia de la disfunción mitocondrial podría estar implicada en la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales.

ABREVIATURAS

16673-34-0: 5-cloro-2-metoxi-N- [2- (4-sulfamoilfenil) etil] benzamida

8-oxo-G: 8-hidroxideoxiguanosina

ACR: Colegio Americano de Reumatología

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNn: ADN nuclear

ATP: Adenosín trifosfato

ASC: Proteína adaptadora

BMCs: Células mononucleares de sangre periférica

BMI: Índice de masa corporal

CS: Citrato sintasa

CoQ₁₀: Coenzima Q₁₀

CPEO: Oftalmoplejia externa progresiva crónica

Cu/ZnSOD: Superóxido de cobre/zinc dismutasa

DCPIP: 2,6-Dicloroindofenol sodio hidratado

DTNB: 5,5'-Dithiobis (2-ácido nitrobenzoico)

FBS: Suero fetal bovino

FM: Fibromialgia

FIQ: Cuestionario de Impacto de Fibromialgia

Mario David Cordero Morales

GPX: Glutation peroxidasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HRP: Peroxidasa de rábano picante

IMC: Índice de masa corporal

IOD: Intensidad óptica integrada

LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber

LPS: Lipopolisacárido

LRR: Leucine rich region

MELAS: Miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y accidente cerebrovascular

MERRF: Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas

MnSOD: Manganeso superóxido dismutasa

mtNOS: Óxido nítrico sintasa mitocondrial

NARP: Debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa

NLR: Receptor Nod-like

NO: Óxido nítrico

O₂: Oxígeno

OCR: Tasa de consumo de oxígeno

ONOO⁻: Peroxinitrito

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PABA: 4-aminobenzoato

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PCr: Fosfocreatina

PEG: Polietilenglicol

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas de Oxígeno

SRC: Capacidad respiratoria de repuesto

VAS: Escala analógica visual

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La mitocondria

Las mitocondrias son importantes orgánulos de doble membrana presentes en prácticamente todas las células eucariotas. Una de las principales funciones de la mitocondria es la producción de ATP a través del sistema conocido como fosforilación oxidativa mediante una serie de reacciones mediadas por complejos multiprotéicos codificadas tanto por el ADN nuclear (ADN_n) como el ADN mitocondrial (ADN_{mt}) (Haas et al., 2008; De Greaves et al., 2012) (**Figura 1**). Por otra parte, las mitocondrias juegan un papel crucial en muchos otros procesos metabólicos y regulatorios, y en una variedad de mecanismos patológicos (Turrens, 2003; Haas et al., 2008). La enorme actividad bioenergética y respiratoria que tiene lugar en las mitocondrias hacen de esta un entorno con alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son responsables tanto del daño que se produce dentro de la mitocondria como de la producción de altos niveles de estrés oxidativo y daño en otras partes de la célula (membranas, orgánulos, ADN, etc) (Turrens, 2003).

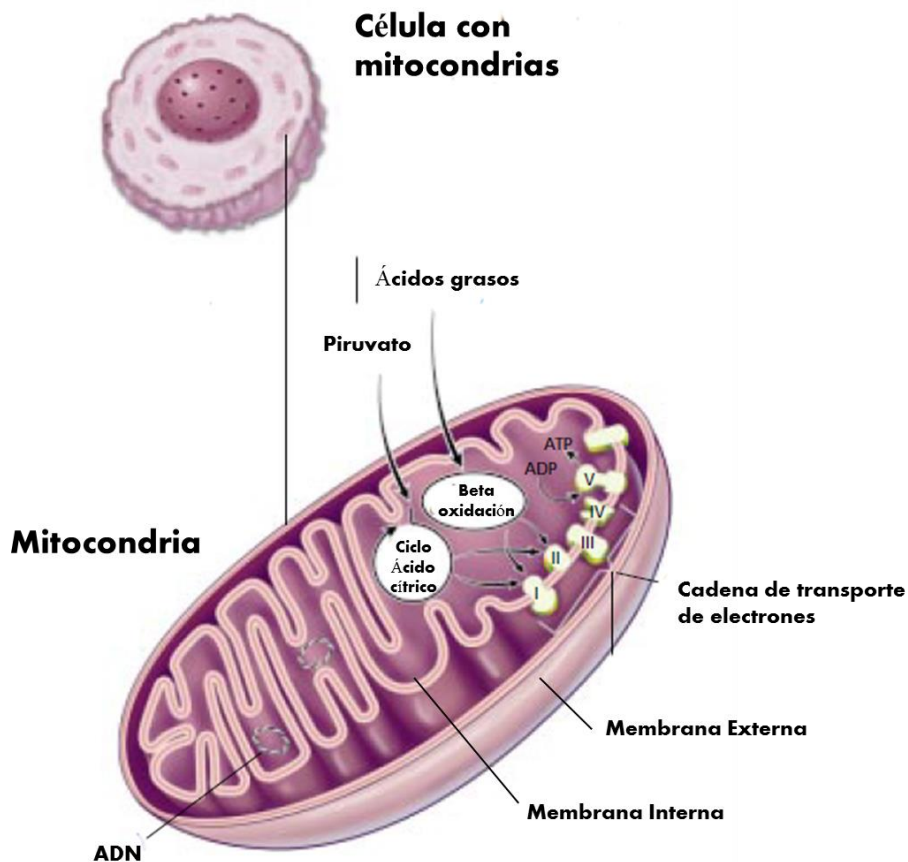


Figura 1. Estructura de la mitocondria. En la imagen se aprecia la doble membrana, la molécula circular de ADN así como la localización donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa o cadena respiratoria mitocondrial a partir de los sustratos derivados del metabolismo del piruvato y los ácidos grasos. Modificado de Cohen & Gold, 2001.

Una de las principales características de las mitocondrias respecto a otros orgánulos es la de conservar vestigios de su vida como organismos independientes según la teoría endosimbiótica. Así, las mitocondrias se reproducen por un proceso de fisión binaria similar a las bacterias y presentan su propio sistema genético en una molécula circular de ADN, con todos los genes necesarios para replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene (Wallace, 2005). El resto de material genético de la bacteria original que no se conservó en el ADNmt fue transferido al ADNn.

De ese modo, la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares y sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos y desde ahí son importadas a la mitocondria mediante el reconocimiento de una secuencia peptídica amino terminal característica (Wallace, 2005). El ADNmt humano, de estructura circular, está compuesto por 16,569 pares de bases, y contiene información para 37 genes de los cuales 13 corresponden a proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial que intervienen en el sistema de fosforilación oxidativa, 22 de ARN transferente y 2 ARN ribosómico (**Figura 2**).



Figura 2. Molécula de ADN mitocondrial. Modificado de <http://haygenealogy.com/dankenbring/genome.html>.

Las 13 proteínas que hemos mencionado son componentes de cuatro de los cinco complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, de los cuales: 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6) de la NADH:ubiquinona oxido-reductasa (Complejo I); una subunidad (cyt b) del ubiquinol:citocromo c óxido-reductasa (Complejo III); 3 subunidades (COX I, II y III) del citocromo c oxidasa (Complejo IV); y 2 subunidades de la ATP sintetasa (Complejo V) (Acín-Pérez y Enríquez, 2014). El resto de las proteínas de estos complejos y el Complejo II en su totalidad, están codificados por el ADNn. El ADNmt codifica además 2 ácidos ribonucleicos ribosómicos (ARN 12S y 16S), componentes de los ribosomas específicos mitocondriales, y 22 ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNt) (Shokolenko y Alexeyev, 2015).

La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta, como vemos, de cinco complejos multienzimáticos. El transporte de electrones entre los complejos I y IV está acoplado a la extrusión de protones a través de la membrana interna mitocondrial por los componentes de la bomba de protones de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria transfiere electrones de NADH y FADH₂, productos ambos de la degradación de sustratos orgánicos como el piruvato y los ácidos grasos en la matriz mitocondrial (**Figura 3**), al oxígeno molecular que actuará como último aceptor de electrones. La energía procedente de la oxidación de estos sustratos se utiliza para generar un gradiente protón-motriz a través de la membrana interna mitocondrial. El complejo V utilizará este gradiente de protones para catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Es precisamente en la cadena respiratoria mitocondrial donde se producen gran cantidad de estos ROS debido al flujo de electrones entre los complejos y a la participación de transportadores de electrones como el Coenzima Q (CoQ) (**Figura 3**) que pueden verse alterados en determinadas condiciones patológicas (Area-Gómez y Schon, 2014).

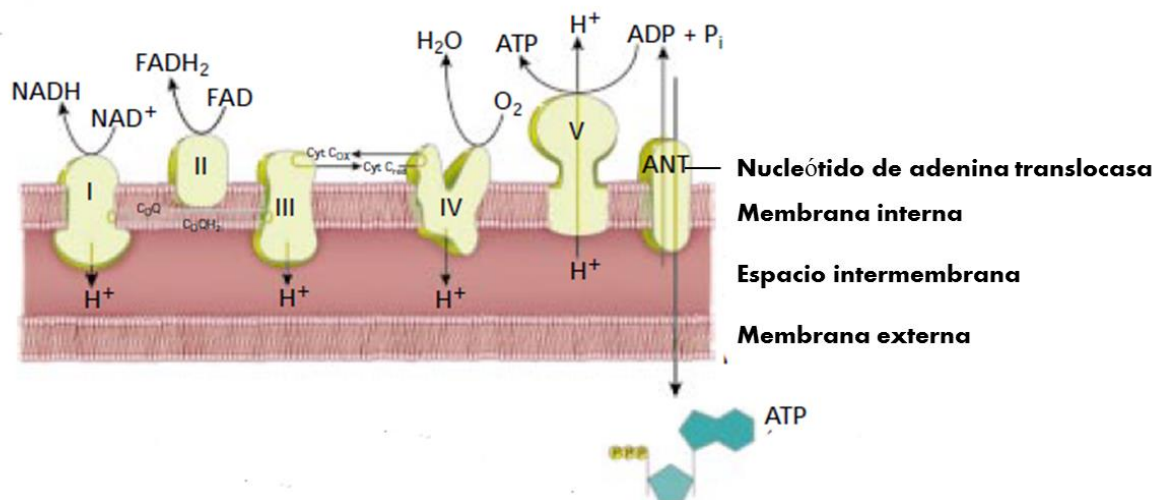


Figura 3. Cadena respiratoria mitocondrial. Los complejos multiprotéicos se sitúan en la membrana interna mitocondrial donde se realiza el transporte de electrones que generará un gradiente de protones a lo largo de la membrana permitiendo la síntesis de ATP. El CoQ actúa como transportador de electrones, transfiriéndolos de los complejos I y II al complejo III, que a su vez los cede al citocromo c. El complejo IV cede los electrones del citocromo C al O_2 para formar H_2O . Al mismo tiempo se desarrolla un flujo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana que produce un gradiente electroquímico que permite la síntesis de ATP mediante la formación de un enlace de alta energía entre ADP y fosfato.

El CoQ o ubiquinona (2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-bezoquinona) es un lípido isoprenoide constituido por un anillo bencénico hidroxilado que posibilita la función del CoQ en la cadena respiratoria mitocondrial al poseer la capacidad de captar y ceder electrones y una cola isoprenoide hidrófoba que le confiere la propiedad de anclarse a la membrana. La cola isoprenoide está compuesta por una serie de repeticiones de moléculas de isopreno con 5 átomos de carbono y un doble enlace. El número de unidades de isopreno es característico de cada especie y, aunque suele haber una forma predominante, muchas especies tienen distintas isoformas de CoQ. Por tanto, en humanos el CoQ se denomina CoQ_{10} , donde “10” es el número de unidades isoprenoides que contiene. De igual forma, los mamíferos de mayor tamaño (caballos, conejos, cerdos) poseen también

CoQ₁₀, en el caso de los roedores encontramos que sintetizan CoQ₉ y CoQ₁₀ (Turunen et al., 2002).

El CoQ está presente en todos los tejidos, sin embargo, las cantidades suelen ser variables con gran dependencia al tipo de tejido. Así, esta concentración de CoQ en un organismo varía de un órgano a otro y entre las distintas regiones de un mismo órgano o tejido, aunque hay que tener en cuenta que la dieta influye considerablemente en las concentraciones de los diferentes tejidos. Igualmente, esta concentración varía en un mismo individuo a lo largo de su vida siendo muy influenciada por el envejecimiento. Los tejidos más ricos en CoQ son el tejido cardíaco, hepático, muscular y cerebral. Dentro de un mismo tejido, las zonas con más abundancia de CoQ son las membranas externa e interna mitocondrial, los lisosomas y las vesículas de Golgi (Turunen et al., 2004).

Se han descrito diversas funciones sobre el CoQ entre las cuales, la principal es la de participar en la fosforilación oxidativa transfiriendo electrones desde los complejos I y II al complejo III mitocondrial, facilitando el paso de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (Turunen et al., 2004). Por lo tanto un componente decisivo de los procesos de fosforilación oxidativa, para producir energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). Este carácter de transportador de electrones le confiere también capacidad antioxidante actuando como agente protector frente a la peroxidación y manteniendo en su estado reducido antioxidantes exógenos como el alfa-tocoferol (vitamina E) y el ascorbato (vitamina C) (Villalba et al., 2000). Dado su importante papel en la mitocondria, su deficiencia se ha asociado a diversas patologías en las cuales, la disfunción mitocondrial se ha asociado de forma directa o indirecta a su fisiopatología y constituye una herramienta diagnóstica en las patologías mitocondriales (Haas et al., 2008).

1.2. Mitocondria y estrés oxidativo

Además de energía, la fosforilación oxidativa mitocondrial también genera especies reactivas de oxígeno (ROS). Cuando la cadena respiratoria mitocondrial se convierte en altamente reducida, el exceso de electrones de los complejos I y III, pueden pasar directamente a O_2 para generar el anión superóxido (O_2^-). El superóxido se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por las enzimas de desintoxicación manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) o superóxido de cobre/zinc dismutasa (Cu/ZnSOD), y luego a agua por la catalasa, glutatión peroxidasa (GPX) o peroxidoxin III (IIIIPRX). Sin embargo, cuando estas enzimas no pueden convertir ROS como el radical superóxido a agua lo suficientemente rápido, el daño oxidativo se produce y se acumula en la mitocondria. Si el H_2O_2 se encuentra con un metal de transición reducido, o se mezcla con O_2^- , el H_2O_2 puede reducirse aún más a radical hidroxilo (OH^\bullet) que es el agente oxidante más potente entre los ROS. De forma adicional, el óxido nítrico (NO) se produce dentro de las mitocondrias por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) y se difunde libremente en la mitocondria desde el citosol. NO reacciona con O_2^- para producir peroxinitrito ($ONOO^-$). Estos dos radicales junto con otros, pueden ocasionar un gran daño a la mitocondria y otros componentes celulares (Turrens, 2003).

En condiciones fisiológicas normales, la producción de ROS está bastante regulada. Sin embargo, si la cadena respiratoria está inhibida, o ciertos componentes claves de la misma como el CoQ_{10} son deficientes, los electrones acumulados en los transportadores de la cadena, aumentan considerablemente el número de electrones desapareados que son transferidos a O_2 para generar O_2^- . Una producción excesiva de ROS mitocondrial puede exceder la defensa antioxidante celular y el daño acumulado puede, en última instancia, destruir la célula por necrosis o por apoptosis.

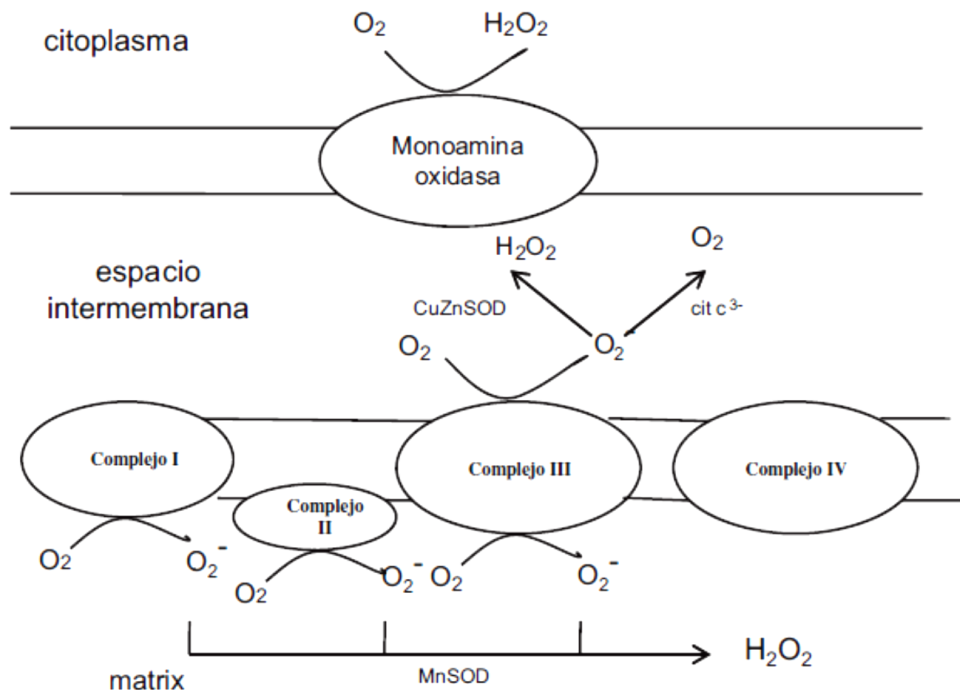


Figura 4. Mecanismo de producción de especies reactivas de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial. Fuente: modificado de Turrens JF, 2003. cit c³: citocromo c³; CuZnSOD: cobre-zinc superóxido dismutasa; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; MnSOD: manganeso superóxido dismutasa; O₂: oxígeno; O₂⁻: anión superóxido.

1.3. Enfermedades mitocondriales

En 1962, el Dr. Rolf Luft describe por primera vez una enfermedad asociada a la mitocondria, concretamente a la transducción de la energía en las mitocondrias (Luft et al., 1962). Se trató de un paciente de 30 años que presentaba debilidad general, transpiración excesiva, no incremento de peso a pesar de aumentar la ingesta, y un alto metabolismo basal. En este caso, el diagnóstico mostró un fallo en el mecanismo de acoplamiento de la fosforilación oxidativa. A partir de este momento la medicina mitocondrial comienza a adquirir relevancia, habiéndose descrito hasta la fecha 150

patologías genéticas asociadas a la mitocondria. Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos producidos por un fallo en el sistema de fosforilación oxidativa, con la consiguiente deficiencia de ATP. Constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades de fenotipo complejo (Rubio Lightowlers et al., 2015). Dada la variedad de afectaciones que causan, son enfermedades multisistémicas que se originan por alteraciones en los genes que codifican las reacciones metabólicas que tienen lugar en la mitocondria. Esto conlleva la aparición de múltiples signos y síntomas por la afectación de distintos órganos y tejidos, como el músculo, el sistema nervioso, el corazón, el riñón o las glándulas endocrinas, siendo sobre todo el músculo y el sistema nervioso los más vulnerables debido a su alta demanda energética, por lo que son los principales tejidos afectados en estas enfermedades (Taylor et al., 2005). Las manifestaciones clínicas de estas afecciones son muy variadas, incluyendo deterioro de las funciones mentales, trastornos motores, intolerancia al ejercicio, epilepsia, retinosis pigmentaria, accidentes vasculares, oftalmoplejía, cardiomiopatía, sordera, insuficiencia hepática y pancreática así como acidosis metabólica (Dimauro e Hirano, 2009).

Debemos tener en cuenta que las patologías mitocondriales no solo son aquellas que se producen por alteraciones en los genes del ADNmt dado que para su función, la mitocondria cuenta tanto con los genes codificados por su propio ADN, como por genes codificados a partir de ADNn. Por ello, las enfermedades mitocondriales se clasifican desde un punto de vista genético en dos grupos:

Enfermedades por defectos en el ADN mitocondrial:

En este grupo incluimos mutaciones puntuales (sustituciones de bases) y mutaciones por reordenamientos simples o complejos de nucleótidos (deleciones, duplicaciones, inserciones), y pueden afectar a cualquiera de los 37 genes del genoma mitocondrial (Haas et al., 2008). El grado de afectación en este tipo de alteraciones dependerá del grado de heteroplasmia, que consiste en el número de copias de ADNmt que presentan la mutación. En este sentido, es necesario que la mutación afecte a un número mínimo de copias para que la célula presente el correspondiente defecto bioquímico (Dowling, 2014), por lo que la expresión clínica de una mutación puntual vendrá determinada por la relación entre copias sanas y mutadas en los diferentes tejidos (Haas et al., 2008; Dowling, 2014).

La mayoría de las mutaciones puntuales en genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial son de herencia materna (**Figura 5**), ya que se dan en los genes del ADN mitocondrial, y tienen carácter multistémico. Sin embargo, se presentan también casos de mutaciones esporádicas y específicas de tejido (Andreu, et al., 2004). Entre estas patologías destacan: Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), Síndrome de Leigh y Debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP), Epilepsia mioclónica y fibras rojas de aspecto rasgado (MERRF), Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios que asemejan a la apoplejía (MELAS), Síndrome de Kearns-Sayre, el Síndrome de Pearson y la Oftalmoplejia externa progresiva crónica (CPEO) (Chinnery et al., 2014).

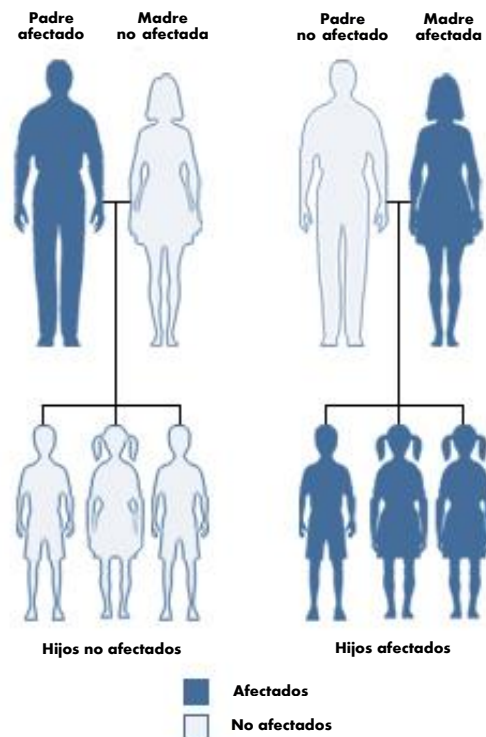


Figura 5. Esquema del perfil de herencia materna característica de las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial. Fuente: modificado de <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations>.

Enfermedades asociadas a defectos en el ADN nuclear

El ADNn codifica multitud de proteínas (se estima que cerca de 3000 genes) que son transportadas hasta la mitocondria para desempeñar gran variedad de funciones (Ng y Turnbull, 2015). Por ello, muchas enfermedades mitocondriales hereditarias están causadas por mutaciones en genes nucleares en cuyo caso se presentan con herencia de tipo mendeliana. Estos genes codifican para cada una de las funciones relacionadas con la mitocondria como:

- Subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.
- Ensamblaje de complejos mitocondriales.
- Señalización intergenómica entre DNAn y ADNmt.
- Ensamblaje y estabilidad mitocondrial.
- Replicación mitocondrial y biogénesis.
- Fisión-fusión.
- Vía oxidación de ácidos grasos.
- Proteínas del ciclo de Krebs.

En este sentido, existen patologías asociadas a fallos en cada uno de estos genes y por tanto rutas metabólicas. Algunos ejemplos importantes en este grupo son las mutaciones en los genes del complejo I: NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8 asociadas a la enfermedad de Leigh, leucodistrofia, cardiomiopatía y encefalopatías así como epilepsia mioclónica. Asociadas al complejo II: flavoproteína y SDHD asociadas a la enfermedad de Leigh y paraganglioma hereditario, o los genes relacionados con la síntesis de CoQ₁₀ que se asocian a fallos en los complejos I, II y III dando como consecuencias miopatía, ataxia y problemas de desarrollo. Existen también ejemplos en cuanto al ensamblaje y estabilidad de las mitocondrias como las mutaciones en los genes: SURF1, SCO1 y SCO2, COS10 asociadas al síndrome de Leigh y a la encefalopatía infantil (Ng y Turnbull, 2015).

Desde un punto de vista terapéutico, estas patologías no tienen tratamientos eficaces actualmente dado su complejidad. Sin embargo, actualmente las terapias de este conjunto de enfermedades están enfocadas a la protección y mejora del metabolismo mitocondrial. Algunos de los compuestos comúnmente usados son: L-carnitina, necesaria para el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la matriz mitocondrial donde se somete a β

–oxidación; L-arginina, que aumenta la disponibilidad de óxido nítrico conduciendo a mejorar la vasodilatación intracerebral y el flujo sanguíneo; creatina, que se almacena principalmente en el músculo, corazón, y cerebro, es metabolizado en fosfocreatina que es un fosfato esencial donante para regeneración de ATP en el músculo y el cerebro; y el CoQ₁₀, cuyas funciones ya hemos mencionado (El-Hattab et al., 2015).

1.4. Inflamación e inflammasoma.

La inflamación es una respuesta del cuerpo a la lesión tisular, y desempeña un papel esencial en la reparación de tejidos. Sin embargo, la inflamación crónica y fuera de control supone un evento patológico con graves resultados en el daño tisular. La inflamación es inducida por diversos estímulos, y es el resultado de un cambio en el equilibrio entre las citoquinas anti-inflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-10 o TGF- β y pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-18 o TNF α entre otras, mediadas en su mayoría por la activación el factor de transcripción NF κ B en respuesta a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o señales de peligro (DAMP) (Harjith et al., 2014). En los últimos años, las citoquinas IL-1 β , IL-18 han adquirido un papel protagonista en numerosos procesos patológicos no solo por su papel proinflamatorio, sino por ser las principales citoquinas activadas por el complejo inflammasoma. El complejo inflammasoma es un complejo multiproteico que comprende un sensor intracelular, por lo general un receptor Nod-like (NLR), el precursor de la pro-caspasa-1 y el adaptador de ASC cuya activación conduce a la maduración de la caspasa-1 y el procesamiento de sus sustratos, IL-1 β e IL-18 (**Figura 6**). Los NLR son receptores citosólicos que regulan la inflamación y la apoptosis. Están formados por tres dominios en la región amino-terminal, que se encargan de mediar la transducción de la señal y/o la activación de caspasas inflamatorias como la caspasa-1. En la región central presentan un dominio de unión a nucleótidos, responsable de la oligomerización (NOD) que depende del ATP, y en la región carboxi-

terminal contiene una secuencia repetitiva rica en leucinas o LRR (leucine rich region), con la que se une a ligandos específicos. La familia de NLR está constituida por una gran variedad de miembros (**Figura 7**).

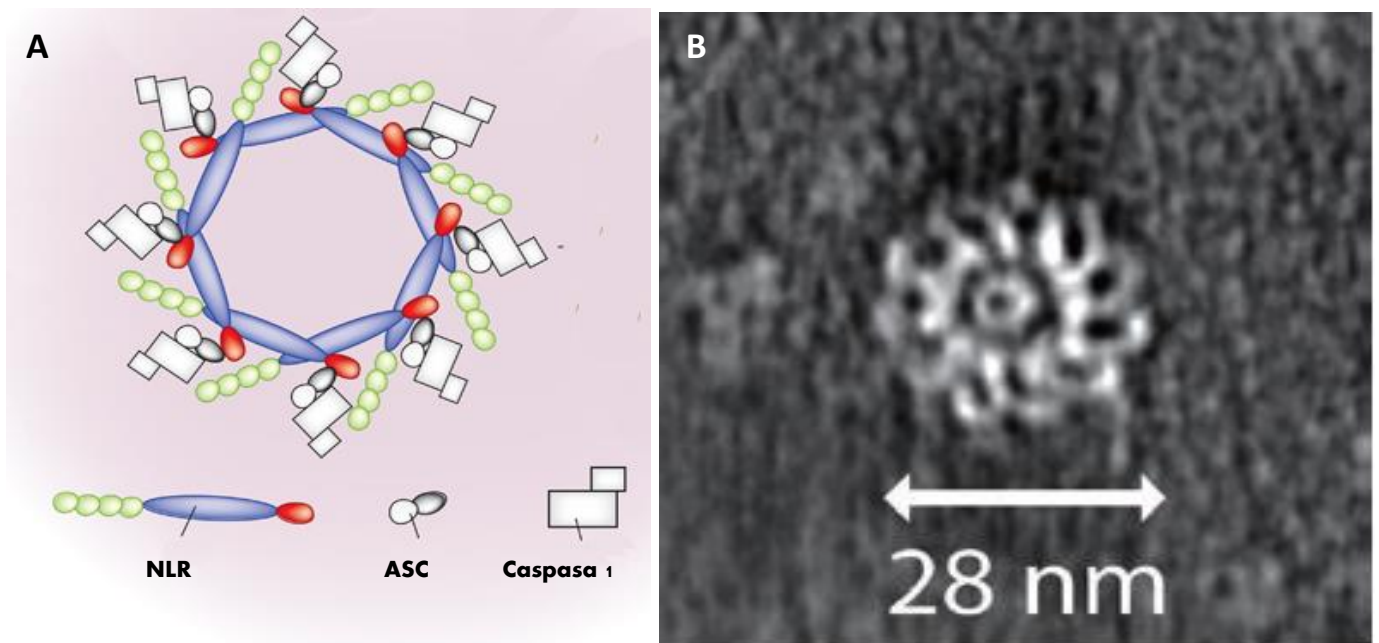


Figura 6. Estructura del complejo inflammasoma. A. Hélice formada por la unión de una proteína NLR, el precursor de la pro-caspasa-1 y el adaptador de ASC. Modificado de Elinav et al., 2013. B. Estructura de la hélice tomada por microscopía electrónica. Modificado de Chai J y Shi, 2014.

NLRC4	R F K P K	Y	K	F	F	H
Apaf—1	N G K S F	R	Y	Y	L	H
NOD—1	G D Q Q S	Y	E	F	F	H
NOD—2	G S T A P	L	E	F	L	H
NLRC3	A S S V A	Y	C	F	T	H
NLRC5	H Q Q T G	Y	A	F	T	H
NLRP1	P I P L S	Y	S	F	I	H
NLRP2	V S K G C	Y	S	F	I	H
NLRP3	D C E K F	Y	S	F	I	H
NLRP4	E R E S S	Y	V	F	L	H
NLRP5	H C E E Y	Y	T	F	F	H
NLRP6	E T E V T	Y	Q	F	I	D
NLRP7	V S K G C	Y	S	F	I	H
NLRP8	G E E D H	Y	V	F	T	L
NLRP9	R R G D C	F	A	F	M	H
NLRP10	A I K K F	Y	S	F	R	H
NLRP11	T H K D R	Y	K	F	I	H
NLRP12	N C E R Y	Y	S	F	I	H
NLRP13	D C G G C	T	T	F	T	H
NLRP14	E Y I N C	Y	V	F	T	H
NLRX1	G R A G T	F	V	F	T	V
CIITA	A A E S E	L	A	F	P	S
NAIP	R L R P F	Y	R	F	L	S
M1a10	S G E A Y	A	C	R	V	H
Rpm1	F G R P K	A	F	K	M	H
Rps2	E R N K S	N	V	K	M	H
Pi_ta	K N E V L	S	C	V	V	H

Figura 7. Relación de la familia de NLRs descritos hasta la fecha. Modificado de Chai J y Shi, 2014.

De todos los NLRs, NLRP3 es el más estudiado y se activa por una amplia gama de señales de estrés celular, y precisamente se ha demostrado que los ROS y la disfunción mitocondrial son importantes activadores de la inflamación mediada por inflamasoma (Zhou et al., 2011; Shimada et al., 2014). A este respecto, el estado del ADNmt adquiere una gran relevancia puesto que suele estar relacionado con la aparición de alteraciones moleculares (mutaciones, deleciones, depleciones y polimorfismos) que conllevan un incremento del estrés oxidativo y una considerable disfunción mitocondrial que dificulta el correcto funcionamiento de la mitocondria.

1.5. La fibromialgia.

La fibromialgia (FM) es un síndrome de dolor crónico generalizado acompañado de otros síntomas como, disminución del umbral del dolor, fatiga muscular, intolerancia al ejercicio, dolor de cabeza, trastornos del sueño y la depresión. Es una condición crónica que se caracteriza por un patrón de síntomas difíciles de diagnosticar y tratar. La FM se diagnostica de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Wolfe et al., 1990) e investigaciones de laboratorio de rutina no suelen ser de utilidad puesto que dan resultados normales (Yunus et al., 1981). La prevalencia de la FM en los países industrializados oscila entre 0,4% y 4% en la población (que afecta a por lo menos 5 millones de personas en los Estados Unidos y 800.000 en España) y es 11 veces más frecuente en mujeres que en hombres (Lawrence et al., 2008). Su alta prevalencia hace que la FM sea un problema importante en los países desarrollados en los últimos años. La FM provoca absentismo laboral y se ha asociado con un alto coste de utilización de servicios médicos así como una alta tasa de invalidez. Por otra parte, el uso de medicamentos y necesidades médicas aumenta notablemente una vez confirmado el diagnóstico por lo que se estima que el coste de los servicios anuales de salud de los pacientes con FM es del doble que la de los pacientes con otras patologías de dolor crónico y pacientes sin dolor. Además, el hecho de que sus criterios diagnósticos sean solamente clínicos y altamente subjetivos, y que su etiopatogenia aún no se ha aclarado hace muy difícil el estudio y el enfoque terapéutico de la enfermedad. Aunque la etiología de la FM no está clara, las evidencias sugieren que factores biológicos, genéticos y ambientales están implicados. Se han observado cambios en la actividad neuronal en el sistema nervioso central, un anormal metabolismo de aminas biogénicas, trastornos inmunológicos y del estrés oxidativo que pueden, entre otros factores, contribuir al desarrollo de la enfermedad. La FM se ha relacionado también con

alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis junto con desequilibrio de la neurotransmisión, que implican aminoácidos excitadores, catecolaminas, sustancia P y serotonina (5-HT) (Russell et al., 1994; Crofford et al., 1996; Neeck, 2002). Los síntomas del paciente pueden derivar de una mala modulación del estrés, una sensibilización de las neuronas nociceptoras específicas y por tanto, disminución del umbral del dolor en respuesta a múltiples factores ambientales, tales como trauma mecánico o emocional, el estrés crónico o incluso infecciones. En los últimos años, se ha aportado nueva información a nuestra comprensión de la fisiopatología de FM. Algunos polimorfismos genéticos así como incremento de anticuerpos han sido asociados con la FM, como anticuerpos contra el sistema serotoninérgico de 5-HTT (Bazzichi et al., 2006a;. Tander et al., 2008), el polimorfismo del gen de la catecol-O-methyltransferase (Gursoy et al., 2004), polimorfismo de repetición del receptor de D4 dopamina exón II (Buskila et al., 2004), y los anticuerpos contra la serotonina (Klein et al., 1992; Werle et al., 2001). También se han postulado alteraciones en el metabolismo, transporte y recaptación de la serotonina, y la sustancia P (Staud y Spaeth, 2008; Alnigenis y Barland, 2001; Schwarz et al., 2002). Por otra parte, la homeostasis de las citoquinas inflamatorias han sido consideradas en la patogénesis de FM (Wallace, 2001; Wallace et al., 2006). Por otro lado, varios estudios han propuesto una participación de la disfunción mitocondrial y altos niveles de estrés oxidativo en pacientes con FM, lo que sugiere que este proceso puede contribuir a la fisiopatología de esta enfermedad.

1.5.1. Disfunción mitocondrial en la FM

Debido a que los principales síntomas en la FM (dolor, rigidez y fatiga) se encuentran asociados a los músculos, se han estudiado las biopsias musculares, sobre todo de trapecio

de los pacientes. En la mayoría de los casos, numerosas alteraciones morfológicas mitocondriales se han encontrado en las biopsias musculares de pacientes con FM. El análisis histoquímico ha demostrado atrofia en fibras tipo II y el aspecto "apolillado" de fibras de tipo I. Los hallazgos en microscopía electrónica eran más llamativos, mostrando una acumulación mitocondrial subsarcolémica (Kalyan-Raman et al., 1984), lisis miofibrilar con la deposición de glucógeno y mitocondrias anormales (Yunus et al., 1986), además de bajo número de mitocondrias (Sprott et al., 2004) y falta de membrana interna mitocondrial (Henriksson et al., 1982), fibras rojas rasgadas (Bengtsson et al., 1988), y defectos de la citocromo-c-oxidasa, el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Drewes et al., 1993, Pongratz y Späth, 1998) (**Figura 8**).

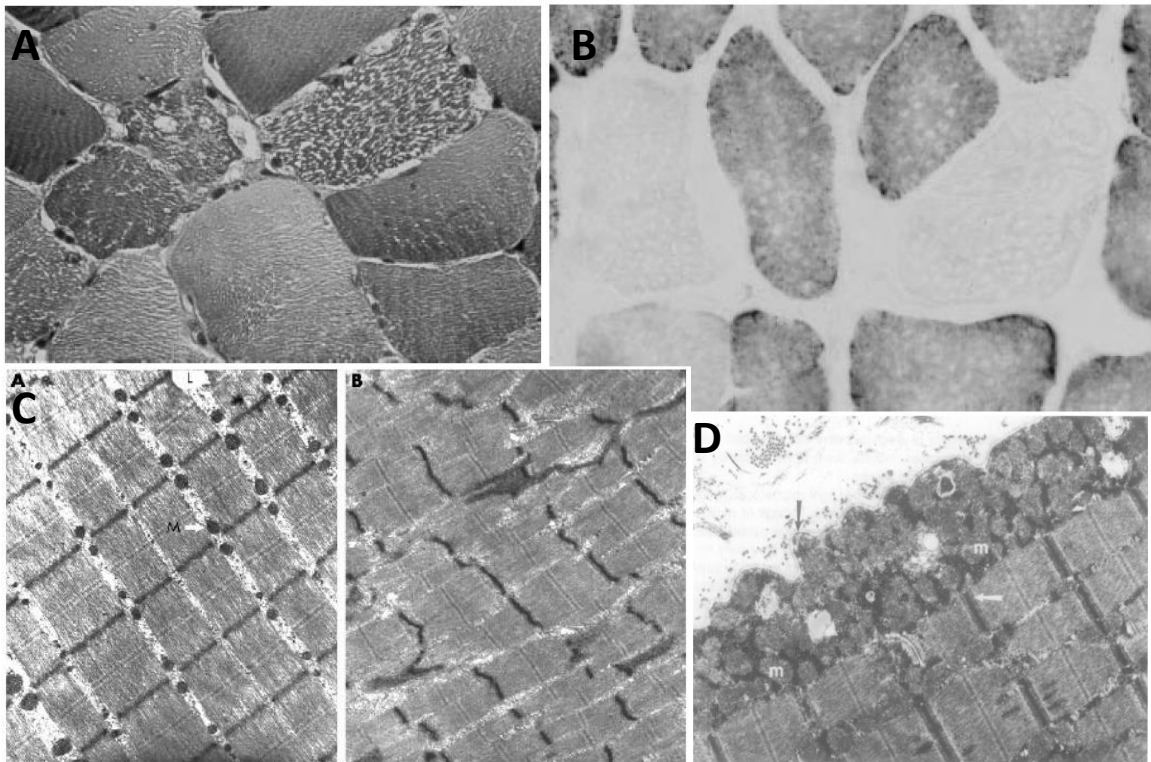


Figura 8. Histopatología en músculo de pacientes con FM propia de patologías mitocondriales: **A.** Fibras rojo rasgadas. **B.** Fibras Cox negativas. **C.** Ausencia de mitocondrias en biopsia muscular (imagen derecha)

comparada con músculo sano (imagen izquierda). **D.** Acúmulos subsarcolémicos que dan la impresión de fibras rasgadas. Fuente: Yunus et al., 1986; Pongratz and Späth, 1998; Sprott et al., 2004.

La presencia de fibras apolilladas y rojo rasgadas indican una distribución y proliferación desigual de las mitocondrias. La tinción de tricrómico de Gomori muestra acumulación subsarcolémica de mitocondrias que dan la apariencia rasgada. La proliferación mitocondrial puede ser un fenómeno compensatorio en los trastornos o estados fisiopatológicos que afectan al metabolismo oxidativo (Bengtsson, 2002). Es interesante mencionar que las fibras rojo rasgadas, la acumulación mitocondrial subsarcolémica y alteración en la ultraestructura, número y tamaño de las mitocondrias son defectos típicos y marcadores encontrados en las enfermedades mitocondriales (MELAS, MERRF, el síndrome de Kearns-Sayre, síndrome de Pearson, el síndrome de Leigh, etc.) (Haas et al., 2008).

El análisis mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) con ^{31}P en músculo ha proporcionado evidencias objetivas sobre anomalías metabólicas consistentes con los síntomas clínicos de debilidad y fatiga en pacientes con FM (Park et al., 1998). Los estudios con RMN mostraron reducidas concentraciones de fosfocreatina (PCr) y ATP en los músculos de los pacientes con FM de un 15% por debajo de los valores normales durante el reposo y el ejercicio. Los niveles reducidos de PCr y ATP en los músculos de los pacientes se correlacionan con las observaciones clínicas con respecto a debilidad y dolor durante el ejercicio. En este estudio, Park también mostró que el dolor se correlacionó inversamente con ATP y los niveles de PCr. La reducción de los niveles de ATP también se han observado en los eritrocitos de los pacientes de FM, lo que sugiere que esto puede ser un fenómeno más sistémico de lo que se suponía anteriormente (Russell et al., 1993).

Recientemente, también se ha observado una disminución de los niveles de ATP en las plaquetas de los pacientes con FM (Bazzichi et al., 2008). Las plaquetas representan un modelo periférico de fácil acceso y fácil de estudiar las alteraciones bioenergéticas en la FM. Las plaquetas poseen un gran número de mitocondrias así como todo el conjunto de enzimas o proteínas implicadas en la producción de energía por la fosforilación oxidativa y, en consecuencia, son muy activas en la producción de ATP (Niu et al., 1996). Por otra parte, las plaquetas presentan en su membrana plasmática numerosos receptores de membrana para el dolor, inflamación o receptores neuroquímicos, tales como los receptores de adenosina/monoamina así como zonas de unión de transportadores serotoninérgicos (Marazziti et al., 1999; Martini et al., 2004), lo que permite el estudio de cualquier ruta neuroquímica o el metabolismo de la energía en forma de ATP en la FM.

En los últimos años las investigaciones sobre el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial se han incrementado considerablemente llegando a formar parte de la patogénesis de la FM de una forma evidente (Bagis et al., 2005; Ozgocmen et al., 2006; Cordero et al., 2010). En apoyo de esta hipótesis existen nuevas referencias en pacientes con FM; en células de pacientes con FM se han observado reducidos niveles de masa mitocondrial, disminución de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y la bioenergética celular (Bazzichi et al., 2008; Cordero et al., 2010; Gerdle et al., 2013; Miyamae et al., 2013; Cordero et al., 2013a). Además, se ha propuesto que la inflamación a nivel sistémico también está involucrada en la FM, y así, se han observado altos niveles de citoquinas, especialmente la IL1 β , en el suero de pacientes con FM (Bazzichi et al., 2007; Ross et al., 2010; Cordero et al., 2013b). Las citoquinas pro-inflamatorias podrían provocar cambios en la estructura y función cerebral y muscular, provocando el desarrollo de los cambios comportamentales, cognitivos y de sensibilización de las terminaciones nerviosas, características propias de la FM. Por tanto, la asociación de

ambos eventos patológicos involucrados en la fisiopatología de la FM podría suponer un avance en el conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad y nuevas dianas terapéuticas.

La disfunción mitocondrial es un evento común en la célula sana para el cual, la célula tiene un sistema de control de calidad mediante un equilibrio de biogénesis mitocondrial y la degradación autofágica. Sin embargo, cuando el grado de disfunción mitocondrial sobrepasa a los mecanismos compensatorios de la célula aparecen consecuencias patológicas que llevan a un aumento de estrés oxidativo, una masiva degradación mitocondrial, un daño a otras estructuras celulares y finalmente, la muerte celular. La disfunción mitocondrial, se ha mostrado estar implicado en numerosas patologías tanto de una forma directa, como es el caso de las enfermedades mitocondriales ya mencionadas como de forma indirecta, como en el caso de otras patologías cuyo mecanismo molecular es otro pero la mitocondria tiene un papel relevante en el agravamiento de la fisiopatología y/o agravamiento de los síntomas. En este sentido ciertas patologías como el Parkinson o la diabetes presentan una implicación de la mitocondria hasta tal punto, que han llegado a generar subgrupos patológicos caracterizado por las alteraciones de esta organela (Zuo et al., 2013; Choo-Kang et al., 2002). En estos subgrupos mitocondriales se dan las características comunes a las patologías mitocondriales, como herencia materna, presencia de mutaciones en el ADNmt, etc. Además, en todas estas patologías existen nexos de unión con la inflamación.

Tal y como hemos descrito, la FM es una patología con claros antecedentes de afectación mitocondrial. Por ello, el presente proyecto pretende evaluar el papel de la disfunción mitocondrial en un modelo *in vitro* de fibroblastos aislados de pacientes con diagnóstico de FM. Además, estudiaremos la relación de este proceso patológico con la activación

Mario David Cordero Morales

del complejo inflammasoma, como un mecanismo de inflamación sistémica activo por la producción de ROS mitocondriales. Por otro lado, evaluaremos el papel del CoQ₁₀ como posible tratamiento para los pacientes. Finalmente, se estudiara la posibilidad de aparición de mutaciones en el ADNmt que pudieran explicar la fisiopatología mitocondrial así como mostrar un papel en la herencia de los síntomas de la enfermedad.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Para entender la implicación de la mitocondria y el ADNmt en la fisiopatología de la FM y su relación con el complejo NLRP3-inflamasoma como sensor del estrés celular, el presente estudio plantea los siguientes objetivos:

- Caracterizar la implicación de la disfunción mitocondrial así como del complejo NLRP3-inflamasoma en la fisiopatología de células mononucleares de pacientes con FM.
- Caracterizar la fisiopatología mitocondrial de la FM en fibroblastos de paciente como modelo *in vitro*.
- Determinar la presencia de alteraciones en el ADNmt en pacientes con FM.
- Estudio de la activación del complejo NLRP3-inflamasoma en otros modelos de patología mitocondrial como la enfermedad de MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares) con la mutación m.3243A> G en el gen tRNA^{Leu} (UUR), la enfermedad de MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas) con la mutación m.8344A> G en el gen MT-TK, y la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) con la mutación m.11778G> A en el gen MT-ND4.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Sevilla, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y todas las Conferencias Internacionales de Armonización y Guías de Buenas Práctica Clínicas. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de comenzar el estudio.

3.1. Pacientes

Se eligieron pacientes mayores de 18 años de edad que cumplieran los criterios de diagnóstico del American College of Rheumatology 1990 para FM. Estos criterios incluyen una historia de dolor musculoesquelético generalizado en los lados derecho e izquierdo del cuerpo, así como por encima y por debajo de la cintura, con una duración mínima de 3 meses, y la sensibilidad a la presión a 11 o más de 18 sitios específicos (puntos dolorosos), con sensibilidad moderada o más grave a la palpación digital. Los criterios de exclusión fueron las enfermedades infecciosas agudas en las 3 semanas anteriores; patologías psiquiátricas, metabólicas, autoinmunes, síndrome de fatiga crónica, enfermedades inflamatorias crónicas o dérmicas; hábitos no deseados (por ejemplo, el tabaquismo, el alcohol, etc.); enfermedades orales (por ejemplo, periodontitis); condiciones médicas que requieren tratamiento con glucocorticoides, estatinas o fármacos antidepresivos; abuso pasado o actual o dependencia de sustancias estupefacientes, así como embarazo o lactancia actual. Todos los pacientes tenían un estilo de vida sedentario. Los datos clínicos se obtuvieron a partir de un examen físico, y se evaluaron utilizando el Cuestionario de Impacto de Fibromialgia (FIQ), incluyendo las escalas analógicas visuales sobre el dolor general y difuso típico de FM (VAS).

3.2. Reactivos.

Los reactivos 2,6-Dicloroindofenol sodio hidratado (DCPIP), 5,5'-Dithiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), Triton, Acetil CoA, Oxalacetato, BSA-EDTA, CoQ1, Rotenona, KCN, Succinato, Antimicina A, Citocromo C, tripsina (0,25% Trypsin-EDTA Solution) y coctel inhibidor de proteasas, junto con el inhibidor de la síntesis de CoQ 4-aminobenzoato (PABA) y lipopolisacárido de E. coli fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El anticuerpo anti- GAPDH anticuerpo monoclonal de Calbiochem - Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, Reino Unido). Los anticuerpos específicos para los complejos mitocondriales complejo anti- I humano (subunidad 39 kDa), complejo II (30 kDa subunidad I), Complejo III (subunidad Core 1) y Complejo IV (COX II), MitoSoxTM, PicoGreen, BODIPY 581/591 y Hoechst 3342, fueron adquiridos de Invitrogen / Molecular Sondas (Eugene, Oregón). Los anticuerpos complejo I subunidad 8kDa y complejo II subunidad 70 kDa y OGG - 1 fueron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos para catalasa y MnSOD fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo anti-citocromo c se adquirió en PharMingen (BD Bioscience, San Jose, California). Los anticuerpos anti-caspase-1 y anti-caspasa 3 activa fueron adquiridos en Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti - NLRP3 de Adipogen (San Diego, EE.UU.) y anti -IL - 1 β (p17) de Santa Cruz de Biotecnología. Un cóctel de inhibidores de proteasa (cóctel completo) se adquirió de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). El kit de sustrato Inmun estrella HRP era de Bio -Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

3.3. Cultivos de fibroblastos

Los fibroblastos derivados de los pacientes y controles se obtuvieron de acuerdo con las declaraciones de Helsinki de 1964, revisada en 2001 y el consentimiento informado de los pacientes. Los fibroblastos se cultivaron en un medio D- MEM (4.500 mg / L de glucosa, L - glutamina, piruvato), (Gibco, Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen, Eugene, Oregón, EE.UU.) y antibióticos (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

3.4. Líneas celulares

3.4.1. Líneas de fibroblastos de fibromialgia

En este proyecto hemos trabajado con líneas de fibroblastos de piel aislados de tres pacientes con diagnóstico de FM mediante biopsia de piel en condiciones de esterilidad con punch de 4mm. Las pacientes fueron tres mujeres de 40, 42 y 42 años de edad. Los datos clínicos serán mostrados en el apartado de resultados.

3.4.2. Líneas de fibroblastos de enfermedades mitocondriales

Los fibroblastos MELAS se obtuvieron de un paciente que presentaba una mutación A por G heteroplásmica en el nucleótido 3243 en el gen tRNA^{Leu} (UUR). Clínicamente, el paciente presentaba encefalomiopatía, episodios tipo ictus, y acidosis láctica, además de baja estatura, diabetes mellitus, sordera, demencia y ataxia. El nivel de heteroplasmia fue del 43 % en los fibroblastos. La fisiopatología molecular de estos fibroblastos se describen en las referencias Cotán et al., 2011. Las células fueron cedidas por la Dra. Sandra Jackson del Hospital Universitario Carl Gustav Carus, Dresden (Alemania).

Mario David Cordero Morales

Los fibroblastos MERRF se obtuvieron de un paciente que presentaba una mutación m.8344A > G con una heteroplasmia del 57 %. La fisiopatología molecular se describe en las referencias de la Mata et al., 2012. Las células fueron cedidas por la Dra. Sandra Jackson del Hospital Universitario Carl Gustav Carus, Dresden (Alemania).

Los fibroblastos LHON se obtuvieron de un paciente que presentaba una mutación m.11778G >A. Los fibroblastos LHON no habían sido caracterizados antes de este trabajo. Las células fueron cedidas por la Dra. Sandra Jackson del Hospital Universitario Carl Gustav Carus, Dresden (Alemania).

3.5. Muestras sangre

La recogida de muestras sanguíneas se hizo de forma ambulatoria mediante punción venosa con Vacutainer en condiciones de esterilidad, en tubos con anticoagulante EDTA. Se tomaron 16 ml de sangre a cada paciente.

3.6. Aislamiento de PBMC mediante Ficoll-PaqueTM PLUS.

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se utilizó el protocolo basado en la utilización del polisacárido hidrofílico Ficoll-PaqueTM PLUS. Para este protocolo usamos entre 2,5 - 3 ml de sangre heparinizada y mezclada con 1,5 ml de solución salina equilibrada (BSS, Balanced Salt Solution), solución salina con glucosa que mantenía la viabilidad de las células sanguíneas. Para cada 2 ml de sangre con BSS, se utilizó 1,5 ml de Ficoll-PaqueTM PLUS. El primer paso consistía en introducir el Ficoll-PaqueTM PLUS dentro de un tubo Corning de 15 o 50 ml, dependiendo del volumen de sangre obtenido. A continuación, la sangre se introduce lentamente con una pipeta

Pasteur, evitando que se mezclase con la capa de Ficoll-Paque™ PLUS. Posteriormente se centrifuga a 900 g con una centrífuga basculante durante 40 min. Tras la centrifugación se observaba la separación de los componentes de la sangre, una fase superior amarilla de plasma, seguida de una interfase que contenía los monocitos y linfocitos (PBMC) situada encima del Ficoll y, finalmente, un precipitado formado por plaquetas, eritrocitos y demás fragmentos celulares. Recogimos la interfase formada por monocitos y linfocitos con una pipeta Pasteur, y se pasaba a un nuevo tubo Corning, donde por cada mililitro de células recogidas se añadían 3 ml de tampón BSS, se invertía y se centrifugaba a 900 g durante 10 min para eliminar las plaquetas y limpiar las PBMC.

3.7. Obtención de muestras biológicas.

Las muestras de, orina, biopsia de piel y saliva se obtuvieron de la paciente en la que se observó la mutación. La primera muestra de orina de la mañana de 30-40 ml se recogió mediante un tubo de centrifuga de 50 ml limpio (producido por Corning) y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener sedimentos. La saliva no estimulada se obtuvo por babeo pasivo en tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, DE). Aproximadamente 3 ml de toda la saliva se centrifugó a 1500 g a 4 ° C durante 10 minutos. Después de desechar cuidadosamente el sobrenadante, el sedimento celular insoluble se lavó dos veces usando tampón de PBS enfriado con hielo y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. La biopsia de piel fue tomada de la misma forma que para obtener los fibroblastos.

3.8. Generación de híbridos trans-mitocondriales

Los híbridos trans-mitocondriales utilizados fueron generados mediante la fusión de una célula Rho-0, células que contienen mitocondrias pero que carecen de ADNmt, concretamente la línea 143-B.TK carente de timidina kinasa y plaquetas obtenidas a partir de sangre total, mediante centrifugación diferencial de donantes sanos y la paciente siguiendo el protocolo descrito por Chomyn (Chomyn, 1994).

Se obtuvieron entre 15 y 20 mL de sangre en tubos de heparina de la paciente y control que son transferidos a tubos de 50 mL. A continuación, se añade una novena parte de suero fisiológico salino, se mezclan por agitación y centrifugan a 200 g durante 20 min a 12°C. De este producto final se recogen tres cuartas partes del sobrenadante que contiene las plaquetas en tubos de 15 mL que se centrifugó a 1500 g durante 20 min, 12°C. EL sobrenadante es eliminado y el pellet resuspendido en 11mL de suero salino. De este producto, se aíslan 7 mL a un tubo de 15 mL y se repite la centrifugación a 1500 g durante 20 min, 12°C. El sobrenadante es eliminado dejando 100 µL.

En paralelo, obtenemos un pellet de células Rho-0 mediante lavados con PBS, tripsinización y centrifugación y resuspendiendo el pellet en DMEN sin calcio a una concentración de 5×10^5 células/mL. A continuación, 2 mL de estas células son añadidas al pellet de plaquetas con cuidado de no despegar el pellet. Hacemos una centrifugación a 180 g durante 10 min y eliminamos sobrenadante. Posteriormente, añadimos con pipeta Pasteur 0,1 mL de polietilenglicol (PEG, Sigma). Incubamos 1 min a temperatura ambiente y añadimos 10 mL de medio de cultivo de las células Rho-0 y se resuspenden durante 30 segundos. A continuación añadimos 10 mL del medio de cultivo y se reparten en placas de multipocillos de 6 wells para ser incubadas a 37°C, 5% de CO₂. Tras tres días del sembrado, el medio se cambia por medio selectivo sin uridina y con BrdU, el

cual es cambiado cada tres días. A partir de los 12 días, se han formado colonias que pueden ser sembradas a frascos. El mantenimiento de las células se realiza con medio DMEN al 10% de suero fetal bovino, 1% de cocktail antibióticos, 1% de piruvato sódico, 1% de L-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales.

3.9. Extracción de CoQ de muestras biológicas.

Las células se recogieron con tripsina (0,25% Trypsin-EDTA Solution, Sigma), para posteriormente centrifugarlas a 800g durante 5 minutos a 4°C obteniéndose un pellet que es resuspendido en 500µl de PBS y trasvasado a un tubo de vidrio de 15ml con tapón de rosca (Pirex), al que añadimos Q₉ como estándar interno de la extracción. La concentración del estándar se determinó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 275nm (ϵ CoQ₉ = 14,7mM⁻¹). El extracto celular con el estándar interno se mantiene en hielo 5 minutos para después añadir 500µl de SDS 2% y agitar con un vórtex durante un minuto a máxima potencia. Posteriormente se añaden 2ml de la mezcla etanol:isopropanol 95:5 y se mezcla con agitación durante un minuto. A continuación se añaden a la mezcla 5 ml de hexano y se agita con vórtex, pasando a centrifugar a 1000 g durante 5 minutos a 4°C para separar la fase orgánica (que contiene los lípidos) de la fase soluble. Tras la centrifugación, la fase orgánica se transfiere a una ampolla de rotavapor de 25ml, volviéndose a repetir la extracción con hexano dos veces más. El hexano de las ampollas es secado por rotavapor (R-3000, B·U·CHI), en condiciones de vacío, a 40°C y con una potencia de rotor del 50%. El residuo seco se reconstituye en 333µl de etanol (calidad HPLC) y se pasa a un tubo eppendorf limpio, repitiendo el lavado dos veces más. El etanol se evapora por vacío (SPD121P, Savant SpeedVac) durante 2-3 horas a 50°C.

Tras este proceso, El residuo seco es guardado a -20°C , para ser reconstituido finalmente, en un volumen adecuado de etanol (calidad HPLC) antes de la medida por cromatografía.

3.10. Extracción de ADN

La extracción del ADN total se realizó de diferentes tejidos: biopsia de piel, sangre, saliva, orina y fibroblastos. Para la extracción del ADN de la biopsia de piel se siguió el método descrito (Sambrook J & Russell D, 2000), con modificaciones. Se partió de una porción de tejido congelado triturado previamente en un mortero, evitando la descongelación. El pulverizado se depositó en tubo de polipropileno de 2 mL, al que se añadieron 180 μL de tampón TSE (Tris-HCl 100 mM pH=7,4, ClNa 10 mM, EDTA 25 mM) y 20 μL de solución acuosa de proteinasa K (20 mg/mL). Se centrifugó a 14.000 rpm, mezcló e incubó 5 minutos a 55°C . Posteriormente se añadieron 180 μL de tampón TSE, 20 μL de proteinasa K y 40 μL de SDS. Se mezcló e incubó 1 h a 55°C . Posteriormente, se añadió 20 μL de proteinasa K y se incubó de nuevo a 55°C durante 30 minutos. A continuación se incorporó 50 μL de ClNa 5 M, se mezcló, y se añadió 1 mL de una mezcla 25: 24: 1 fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Se agitó y se centrifugó a 14000 rpm brevemente para separar las fases. Se recogió el sobrenadante y lavó dos veces con 1 mL de éter dietílico. Tras evaporarse el éter, se añadieron 1,5 mL de etanol al 98%, que provoca el precipitado del ADN, el cual se recoge en un eppendorf estéril. El resto de etanol se eliminó al vacío y el ADN se disolvió en 50-100 μL de Tris-EDTA (TE) 1X estéril (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=7,4). La solución de ADN se conservó a -20°C .

Para extraer el ADN de los fibroblastos o cíbridos éstos se tripsinizaron y lavaron 2 veces con PBS y se procedió a su extracción con el kit QIAamp® DNA Mini siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN GmbH). Para extraer ADN directamente de

sangre, células de la orina o saliva se siguieron las instrucciones del fabricante del sistema de extracción nucleon BACC3 (Amersham Pharmacia Biotech), cuyo fundamento es la precipitación de proteínas con perclorato sódico y su separación del ADN mediante cloroformo y una resina patentada.

3.11. Determinación de los niveles de CoQ por HPLC

El proceso de separación de los componentes lipídicos de las muestras se lleva a cabo en un HPLC Shimadzu UFLC, equipado con una columna sílica de fase reversa 15-cm Kromasil C-18, con un horno a 40°C, flujo de 1ml/min en una fase móvil compuesta de metanol:isopropanol (60:40) y 1,42 mM perclorato de litio. Los niveles de CoQ se analizan por un detector ultravioleta 15 (System Gold 168) y electroquímico (Coulochem III ESA). Las muestras se reconstituyeron en 200 µL de fase móvil y se carga 20 µL en el HPLC tras realizar una línea de base de fase móvil, así como los estándares necesarios. Los datos obtenidos fueron referidos a mg de proteínas.

3.12. Análisis enzimático de la actividad de la Cadena Respiratoria Mitocondrial

3.12.1. Preparación de fibroblastos para la determinación de la Cadena Respiratoria Mitocondrial

Las células crecidas en monocapa se lavan con PBS 1X pH 7,4, se recogen con tripsina (0,25% Trypsin-EDTA Solution, Sigma) y se centrifugan a 800g durante 10 minutos. El pellet se lava con PBS 1X pH 7,4, se resuspenden por vórtex y se repiten los lavado 2 veces más. El pellet es resuspendido en 1ml de Tampón A (MOPS 20mM, Sacarosa 0,25M) y transferida la solución a un eppendorf, al que se añaden 500µl de digitonina

0,2mg/ml. Tras reposo de 5 minutos en hielo, se centrifuga a 5000g durante 3 minutos en frío. El pellet se resuspende por agitación con vórtex en 500µl de Tampón B (MOPS 20mM, Sacarosa 0,25M, EDTA 1mM) y se deja reposar de nuevo en hielo durante 5 minutos, tras los cuales se centrifuga a 10000g durante 3 minutos en frío. Desechado el sobrenadante, se resuspende el pellet en 200µl de Tampón KP 10mM pH 7,4. Para proceder al análisis de la cadena respiratoria el homogenado es sonicado durante 10 segundos al 30% de potencia (Sonicador Bandelin Sonoplus).

3.12.2. Análisis enzimático de la actividad de la Cadena Respiratoria Mitochondrial a partir de homogenado de fibroblastos

La actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial se determinó por métodos espectrofotométricos, con un espectrofotómetro UniCam UV 500 (Thermo Spectronic) con célula Peltier acoplada (PCB 150, Water Peltier System, Thermo Spectronic).

3.12.3. Citrato sintasa

Siempre por duplicado, en el siguiente orden añadimos a la cubeta:

- Tris-HCl 0,75M pH8	100 µl	75mM
- DTNB 1mM	100 µl	100 µM
- Triton 1%	100 µl	0,1%
- Acetil CoA (7mg/ml)	50 µl	350µg/ml
- Homogenado	5µl	
- Agua destilada 595µl. Agitar e incubar 2 minutos a 30°C, y añadir:		
- Oxalacetato 10mM	50 µl	0,5mM

Agitar, incubar 30 segundos a 30°C y leer 2 minutos a una longitud de onda de 412nm a 30°C.

Cálculos: $*\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min}$ con Oxalacetato

3.12.4. Complejo I – NADH CoQ Oxidorreductasa

Por orden se añade a la cubeta:

- Tampón KP 40mM pH8	500 μl	20mM
- NADH 1mM	200 μl	0,2mM
- NaN ₃ 50mM	20 μl	1mM
- BSA-EDTA 1%	100 μl	
- Homogenado	40 μl	
- Agua destilada	130 μl	

Agitar e incubar 8 minutos a 30°C, para después leer la línea base a $\lambda=340\text{nm}$ a 30°C. Una vez leída la LB añadir:

- CoQ1	10mM	10 μl
--------	------	------------------

Agitar, incubar 30 segundos a 30°C y leer 2 minutos a $\lambda=340\text{nm}$, y añadir:

- Rotenona 0,25mM	20 μl	5 μl
-------------------	------------------	-----------------

Leer 2 minutos a $\lambda=340\text{nm}$.

Cálculos: $*\epsilon = 6,81 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min}$ con CoQ1

3.12.5. Complejo II - Succinato deshidrogenasa

Por orden se añade a la cubeta:

Mario David Cordero Morales

- Tampón KP 100mM pH7	500 μ l	50mM
- KCN 30mM	50 μ l	1,5mM
- DCPIP 1mM	100 μ l	0,1mM
- Homogenado	20 μ l	
- Agua destilada	230 μ l	

Agitar e incubar 2 minutos a 30°C, para después añadir:

- Succinato 320mM	100 μ l	32mM
-------------------	-------------	------

Agitar, incubar 30 segundos a 30°C y leer 2 minutos a $\lambda=600\text{nm}$, para luego añadir:

- CoQ1 10mM	5 μ l	5 μ M
-------------	-----------	-----------

Cálculos: $\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Actividad SDH: se usa el Δ de la reacción del succinato

Actividad Complejo II: se usa el Δ de la reacción con el CoQ1

3.12.6. Complejo III: DBH2 – Citocromo C Oxidorreductasa

Cada muestra se analizará en paralelo con Antimicina y sin Antimicina.

- Tampón KP 100mM pH7,5	500 μ l	50mM
- NaN3 50mM	40 μ l	2mM
- BSA-EDTA 1%	100 μ l	
- \pm Antimicina A (1mg/ml EtOH 50%)	10 μ l	
- Agua destilada 285 μ l en la cubeta con Antimicina		

259 μ l en la cubeta sin Antimicina

- DBH2 10mM 5μl 50μM

Agitar y leer la línea base durante 2 minutos a 30°C y $\lambda=550\text{nm}$:

- Homogenado 10μl

Agitar y leer 2 minutos a 30°C y $\lambda=550\text{nm}$:

- CoQ1 10mM 5μl 5μM

Cálculos para actividad sensible a Antimicina:

$*\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} = \text{Abs} / \text{min sin Antimicina} - \text{Abs} / \text{min con Antimicina}$

3.12.7. Complejo I + III: NAHD – Citocromo C – Reductasa

En el siguiente orden se añade a la cubeta:

- Tampón KP 100mM pH7,5 550μl

- Citocromo C 1mM 100μl

- KCN 30μl

- Homogenado 10μl

- Agua destilada 210μl

Agitar y leer la línea base durante 2 minutos a 30°C y $\lambda=550\text{nm}$, para después añadir iniciadores de la actividad:

- NADH 1mM 100μl

Agitar y leer 2 minutos a 30°C y $\lambda=550\text{nm}$

Cálculos: $*\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min con NADH}$

3.12.8. Complejo II + III: Succinato – Citocromo C – Reductasa

En el siguiente orden se añade a la cubeta:

- Tampón KP 100mM pH7,5 550µl
- Citocromo C 1mM 100µl
- KCN 30µl
- Homogenado 30µl
- Agua destilada 190µl

Agitar y leer la línea base durante 2 minutos a 30°C y $\lambda=550\text{nm}$, para después añadir iniciadores de la actividad:

- Succinato 30mM 100µl

Agitar y leer 2 minutos a 30°C y $\lambda=550\text{nm}$

Cálculos: $*\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min}$ con succinato

3.12.9. Complejo IV - Citocromo C Oxidasa

En el siguiente orden se añade a la cubeta:

- Tampón KP 100mM pH7 100µl 10mM
- Citocromo C 800µM (1%) Reducido 100µl 80µl
- Agua destilada 790µl

Agitar e incubar 2 minutos a 38°C y $\lambda=550\text{nm}$, para después añadir:

- Homogenado 10µl Agitar y leer la durante 2 minutos a 38°C y $\lambda=550\text{nm}$.

Cálculos para actividad COX: $*\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} = \text{Abs} / \text{min}$ de la reacción con Citocromo C reducido

3.13. Análisis de proteínas mediante Western-Blot.

3.13.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.

Para determinar la cantidad de proteínas para los ensayos de Western-Blot se usó una modificación del método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) ideada para muestras que contienen membranas (Stoschek, 1990). El ensayo se realizó añadiendo en una cubeta de espectrofotómetro 50 μl de NaOH 1M, 20 μL de la muestra y 1 ml de reactivo de Bradford. Tras dejar incubar la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, se midió la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro UniCam UV 500 (Thermo Spectronic). La cantidad de proteína fue determinada mediante una recta patrón realizada con cantidades conocidas de inmunoglobulina G (0-28 μg).

3.13.2. SDS-Page y Western-Blot.

El análisis de las proteínas que estaban presentes en los lisados celulares se llevó a cabo mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el procedimiento descrito por Laemli (Laemli, 1970), a una intensidad de 35mM/gel en un sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y con tampón de carrera TGS10X (Tris/Glycine/SDS Buffer 10X, BioRad). Se prepararon geles de diferentes concentraciones de acrilamida de acuerdo a las necesidades del peso molecular de las proteínas a estudiar y al 4% el gel condensador. Realizamos la electroforesis a 120 V en tampón de electroforesis TGS (Tris/Glicina/SDS, Bio-Rad). Tras la electroforesis se procedió a la transferencia (Trans-Blot, SD, Semi-Dry Transfer Cell con fuente de alimentación Bio-Rad Power Pac 1000) a 25V y durante 45 minutos en tampón de transferencia TG (Tris/Glycine Buffer 10X, BioRad). Se usaron membranas de Nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham

Biosciences). Finalizada la transferencia, para comprobar que la misma se ha realizado correctamente, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con una solución de Rojo Ponceau al 0.5% en ácido acético al 1%. Después de desteñir el rojo Ponceau con ácido acético 1%, las membranas fueron bloqueadas con TTBS (Tris 20mM pH 7.6, NaCl 150 mM+Twenn-20 0,05%)+Leche 0,5% a 4°C durante 16 horas.

3.13.3. Inmunodetección con anticuerpos y electrotransferencia de proteínas

Las membranas, una vez bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C en TTBS (TBS, Tween-20 al 0.05%, agua destilada y leche en polvo). A continuación, lavamos las membranas tres veces durante 5 minutos cada lavado en TTBS (TBS, Tween-20 al 0.05%, agua destilada). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario, que está marcado con peroxidasas de rábano HRP para catalizar la oxidación del luminol en presencia del peróxido de hidrógeno, durante 2 horas en TTBS (igual que el primario). Realizamos la detección de la proteína por quimioluminiscencia mediante el kit comercial immun-Star HRP Chemiluminiscent (BioRad Laboratories) y películas fotográficas CL-Xposure™Film (Clear Blue X-Ray Film, Pierce). La imagen de Western blot se cuantificó utilizando el software ImageJ (ver: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

3.14. Amplificación por PCR y secuenciación

El ADNmt completo se amplificó a partir de ADN total en 24 fragmentos superpuestos de PCR de 800-1.000 pb de largo. Los cebadores fueron cuidadosamente diseñados utilizando la secuencia Cambridge revisada de referencia para el ADNmt (www.mitomap.org/mitoseq.html).

Los fragmentos de PCR se secuenciaron en sistema secuenciador ABI 3730 (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com; Foster City, CA) usando un kit de secuenciación BigDye v3.1 (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com; Foster City, CA). El montaje y la identificación de las variaciones en el ADN mitocondrial se realizó usando el paquete Staden (Bonfield et al., 1995). Para este propósito se utilizó la secuencia de referencia revisado mitocondrial humano DNA Cambridge (www.mitomap.org/mitoseq.html). Todo el proceso se llevó a cabo en Secugen (Madrid, España).

3.15. Niveles IL-1 β e IL-18

Los niveles de IL-1 β (Genway, San Diego CA, EE.UU.) e IL-18 en suero (Biosensis, Australia) se analizaron por duplicado por los kits ELISA comerciales. Brevemente, el procedimiento consistió en pipetear en una placa multipocillos cuyos pocillos estaban revestidos de un anticuerpo específico para la IL-1 β , 100 μ l de suero de cada sujeto y se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. Tras esta incubación y los lavados correspondientes, se procedió a la incubación con un segundo anticuerpo biotinilado durante otra hora. Buscar qué es esto. Durante la primera incubación, el antígeno IL-1 β se une de forma simultánea al anticuerpo inmovilizado en un sitio, y al anticuerpo biotinilado en un segundo sitio. Después de la eliminación del exceso de este segundo anticuerpo, se añadió la enzima estreptavidina-peroxidasa. Ésta se une al anticuerpo biotinilado para completar el sándwich de cuatro miembros. Después de una incubación y del lavado para eliminar toda la enzima no unida, se añadió una solución de sustrato, que actúa sobre la enzima unida para producir color. Finalmente las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro (iMark microplate, Bio-Rad) a una longitud de onda

de 450nm. La intensidad de este producto coloreado es directamente proporcional a la concentración de IL-1 β presente en las muestras.

Para la determinación de los niveles de IL-18 presente en el suero de los sujetos, se utilizó igualmente un Kit de ELISA (Biosensis, Australia), procediendo como indica el fabricante. Se añadieron 100 μ l de cada muestra en una placa que estaba revestida de un anticuerpo monoclonal específico para IL-18 y se incubaron durante una hora. Durante esta primera incubación, IL-18 es capturado e inmovilizado sobre la placa. Después del lavado, un conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-IL-18 anticuerpo se pipeteó en los pocillos, y se incubó durante una hora. La unión del anticuerpo conjugado HRP a los pocillos completa el sándwich de tres miembros. Tras el lavado, la actividad de HRP se detectó mediante la incubación del reactivo de sustrato TMB durante 30 minutos. La incubación del reactivo de sustrato dentro de los pocillos produce un color que es proporcional a la cantidad de IL-18 contenida en la muestra. Al final del período de incubación, la reacción se paró añadiendo a cada pocillo una solución que termina la reacción catalizada por HRP y estabiliza el color formado. La absorbancia de cada pocillo se midió a 450 nm utilizando un lector de placa iMark microplate, Bio-Rad.

3.16. Niveles de ATP

Los niveles de ATP se determinaron en homogenados celulares mediante un ensayo de bioluminiscencia utilizando un kit de determinación de ATP (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el requerimiento de ATP por parte de la luciferasa para la producción de luz, de manera que a mayor contenido de ATP de la muestra, mayor emisión de luz. De esta forma, en los ensayos se mezclaron cantidades proporcionales de una solución de reacción que contenía luciferasa de

luciérnaga recombinante y su sustrato D- luciferin, con los homogenados de tejido, para medir posteriormente la luminiscencia emitida con un luminómetro modelo Luminoskan TL Plus (Thermos Lab Systems) a una longitud de onda de 560nm. Para la cuantificación final, se realizó una recta de calibrado con muestras de ATP de concentración conocida.

3.17. Cuantificación de ADNmt

El ADN se extrajo por lisis celular estándar. Los cebadores utilizados fueron: para el ADN mitocondrial, mtF3212 (5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3 ') y mtR3319 (5'-TGGCCATGGGTATGTTGTAA-3') y para el ADN nuclear para la normalización, 18S rRNA 18S1546F gen (5'-3-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC ') y 18S1650R (5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT3'). Las unidades arbitrarias se calcularon como la relación entre la banda de densidad óptica correspondiente a la del ADNmt estudiado en el ciclo 20-30th y la del ADNn en el ciclo de amplificación 15th.

3.18. Genotipado de la mutación en pacientes y híbridos

Una vez que se extrajo el ADN, la amplificación por PCR del fragmento de mtCYB que contiene la mutación, desde 15.700 hasta 16.003 nucleótidos de ADNmt, se realizó usando los siguientes cebadores: 5'-TCCATCAGGGTATCCTCTCC-3 'y 5'-GGAGGCAAGCATAAGACTGG -3', produciendo un producto final de 300 pb. Los productos de amplificación fueron digeridos con la enzima de BbvI y se fraccionó en un gel de agarosa al 2,5%. Después de la electroforesis en gel de ADN no mutante y los fragmentos de ADN mitocondrial mutantes pueden ser discriminados debido a que en el

ensayo de restricción BbvI se generara un patrón de bandas diferencial (no mutante ADNmt: fragmento de 300 pb, y el ADNmt mutante: 181 y 119 fragmentos bp).

3.19. Producción mitocondrial de ROS

La generación mitocondrial de ROS en PBMCs y fibroblastos fueron determinados mediante el uso de MitoSOX™, un indicador de la dismutasa mitocondrial en rojo. Citometría de flujo. Aproximadamente 1×10^6 células se incubaron con $1 \mu\text{M}$ MitoSOX™ rojo durante 30 min a 37°C , se lavó dos veces con PBS, se resuspendieron en 500 ml de PBS y se analizaron por citometría de flujo en un citómetro Epics XL, Beckman Coulter, Brea, California, EE.UU. (excitación a 510 nm y detección de fluorescencia a 580 nm).

Microscopía de fluorescencia. Los fibroblastos cultivados sobre cubres-objetos estériles en placas de 6 pocillos de $9,6\text{cm}^2/\text{pocillo}$ (Nunc Multidishes 6 well, Nunc™), en medio DMEM-4500mg/L Glucosa más 10% FBS se incubaron con MitoSOX™ Red durante 30 min a 37°C , se lavaron dos veces en PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 0,5-1 h a temperatura ambiente, y se lavaron dos veces con PBS. Después de eso, las células se incubaron durante 10 min a 37°C con anti- citocromo c anticuerpo (Invitrogen, Barcelona, España) para marcar las mitocondrias. Las muestras se visualizaron por microscopía de fluorescencia usando un microscopio TCS SL de Leica.

3.20. Determinación de la peroxidación lipídica

Se cultivaron las células sobre cubres-objetos estériles en placas de 6 pocillos de $9,6\text{cm}^2/\text{pocillo}$ (Nunc Multidishes 6 well, Nunc™), en medio DMEM-4500mg/L

Glucosa más 10% FBS. Una vez alcanzada la densidad deseada, se añadió al medio C11-Bodipy 1 μ M (BODIPY® 581/591 C11, Molecular Probes) y se incubó el cultivo durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se lavó la monocapa celular con PBS y se montaron los cubres sobre los portas con Mounting medium for fluorescente (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El colorante fluorescente C11-Bodipy 581/59 se inserta en las membranas lipídicas y permite la evaluación cuantitativa de lípidos oxidados y no oxidados, fluorescentes en color verde o rojo respectivamente. Las muestras se visualizaron por microscopía de fluorescencia usando un microscopio TCS SL de Leica.

3.21. Cuantificación de la tasa de proliferación celular

Se cultivaron 100.000 fibroblastos durante 72 horas. Tras desechar las células muertas retirando el medio de cultivo y reemplazándolo por medio fresco, las células fueron contadas usando un microscopio invertido con objetivo 40X (Olympus CK40).

3.22. Determinación de los niveles de daño oxidativo del ADN por 8-hidroxideoxiguanosina.

Para la determinación de la 8-hidroxideoxiguanosina (8-oxo-G) se utilizó el kit de la 8-oxo-dGuo-EIA-BIOTECH (OXIS Health Products, Inc. 6040 N Cutter Circle, Suite 317 Portland, OR 97217-3935 U.S.A.), tal como sigue: a una placa en la cual está fijada la 8-oxo-dGuo se añadió el anticuerpo monoclonal de 8-oxo-G y la muestra o estándar. La 8-oxo-dGuo en la muestra o estándar compete con el 8-oxo-G unido a la placa por los sitios de unión del anticuerpo monoclonal de 8-oxo-G. Los anticuerpos que se han unido a la 8-oxo-dGuo de la muestra son lavados, mientras que aquellos que se han unido a la 8-

oxo-G de la placa permanecen. Posteriormente, añadimos el anticuerpo secundario marcado con el enzima, el cual se une al anticuerpo monoclonal que permanece en la placa. El anticuerpo secundario marcado con enzima que no se ha unido se elimina mediante un proceso de lavado. Finalmente se le añade un cromógeno, y la intensidad de coloración es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la placa.

3.23. Tasa de consumo de oxígeno (OCR)

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) se determinó en tiempo real usando el analizador XF-24 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células (5×10^4 / pocillo) se sembraron durante 16 horas en la placa de XF-24 antes del experimento en un medio DMEM al 10% de suero. Para determinar el número de células, se realizó un recuento de las células mediante el citómetro Tali® base-Imagen | Life Technologies. Las células se sembraron el día antes del experimento (aproximadamente 16 horas antes del experimento). Antes del experimento la presencia de células por cada pocillo fue confirmada por observación directa de cada pocillo utilizando el microscopio óptico con el fin de verificar la homogeneidad de la monocapa celular en los pocillos. Debido a que durante los tiempos de incubación, las células continúan creciendo y por lo tanto su número aumenta, después de la finalización del experimento, se realizó un segundo recuento de células para cada pocillo. Las células se trataron con tripsina y se contaron de nuevo usando el citómetro Tali®-Based Image | Life Technologies en el modo de estandarizar los resultados de acuerdo con el número final de células. Antes de comenzar las mediciones, las células se colocaron en un medio DMEM (suplementado con glucosa 25 mM, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, y sin suero) y pre-incubaron durante 20 min a 37 ° C en ausencia de CO₂ en el Estación XF

Pre-incubadora (Seahorse Bioscience, Billerica MA, EE.UU.). Las células se transfirieron al analizador XF-24 y después de una medida de referencia del OCR, la función mitocondrial se realizó por inyección secuencial de cuatro compuestos que afectan a la bioenergética, como sigue: 55 μ l de oligomicina (concentración final 2,5 mg / ml) a inyección en el puerto de A, 61 μ l de 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) (concentración final 1 mM) en la inyección en el puerto B, y 68 μ l de antimicina / rotenona (concentración final 10 mM / 1 μ M) en la inyección en puerto C. Un mínimo de cinco pozos fueron utilizados por condición en cualquier experimento. Los datos se expresan como pmol de O₂ consumido por minuto normalizada a 1000 células (pMol O₂ / 1000 células / min).

3.24. Análisis de la estructura y la secuencia de conservación

Para obtener la estructura tanto para CYB y proteínas COXIII, se utilizó el servidor de Swiss- Model (Biasini et al., 2014) con los parámetros por defecto y se visualizaron con el programa RasMol. Logo diagramas fueron creados usando Skyline para mostrar la conservación de los residuos en los alrededores de la mutación estudiada (Wheeler et al., 2014).

3.25. Análisis Estadístico

Los datos en cifras se ofrecen como media \pm desviación estándar. Los datos entre los diferentes grupos fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA sobre los rangos con Sigma Plot y software estadístico Sigma Stat (SPSS para Windows, 19, 2010, SPSS Inc. Chicago, IL, EE.UU.). Análisis estadístico de correlación entre la IL- 1 β e IL – 18 respecto a VAS, CoQ₁₀, y mitocondrial de ROS se efectuó mediante índice de correlación

Mario David Cordero Morales

de Pearson. Para los estudios de cultivo celular, se utilizó la prueba t de Student para análisis de datos. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO NLRP3-INFLAMASOMA ES INDUCIDA POR LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE LOS PACIENTES CON FM.

Para esta parte del proyecto se seleccionaron un conjunto de pacientes para la obtención de muestras sanguíneas. Todos los pacientes mostraron síntomas de dolor, así como otros síntomas propios de la FM como muestra la Tabla 1. Salvo la sintomatología, los demás parámetros tenidos en cuenta fueron similares entre el grupo control como el grupo FM; edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), etc (**Tabla 1**).

Tabla 1. Parámetros antropométricos y sintomáticos en voluntarios sanos y pacientes con FM.

Parámetros	Controles	Pacientes
Edad (años)	45.5 ± 6.1	46.1 ± 8
Puntos dolorosos	—	14.5 ± 1.8
Duración enfermedad (años)	—	8.1 ± 3.3
Sexo (masculino/femenino)	5\15	5\25
IMC (kg/m ²)	23.2 ± 2.5	22.9 ± 1.2
FIQ Puntuación Total, rango 0-80	2.7 ± 1.5	56.6 ± 8.3***
Dolor	0.6 ± 0.2	6.9 ± 2.1**
Fatiga	1.2 ± 0.5	7.1 ± 1.2***
Cansancio		
Matutino	1 ± 0.3	5.5 ± 1**
Rigidez	0.4 ± 0.1	6.2 ± 2.2**
Anxiedad	1 ± 0.5	5.8 ± 1.2**
Depresión	0.2 ± 0.6	5.6 ± 1.2***
VAS Dolor Puntuación Total 0-10	0.7 ± 0.2	7.5 ± 2.1***

IMC, Índice de masa corporal; FIQ, Cuestionario de impacto de la Fibromialgia; VAS, Escala Visual

Analógica. n=20 y 30 para controles y FM respectivamente. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Por otro lado, una de las principales características de esta enfermedad desde el punto de vista diagnóstico, es la falta de marcadores alterados en las pruebas diagnósticas comúnmente usadas en la práctica clínica. En este sentido, nuestros pacientes no mostraron ninguna alteración relevante en los valores analíticos bioquímicos de rutina (**Tabla 2**)

Tabla 2. Parámetros de bioquímica sérica en pacientes con FM. n=20 para controles y n=30 para pacientes con FM respectivamente.

Parámetros bioquímicos	Controles	Pacientes
Glucosa (mg/dL)	93.8 ± 15.2	98.1 ± 12.2
Ácido úrico (mg/dL)	3.9 ± 1.5	3.1 ± 1.6
GOT (mU/mL)	21.9 ± 8.8	25.2 ± 7.3
GPT (mU/mL)	23.5 ± 5.1	24.6 ± 6.1
Creatina kinasa (IU/L)	671.1 ± 42.3	623.5 ± 34.4
Colesterol (mg/dL)	179.9 ± 53.4	176.9 ± 59.1
Triglicéridos (mg/dL)	157.5 ± 60.1	144.9 ± 52.3

4.1. Disfunción mitocondrial en PBMC de pacientes con FM

Las alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial son uno de los marcadores más utilizados para detectar la presencia de disfunción mitocondrial. En este sentido, hemos observado una importante reducción de la actividad de los complejos de la cadena

respiratoria mitocondrial, entre el 50-60%, en las PBMC de los pacientes en comparación con las células control (**Figura 9**).

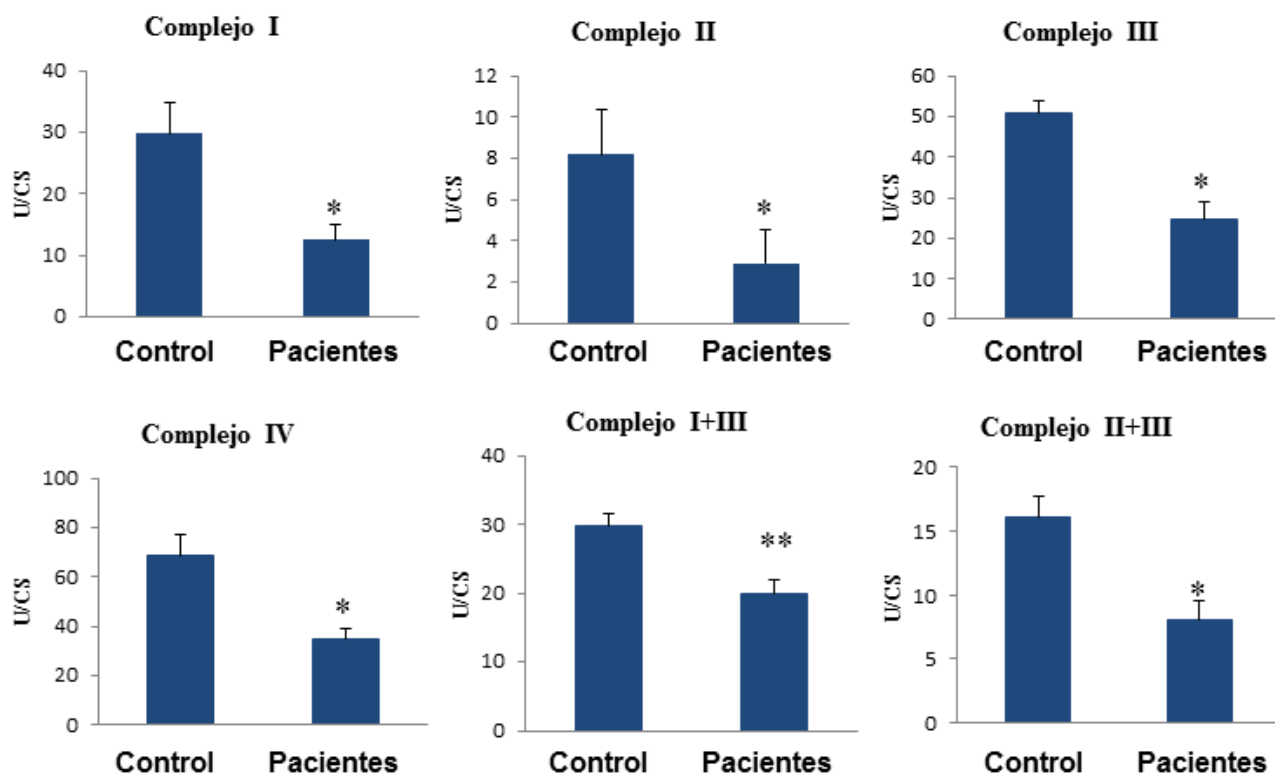


Figura 9. Actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en PBMC de pacientes con FM. $n = 20$ y 30 para el grupo control y grupo de FM, respectivamente. Actividades enzimáticas mitocondriales. La determinación de la actividad enzimática de cada uno de los complejos se llevó a cabo por análisis espectrofotométrico según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en U/CS (unidades por citrato sintasa), y representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. * $P < 0,001$ y ** $P < 0,01$ entre los pacientes de control y FM.

Esta reducción de la actividad en la cadena mitocondrial en PBMC era acompañada de una importante reducción de los niveles de expresión de las proteínas mitocondriales

correspondientes a los complejos I y el complejo III (**Figura 10A y 1B**) apoyando los resultados obtenidos en la medida de la actividad enzimática mitocondrial.

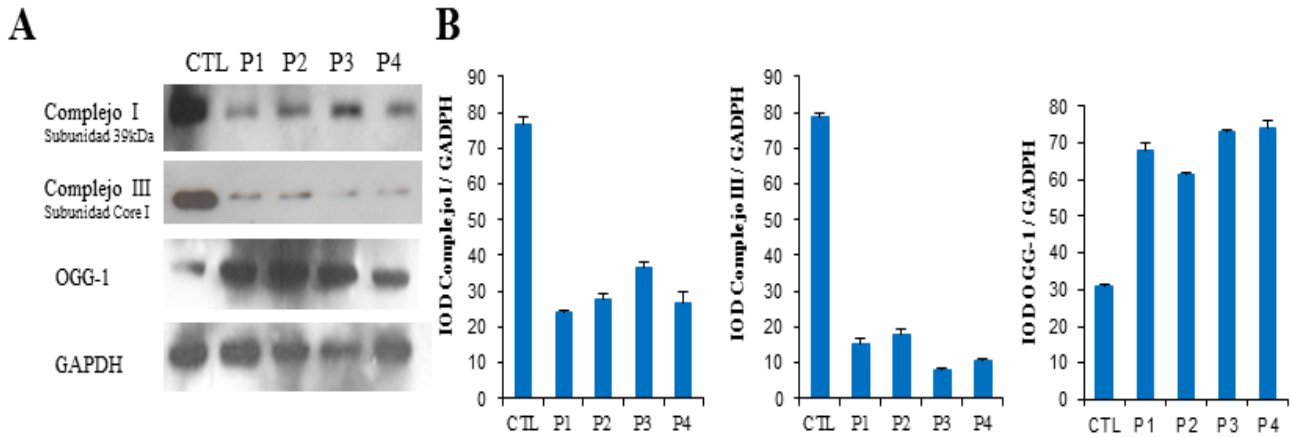


Figura 10. Expresión de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial. **A.** Niveles de expresión de las proteína de los complejo mitocondriales I (subunidad 39 kDa), complejo III (Subunidad Core I), y oxoguanina-glicosilasa 8 (OGG - 1, una enzima ADN glicosilasa responsable de la escisión de 7,8 -dihidro-8 -oxoguanine (8 - oxo G). **B.** Los niveles de las proteína se determinaron por análisis densitométrico (IOD, intensidad óptica integrada) de tres Western blots diferentes y normalizados respecto la señal de GAPDH, utilizando PBMC a partir de cuatro pacientes con FM representativos, en comparación con un grupo de 5 saludable sujetos de control por edad y sexo.

El CoQ₁₀ es un componente clave de la cadena respiratoria mitocondrial debido a su función en la transferencia de electrones de los complejos I y II del complejo III, por lo que las deficiencias de este transportador de electrones están asociadas con la disfunción mitocondrial en una variedad de trastornos humanos. De acuerdo con esto, en nuestros pacientes hemos podido observar una considerable reducción de los niveles de CoQ₁₀ (46%) respecto del valor medio de las células control en las PBMC de los pacientes con FM (**Figura 11A**). Por otra parte, para determinar el efecto de la disfunción mitocondrial

en la bioenergética celular, medimos los niveles de ATP intracelulares en PBMC de los controles y pacientes con FM. Tras la determinación, pudimos observar que los niveles de ATP se mostraban reducidos al 76% respecto a los controles ($p < 0,001$) (**Figura 11B**).

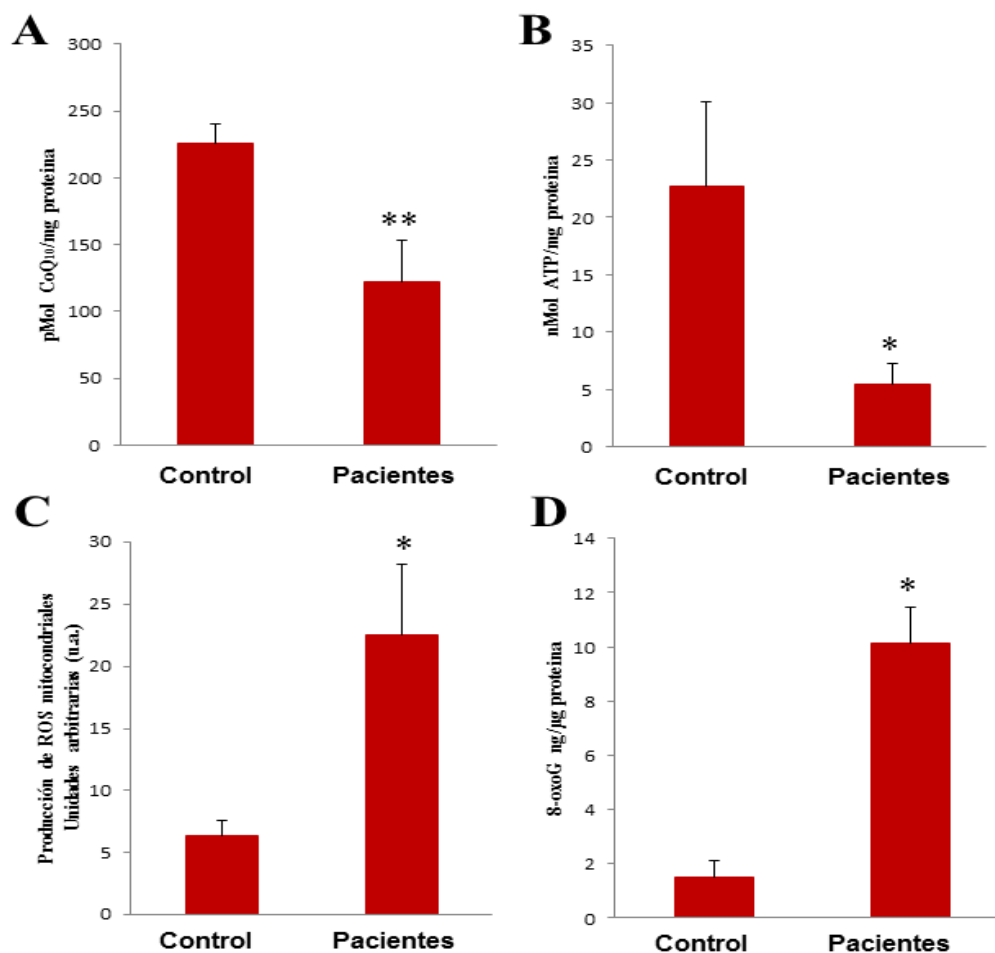


Figura 11. Disfunción bioenergética y estrés oxidativo en PBMC de controles y pacientes con FM. A. Niveles de CoQ₁₀ en células de control y FM determinadas mediante extracción con hexano y separación por HPLC como se describe en Material y Métodos. **B.** Los niveles de ATP en control y FM BMC se analizaron por bioluminiscencia como se describe en Material y Métodos. **C y D.** Se analizaron la producción de ROS mitocondriales y la producción de 8-oxo-G en PBMC de los pacientes de control y FM por citometría de flujo y el kit de EIA como se describe en Material y Métodos. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ entre las células del grupo control y FM.

4.2. Estrés oxidativo en PBMC de los pacientes con FM

Está bien establecido que la disfunción mitocondrial está asociada con la inducción de la producción de ROS en las mitocondrias. Además, el estrés oxidativo se ha propuesto como un evento relevante en la patogénesis de FM que muestra una correlación positiva significativa con los síntomas clínicos. A fin de evaluar el estrés oxidativo en FM, se determinó la producción de ROS mitocondrial en las PBMC a partir de controles y de pacientes con FM mediante el uso de MitoSOX, un indicador de superóxido mitocondrial. La producción de superóxido mitocondrial fue significativamente mayor en PBMC de los pacientes con FM respecto a los controles ($p < 0,001$) (**Figura 11C**). Además, como marcador de estrés oxidativo, se determinaron los niveles de expresión de 8-oxoguanina glicosilasa (OGG1), una ADN enzima glicosilasa responsable de la escisión de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxo-G), un subproducto de base mutagénica que se produce como resultado de la exposición del ADN a los ROS, y los niveles de 8-oxo-G en PBMC de los pacientes. Como muestra la figura, los pacientes con FM mostraron significativamente más altos niveles de OGG1 (**Figura 10A**) y 8-oxo-G en las PBMC de los pacientes con FM (**Figura 11D**). Estos datos muestran un intenso daño oxidativo del ADN como consecuencia del alto nivel de ROS que observamos en las células de los pacientes respecto a los controles sanos.

4.3. Activación del complejo inflammasoma por el estrés oxidativo involucrados en el dolor de la FM

Como ya hemos mencionado anteriormente, la mitocondria y el estrés oxidativo constituyen dos importantes inductores de la activación del complejo inflammasoma. Zhou y colaboradores mostraron que la inhibición de los complejos I, II o III inducía un

incremento en la producción de ROS que provocaba la activación del complejo NLRP3-inflamasoma (Zhou et al., 2011). Dado que nuestros pacientes mostraron una considerable disfunción mitocondrial marcada por reducida actividad de los complejos I y II con importante incremento en la producción de ROS mitocondriales, nos propusimos analizar la activación de las proteínas relacionados con el inflamasoma. Nuestros resultados mostraron un importante aumento de la expresión génica NLRP3 y de la caspasa-1, aumento de los niveles de expresión de proteínas NLRP3 y la caspasa-1 escindida que sugiere la activación del inflamasoma (**Figura 12A y 12B**). Dado que la activación de la caspasa-1 está también relacionada con la apoptosis o muerte celular, comparamos esta activación con la de otra caspasa relacionada con la muerte celular pero no con la inflamación como la caspasa-3. No observamos activación de la caspasa-3, por lo que la activación de caspasa-1 no era secundaria a la activación de vía de muerte celular por apoptosis.

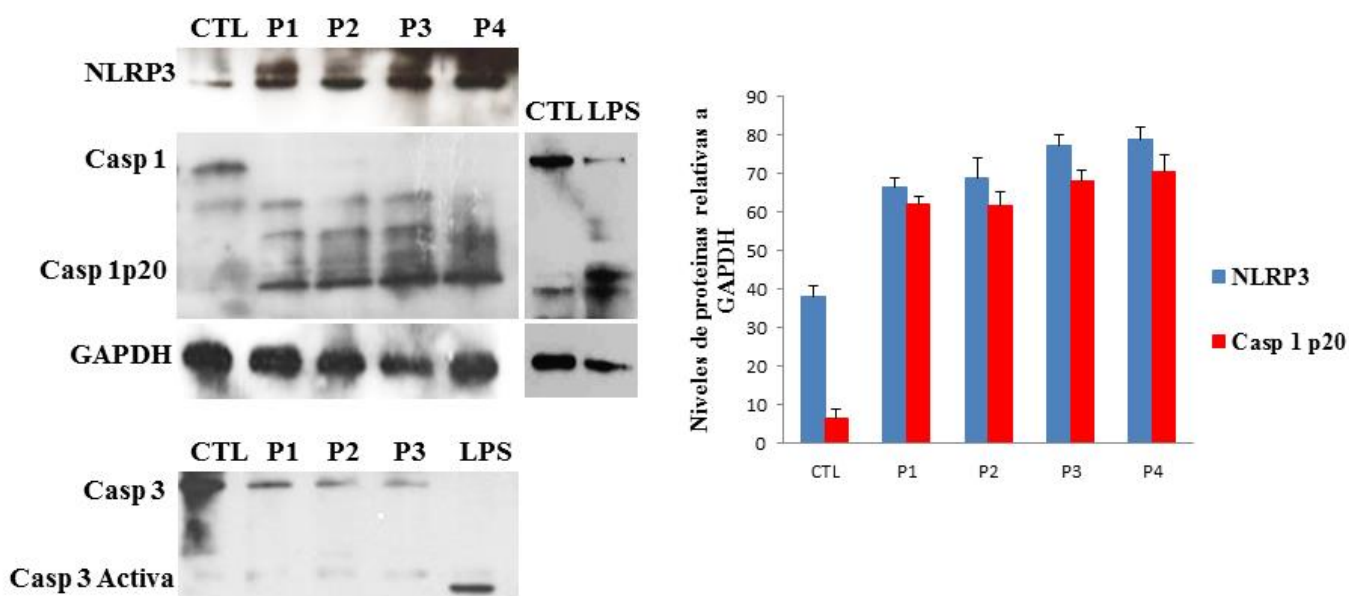


Figura 12. Activación del complejo NLRP3-inflamasoma en PBMCs de pacientes con FM respecto a controles. Los niveles de proteína NLRP3 y de la activación de caspasa 1 se analizaron por Western blot. Los niveles de proteína se determinaron mediante análisis densitométrico (IOD, intensidad óptica integrada) de tres Western blots diferentes y normalizadas respecto a GAPDH, utilizando PBMC a partir de cuatro pacientes con FM representativos, en comparación con un conjunto de 5 sujetos control de igual edad y sexo. PBMC de individuos sanos fueron tratados con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* para ser usados como control positivo de la activación de caspasa-1.

Este incremento en las proteínas era acompañado de un incremento de transcritos tanto de NLRP3 como de Caspasa-1 (**Figura 13**).

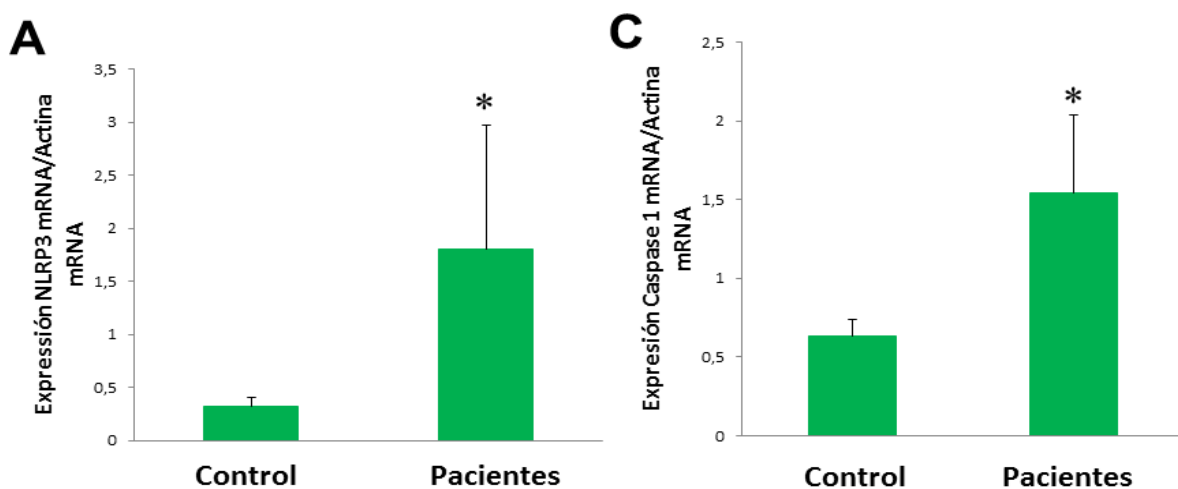


Figura 13. Activación del complejo NLRP3-inflamasoma en PBMCs de pacientes con FM respecto a controles determinada por expresión a tiempo real. A. Niveles de expresión de B. Los niveles de la proteína se determinaron por análisis densitométrico (IOD, intensidad óptica integrada) de tres Western blots diferentes y normalizados respecto la señal de GAPDH, utilizando PBMC a partir de cuatro pacientes con FM representativos, en comparación con un grupo de 5 saludable sujetos de control por edad y sexo. de NLRP3 y B. Caspasa 1 determinados por Real time RT-PCR cuantitativa. n = 20 para el control y n =

30 para el grupo de FM, respectivamente. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $P < 0,05$ entre los pacientes del grupo control y FM.

La consecuencia final de la activación del complejo inflamasoma es la liberación de la forma activa de las IL-1 β e IL-18 como una forma de inflamación sistémica. En ese sentido, sería lógica la presencia de incrementados niveles de estas citoquinas en la sangre de los pacientes. En nuestro estudio, estas citoquinas implicadas en la activación del inflamasoma y la inflamación, como la IL-1 β e IL-18, se encontraron incrementadas en suero de pacientes con FM (**Figura 14A y 14B**).

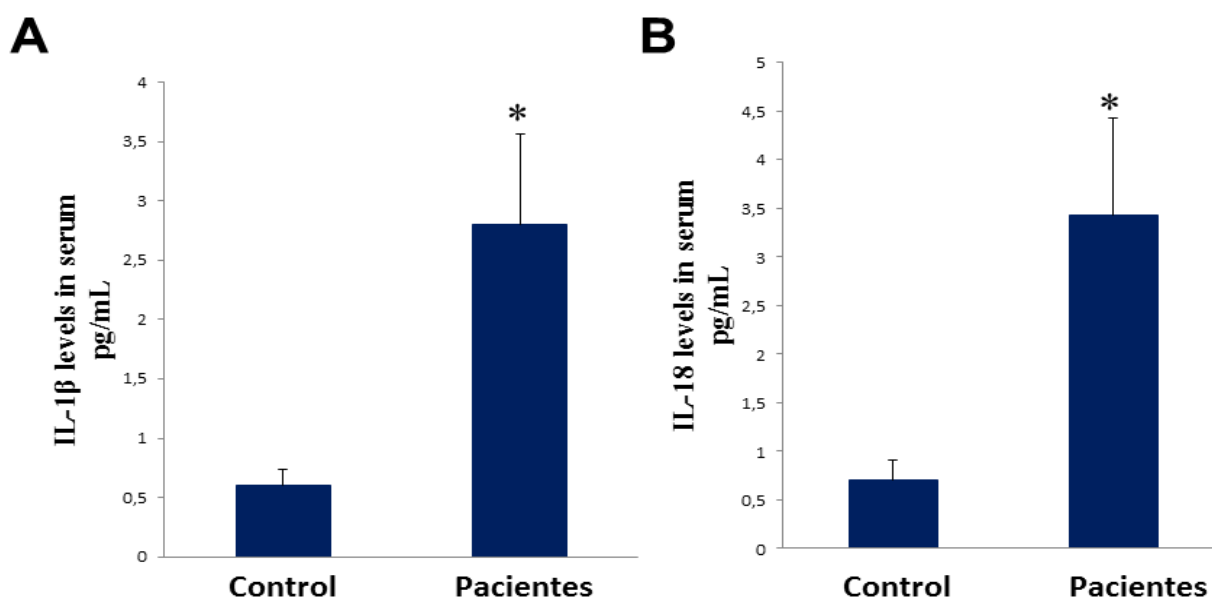


Figura 14. Niveles de IL-1 β (A) e IL-18 (B) en suero de los pacientes con FM en comparación con los controles sanos. La determinación se hizo mediante ELISA tal y como se describe en el Material y métodos. $n = 20$ para el control y $n = 30$ para el grupo de FM, respectivamente. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. $P < 0,001$ entre el control y los pacientes con FM.

Estos niveles de IL- 1 β incrementados en suero de los pacientes se correlacionaban con los niveles de proteína IL- 1 β en su forma activa (p17) en las PBMC (**Figura 15A**). Dado que nuestros datos parecen mostrar que la activación del complejo inflammasoma en nuestros pacientes viene mediada por la disfunción mitocondrial y el consecuente estrés oxidativo, las PBMC de pacientes con FM fueron aisladas y cultivadas con CoQ₁₀ para tratar la deficiencia detectada en las células de los pacientes y por su potencial antioxidante y protector de la mitocondria. Tras el tratamiento en cultivo con CoQ₁₀ 30 μ M después de 24 h las células mostraron una importante reducción de la caspasa-1 activa así como de los niveles de proteína IL- 1 β (p17) (**Figura 15B y 15C**).

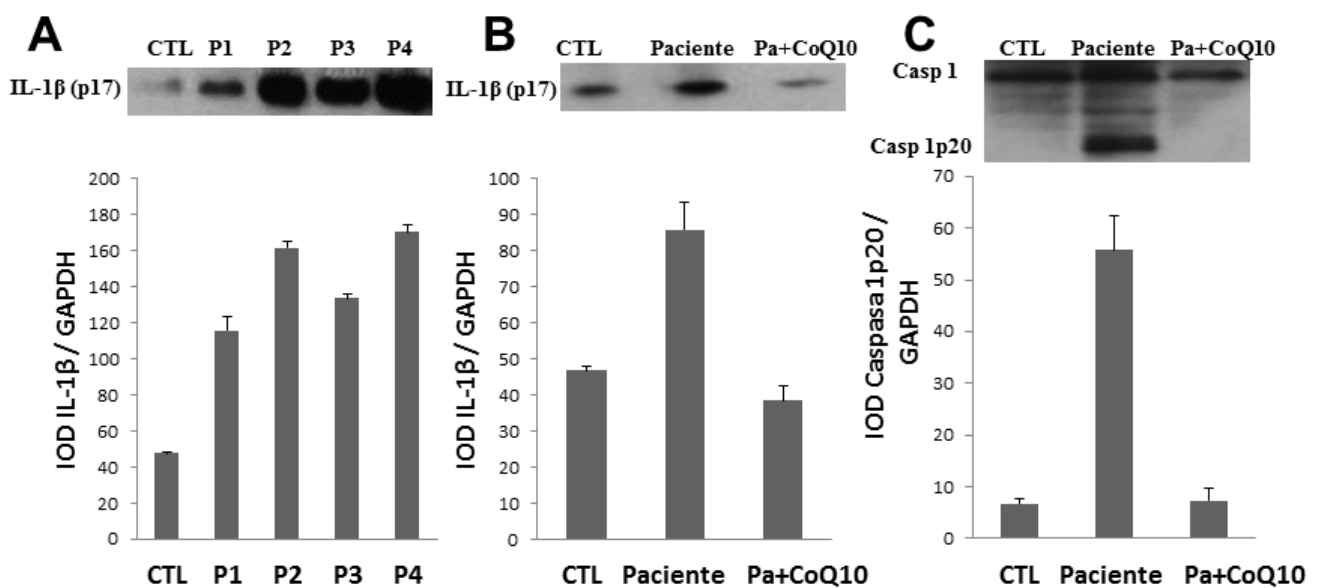


Figura 15. Efecto del tratamiento con CoQ₁₀ en la activación del complejo inflammasoma en células de pacientes con FM. **A.** Niveles de proteína IL-1 β en la forma activa p17 en PBMC de varios pacientes comparados con PBMC de controles sanos y la IL- 1 β . **B.** Efectos del tratamiento con CoQ₁₀ 30 μ M en los niveles de proteína IL- 1 β p17 tras 24h de incubación. **C.** Niveles proteicos de caspasa-1 activa en PBMC de los pacientes antes y después del tratamiento CoQ₁₀ 30 μ M. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * P < 0,001 entre el control y los pacientes con FM.

Por otro lado, y dado que nuestros resultados mostraron que el tratamiento con un antioxidante y protector mitocondrial reducían la activación del complejo inflamasoma, realizamos una correlación mediante Pearson entre los niveles séricos de IL-1 β y los niveles tanto de CoQ₁₀ como marcador de la disfunción mitocondrial de estos pacientes como los niveles de ROS mitocondriales. Los niveles séricos de IL-1 β en pacientes con FM mostraron una correlación negativa significativa ($P < 0.05$) con los niveles de CoQ₁₀ y una correlación positiva significativa ($p < 0,001$) con los niveles de ROS mitocondriales **(Figura 16A y 16B)**.

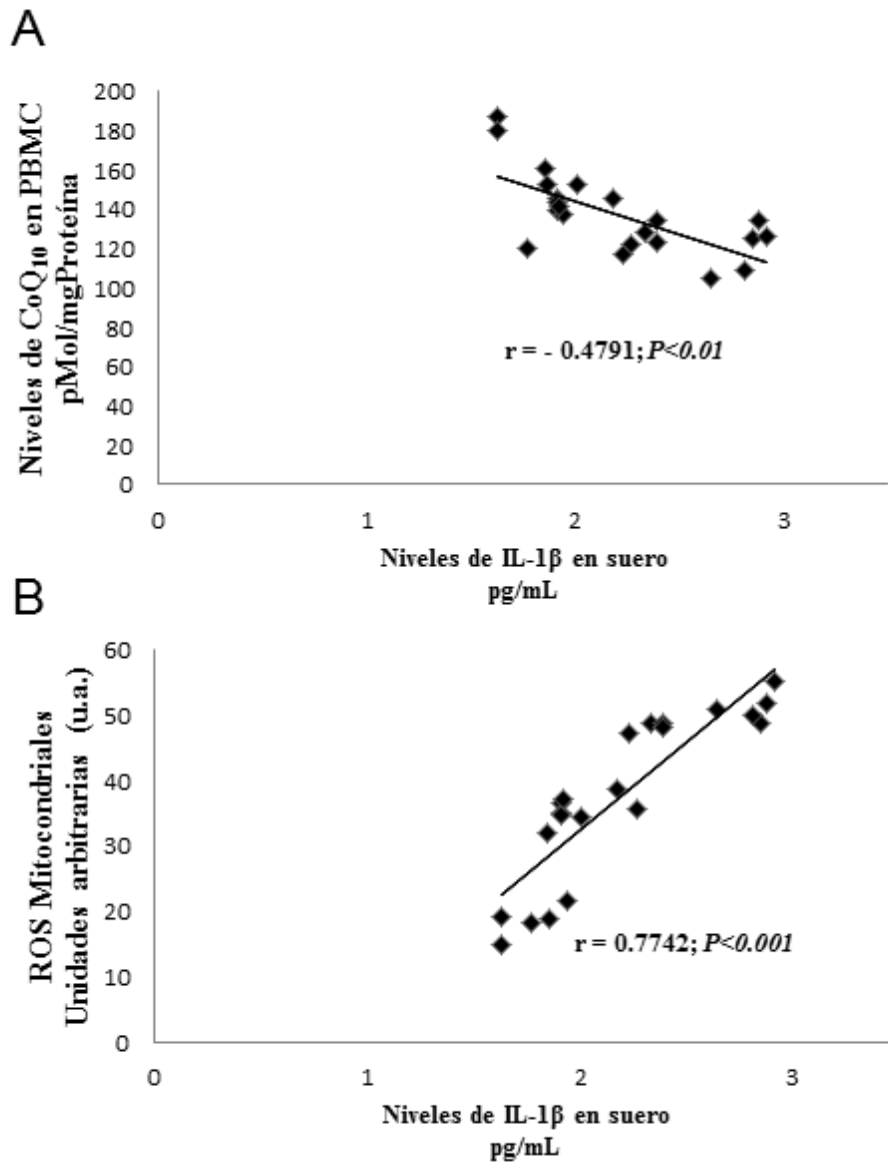


Figura 16. Correlación de los niveles de CoQ₁₀ en PBMC (**panel A**) con los niveles séricos de IL-1 β de los pacientes con FM. Niveles de ROS mitocondriales (**Panel B**) en PBMC de los pacientes con FM correlacionados con los niveles de IL-1 β séricos. n = 30. La correlación fue establecida mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson.

Además, los niveles séricos de IL-1 β mostraron una alta correlación positiva con las puntuaciones de la escala de dolor de los pacientes con FM (**Figura 17**). Estos datos sugieren que los altos niveles de IL-1 β y los niveles de IL-18 pueden tener un papel en la fisiopatología de la FM. En esta línea, es interesante destacar que las IL-1 β e IL-18 se han descrito de estar involucrados en el aumento de la sensibilidad de los receptores sensoriales, lo que significa que causan directamente o al menos modular el dolor (Verri et al., 2007; Li et al., 2009).

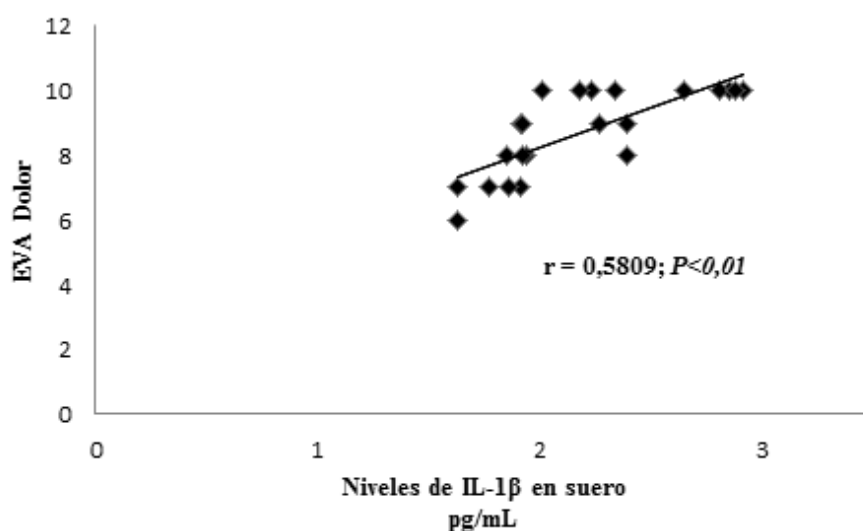


Figura 17. Asociación de niveles séricos de IL-1 β y las puntuaciones de dolor en pacientes con FM. $n = 30$ para los grupos de fibromialgia. La fuerza de la asociación fue establecida mediante el cálculo de coeficientes de correlación de Pearson.

4.4. La inducción de deficiencia de CoQ₁₀ produce la activación del inflamasoma

Para verificar el papel del CoQ₁₀ y la disfunción mitocondrial en el proceso inflamatorio en la FM, se indujo la deficiencia de CoQ₁₀ en PBMC a partir de 5 controles sanos mediante la inhibición de la biosíntesis endógena de la CoQ₁₀ con 1 mM p-aminobenzoato (PABA) durante 24 horas. La inhibición de la CoQ₁₀ (**Figura 18A**) en PBMC tuvo un efecto notable sobre la bioenergética celular, induciendo una disminución del 57% de los niveles de ATP intracelulares, que fueron restaurados después del tratamiento con 10 μ M CoQ₁₀ (**Figura 18B**). Esta deficiencia de CoQ₁₀ en PBMC también indujo un aumento de la oxidación del ADN (OGG1) y de la activación del inflamasoma demostrado por el aumento de los niveles de expresión de NLRP3 y la caspasa-1 activa (**Figura 18C y 18D**), asociado con un aumento significativo de los niveles de IL-1 β y IL-18 en el medio de cultivo (**Figura 18E y 18F**). Curiosamente, la suplementación con CoQ₁₀ indujo una reducción significativa en la oxidación del ADN, la activación inflamasoma, los niveles de IL-1 β y IL-18 en el medio de cultivo de las PBMC deficientes de CoQ₁₀ (**Figura 18C a 18F**).

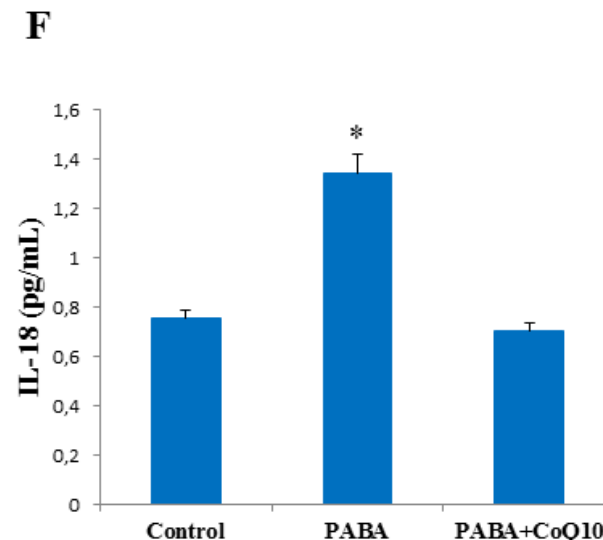
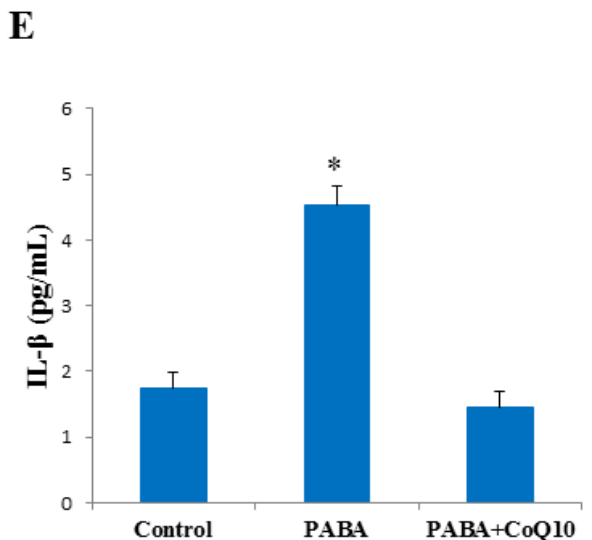
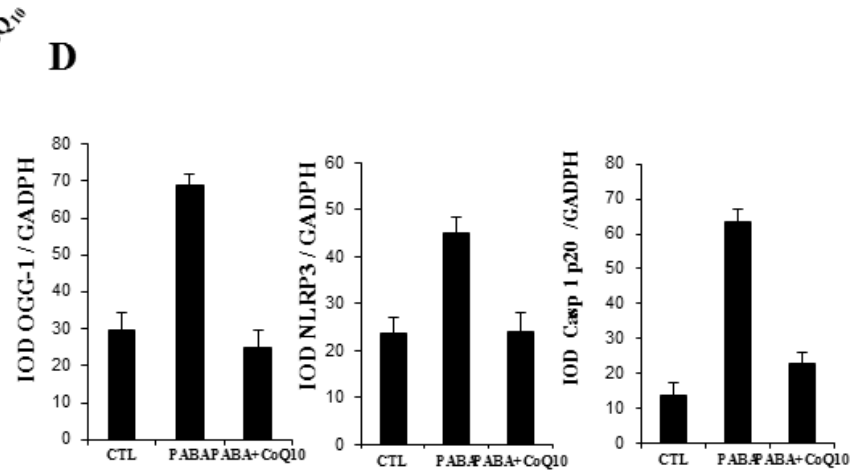
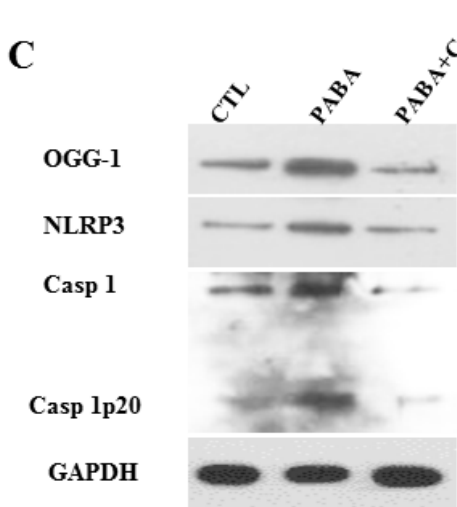
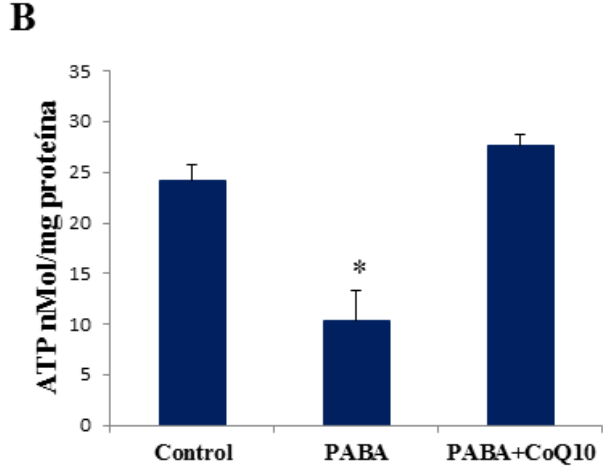
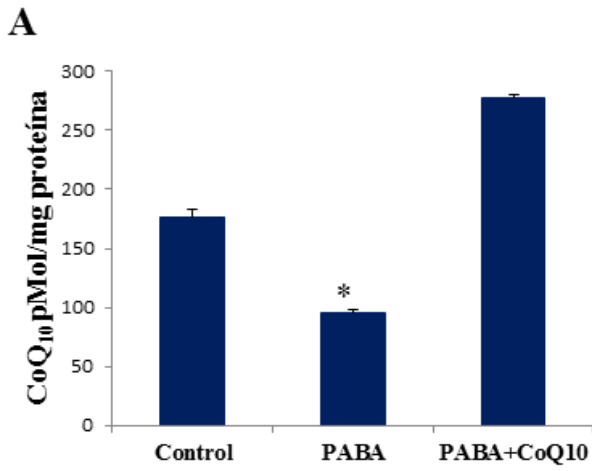


Figura 18. La inducción de la deficiencia de CoQ₁₀ en un modelo in vitro activa el complejo inflamasoma en PBMC. A y B. La deficiencia de CoQ₁₀ y la disminución de los niveles de ATP inducida por 1 mM de p- aminobenzoato de tratamiento (PABA) durante 24 horas en PBMC a partir de 5 voluntarios sanos. **C.** Niveles de expresión de proteínas de OGG -1 y NLRP3 así como la inducción de la activación de caspasa-1 analizado por Western Blot en una homogenado de células de PBMC de 5 controles. **D.** Los niveles de expresión de proteínas se determinaron por análisis densitométrico (IOD, la intensidad óptica integrada) de tres transferencias de Western diferentes y normalizadas respecto la señal de GADPH. **E y F.** Niveles IL- 1 β e IL -18 en los medios de cultivo de PBMC incubadas con PABA durante 24 horas y analizadas por ELISA como se describe en Material y Métodos. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * P < 0,001 entre el control y PABA, y entre PABA y CoQ₁₀.

FISIOPATOLOGÍA DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN FIBROBLASTOS DE FIBROMIALGIA

Dado que existe una clara disfunción mitocondrial en nuestros pacientes, nos propusimos estudiar el efecto de esta disfunción en el metabolismo celular. Para ello, el modelo más utilizado son los fibroblastos de piel aislados mediante biopsia dérmica de los pacientes. Este modelo permite una línea primaria en cultivo con las características moleculares del paciente (Haas et al., 2008).

4.5. Metabolismo mitocondrial en fibroblastos de pacientes con FM

Para evaluar la el metabolismo mitocondrial en fibroblastos, se obtuvieron biopsias de piel y se aislaron fibroblastos de tres pacientes y dos sujetos sanos de igual sexo y edad a los pacientes (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características de pacientes y controles.

	Control 1	Control 2	FM1	FM2	FM3
Edad (años)	42	41	40	42	42
Puntos dolorosos	---	---	14	13	15
Duración enfermedad (años)	---	---	7	6	8
Sexo	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer
IMC	20.80	21.15	20.14	21.80	20.04
FIQ, range 0-80	---	---	63	65	61
VAS, range 0-10	---	---	8	7	8
Glucosa (mg/dL)	93.2	92.4	94.3	93.15	92.2
Ácido Úrico(mg/dL)	3.8	3.9	3.2	3.7	3.7
GOT (mU/mL)	25.4	24.3	25.5	23.4	24.1
GPT (mU/mL)	24.5	23.1	25.2	24.9	24.1
Creatina kinasa(IU/L)	650.1	648.3	652.4	649.3	650.1
Colesterol (mg/dL)	178.9	179.4	169.4	178.6	165.2
Triglicerides (mg/dL)	152.6	159.3	155.7	153.3	157.1

IMC: índice de masa corporal; FIQ: Cuestionario de Impacto de Fibromialgia; VAS: escala analógica visual.

Los fibroblastos de pacientes con FM mostraron una reducción significativa en las actividades de las enzimas respiratoria mitocondrial en comparación con los fibroblastos de control (**Figura 19**).

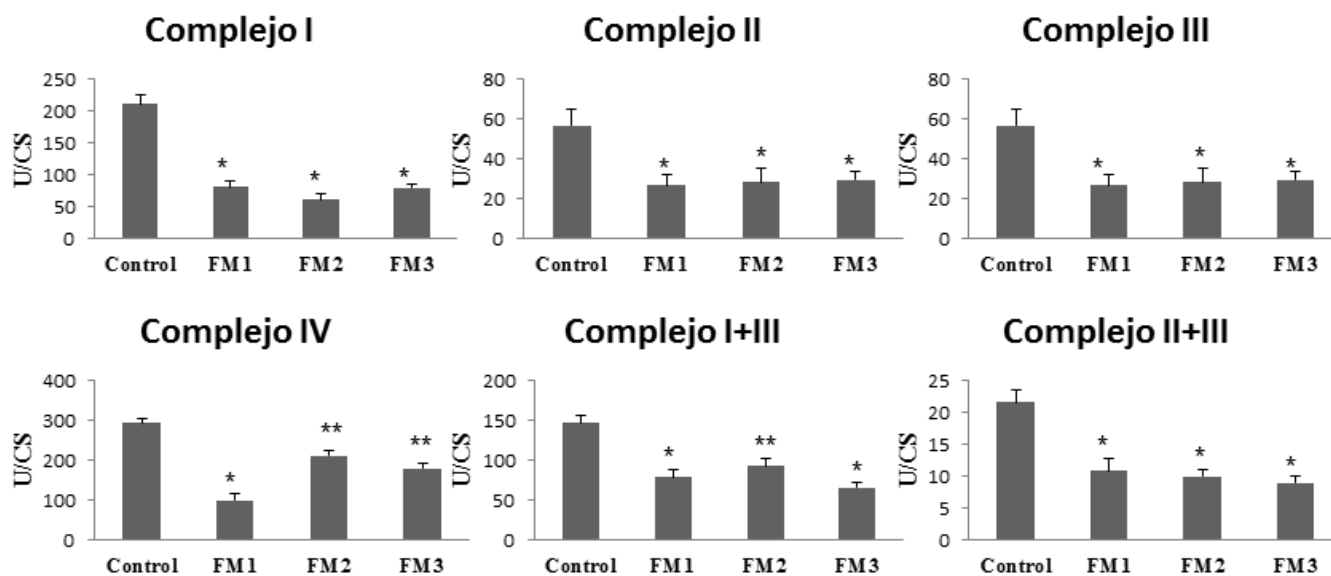


Figura 19. La actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en los fibroblastos de la piel de los pacientes con FM. Las actividades enzimáticas mitocondriales se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Resultados (media \pm DE) se expresan en U / CS (unidades por citrato sintasa). * P < 0,001 ; ** P < 0,01 entre los pacientes de control y FM.

De igual forma que en los resultados observados en las PBMC de los pacientes con FM, los niveles de expresión de proteínas mitocondriales se correlacionaron con la reducción de las actividades observadas en las enzimas respiratorias (**Figura 20**).

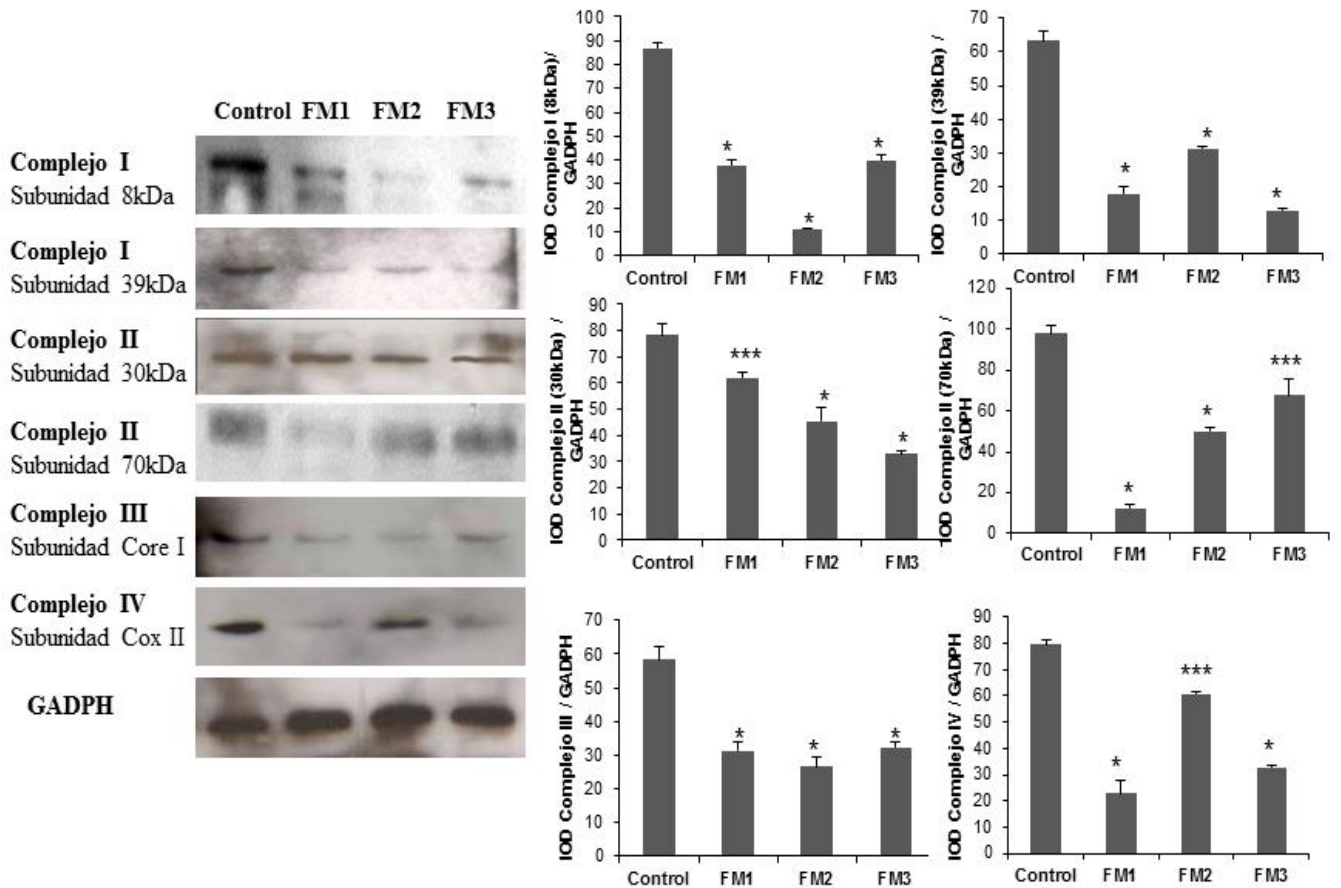


Figura 20. Los niveles de expresión de las proteínas de las subunidades de los complejos I, II, III y IV mitocondriales determinados mediante western blot. Los niveles de proteína se determinaron mediante análisis densitométrico (IOD, la intensidad óptica integrada) de tres transferencias de Western diferentes y se normalizó con respecto a GADPH, utilizando fibroblastos a partir de tres pacientes con FM, en comparación con un grupo de fibroblastos de 5 por edad y sexo sano sujetos de control. * P < 0,001; ** P < 0,01; *** P < 0,05 entre los pacientes de control y FM.

Dado que los fibroblastos mostraron una clara disfunción mitocondrial, cabría esperar un descenso en el metabolismo bioenergético de las células. Para ello, se investigó la función mitocondrial mediante la medición de los valores de tasa de consumo de oxígeno (OCR) en los fibroblastos de control y de FM, expuestos secuencialmente a cada uno de cuatro

moduladores de la fosforilación oxidativa (OXPHOS): oligomicina (un inhibidor de la F1Fo-ATPasa o complejo V), 2,4-DNP (desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa) y antimicina / rotenona (inhibidores de los complejo I y III respectivamente) (**Figura 21A**). El OCR basal estaba considerablemente afectado en los fibroblastos de los pacientes de FM en comparación con los controles (**Figura 21B**). La capacidad respiratoria de repuesto (SRC) de las células, o capacidad de las células para aumentar la producción de ATP, se obtuvo mediante el cálculo de la media de los valores de OCR después de la inyección de 2,4-DNP menos la respiración basal y podría ser utilizado como un indicador de lo cerca que una célula está funcionando al máximo límite bioenergético. Los fibroblastos de pacientes con FM mostraron una disminución significativa de SRC en comparación con las células control (**Figura 21C**).

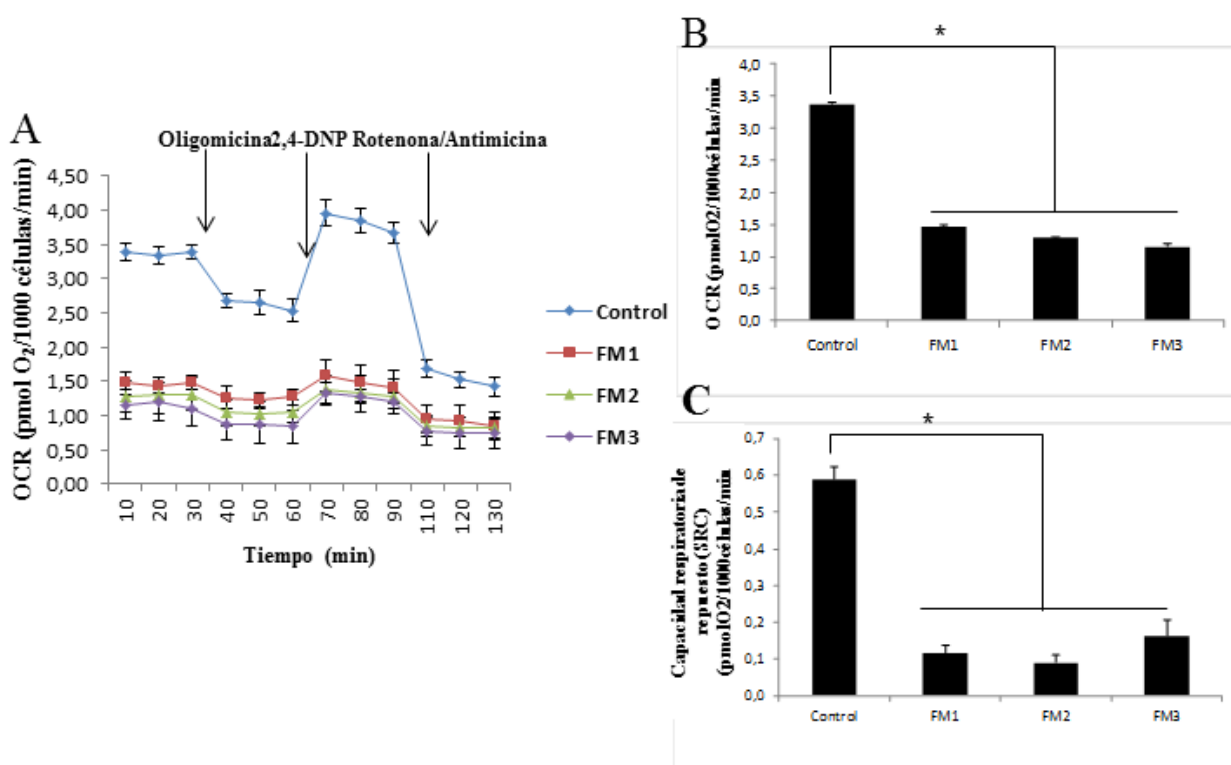


Figura 21. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) en las células de los pacientes del grupo control y FM. **A.** El nivel de OCR se determinó usando el Seahorse XF- 24 extracelular Flux Analyzer con la inyección secuencial de oligomicina (1 mg / mL), 2,4- DNP (100 mM), rotenona (1 M) en el punto de tiempo indicado. **B.** El OCR basal se observa marcadamente afectado en las células de FM en comparación con el control. **C.** La capacidad respiratoria de repuesto (SRC) de los fibroblastos FM mostró una disminución significativa con respecto al control fibroblastos. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $P < 0,001$ entre los pacientes de control y FM.

Esta reducida capacidad respiratoria por parte de las células mostró consecuencias desde el punto de vista bioenergético en las células de los pacientes, observándose bajos niveles de ATP (**Figura 22**).

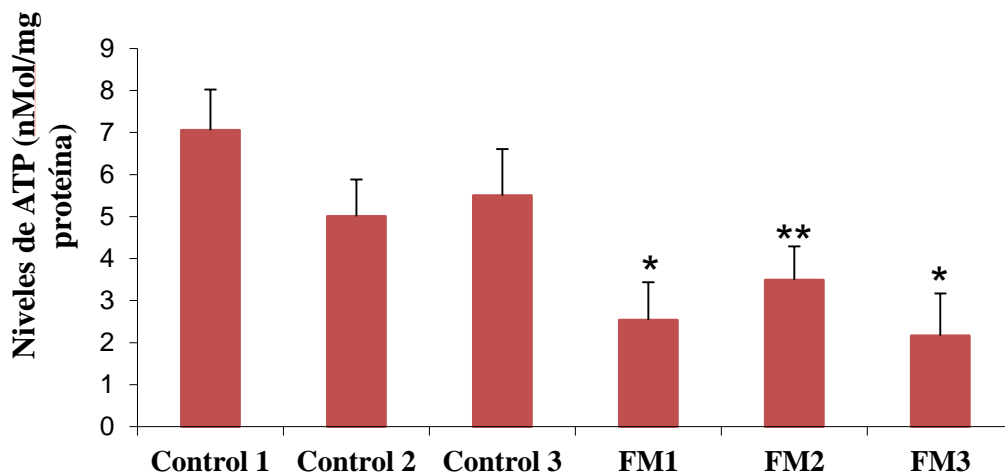


Figura 22. Bioenergética de fibroblastos de pacientes con FM determinados por luminiscencia tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ entre los pacientes de control y FM.

Además, de forma similar a los resultados observados previamente en PBMC, los fibroblastos de pacientes con FM también mostraron una disminución de los niveles de CoQ₁₀ en comparación con los controles (**Figura 23A**). El contenido de CoQ₁₀ de fibroblastos del paciente 1 se observó reducido en un 70%, paciente 2 en un 78% y de paciente 3 en un 82%. Además, los fibroblastos de pacientes también mostraron un menor número de mitocondrias en cuanto a un reducido contenido de ADN mitocondrial en comparación con los valores de fibroblastos control. Nuestros resultados mostraron que el contenido de ADNmt fue 30 a 50% menor en los fibroblastos de FM (**Figura 23B**). Este resultado se confirmó además mediante la visualización del número de copias de ADNmt por célula utilizando la tinción PicoGreen y microscopía de fluorescencia. Las copias de ADNmt se observaron significativamente reducidas en los fibroblastos de FM (**Figura 23C y 23D**).

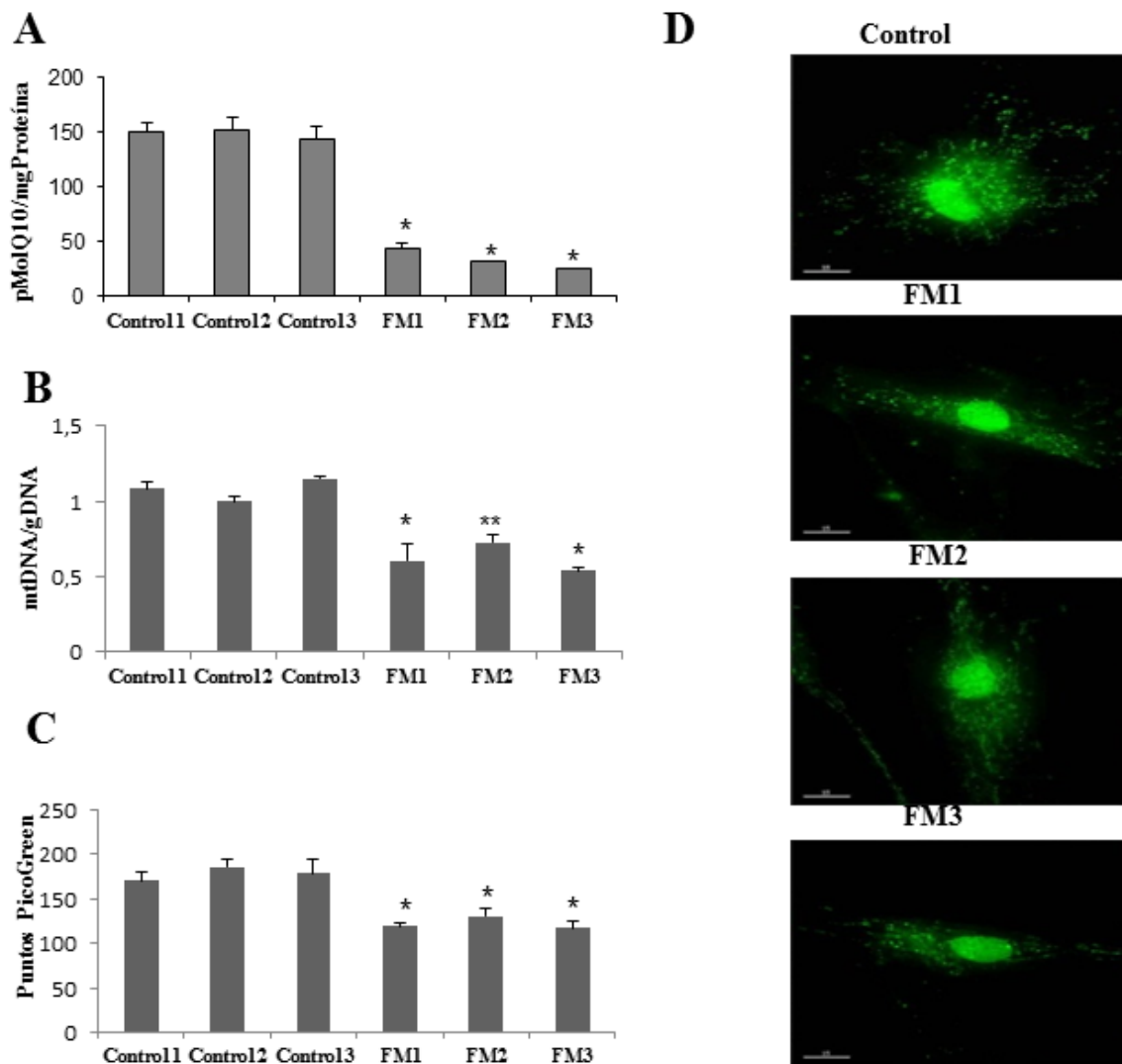


Figura 23. **A.** Los niveles de CoQ₁₀ en células de control y FM determinados mediante HPLC. **B.** Número de copias de ADNmt que se midió mediante RT-PCR como se describe en Material y Métodos. **C y D.** Imágenes del ADNmt mediante tinción PicoGreen y cuantificación de puntos de PicoGreen en los fibroblastos de control y FM. Los datos representan la media ± SD de tres experimentos separados. Bar = 15 micras * P < 0,001; ** P < 0,01 entre los pacientes de control y FM.

4.6. Niveles de estrés oxidativo en los fibroblastos de pacientes con FM

Uno de los efectos de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial es la formación de ROS como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxílicos. De hecho, en condiciones normales entre el 2% y el 5% de los electrones transportados en la cadena respiratoria mitocondrial se pierden en forma de radicales libres. Por tanto, parece lógico pensar que el trastorno en la actividad de los complejos mitocondriales pueda llevar aparejada una alteración en la producción de dichas ROS (Cotán et al., 2011). Con el fin de analizar la generación de ROS en los fibroblastos de pacientes con FM como consecuencia de la disfunción mitocondrial descrita, cuantificamos los niveles de producción de ROS mitocondriales mediante citometría de flujo usando MitoSOX. La producción de superóxido mitocondrial fue significativamente mayor en los fibroblastos de FM en comparación con los controles ($p < 0,001$) (**Figura 24A**). Estos ROS producidas por la mitocondria son compuestos altamente reactivos, que atacan a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos iniciando reacciones de peroxidación, por lo que causan lesiones en los tejidos al dañar los componentes estructurales básicos de las células. Para comprobar si un desequilibrio entre las defensas antioxidantes y la producción de ROS están dañando componentes celulares, realizamos ensayos de peroxidación lipídica en fibroblastos de FM usando C11-Bodipy, un análogo de los ácidos grasos de las membranas celulares con la propiedad de emitir fluorescencia en el espectro visible. Como consecuencia de la oxidación producida por las ROS, la fluorescencia del C11-Bodipi pasa del rango del rojo al del verde, mostrando el ratio de oxidación/reducción de las bicapas lipídicas (Drummen GP, et al, 2001). Nuestros datos confirmaron que los fibroblastos de FM sufrían un alto grado de peroxidación de sus membranas en comparación con fibroblastos control (**Figura 24B**).

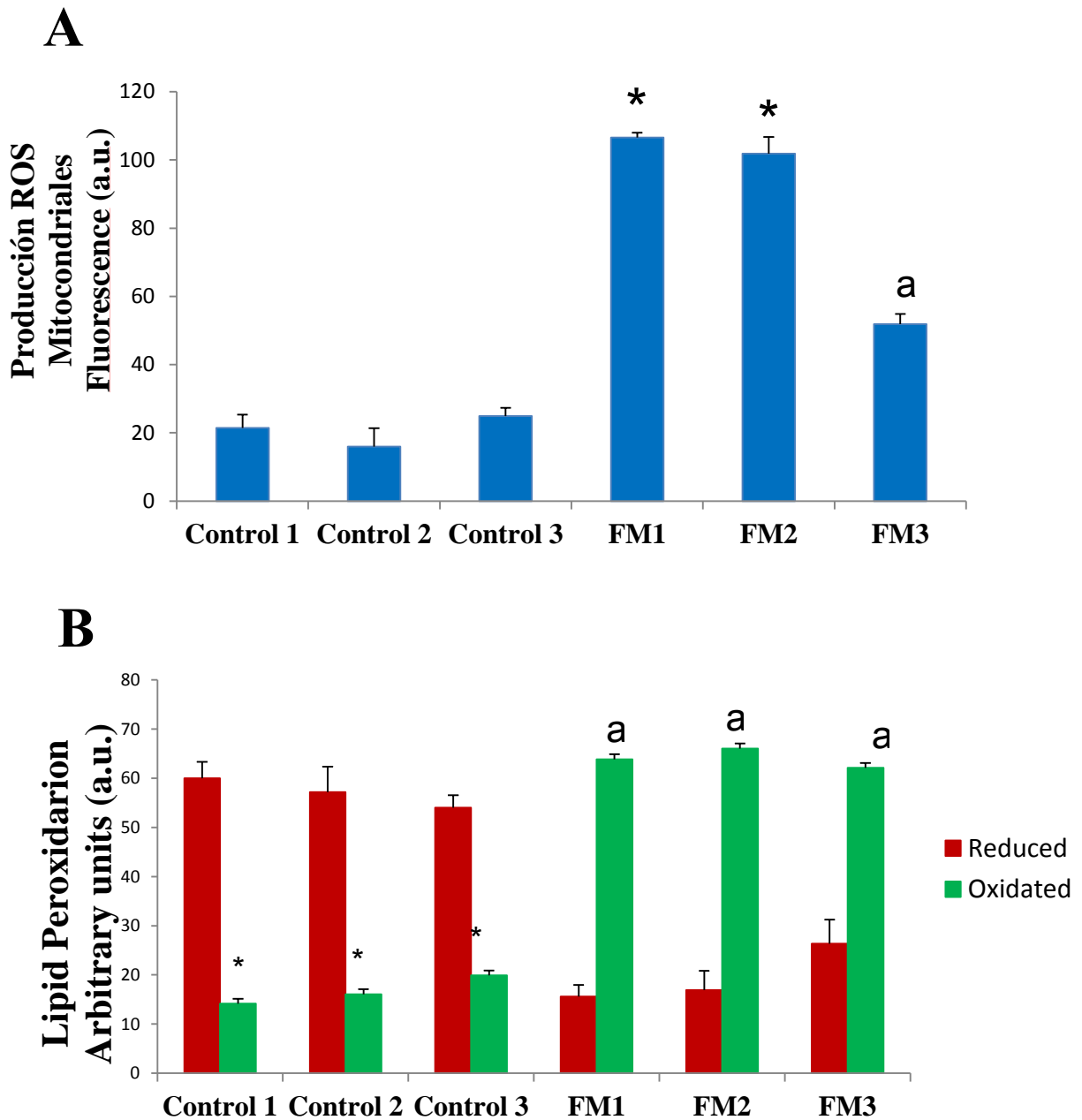


Figura 24. Estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes con FM. A. Producción de ROS mitocondrial analizada en fibroblastos de los pacientes control y FM por citometría de flujo como se describe en Material y Métodos. **B.** Cuantificación de la peroxidación lipídica en los fibroblastos de control y FM. Los datos representan la proporción de lípido reducido /oxidado. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $P < 0,001$, ^a $P < 0,01$ entre los pacientes del grupo control y FM.

Este incremento en la producción de ROS mitocondriales era también observado por microscopía de fluorescencia mostrando la colocalización de fluorescencia de MitoSOX con un marcador de mitocondrias (**Figura 25A**). Además, en la figura 25 se muestran las imágenes de la peroxidación lipídica (**Figura 25B**).

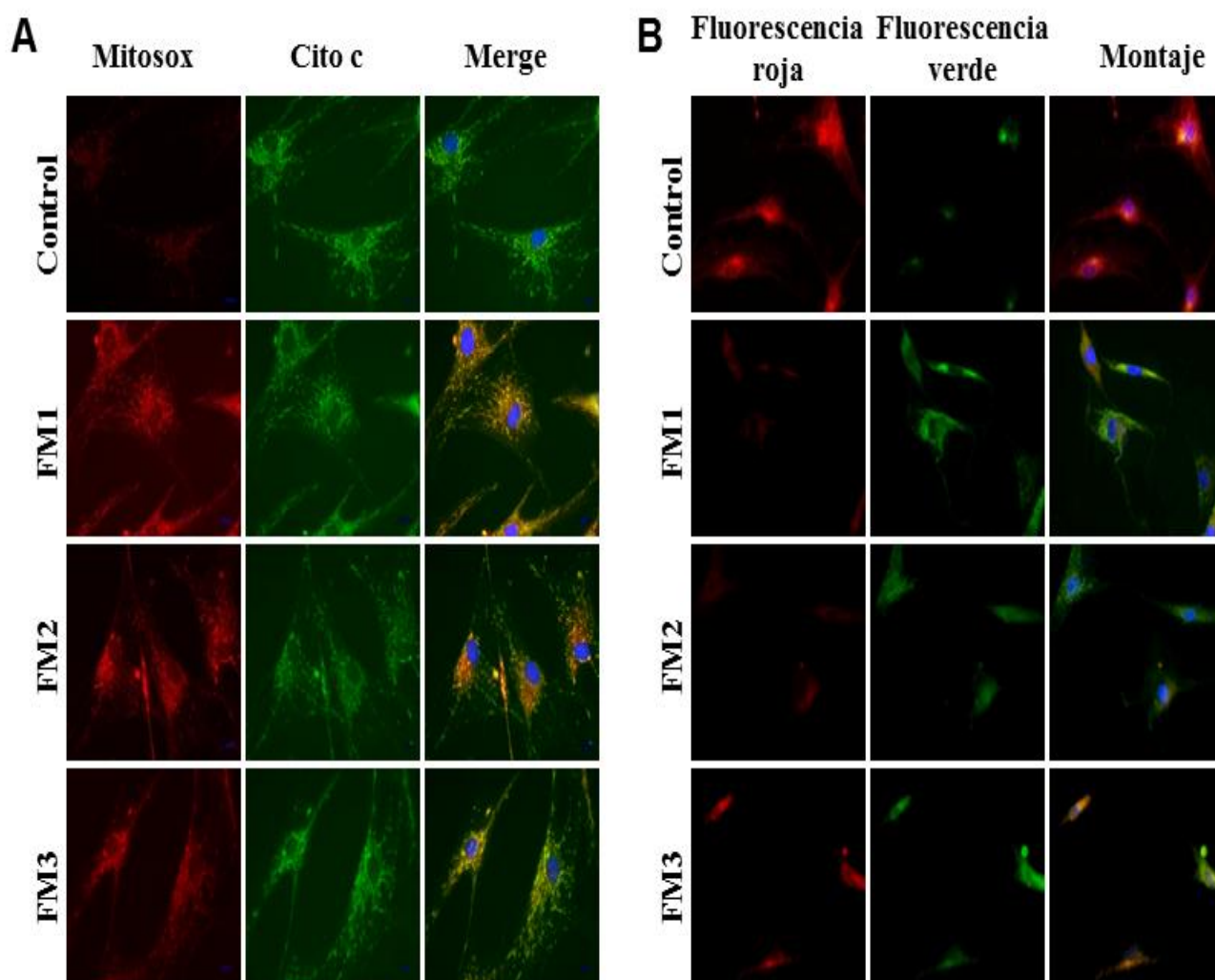


Figura 25. Estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes con FM por microscopía de fluorescencia. A. Producción de ROS mitocondriales determinado mediante MitoSOX un indicador de la dismutasa mitocondrial en rojo **B.** La peroxidación de las bicapas lipídicas se determinó por microscopía de fluorescencia mediante C11-Bodipy 581/59 de acuerdo se describe en Materiales y Métodos. El colorante fluorescente C11-Bodipy 581/59 se inserta en las membranas lipídicas y permite la evaluación cuantitativa de lípidos oxidados (fluorescentes en color verde) y no oxidados (color rojo).

Para confirmar estos resultados, se determinó los niveles de expresión de OGG1, una ADN enzima glicosilasa responsable de la escisión de 8-oxo G, un subproducto de base mutagénica que se produce como resultado de la exposición del ADN a los ROS, en las células de los pacientes. Como muestra la figura, los pacientes con FM mostraron significativamente más altos niveles de OGG1 (**Figura 26A**). Estos datos muestran un intenso daño oxidativo del ADN como consecuencia del alto nivel de ROS que observamos en las células de los pacientes respecto a los controles sanos.

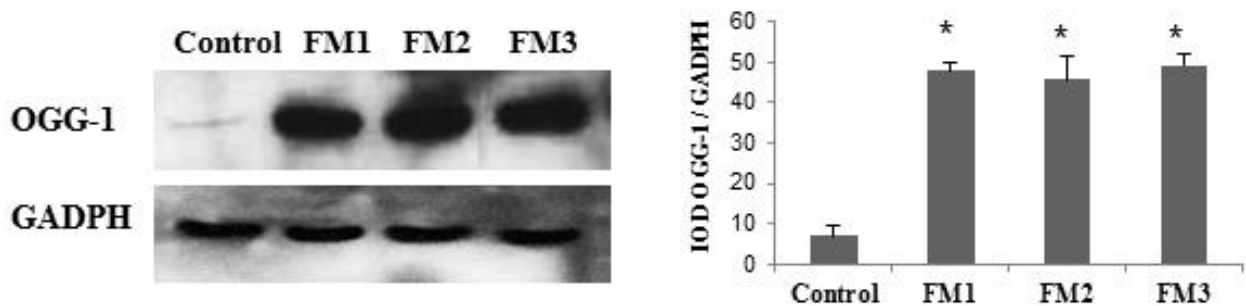


Figura 26. Expresión de proteínas de oxoguanina-glicosilasa 8 (OGG - 1, una enzima ADN glicosilasa responsable de la escisión de 7,8 -dihidro- 8 -oxoguanine (8-oxo-G). Los niveles de las proteína se determinaron por análisis densitométrico (IOD, intensidad óptica integrada) de tres Western blots diferentes y normalizados respecto la señal de GADPH.

Dentro de un entorno altamente oxidativo, las células tienden a activar todo un sistema defensivo mediante la producción de antioxidantes. El desequilibrio de este sistema tiene como consecuencia el agravamiento del estrés oxidativo. Por ello, estudiamos la actividad de dos importantes antioxidantes en la célula, la MnSOD y la Catalasa. Nuestros datos mostraron niveles significativamente reducidos en los fibroblastos de los pacientes con FM (**Figura 27A y 27B**). Esta reducción de los niveles proteicos de ambos antioxidantes

eran acompañados de una baja actividad de los mismos (**Figura 27C y 27D**) demostrando que efectivamente, existe un entorno oxidativo en los fibroblastos de pacientes con FM que permite el exceso de ROS y de daño en lípidos y ADN que el sistema antioxidante no es capaz de controlar.

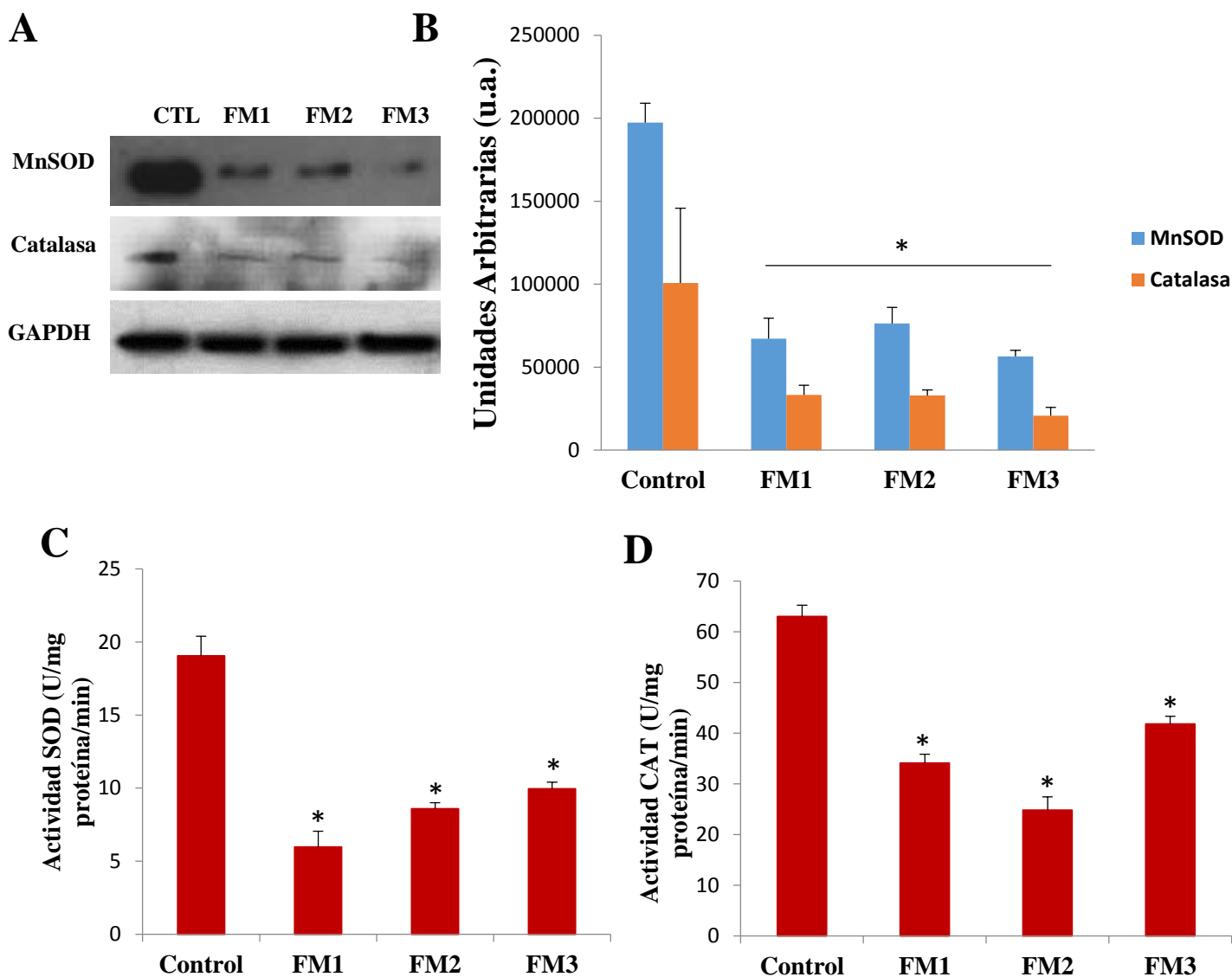


Figura 27. Actividad antioxidante en fibroblastos de pacientes con FM. A. Niveles de expresión de las proteínas MnSOD y catalasa en fibroblastos de pacientes con FM comparados con FM. Los niveles de proteína se determinaron mediante análisis densitométrico (IOD, la intensidad óptica integrada) de tres

Mario David Cordero Morales

Western diferentes y normalizados a la señal de GAPDH. * $P < 0,001$ entre el control y los pacientes con FM. **B.** Actividades de enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en fibroblastos de pacientes con FM. * $P < 0,001$ entre pacientes y control.

UNA MUTACIÓN EN EL GEN CITOCROMO B DEL ADN MITOCONDRIAL EN UNA FAMILIA CON FIBROMIALGIA SE ASOCIA CON LA ACTIVACIÓN NLRP3 - INFLAMASOMA

4.7. Análisis de ADNmt de pacientes con FM

Para evaluar si las mutaciones en los genes mitocondriales se asocian con la FM, se secuenció el ADNmt de cinco pacientes con FM e intolerancia al ejercicio a partir de muestras sanguíneas. La edad media en el grupo de FM fue 44 ± 2 años. La duración media de los síntomas fue de $6,2 \pm 1,7$ años. La media de los puntos de dolor fue $15,1 \pm 2,2$ puntos, y los pacientes tenían niveles significativamente de dolor (VAS) ($6,8 \pm 0,8$), y de alto impacto global de FM (FIQ) ($60 \pm 3,4$) así como de las subescalas FIQ de dolor ($6 \pm 1,5$), fatiga ($7,6 \pm 1,1$), cansancio matutino ($6 \pm 1,8$), rigidez ($7,6 \pm 1,6$), ansiedad ($6,4 \pm 2,8$) y la depresión ($4,8 \pm 2,5$) (**Tabla 4**). Acerca de manifestaciones típicas de la enfermedad mitocondrial como ptosis, pérdida de la audición, síntomas visuales, el paciente 3 refirió una pérdida auditiva moderada en su historia clínica. El análisis de secuencia de todo el genoma mitocondrial reveló varias variantes polimórficas conocidas similares en todos los pacientes en comparación con la Secuencia de Referencia de Cambridge revisado (**Tabla 5**), y una mutación en homoplasma en la paciente 3: m.15804T> C, en el gen mtCYB, mostrando la sustitución de la valina en el codón 353 con una alanina (p.V353A). A continuación se analizaron las implicaciones patológicas de esta mutación en la paciente 3 y su familia.

Tabla 4. Parámetros sintomáticos de los pacientes con FM. IMC, Índice de masa corporal; FIQ, Cuestionario de impacto de la fibromialgia; VAS, Escala analógica visual.

Parámetros	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Edad (años)	45	46	43	41	45
Puntos dolorosos	15	14	12	11	13
Duración enfermedad (años)	6	8	5	4	8
Sexo	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer
IMC (kg/m ²)	23.2	22.9	24.9	22.1	23.8
FIQ, rango 0-80	68	70	66	71	75
Dolor	7	6	8	4	5
Fatiga	8	9	7	8	6
Fatiga matutina	8	8	5	4	5
Rigidez	7	8	9	9	5
Ansiedad	7	10	6	7	2
Depresión	7	6	7	2	2
VAS dolor 0-10	7	6	8	7	6

Tabla 5. Resumen de los resultados de la secuenciación en sangre de pacientes con FM.

	FM1	FM2	FM3	FM4	FM5
MT-RNR1	A750G A1438G	G709A A750G A1438G	A750G A1438G	G709A A750G A1438G	A750G A1438G
MT-RNR2	G3010A	G1888A A2706G		G1888A A2706G	
MT-ND1		G3834A T4216C		G3834A T4216C	
MT-ND2	A4769G	A4769G A4917G T5105C	A4769G	A4769G A4917G T5105C	A4769G
MT-TW					
MT-CO1		C7028T	T6776C	C7028T	T6776C
MT-CO2	A8014G				
MT-ATP6	A8860G	G8697A A8701G A8860G	A8860G	G8697A A8701G A8860G	A8860G
MT-CO3					
MT-ND4		A11251G G11719A		A11251G G11719A	
MT-ND5		C12633A G13368A		C12633A G13368A	
MT-CYB	A15326G	C14766T G14905A A15326G C15452A A15607G	A15326G T15804C	C14766T G14905A A15326G C15452A A15607G	A15326G

MT-TT		G15928A		G15928A	
MT-DLOOP	T16519C	T16126C	T16519C	T16126C	T16519C
	A263G	A16163G	A263G	A16163G	A263G
	302insCC- CCC	C16186T	T152C	C16186T	T152C
	310insC	T16189C	310insC	T16189C	310insC
	514inCA	C16294T		C16294T	
		T16519C		T16519C	
		A73G		A73G	
		A263G		A263G	
		302insCC		302insCC	
		310insC		310insC	
		514inCA		514inCA	

4.8. Análisis molecular de la mutación encontrada

La transición T → C en la paciente 3 genera un nuevo sitio de restricción para la enzima BbvI que nos permitió diseñar un ensayo de PCR para el diagnóstico de la mutación m.15.804 (**Figura 28A**). El análisis molecular en la paciente 3, una mujer de 45 años de edad, mostró que la mutación 15804 fue homoplásmica en las células de sangre, orina y muestras de saliva (**Figura 28B**). Además, se evaluaron varios miembros de la familia de la paciente 3, a partir de tres generaciones (**Figura 28C**). El pedigrí mostró claramente un patrón típico de herencia materna e interesantemente, la mutación estuvo presente en los miembros con manifestación clínica típica de FM cuyo diagnóstico se estableció según criterios ACR.

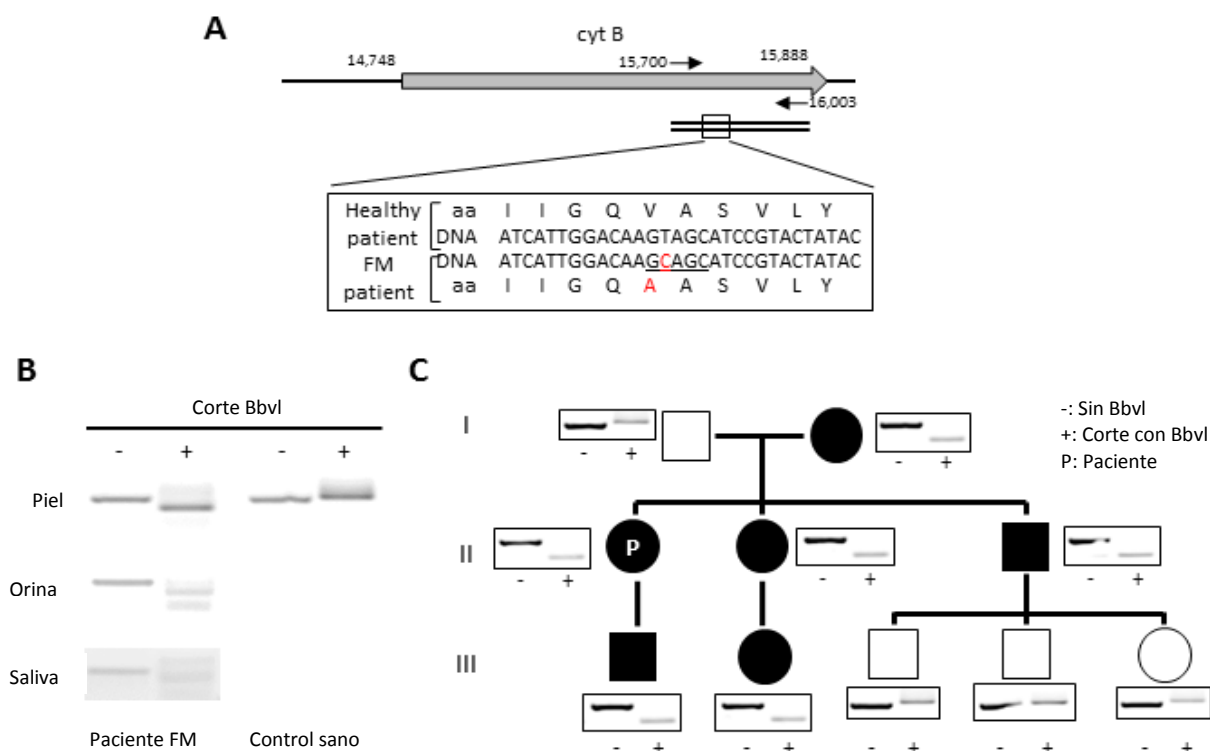


Figura 28. Análisis de genotipado de la mutación mtCYB. **A.** Ilustración de la mutación encontrada en la paciente 3 en el gen mtCYB. El m15.804 transición C → T genera un nuevo sitio de restricción (GCAGC) para la enzima BbvI. La amplificación por PCR de muestras de ADN y la digestión con restricción BbvI permite identificar los diferentes haplotipos por patrón específico de bandas de ADN en la electroforesis en gel de agarosa. **B.** el análisis molecular en la paciente 3 mostró que la mutación estaba en homoplasmia en las células de la orina, muestras de saliva y biopsia de piel. **C.** el análisis del pedigrí de la familia de la paciente 3 a lo largo de tres generaciones. Símbolos blancos y negros denotan las personas con o sin síntomas de la FM, respectivamente. Formas: hombre, círculos: mujer.

Además de la paciente 3, los pacientes familiares P4, P5 y P6 (ver pedigrí en la figura 9) con mutación refieren una pérdida auditiva moderada en sus antecedentes clínicos. Curiosamente, la pérdida de audición se ha descrito y relacionado con FM (Bayazit et al., 2002; Wolfe et al, 2012). La evaluación de parámetros de laboratorio en la paciente 3 se mostraban en rangos normales, incluyendo lactato en sangre, electrolitos, la creatina quinasa, y el perfil lipídico (**Tabla 6**). La mutación en homoplasmia encontrada fue el único cambio sospechoso observado en la paciente 3 y la familia que no se observa en otros pacientes y controles habiéndose estudiado en otros 60 pacientes y en 40 controles, lo que sugiere que podría estar asociada con la enfermedad en la familia.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos séricos en la paciente 3.

Parámetros bioquímicos	Paciente	Rango normal
Glucosa (mg/dL)	99	76-110
Urea (mg/dL)	17	10-50
Proteínas totales (g/dL)	6.8	6.6-8.7
Na (mEq/L)	142	135-145
K (mEq/L)	4.2	3.5-5
Ácido úrico (mg/dL)	3.9	2.4-5.7
Creatinina (mg/dL)	0.71	0.5-0.9
Ca (mg/dL)	9.4	8.5-10.5
Fosfato (mg/dL)	3.44	2.7-4.5
Bilirubina (mg/dL)	0.39	0.2-1
Fosfatasa alcalina (U/L)	55	35-104
GOT (mU/mL)	21.9	5-37
GPT (mU/mL)	23.5	5-41
Creatina kinasa (U/L)	73	10-190
Colesterol (mg/dL)	155	80-200
HDL Colesterol (mg/dL)	65	50-100
LDL Colesterol (mg/dL)	69	<120
Triglicéridos (mg/dL)	50	50-150

4.9. Análisis de la estructura y secuencia de aminoácidos

La mutación en la proteína CYB sustituye un residuo de valina parcialmente conservado en una alanina. Este es un cambio conservador que parece no afectar a la función o estructura. Sin embargo, este mismo cambio ha sido encontrado previamente en otra proteína de la cadena respiratoria mitocondrial, COXIII correspondiente al complejo IV, asociada con el síndrome de Leigh (Mkaouar-Rebai et al., 2011). Tras la comparación de los residuos del cambio y su conservación, se observa que hay una alta similitud en esa misma región en ambas proteínas (**Figura 29**). En ambas proteínas el residuo valina

aparece en la posición central de una hélice trans-membrana enriquecida con residuos hidrofóbicos con características similares. Este análisis nos muestra que ambos cambios pueden llegar a tener características fisiopatológicas.

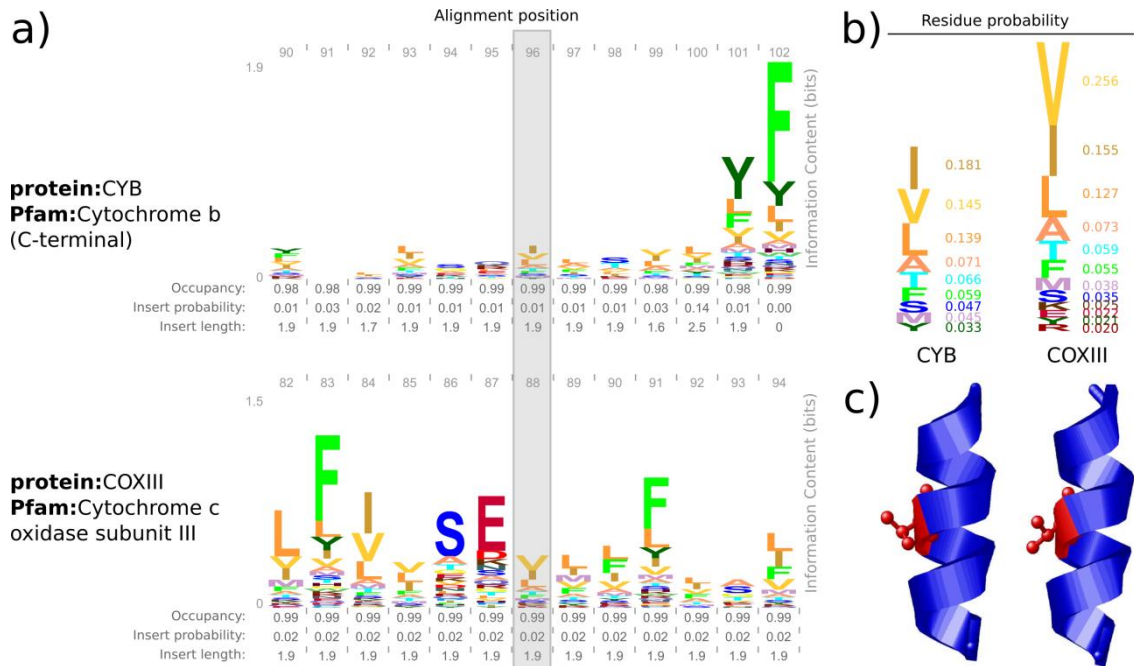


Figura 29. Conservación y estructura de similitud de la mutación Val- Ala entre CYB y COXIII. **A.** conservación, imagen-muestra de la región circundante (6 residuos en cada lado) para la mutación en las dos proteínas. La altura de la columna corresponde a la conservación en esa posición (contenido de la información), y la altura de cada letra se relaciona en la frecuencia de esa letra en esa posición. La ocupación es la probabilidad de observar una letra en una posición, y la probabilidad de inserción y la longitud dependen de insertos putativos en la alineación. La mutación aparece en diferentes dominios Pfam de las dos proteínas: b citocromo C-terminal para CYB, y citocromo c oxidasa subunidad III para COXIII. **B.** posición de la mutación ampliada que muestra la probabilidad de residuos. **C,** estructura de la región de las dos proteínas, que corresponde a parte de una hélice transmembrana. El residuo valina se resalta en rojo.

4.10. Estudios fisiopatológicos

En consonancia con el hecho de que la nueva mutación se detectó en una proteína del complejo III, los fibroblastos de la piel de la paciente 3 e hijo mostraron una reducción de los niveles de la actividad del complejo III (**Figura 30A**) asociada con la deficiencia de CoQ₁₀ (**Figura 30B**), la reducción de los niveles de ATP, los niveles altos de mitocondrial de ROS, la reducción de los contenidos de ADNmt (**Figura 30C-E**) y la proliferación tasa baja de las células (**Figura 31**).

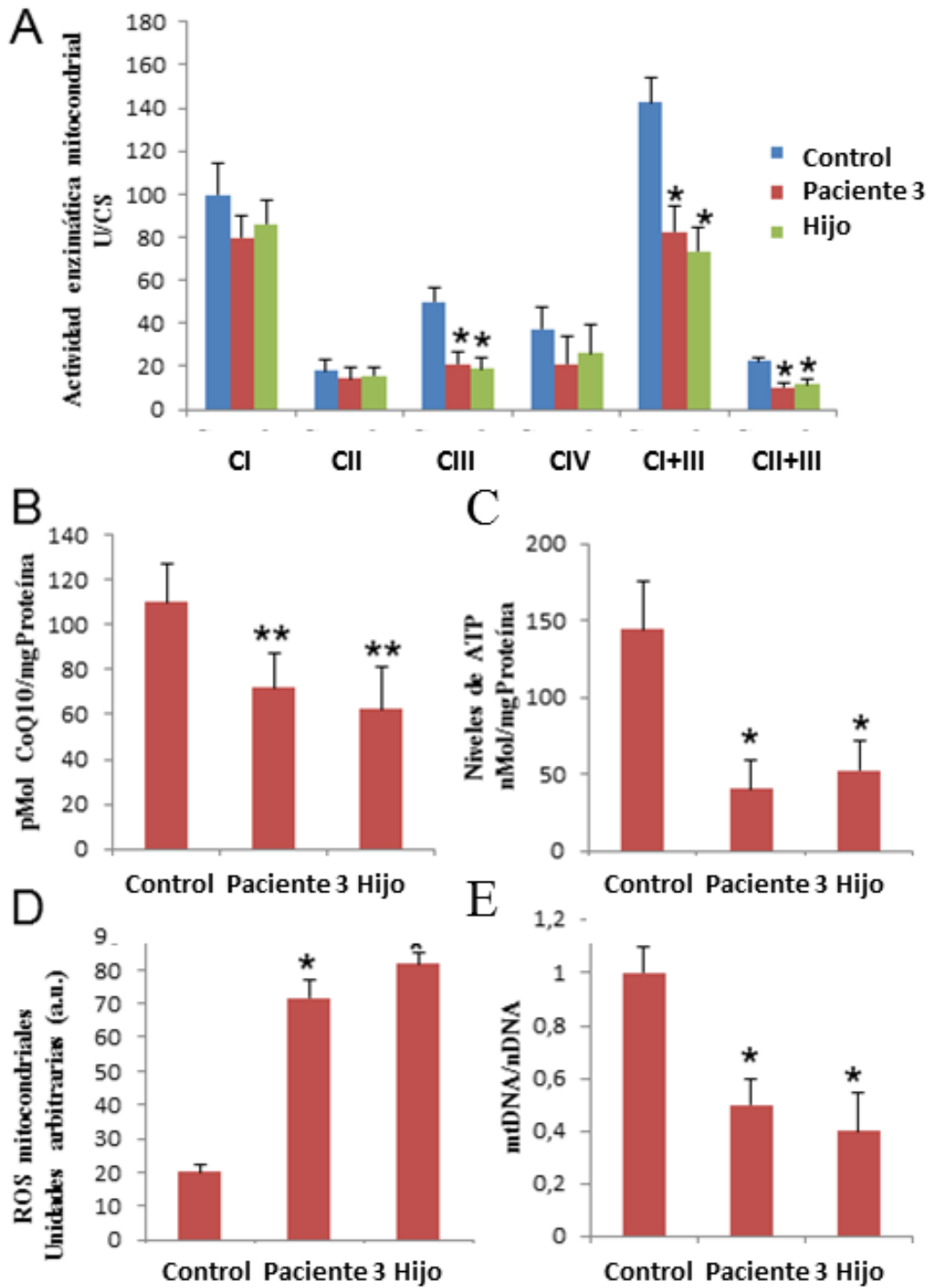


Figura 30. Fisiopatología de fibroblastos de la paciente 3 e hijo. **A**, actividad de la cadena respiratoria en fibroblastos de la paciente 3 y su hijo en comparación con el control. **B**, niveles de CoQ₁₀. **C**, niveles de bioenergética de los fibroblastos por determinación de ATP. **D**, producción de ROS mitocondriales. **E**,

reducido contenido de ADNmt en fibroblastos de los pacientes de FM en comparación con los controles sanos. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * P <0,001; ** P <0,005 entre los controles y los pacientes con FM.

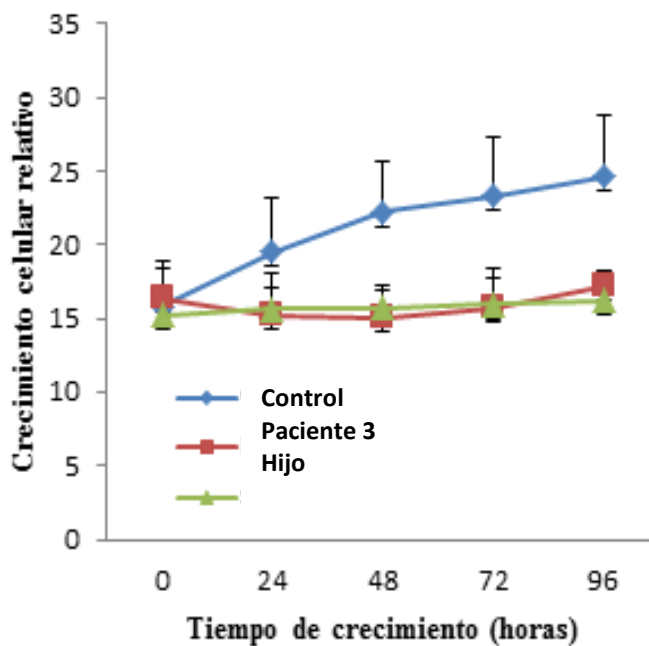


Figura 31. Crecimiento de las células determinadas en fibroblastos de ambos pacientes comparados con controles.

Similares alteraciones fisiopatológicas se observaron en otras muestras biológicas de la paciente 3, tales como las células de la sangre, la orina, las muestras de saliva y plaquetas (Tabla 7).

Tabla 7. Datos bioquímicos en diferentes muestras biológicas de la paciente 3. Los cambios se muestran por porcentaje respecto a controles sanos.

	Sangre	Células de orina	Células de saliva	Plaquetas
Complejo III	49%	28%	33%	45%
CoQ₁₀	40%	31%	60%	50%
ATP	42%	36%	36%	70%
mtDNA/nDNA	37%	30%	32%	47%

Para evaluar la disfunción mitocondrial se midió la tasa de OCR en fibroblastos de la paciente 3 e hijo. Las determinaciones se realizaron mediante la exposición secuencial de las células a cuatro moduladores de la fosforilación oxidativa (OXPHOS): oligomicina (un inhibidor de F1Fo-ATPasa o complejo V), 2, 4-DNP (desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa) y antimicina / rotenona (complejo I e inhibidores III respectivamente). El OCR basal en las células de FM era notablemente inferior respecto al control, con valores de aproximadamente 2,8 veces ($p < 0,05$) más bajo que los controles (**Figura 32A y B**). La SRC de las células se obtuvo mediante el cálculo de la media de los valores de OCR después de la inyección de 2,4-DNP menos la respiración basal, y se puede utilizar como un indicador de cómo de cerca a su límite bioenergético está funcionando una célula. El SRC en las células FM fue significativamente baja (5 veces, $p < 0,05$) en comparación con las células control (**Figure 32C**).

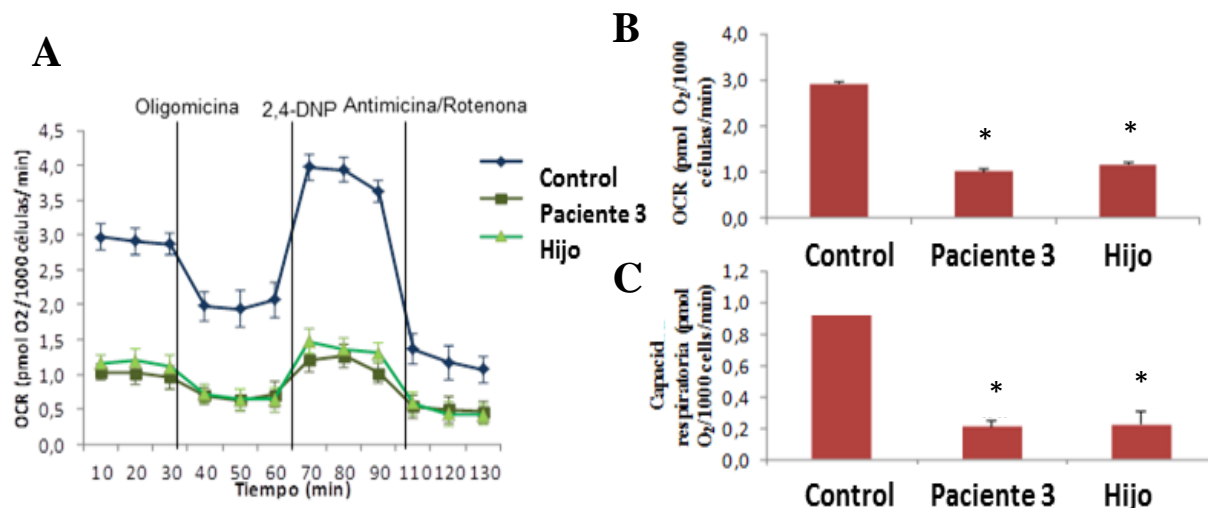


Figura 32. **A.** OCR se determinó a través de Seahorse XF-24 extracelular Flux Analyzer con la inyección secuencial de oligomicina (1 mg / ml), 2,4-DNP (100 mM), antimicina/rotenona (1 μ M) en el punto de tiempo indicado en cada pocillo, después de la medición del nivel basal. **B.** El OCR basal estaba considerablemente afectado en las células de los pacientes. **C.** La capacidad respiratoria de repuesto (SRC) en fibroblastos de FM mostró una disminución significativa. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $P < 0,001$ entre los controles y los pacientes con FM.

4.11. Activación del complejo NLRP3-inflamasoma

En condiciones de estrés oxidativo, las mitocondrias pueden ser dañados y a su vez, dañar a la propia célula resultando una disfunción celular y un incremento de la inflamación (Cordero et al., 2013b). De esta forma, la inhibición del complejo I o III de la cadena respiratoria mitocondrial se ha demostrado que induce un incremento en la producción de ROS y la activación inflammasoma NLRP3 (Zhou et al., 2011; Shimada et al., 2012; Ding et al., 2014) En este sentido, hemos analizado la activación de proteínas relacionadas con el inflammasoma en la paciente 3. Encontramos un aumento en los niveles de expresión de NLRP3, caspasa 1 p20, e IL-1 β (p17) en los fibroblastos de la paciente 3 (**Figura 33A**)

y aumento de los niveles de IL-1 β en el suero sugiriendo la activación del inflamasoma (Figura 33B).

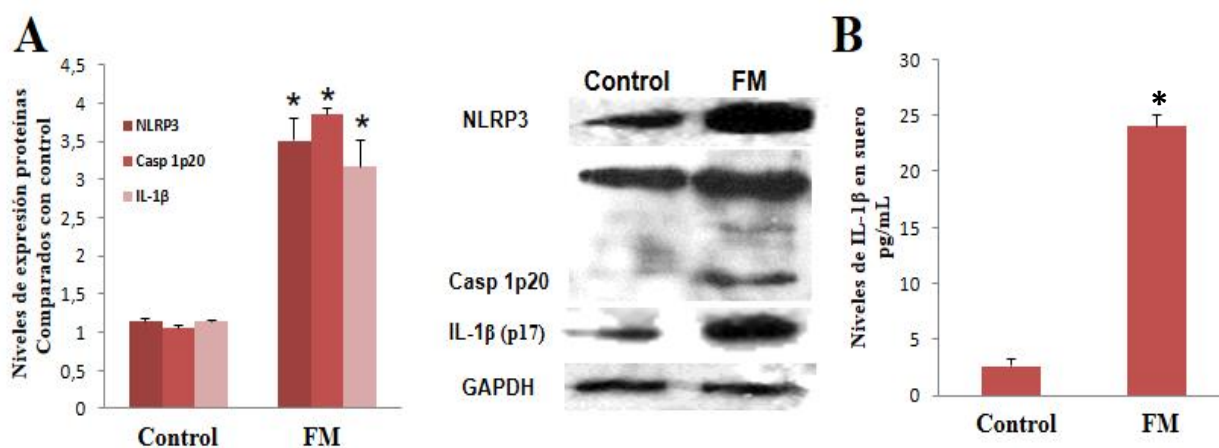


Figura 33. Activación del inflamasoma en los fibroblastos de la paciente y niveles de IL-1 β en el suero de la paciente 3 con FM. **A.** niveles de proteína NLRP3, caspasa 1 p20 y IL-1 β (p17) se analizaron por Western. Los niveles de proteína se determinaron por análisis densitométrico (IOD, intensidad óptica integrada) de tres transferencias de Western diferentes y se normalizó a la señal de GAPDH en comparación con un grupo de 5 sujetos control emparejados por sexo y edad. **B.** niveles en suero de IL-1 β de paciente con FM y control determinados por ELISA. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * P < 0,001 entre los controles y los pacientes de FM.

Interesantemente, las PBMCs de los miembros de la familia que portaban la mutación también mostraron un aumento de expresión de la proteína IL-1 β (p17), así como un aumento de los niveles séricos de IL-1 β (Figura 34).

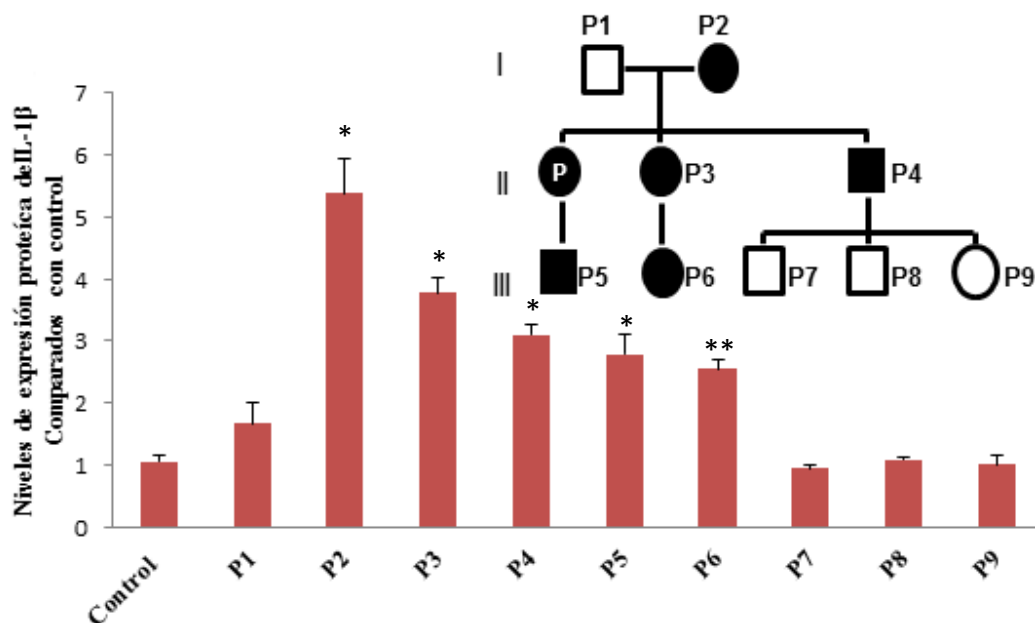


Figura 34. Los niveles de IL-1β (p17) en BMC se determinaron en varios miembros de tres generaciones de la familia de la paciente 3. El pedigree muestra a los miembros afectados de la familia con la mutación. Cuadros: hombre, círculos: mujer. Los datos representan la media ± SD de tres experimentos separados. * P <0,001; ** P <0,005 entre los controles y los pacientes de FM.

Para examinar el efecto de la activación inflamatoria en el metabolismo celular, los fibroblastos de la paciente 3 fueron tratados con 16673-34-0 (5-cloro-2-metoxi-N-[2-(4-sulfamoyl)fenil]etil] benzamida, un nuevo inhibidor específico de NLRP3 (Marchetti et al., 2014), mediante la evaluación del crecimiento celular. La inhibición de la NLRP3 indujo un aumento del crecimiento celular en fibroblastos del paciente (**Figura 35**), lo que podría interpretarse como una mejora en el metabolismo de la célula lo que indicaría que los altos niveles de inflamación en la célula estarían contribuyendo al agravamiento de su fisiopatología.

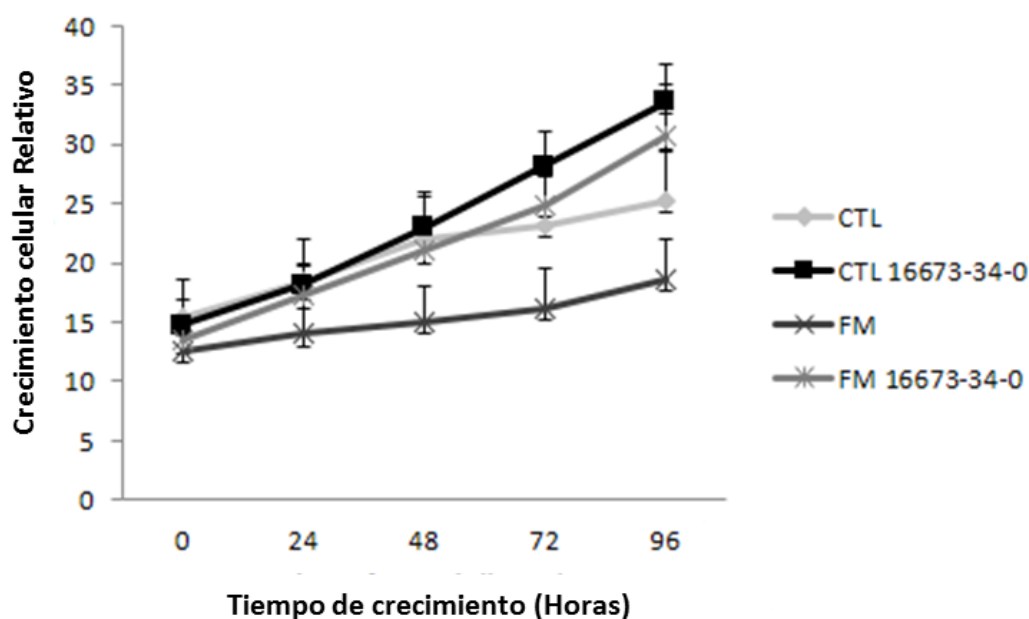


Figura 34. Evaluación del efecto de la inhibición de NLRP3 en el crecimiento celular mediante co-incubación con 16673-34-0 determinado en fibroblastos sanos y FM.

Las enfermedades mitocondriales constituyen un grupo enormemente heterogéneo, ya no solo por sus diferentes manifestaciones clínicas, sino también por su origen diverso puesto que cada diagnóstico genético es establecido por la presencia de una mutación conocida e incluso por la aparición de nuevas mutaciones. En este sentido, nos propusimos evaluar si la activación del complejo inflammasoma es un evento propio de nuestra nueva mutación o existente en otras patologías mitocondriales. Para ello, se analizó la activación de NLRP3-inflammasoma en fibroblastos de otras enfermedades mitocondriales como MELAS, MERRF y LHON. Nuestros datos muestran un aumento en los niveles de expresión de proteínas de NLRP3 e IL-1 β (p17) en los fibroblastos de estas enfermedades (**Figura 35**).

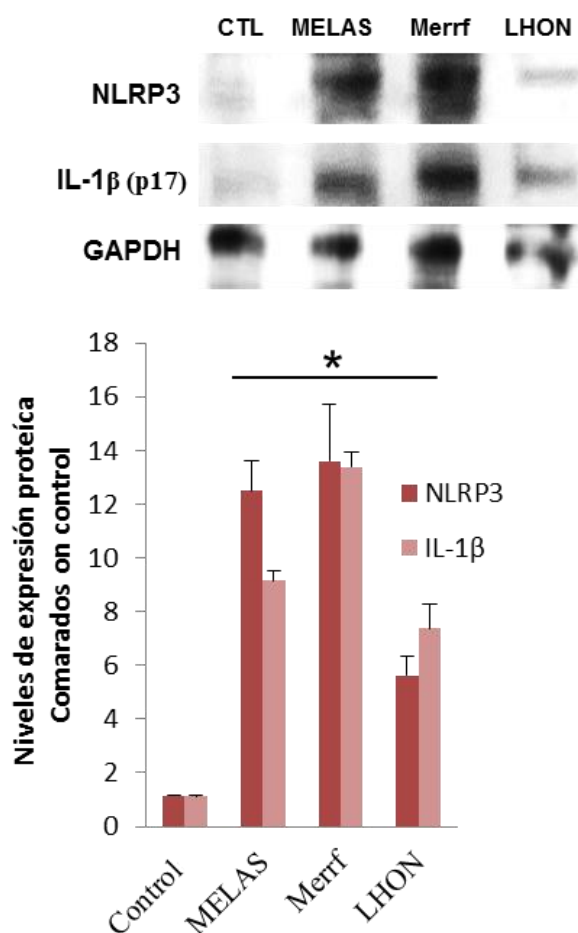


Figura 35. Niveles de expresión proteica de NLRP3 y IL-1 β (p17) analizados en fibroblastos de MELAS, MERRF y LHON por Western Blot. Los niveles de proteína se determinaron por análisis densitométrico (IOD, intensidad óptica integrada) de tres transferencias de Western diferentes y se normalizó a la señal de GAPDH en comparación con un grupo de 5 sujetos control emparejados por sexo y edad. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * P <0,001; ** P <0,005 entre los controles y los pacientes de FM.

Para confirmar la condición patológica de la mutación descrita independiente al fondo nuclear, se generaron líneas celulares transmitocondriales (híbridos citoplasmáticos o cíbridos) utilizando la línea de osteosarcoma 143B206 rho0 celular (King y Attardi, 1989) y las mitocondrias de las plaquetas de la paciente 3. Los cíbridos control también se

generaron mediante el uso de las mitocondrias de las plaquetas de individuos sanos. Mediante genotipado, confirmamos que los cíbridos control y mutantes albergaban el ADNmt de las plaquetas de los donantes correspondientes (**Figura 36**).

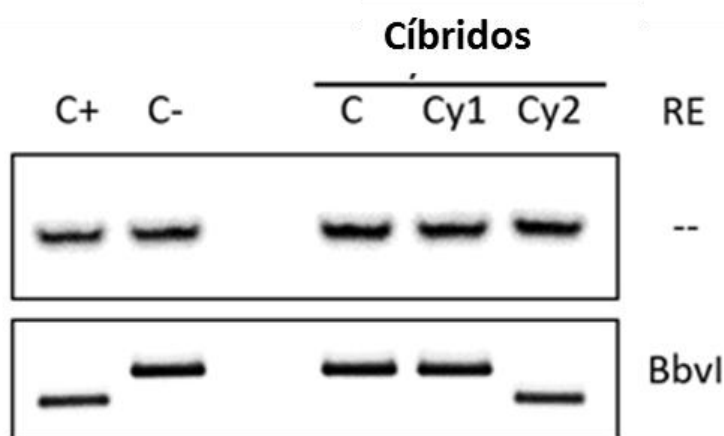


Figura 36. Genotipado de cíbridos. Análisis molecular de cíbridos generados a partir de osteosarcoma 143B206 línea celular rho0 (C), con el fondo nuclear común, y las plaquetas de la paciente 3 (cy 1 y 2). La mutación m15.804 no se introdujo en células Cy2. Por tanto se usó el clon Cy1.

Los cíbridos seleccionados como portadores de la mutación mostraron una considerable reducción en la actividad del complejo III (**Figura 37**). Además, los niveles de ATP en los cíbridos mutantes fueron menores que en los cíbridos control (**Figura 38A**). Los niveles de ROS mitocondrial en los cíbridos mutantes también fueron significativamente más altos que en los cíbridos control (**Figura 38B**). Interesantemente, los niveles de expresión de proteínas IL- 1 β (p17) se mostraban incrementados en los cíbridos mutantes (**Figura 38C**). Estos resultados sugieren fuertemente que el ADNmt mutado es, de hecho,

responsable de las alteraciones bioquímicas que ocurren en las células del paciente así como que se muestra asociado a la activación del inflammasoma.

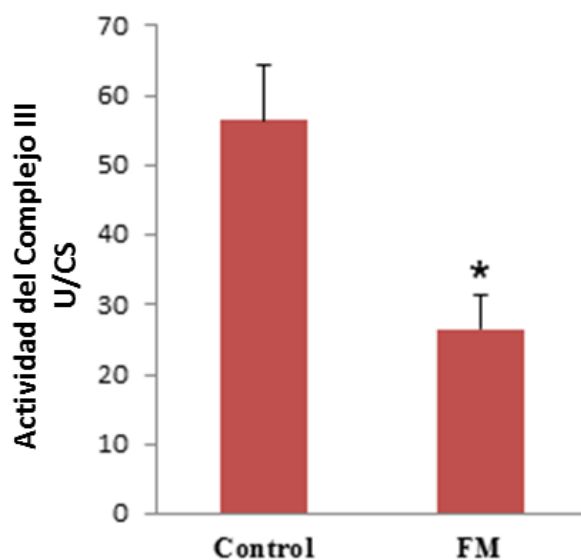


Figura 37. Actividad mitocondrial del complejo III. Los datos representan la media±SD de tres experimentos separados. * $p < 0.001$ entre los controles y los pacientes con FM.

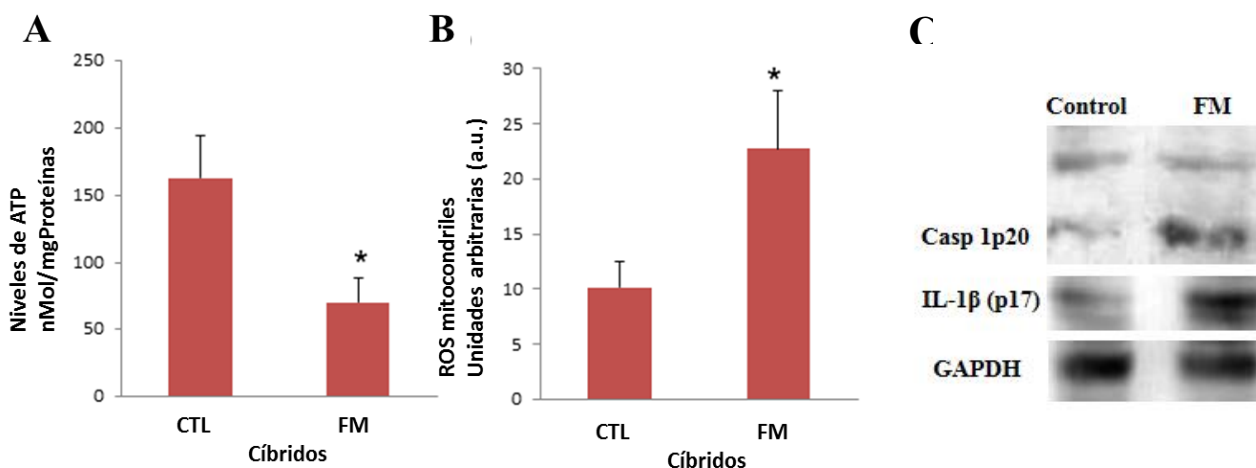


Figura 38. A. Niveles bioenergéticos de cíbridos mutantes evaluados mediante la determinación de ATP. B. la producción de ROS mitocondriales fue analizado en cíbridos por citometría de flujo. C. Caspasa 1p20 y IL- 1 β (p17) se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western.. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $p < 0.001$ entre los controles y los pacientes con FM.

La evaluación del efecto del cambio de aminoácido en la estructura de la proteína mostró que la mutación (rojo) se localizó en una zona opuesta del sitio de unión ubiquinona (verde) (**Figura 39**). Por tanto, se prevé una buena respuesta de las células al tratamiento con CoQ₁₀.

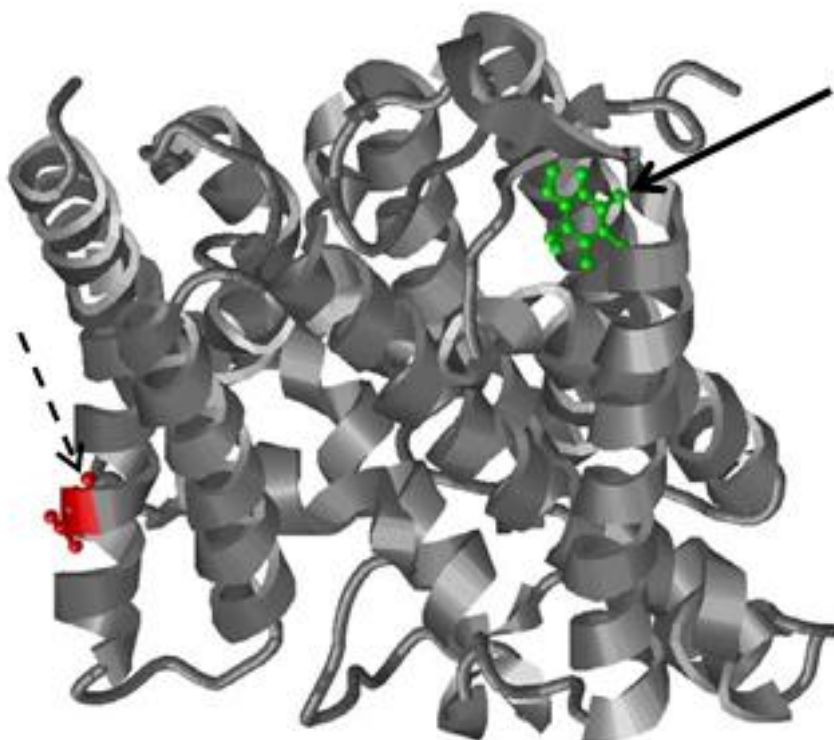


Figura 39. Estructura tridimensional del mtCYB mostrando la mutación (rojo) localizada en la zona opuesta al sitio de unión ubiquinona (verde).

De acuerdo a esto, los fibroblastos de la paciente con la mutación fueron suplementados con CoQ₁₀ 30 µM. Tras 24 h de tratamiento, se observó una significativa mejora de la tasa OCR así como de la capacidad respiratoria de repuesto lo que demostró una restauración metabólica en los fibroblastos tratados a pesar de la presencia de la mutación (Figura 40).

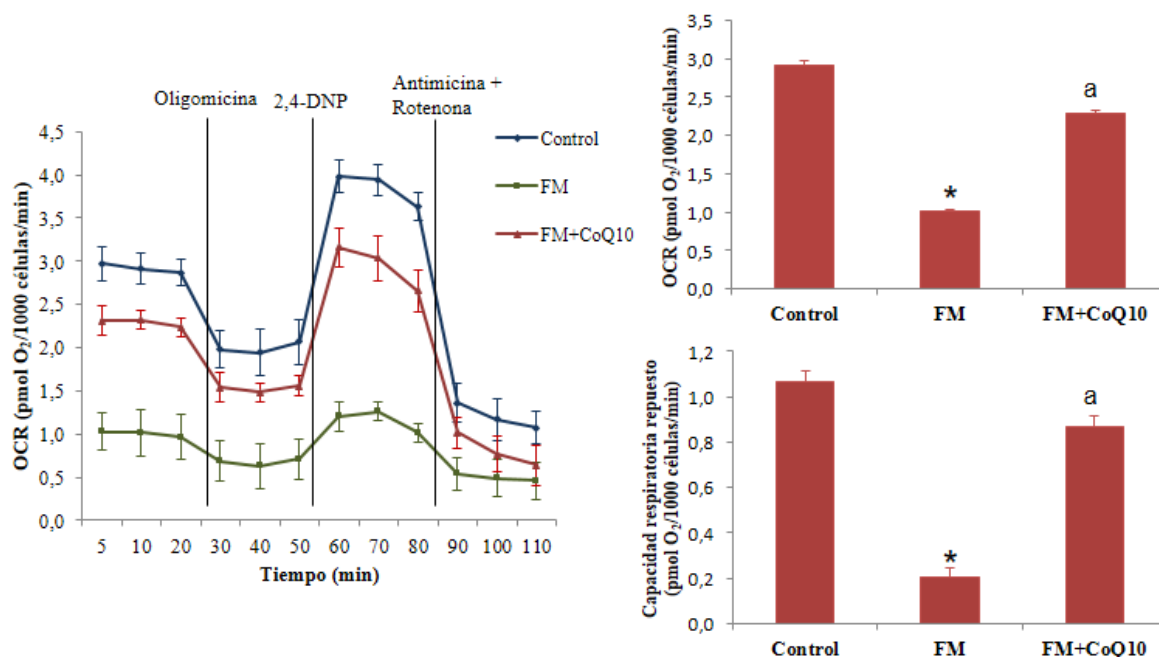


Figura 40. Fisiopatología de fibroblastos mutantes de paciente con mutación después del tratamiento con CoQ₁₀ 30 µM. La OCR se controló a través Seahorse XF-24 extracelular Flux Analyzer con la inyección secuencial de oligomicina (1 mg / mL), 2,4-DNP (100 mM), rotenona (1 M) en el punto de tiempo indicado en cada pocillo, después de la medición del ritmo basal. La OCR basal fue marcadamente afectada en las células de paciente, y mejoró con CoQ₁₀. Además, la capacidad respiratoria de repuesto (SRC) en fibroblastos FM mostró una disminución significativa que fue mejorada por CoQ₁₀. Los datos representan la media - SD de tres experimentos separados. * p <0,001; ** p <0,005 entre los controles y los pacientes de FM. p <0,001 entre los pacientes con FM y el tratamiento con CoQ₁₀.

La deficiencia de CoQ₁₀ se ha asociado comúnmente con enfermedades mitocondriales, y su suplementación se ha documentado como un tratamiento efectivo (Roos et al., 2014; Quinzii et al., 2010; Hargreaves, 2014; Chen et al., 2015). Teniendo en cuenta que previamente se ha demostrado que el tratamiento con CoQ₁₀ induce una significativa mejora clínica en pacientes con FM (Cordero et al., 2012, 2013a), todos los pacientes con mutación comenzaron el tratamiento oral con CoQ₁₀ (5 mg/Kg/día). Después de 7 meses, los pacientes mostraron una mejora significativa en los síntomas clínicos asociados con la restauración a niveles normales de los parámetros bioquímicos alterados (**Tabla 8**).

Tabla 8. Cambios clínicos y bioquímicos en la paciente 3 (probando) y los miembros de la familia portadores de la mutación (identificados según el pedigrée de la figura 9) tras 7 meses de tratamiento oral con CoQ₁₀.

Parámetros	Probando		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4		Paciente 5		Paciente 6	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Puntos dolorosos	12	6	14	7	11	7	13	5	11	4	13	3
FIQ, rango 0-80	66	21	69	20	64	22	67	20	57	18	51	16
Dolor	8	3	8	4	8	2	9	4	7	2	7	2
Fatiga	7	3	8	2	8	4	8	1	8	1	8	3
Fatiga matutina	5	2	5	2	6	2	6	1	6	1	5	2
Rigidez	9	2	7	3	8	2	7	2	6	3	4	2
Ansiedad	6	3	7	3	7	2	8	3	7	2	5	1
Depresion	7	2	6	3	8	2	8	4	5	2	4	1
VAS dolor, rango 0-10	8	3	9	3	7	3	9	4	7	3	8	1
VAS Fatiga, rango 0-10	7	3	7	3	8	2	8	2	8	1	7	2
Cítrate sintasa (Actividad específica)	4.7	18.3	3.7	15.6	4.1	15.9	3.8	16.6	8.1	21.3	6.3	19.1
Niveles deATP (nMol/mgProteína)	5.2	20.4	4.1	19.4	5.8	17.4	3.9	22.1	5.4	26.4	3.7	23.4
IL-1 β (pg/ml)	24.3	5.4	26.1	6.1	21.3	7.1	26.3	4.8	25.2	4.4	27.1	3.4
mtDNA copy number(nDNA/mtDNA)	0.4	0.9	0.5	0.8	0.6	0.9	0.3	0.7	0.3	1	0.3	0.9

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral ha estudiado el papel de la disfunción mitocondrial como un importante agente relacionado con la fisiopatología de la FM, así como su implicación en el estrés oxidativo descrito en estos pacientes y su relación con un nuevo mecanismo inflamatorio como es el complejo NLRP3-inflamasoma. Dado que se trata de una patología de enorme complejidad tanto clínica como científica por su gran heterogeneidad, nuestro estudio pretende aportar una caracterización de los mecanismos moleculares que competen a una población de pacientes de esta patología, o más bien, lo que podríamos definir como un subgrupo. Para definir este conjunto de pacientes, hemos estudiado tres importantes bloques. Por un lado la inflamación, donde se han realizado numerosas contribuciones que sugieren que las citoquinas pueden desempeñar un papel importante en la FM (Salemi et al., 2003; Ross et al., 2010; Wang et al., 2008; Bazzichi et al., 2007; Nakamura et al., 2010; Togo et al., 2009) e incluso se ha observado una correlación entre citoquinas y varios síntomas comunes en FM (Bazzichi et al., 2007; Maes et al., 1999). Sin embargo, hay resultados discrepantes en cuanto a la implicación de la inflamación en la FM (Menzies et al., 2010). Nuestro estudio ha mostrado un incremento de las dos citoquinas implicadas con el complejo inflamasoma. Además, estos pacientes mostraron una importante disfunción mitocondrial en las células mononucleares. La inhibición del complejo I o III de la cadena respiratoria mitocondrial ha demostrado que induce la producción de ROS y una consecuente activación del complejo NLRP3-inflamasoma (Zhou et al., 2009). En este sentido, nuestros datos en las PBMC de pacientes con FM indican una deficiencia en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, acompañada de una deficiencia de CoQ₁₀ y aumento de la producción de ROS mitocondrial, así como un aumento en los niveles de expresión de

marcadores de daño oxidativo en el ADN, ambos activadores del inflamasoma y la inflamación (Mabley et al., 2005; Zhou et al., 2009).

El inflamasoma ha surgido en los últimos años como un sensor del estrés metabólico y oxidativo. De hecho, se ha implicado en el desarrollo de las principales enfermedades metabólicas como la gota, la diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina inducida por la obesidad. Por otra parte, la NLRP3-inflamasoma se ha implicado en otras patologías humanas tales como el cáncer, la asbestosis y la enfermedad de Alzheimer (Menu y Vince, 2011). Es por ello que en los últimos años las investigaciones se han centrado que la identificación de nuevas patologías en las que este complejo tenga una implicación directa o indirecta. En nuestros pacientes, hemos observado su implicación por el aumento de la activación de proteínas propias del inflamasoma como NLRP3, caspasa 1 e IL-1 β en las PBMC y el aumento de los niveles séricos de citoquinas como IL-1 β e IL-18. En respuesta a la disfunción mitocondrial, y dado que la inflamación puede ser activada por el estrés oxidativo, las células activan sus mecanismos de defensa antioxidante (Pagano et al., 2014). Sin embargo, se ha descrito que los mecanismos de compensación antioxidante en los pacientes con FM se encuentran reducidos en los pacientes de FM, lo que conduce a un continuo incremento del estrés oxidativo que mantiene el daño oxidativo en las mitocondrias y otros orgánulos celulares y ADN (Altindag et al., 2006; Bagis et al., 2005; Ozgocmen et al., 2006) y, por tanto, una predisposición al daño inflamatorio. En nuestro estudio, la inflamación se ha mostrado asociada con síntomas de FM con correlaciones significativamente positivas entre IL-1 β y IL-18 niveles de suero y las puntuaciones de dolor lo que sugiere un componente inflamatorio en la inducción de dolor. Estos resultados muestran consonancia con publicaciones previas que señalan el papel patológico de los niveles séricos de IL-1 β en la FM (Salemi et al., 2003; Ross et al., 2010). Además, Feng y colaboradores han

demostrado la implicación del gen MEFV que codifica para la pirina, un importante regulador del inflamasoma controlando de este modo la activación de la caspasa-1 y por tanto, la liberación de IL-1 β (Feng et al., 2009). Estos datos preliminares de Feng et al., están de acuerdo con nuestros resultados. Por otro lado, según nuestros resultados, la correlación negativa entre los niveles de IL-1 β e IL-18 y niveles de CoQ₁₀ y la correlación positiva con los niveles de ROS mitocondriales y puntuaciones de la escala de dolor son compatible con la hipótesis de que la inflamación en FM depende de la disfunción mitocondrial. Para demostrar esto, realizamos un ensayo in vitro de inhibición del CoQ₁₀ en el que reproducimos los mismos resultados de disfunción mitocondrial y activación del complejo inflamasoma. Estos datos sugieren que en FM, la activación del inflamasoma es dependiente de una disfunción mitocondrial en la cual, el CoQ₁₀ adquiere un papel importante. La deficiencia de CoQ₁₀ provoca una reducción de las actividades del complejo II + III, el complejo III y complejo IV, una reducción de la expresión de las proteínas mitocondriales implicadas en la fosforilación oxidativa, una disminución de potencial de membrana mitocondrial, un aumento de la producción de ROS, la activación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), mitofagia de las mitocondrias disfuncionales, y una reducción del crecimiento celular (Quinzii et al., 2008; Rodríguez-Hernández et al., 2009). Dado que en las PBMC de pacientes con FM hemos observado una clara deficiencia de CoQ₁₀ y disfunción mitocondrial, hemos intentado profundizar en el metabolismo mitocondrial a través de un modelo in vitro comúnmente usado en el estudio de las enfermedades mitocondriales, como son los fibroblastos de piel. En nuestros experimentos mostramos definitivamente que existe una disfunción mitocondrial en los fibroblastos derivados de los pacientes con FM. Alteraciones como la deficiencia de CoQ₁₀ y de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, acompañada de un déficit de las proteínas de los complejos, un descenso de la masa

mitocondrial muestran que efectivamente existe afectación de la actividad mitocondrial. Dado que existe una alteración en la cadena de transportes de electrones y por tanto, un deterioro de la biosíntesis de ATP, cabe esperar una reducida respiración celular y reducidos niveles de ATP. Efectivamente, nuestros experimentos mostraron un descenso de la respiración celular y de la capacidad respiratoria de repuesto mostrando un estado forzado para producir ATP que efectivamente se encontró reducido.

Otra consecuencia propia de la disfunción mitocondrial es la alta producción de ROS, como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxílicos. Existe la idea de que la afectación de la función mitocondrial no llevaba aparejado un aumento en la generación de ROS (Rustin P, et al, 2004). Sin embargo, nuestros datos demuestran un claro incremento de los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos de FM. La formación de estas ROS es un efecto secundario normal de la cadena de transporte electrónico, pero el porcentaje de electrones transportados que se pierden como radicales libres aumenta de forma considerable cuando la cadena respiratoria sufre algún tipo de disfunción, generando en el organismo un incremento del estrés oxidativo. En este caso influyen varios factores. Por un lado, la falta de un transportador de electrones esencial en la cadena respiratoria como es el CoQ₁₀ estaría alterando el flujo electrónico normal a lo largo de la cadena, por lo que muchos de estos electrones podrían escapar como radicales libres. Por tanto nuestros datos concuerdan con los de otros autores en los que un grado similar de disfunción mitocondrial induce un incremento de la producción de ROS (Cotán et al., 2011; De la Mata et al., 2012). Por otro lado, la deficiente actividad de otros antioxidantes como MnSOD y catalasa, conlleva una reducida respuesta defensiva. En este sentido, nuestros datos concuerdan con datos previos sobre la reducida actividad de superóxido dismutasa y catalasa en suero de paciente con FM (Altindag et al., 2006; Bagis et al., 2005; Ozgocmen et al., 2006). La MnSOD es la subunidad de la

superóxido dismutasa que se encuentra en la matriz mitocondrial (Turrens, 2003) por lo que el descenso observado por nosotros en fibroblastos podría ser consecuencia de la baja masa mitocondrial observada. Además, el CoQ₁₀ ha mostrado tener un papel en la regulación de otros antioxidantes con la SOD, catalasa, o el ascorbato por lo que su deficiencia podría estar implicada en la baja respuesta de estos antioxidantes (Villalba et al., 2000; Modi et al., 2006).

Parece clara la implicación de la mitocondria en la fisiopatología de la FM. Además, esta disfunción observada es muy similar a la producida en los trastornos mitocondriales. Estos trastornos son un grupo importante de enfermedades genéticas caracterizadas por la alteración de la fosforilación oxidativa y de la bioenergética y que presentan una gran variabilidad de los síntomas, con una variada afectación de órganos, y un curso clínico muy heterogéneo. Muchos de los síntomas asociados con las enfermedades mitocondriales están comúnmente presentes en pacientes con FM: intolerancia al ejercicio, fatiga, miopatía y varias alteraciones neurológicas como la pérdida de la audición (Bayazit et al., 2002; Watson et al., 2009; Wolfe et al., 2012).

Por otro lado, las enfermedades mitocondriales están asociadas con la herencia materna (Haas et al., 2008). En este mismo sentido, en los pacientes con FM, aunque el factor de la herencia se ha documentado, la ausencia de mecanismos patogénicos conocidos complica los estudios familiares y hereditarios. Diversos estudios sobre agregación familiar revelaron altas posibilidades de factores hereditarios en FM. Arnold y colaboradores compararon la prevalencia de la FM con otras enfermedades de dolor como la artritis reumatoide y encontraron un factor más heredado en el grupo de FM (Arnold et al., 2004). En este sentido, Buskila y colaboradores han observado una alta prevalencia de la FM en los hijos de madres con FM (Buskila et al., 1996). En base a estas conclusiones, en nuestro estudio se muestra por primera vez la aparición de una mutación

en el ADNmt en una familia con varios miembros diagnosticados de FM. Como era de esperar, la mutación fue transmitida por vía materna y estuvo presente en todos los miembros de la familia con manifestación clínica típica de FM como ya hemos mencionado antes. Estudios fisiopatológicos mostraron pruebas de una disfunción mitocondrial en las células del paciente. La mutación estuvo ausente en los otros pacientes y controles sanos incluidos en el estudio por lo que, a pesar de la necesidad de analizar más individuos para confirmar estos resultados, nuestros datos podrían estar sugiriendo que la mutación podría estar asociada a la enfermedad en esta familia. La mutación encontrada en nuestro estudio convierte una valina altamente conservada en la posición 353 a alanina en el dominio transmembrana de la mtCYB, que puede afectar a la transferencia de electrones desde el ubiquinol (forma reducida del CoQ₁₀) al citocromo c y que afecte a la utilización de la energía al trasladar protones desde la membrana mitocondrial interna hacia el exterior, aumentando la producción de ROS (Lanciano et al., 2013).

Anteriormente, la disfunción mitocondrial en la FM ha sido ampliamente documentada. Por ejemplo, estudios en biopsias musculares han demostrado la presencia de marcadores inflamatorios, acumulaciones mitocondriales subsarcolémicas, mitocondrias anormales, mayor incidencia de fibras rojas rasgadas, y defectos de la citocromo c oxidasa (complejo IV de la fosforilación oxidativa) (Kalyan-Raman et al., 1984; Yunus et al., 1986; Pongratz y Späth et al., 1998). A pesar de un deterioro mitocondrial marcado en las células de pacientes de FM observado en nuestro estudio, el análisis de secuencias de ADN mitocondrial en otros pacientes no mostró alteraciones importantes, tales como mutaciones o deleciones que pudieran justificar los defectos mitocondriales. Por lo tanto, es razonable postular que las alteraciones del ADN mitocondrial sólo pueden ser detectados en un subgrupo reducido de pacientes diagnosticados de FM.

Las enfermedades mitocondriales presentan una prevalencia reducida (5,7 por 100.000 en la población mayor de 14 años de edad) (Arpa et al., 2003), y los síntomas pueden ser confundidos y frecuentemente etiquetados con otras enfermedades como la FM o síndrome fatiga crónica (van de Glind et al., 2007). En este sentido, Villanova y colaboradores reportaron en 1999 el caso de una mujer de 45 años de edad con FM y una delección en el ADNmt de alrededor de 4 kb y proponen la presencia de pacientes con enfermedades mitocondriales entre los pacientes diagnosticados con FM (Villanova et al., 1999). En este sentido, nuestros datos confirman este informe anterior en un nuevo caso de la familia que presentamos. En nuestros pacientes podría ser interesante estudiar una biopsia muscular, sin embargo, los pacientes no aceptaron esta intervención por ser muy invasiva. A pesar de esto, mientras que el músculo esquelético es el tejido más utilizado para estudios de enfermedades mitocondriales, también tiene limitaciones. Muchos pacientes han sido reportados con defectos enzimáticos detectables en diferentes tejidos, pero actividades enzimáticas normales en músculo esquelético (Bagis et al., 2005). Acerca de esto, cualquiera que sea el órgano afectado, se recomienda realizar una biopsia de la piel para obtener cultivos de fibroblastos para el estudio de las enfermedades mitocondriales bajo sospecha según la recomendación del Comité Diagnóstico de la Sociedad de Medicina mitocondrial (Haas et al., 2008).

En este estudio, también proponemos la implicación del complejo inflamasoma, sensor para el estrés metabólico, en la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales. La inhibición del complejo I o III de la cadena respiratoria mitocondrial ha demostrado que induce la producción de ROS y la activación del NLRP3-inflamasoma (Zhou et al., 2011). Por otro lado, la inflamación se ha propuesto participar en los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades mitocondriales (Vattemi et al., 2013). Además, eventos inflamatorios se han observado en pacientes con una mutación 3251A> G

apoyando la hipótesis de que las enfermedades mitocondriales inducen una respuesta inflamatoria patológica (Mancuso et al., 2013). En este sentido, hemos mostrado la activación del NLRP3-inflamasoma en fibroblastos de tres enfermedades mitocondriales conocidos con mutaciones en el Complejo I, gen tRNALeu mitocondrial (UUR) y gen MT-TK así como en nuestra nueva mutación. Por lo tanto, NLRP3-inflamasoma podría ser inducida por diferentes mutaciones mitocondriales en las que el estrés oxidativo esté implicado (Haas et al., 2008; Hayashi y Cortopassi, 2015). Otro resultado interesante mostrado en este estudio es el efecto de la inhibición NLRP3 en los fibroblastos del paciente. Un crecimiento celular correcto es un importante marcador del estado metabólico de la célula. Los fibroblastos derivados de pacientes con enfermedades mitocondriales tienen un crecimiento relativamente reducido (Cotán et al., 2011), por lo que el incremento del crecimiento celular de los fibroblastos de la paciente 3 indica una posible mejoría en el metabolismo celular. Además, esta mejora demuestra que la activación inflamasoma tiene un papel fisiopatológico en el fenotipo de los fibroblastos de paciente 3. Como la inflamación se ha demostrado que induce la disfunción mitocondrial (Cherry et al., 2015), una inhibición de varias citoquinas podría prevenir el daño mitocondrial y la muerte celular. De acuerdo con esto, la inhibición del inflamasoma podría ser una nueva diana farmacológica en enfermedades mitocondriales.

Tenemos que tener en cuenta, que la mutación encontrada 15804T> C es una rara variante identificada en 20/29,867 secuencias en el GeneBank de Mitomap (www.mitomap.org). Sin embargo, comparamos nuestra mutación con otras mutaciones que se han mostrado causar un cambio patológico en el síndrome de Leigh como el reportado por Mkaouar-Rebai et al., 2011 y este también es una variante identificada en 13/29 867 secuencias en el GeneBank de Mitomap. Del mismo modo, otros cambios polimórficos se han implicado en condiciones patológicas tales como m.15812G>A (211/29867) o

m.14502T>C (118/29867) en neuropatía óptica hereditaria de Leber demostrando la posibilidad de que estos cambios identificados como comunes desarrollen fisiopatología. A este respecto, los estudios epidemiológicos han asociado haplogrupos mitocondriales a las enfermedades mitocondriales. Por lo tanto, es muy difícil encontrar la etiología de estas enfermedades debido a su faceta multifactorial en la que nos encontramos con la combinación de factores genéticos y ambientales (Gómez-Durán et al., 2010). Todos estos factores contribuyen individualmente sólo en una pequeña parte al desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, las mutaciones definitorias de haplogrupos podrían comportarse como factores de susceptibilidad, pero podrían tener también un pequeño efecto sobre la fisiopatología. Debido a que los efectos de estos cambios serían altamente dependiente del "contexto" en el que la variante genética está actuando, la activación de eventos inflamatorios podría ayudar a explicar el contexto patológico inducido por unas mutaciones definitorias de haplogrupos. A este respecto, un enfoque celular está disponible para estudiar este contexto, el cual implica el uso de lo que se conoce como "cíbridos transmitocondriales" (Gómez-Durán et al., 2010). En nuestro estudio, los cíbridos mostraron los mismos eventos fisiopatológicos de fibroblastos y la activación inflamatoria.

La implicación más importante de estos datos podría ser el papel potencial de la activación del complejo inflamatorio y la posterior liberación de IL-1 β en los diferentes tejidos afectados en las enfermedades mitocondriales (cerebro, músculo, riñón, corazón, ojo) (Benetti et al., 2013). Probablemente, un alto contenido de mitocondrias defectuosas puede inducir la activación NLRP3-inflamatorio por el aumento de la producción de ROS. En este sentido, la inhibición del inflamatorio puede representar una nueva opción terapéutica interesante en enfermedades mitocondriales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ROS sirven como importantes inductores de la activación del inflamatorio,

por lo que el tratamiento con antioxidantes también podría ser eficaz en estas enfermedades (Harijith et al., 2014). El actual enfoque farmacológico de las enfermedades mitocondriales se basa en la eliminación de metabolitos tóxicos, utilizando eliminadores de ROS y la administración de diferentes compuestos deficientes como CoQ₁₀. En consecuencia, el complejo inflamasoma que se activa por la producción de ROS mitocondriales puede ser inhibida selectivamente por los antioxidantes del tipo lipofílico. Curiosamente, hemos observado que el CoQ₁₀ inhibe la activación de NLRP3-inflamasoma en PBMC así como una significativa mejora de la respiración celular en los fibroblastos y una mejora clínica y molecular en los pacientes de la familia tratada con CoQ₁₀. Además, el compuesto MitoQ, un derivado de CoQ₁₀ dirigido a las mitocondrias, también se ha observado inhibir al NLRP3-inflamasoma (Dashdorj et al., 2013). Como el CoQ₁₀ es un tratamiento común para las enfermedades mitocondriales (Montini et al., 2008; Quinzii et al., 2010; Hargreaves, 2014), aquí mostramos otro posible mecanismo por el cual el tratamiento CoQ₁₀ puede ser eficaz en estos pacientes.

En resumen, en nuestro estudio proponemos la implicación de la disfunción mitocondrial en un conjunto de pacientes, así como la implicación del complejo inflamasoma como una consecuencia de tal disfunción mitocondrial. Además, una disfunción mitocondrial puede ocurrir por numerosos factores entre los que destacan la aparición de mutaciones en el ADNmt. En este caso, y dado el grado de similitud en cuanto a sintomatología y patrón de herencia en muchos casos de fibromialgia con las miopatías mitocondriales, el análisis de secuencias de ADNmt podría estar indicado en pacientes con FM con una clara evidencia de herencia materna enmascarando enfermedades mitocondriales entre los pacientes con FM que podrían beneficiarse de tener un diagnóstico genético por análisis de secuencias del ADNmt y ser candidatos para el tratamiento con compuestos orientados a la mitocondria. Por otra parte, la implicación del complejo inflamasoma como un sensor

de estrés podría ser inductor del daño en los tejidos y agravar los síntomas en estas enfermedades.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Nuestro estudio aporta las siguientes conclusiones en base a los resultados obtenidos en nuestro proyecto:

1. Los fibroblastos de pacientes con FM presentan una disfunción mitocondrial con un déficit en la cadena respiratoria mitocondrial, déficit de CoQ₁₀ y altos niveles de daño oxidativo.
2. Los pacientes con FM que presentan herencia materna así como síntomas tales como intolerancia al ejercicio, miopatía, etc, son candidatos al diagnóstico genético mitocondrial.
3. Las mutaciones en el ADNmt podrían encontrarse en pacientes con patologías mitocondriales que mimetizan el fenotipo clínico de la FM.
4. Las mutaciones en el ADNmt podrían explicar el alto grado de herencia materna descrito en algunos pacientes diagnosticados de FM.
5. La disfunción mitocondrial induce la activación del complejo inflammasoma en pacientes con FM.
6. El complejo inflammasoma interviene en la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales mediadas por la disfunción mitocondrial.
7. La inhibición del inflammasoma podría ser una terapia prometedora para los pacientes con enfermedades mitocondriales.
8. El tratamiento con CoQ₁₀ induce una mejora de la disfunción mitocondrial y de la activación del complejo inflammasoma reduciendo las manifestaciones patológicas de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Acin-Perez R, Enriquez JA. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta*. 1837:444-50, 2004.

Andreu AL and Gonzalo-Sanz R. Las enfermedades mitocondriales: Una clasificación para el siglo XXI. *Neurología*. 19:15-22, 2004.

Alnigenis MNY and Barland P. Fibromyalgia syndrome and serotonin. *Clin Exp Rheumatol*. 19:205–210, 2001.

Area-Gomez E, Schon EA. Mitochondrial genetics and disease. *J Child Neurol*. 29:1208-15, 2014.

Arnold LM, Hudson JI, Hess EV, Ware AE, Fritz DA, Auchenbach MB, Starck LO, Keck PE Jr. Family study of fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 50:944-52, 2004.

Arpa J, Cruz-Martínez A, Campos Y, Gutiérrez-Molina M, García-Rio F, Pérez-Conde C, Martín MA, Rubio JC, Del Hoyo P, Arpa-Fernández A, Arenas J. Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients. *Muscle Nerve*. 28:690-5, 2003.

Bagis S, Tamer L, Sahin G, Bilgin R, Guler H, Ercan B, Erdogan C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatol Int*. 25:188-90, 2005.

Bayazit YA, Gürsoy S, Ozer E, Karakurum G, Madenci E. Neurotologic manifestations of the fibromyalgia syndrome. *J Neurol Sci*. 196:77-80, 2002.

Bazzichi L, Giannaccini G, Betti L, Italiani P, Fabbrini L, Defeo F, Giacomelli C, Giuliano T, Rossi A, Uccelli A, Giusti L, Mascia G, Lucacchini A, Bombardieri S. Peripheral benzodiazepine receptors on platelets of fibromyalgic patients. *Clinical Biochem*. 39:867–72, 2006.

Bazzichi L, Rossi A, Massimetti G, Giannaccini G, Giuliano T, De Feo F, Ciapparelli A, Dell'Osso L, Bombardieri S. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clin Exp Rheumatol*. 25:225-30, 2007.

Bazzichi L, Giannaccini G, Betti L, Fabbrini L, Schmid L, Palego L, Giacomelli C, Rossi A, Giusti L, De Feo F, Giuliano T, Mascia G, Bombardieri S, Lucacchini A. ATP, calcium and magnesium levels in platelets of patients with primary fibromyalgia. *Clin Biochem*. 41: 1084-90, 2008.

Benetti E, Chiazza F, Patel NS, Collino M. The NLRP3 Inflammasome as a novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders. *Mediators Inflamm*. 2013:678627, 2013.

Bengtsson A, Henriksson KG, Larsson J. Muscle biopsy in primary fibromyalgia. Light-microscopical and histochemical findings. *Scand J Rheumatol*. 15:1-6, 1986.

Bengtsson A. The muscle in fibromyalgia. *Rheumatology (Oxford)*. 41:721-4, 2002.

Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. 42:W252-8, 2014.

Bonfield JK, Rada C, Staden R. Automated detection of point mutations using fluorescent sequence trace subtraction. *Nucleic Acids Res*. 26:3404-9, 1998.

Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet*. 11:8. 1995.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254, 1976.

Buskila D, Neumann L, Hazanov I, Carmi R. Familial aggregation in the fibromyalgia syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 26:605-11, 1996.

Buskila D, Cohen H, Neumann L, Ebstein RP. An association between fibromyalgia and the dopamine D4 receptor exon III repeat polymorphism and relationship to novelty seeking personality traits. *Mol Psychiatry.* 9:730–731, 2004.

Chai J and Shi Y. Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *Natl Sci Rev.* 1: 101-118, 2014.

Chen Z, Zhao Z, Ye Q, Chen Y, Pan X, Sun B, Huang H, Zheng A. Mild clinical manifestation and unusual recovery upon coenzyme Q₁₀ treatment in the first Chinese Leigh syndrome pedigree with mutation m.10197 G>A. *Mol Med Rep.* 11:1956-62, 2015.

Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015, 2000.

Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet.* 54:966-74, 1994.

Choo-Kang AT, Lynn S, Taylor GA, Daly ME, Sihota SS, Wardell TM, Chinnery PF, Turnbull DM, Walker M. Defining the importance of mitochondrial gene defects in maternally inherited diabetes by sequencing the entire mitochondrial genome. *Diabetes*. 51:2317-20, 2002.

Cordero MD, De Miguel M, Moreno-Fernández AM, Carmona López IM, Garrido Maraver J, Cotán D, Gómez Izquierdo L, Bonal P, Campa F, Bullón P, Navas P, Sánchez Alcázar JA. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implication in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Res Ther*. 12:R17, 2010.

Cohen BH, Gold DR. Mitochondrial cytopathy in adults: what we know so far. *Cleve Clin J Med*. 68:625-6, 629-42, 2001.

Cordero MD, Cotán D, del-Pozo-Martín Y, Carrión, AM, de Miguel M, Bullón P, Sánchez-Alcazar JA. Oral coenzyme Q10 supplementation improves clinical symptoms and recovers pathologic alterations in blood mononuclear cells in a fibromyalgia patient. *Nutrition*. 28:1200-3, 2012.

Cordero MD, Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Culic O, Carrión AM, Alvarez-Suarez JM, Bullón P, Battino M, Fernández-Rodríguez A, Sánchez-Alcazar JA. Can Coenzyme Q10 Improve Clinical and Molecular Parameters in Fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal*. 19:1356-1361, 2013a.

Cordero MD, Díaz-Parrado E, Carrión AM, Alfonsi S, Sánchez-Alcazar JA, Bullón P, Battino M, de Miguel M. Is inflammation a mitochondrial dysfunction-dependent event in Fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal*. 18:800-7, 2013b.

Cotán D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Ávila M, Rodríguez-Hernández A, Gómez Izquierdo L, De la Mata M, De Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Jackson S, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. Secondary coenzyme Q10

deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J.* 25:2669-87, 2011.

Cherry AD, Piantadosi CA. Regulation of mitochondrial biogenesis and its intersection with inflammatory responses. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Apr 20;22(12):965-76.

Crofford LJ, Engleberg NC, Demitrack MA. Neurohormonal perturbations in fibromyalgia. *Baillieres Clin Rheumatol.* 10:365–78, 1996.

Dashdorj A, Jyothi KR, Lim S, Jo A, Nguyen MN, Ha J, Yoon KS, Kim HJ, ParkJH, Murphy MP, Kim SS. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. *BMC Med.* 11:178, 2013.

De la Mata M, Garrido-Maraver J, Cotán D, Cordero MD, Oropesa-Ávila M, Izquierdo LG, De Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Ybot P, Jackson S, Sánchez-Alcázar JA. Recovery of MERRF fibroblasts and cybrids pathophysiology by coenzyme Q10. *Neurotherapeutics.* 9:446-63, 2012.

DiMauro S, Hirano M. Pathogenesis and treatment of mitochondrial disorders. *Adv Exp Med Biol.* 652:139-70, 2009.

Ding Z, Liu S, Wang X, Theus S, FanY, Deng X, Mehta JL. LOX-1 - dependent mitochondrial DNA damage and NLRP3 activation during systemic inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 451:637-43, 2014.

Dowling DK. Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype. *Biochim Biophys Acta.* 1840:1393-403, 2014.

Drewes AM, Andreasen A, Schrøder HD, Høgsaa B, Jennum P. Pathology of skeletal muscle in fibromyalgia: a histo-immuno-chemical and ultrastructural study. *Br J Rheumatol.* 32:479-83), 1993.

El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab.* 116:4-12, 2015.

Elinav E, Henao-Mejia J, Flavell RA. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* 6:4-13, 2013.

Feng J, Zhang Z, Li W, Shen X, Song W, Yang C, Chang F, Longmate J, Marek C, St Amand RP, Krontiris TG, Shively JE, Sommer SS. Missense mutations in the MEFV gene are associated with fibromyalgia syndrome and correlate with elevated IL-1beta plasma levels. *PLoS One*, 4:e8480, 2009.

Gerdle B, Forsgren MF, Bengtsson A, Leinhard OD, Sören B, Karlsson A, Brandejsky V, Lund E, Lundberg P. Decreased muscle concentrations of ATP and PCR in the quadriceps muscle of fibromyalgia patients--a 31P-MRS study. *Eur J Pain.* 17:1205-15, 2013.

Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet.* 9:3343-53, 2010.

Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol.* 226:274-86, 2012.

Gursoy S, Erdal E, Herken H, Madenci E, Alasehirli B, Erdal N. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int.* 23:104-107, 3003.

- Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, Wong LJ, Cohen BH, Naviaux RK. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab.* 94:16-37, 2008.
- Hargreaves IP. Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 49:105-11, 2014.
- Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol.* 5:352, 2014.
- Hayashi G, Cortopassi G. Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases. *Free Radic Biol Med.* 88:10-7, 2015.
- Hénriksson KG, Bengtsson A, Larsson J, Lindström F, Thornell LE. Muscle biopsy findings of possible diagnostic importance in primary fibromyalgia (fibrositis, myofascial syndrome). *Lancet.* 2:1395, 1982.
- Kalyan-Raman UP, Kalyan-Raman K, Yunus MB, Masi AT. Muscle pathology in primary fibromyalgia syndrome: a light microscopic, histochemical and ultrastructural study. *J Rheumatol.* 11:808-13, 1984.
- Klein R, Beansch M, Berg PA. Clinical relevance of antibodies against serotonin and gangliosides in patients with primary fibromyalgia syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 17:593–598, 1992.
- King MP and Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 246:500–503, 1989.
- Lanciano P, Khalfaoui-Hassani B, Selamoglu N, Ghelli A, Rugolo M, Daldal F. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta.* 1827:1332-9, 2013.

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F. National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* 58:26-35, 2008.

Li WW, Guo TZ, Liang D, Shi X, Wei T, Kingery WS and Clark JD. The NALP1 inflammasome controls cytokine production and nociception in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Pain.* 147:277-86, 2009.

Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science.* 349:1494-9, 2015.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275, 1951.

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: A correlated clinical, biochemical and morphological study. *J Clin Invest.* 41:1776-1804, 1962.

Mancuso M, Orsucci D, Ienco EC, Ricci G, Ali G, Servadio A, Fontanini G, Filosto M, Vielmi V, Rocchi A, Petrozzi L, Logerfo A, Siciliano G. An "inflammatory" mitochondrial myopathy. A case report. *Neuromuscul Disord.* 23:907-10, 2013.

Marazziti D, Dell'Osso L, Presta S, Pfanner C, Rossi A, Masala I, Baroni S, Giannaccini G, Lucacchini A, Cassano GB. Platelet [³H]paroxetine binding in patients with OCD-related disorders. *Psychiatry Res.* 89:223-8, 1999.

Marchetti C, Chojnacki J, Toldo S, Mezzaroma E, Tranchida N, Rose SW, Federici M, Van Tassell BW, Zhang S, Abbate A. A novel pharmacologic

- inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury after ischemia-reperfusion in the mouse. *J Cardiovasc Pharmacol.* 63:316-22, 2014.
- Martini C, Trincavelli ML, Tuscano D, Carmassi C, Ciapparelli A, Lucacchini A, Cassano GB, Dell'Osso L. Serotonin-mediated phosphorylation of extracellular regulated kinases in platelets of patients with panic disorder versus controls. *Neurochem Int.* 44:627–39, 2004.
- Maes M, Libbrecht I, Van Hunsel F, Lin AH, De Clerck L, Stevens W, Kenis G, de Jongh R, Bosmans E, Neels H. The immune-inflammatory pathophysiology of fibromyalgia: increased serum soluble gp130, the common signal transducer protein of various neurotrophic cytokines. *Psychoneuroendocrinology.* 24:371-83, 1999.
- Menzies V, Lyon DE. Integrated review of the association of cytokines with fibromyalgia and fibromyalgia core symptoms. *Biol Res Nurs.* 11:387-94, 2010.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid. Res.* 16:1215, 1988.
- Miyamae T, Seki M, Naga T, Uchino S, Asazuma H, Yoshida T, Iizuka Y, Kikuchi M, Imagawa T, Natsumeda Y, Yokota S, Yamamoto Y. Increased oxidative stress and coenzyme Q10 deficiency in juvenile fibromyalgia: amelioration of hypercholesterolemia and fatigue by ubiquinol-10 supplementation. *Redox Rep.* 18:12-9, 2013.
- Mkaouar-Rebai E, Ellouze E, Chamkha I, Kammoun F, Triki C, Fakhfakh F. Molecular-clinical correlation in a family with a novel heteroplasmic Leigh syndrome missense mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene. *J Child Neurol.* 26:12-20, 2011.

Modi K, Santani DD, Goyal RK, Bhatt PA. Effect of coenzyme Q10 on catalase activity and other antioxidant parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res.* 109:25-34, 2006.

Montini G, Malaventura C, Salviati L. Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med.* 358:2849-50, 2008.

Nakamura T, Schwander SK, Donnelly R, Ortega F, Togo F, Broderick G, Yamamoto Y, Cherniack NS, Rapoport D, Natelson BH. Cytokines across the night in chronic fatigue syndrome with and without fibromyalgia. *Clin Vaccine Immunol.* 17:582-7, 2010.

Neeck G. Pathogenic mechanisms of fibromyalgia. *Ageing Res Rev.* 1:243–55, 2002.

Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol.* DOI:10.1007/s00415-015-7884-3, 2015

Niu X, Arthur P, Abas L, Whisson M, Guppy M. Carbohydrate metabolism in human platelets in a low glucose medium under aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta.* 1291:97–106, 1996.

Ozgoçmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O. Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatol Int.* 26:585-97, 2006.

Pagano G, Aiello Talamanca A, Castello G, Cordero MD, d'Ischia M, Gadaleta MN, Pallardó FV, Petrović S, Tiano L, Zatterale A. Current experience in testing mitochondrial nutrients in disorders featuring oxidative stress and mitochondrial dysfunction: rational design of chemoprevention trials. *Int J Mol Sci.* 15:20169-208, 2014.

- Park JH, Phothimat P, Oates CT, Hernanz-Schulman M, Olsen NJ. Use of P-31 magnetic resonance spectroscopy to detect metabolic abnormalities in muscles of patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 41:406-13, 1998.
- Pongratz DE, Späth M. Morphologic aspects of fibromyalgia. *Z Rheumatol.* 57:47-51. 1998.
- Quinzii CM, Lopez LC, Von-Moltke J, Naini A, Krishna S, Schuelke M, Salviati L, Navas P, Dimauro S, Hirano M. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *Faseb J.* 22:1874-85, 2008.
- Quinzii CM, Hirano M. Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Dev Disabil Res Rev.* 16:183-8, 2010.
- Rodriguez-Hernandez A, Cordero MD, Salviati L, Artuch R, Pineda M, Briones P, Gomez Izquierdo L, Cotan D, Navas P, Sanchez-Alcazar JA: Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy.* 5:19-32, 2009.
- Roos S, Lindgren U, Ehrstedt C, Moslemi AR, Oldfors A. Mitochondrial DNA depletion in single fibers in a patient with novel TK2 mutations. *Neuromuscul Disord.* 24:713-20, 2014.
- Ross RL, Jones KD, Bennett RM, Ward RL, Druker BJ, Wood LJ. Preliminary Evidence of Increased Pain and Elevated Cytokines in Fibromyalgia Patients with Defective Growth Hormone Response to Exercise. *Open Immunol J.* 3:9-18, 2010.
- Russell IJ, Vipraio GA, Abraham GE. Red cell nucleotide abnormalities in fibromyalgia syndrome (abstr). *Arthritis Rheum.* 36:S223, 1993.

Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, Lopez Y, MacKillip F. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* 37:1593–601, 1994.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 228: 35–51, 1994.

Rustin P, Munnich A, Rotig A. Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction Caused by Coenzyme Q Deficiency. In *Methods in Enzymology Quinones and Quinone Enzymes, Part B*, Helmut Sies and Lester Packer, ed. Academic Press), pp. 81-88, 2004.

Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sprott H.. Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *J Rheumatol.* 30:146-50, 2003.

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, Arditi M. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity.* 36:401-14, 2012.

Schwarz MJ, Offenbaecher M, Neumeister A, Ewert T, Willeit M, Praschak-Rieder N, Zach J, Zacherl M, Lossau K, Weisser R, Stucki G, Ackenheil M. Evidence for an altered tryptophan metabolism in fibromyalgia. *Neurobiol Dis.* 11:434-42, 2002.

Shokolenko IN, Alexeyev MF. Mitochondrial DNA: A disposable genome? *Biochim Biophys Acta.* 1852:1805-9, 2015.

- Sprott H, Salemi S, Gay RE, Bradley LA, Alarcón GS, Oh SJ, Michel BA, Gay S. Increased DNA fragmentation and ultrastructural changes in fibromyalgic muscle fibres. *Ann Rheum Dis*. 63:245-51, 2004.
- Staud R, Spaeth M. Psychophysical and neurochemical abnormalities of pain processing in fibromyalgia. *CNS Spectr*. 13:12-7, 2008.
- Tander B, Gunes S, Boke O, Alayli G, Kara N, Bagci H, Canturk F. Polymorphisms of the serotonin-2A receptor and catechol-O-methyltransferase genes: a study on fibromyalgia susceptibility. *Rheumatol Int*. 28:685-91, 2008.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 6:389-402, 2005.
- Togo F, Natelson BH, Adler GK, Ottenweller JE, Goldenberg DL, Struzik ZR, Yamamoto Y. Plasma cytokine fluctuations over time in healthy controls and patients with fibromyalgia. *Exp Biol Med (Maywood)*. 234:232-40, 2009.
- Turunen M, Swiezewska E, Chojnacki T, Sindelar P, Dallner G. Regulatory Aspects of Coenzyme Q Metabolism. *Free Radical Research*. 36:437-443, 2002.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 552:335-441, 2003.
- van de Glind G, de Vries M, Rodenburg R, Hol F, Smeitink J, Morava E. Resting muscle pain as the first clinical symptom in children carrying the MTTK A8344G mutation. *Eur J Paediatr Neurol*. 11:243-6, 2007.
- Vattemi G, Marini M, Ferreri NR, Hao S, Malatesta M, Meneguzzi A, Guglielmi V, Fava C, Minuz P, Tomelleri G. Overexpression of TNF- α in mitochondrial diseases caused by mutations in mtDNA: evidence for signaling through its receptors on mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 63:108-14, 2013.

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Liew FY, Ferreira SH and Cunha FQ. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. *Brain Behav Immun.* 21:535-43, 2007.

Villalba JM, Navas P. Plasma membrane redox system in the control of stress-induced apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2:213-30, 2000.

Villanova M, Selvi E, Malandrini A, Casali C, Santorelli FM, De Stefano R, Marcolongo R. Mitochondrial myopathy mimicking fibromyalgia syndrome. *Muscle Nerve.* 22:289-91, 1999.

Wallace DC. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: On the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene.* 354:169-180, 2005.

Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hallegua D, Silverman S, Silver D, Weisman MH. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology (Oxford).* 40:743-9, 2001.

Wallace DJ. Is there a role for cytokine based therapies in fibromyalgia. *Curr Pharm Des.* 12:17-22, 2006.

Wang H, Moser M, Schiltenswolf M, Buchner M. Circulating cytokine levels compared to pain in patients with fibromyalgia -- a prospective longitudinal study over 6 months. *J Rheumatol.* 35:1366-70, 2008.

Watson NF, Buchwald D, Goldberg J, Noonan C, Ellenbogen RG. Neurologic signs and symptoms in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 60:2839-44, 2009.

Werle E, Fisher H, Muller A, Fiehn W, Eich W. Antibodies against serotonin have no diagnostic relevance in patients with fibromyalgia syndrome. *J Rheumatol.* 28:595-600, 2001.

Wheeler TJ, Clements J, Finn RD. Skylign: a tool for creating informative, interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models. *BMC Bioinformatics*. 15:7, 2014.

Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, Tugwell P, Campbell SM, Abeles M, Clark P. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum*. 33:160-72, 1990.

Wolfe F, Rasker JJ, Häuser W. Hearing loss in fibromyalgia? Somatic sensory and non-sensory symptoms in patients with fibromyalgia and other rheumatic disorders. *Clin Exp Rheumatol*. 30:88-93, 2012.

Yunus M, Masi AT, Calabro JJ, Miller KA, Feigenbaum SL. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Semin Arthritis Rheum*. 11:151-71, 1981.

Yunus MB, Kalyan-Raman UP, Kalyan-Raman K, Masi AT. Pathologic changes in muscle in primary fibromyalgia syndrome. *Am J Med*. 81:38-42, 1986.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 469:221-5, 2011.

Zuo L, Motherwell MS. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene*. 532:18-23, 2013.

8. PRODUCCIÓN

Artículos:

1. **Cordero MD**, Alcocer-Gómez E, Culic O, Carrión AM, de Miguel M, Díaz-Parrado E, Pérez-Villegas EM, Bullón P, Battino M, Sánchez-Alcazar JA. **NLRP3 inflammasome is activated in fibromyalgia: the effect of coenzyme Q10**. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(8):1169-80.
2. Alcocer-Gómez E, Garrido-Maraver J, Bullón P, Marín-Aguilar F, Cotán D, Carrión AM, Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Sánchez-Alcazar JA, Battino M, **Cordero MD**. **Metformin and caloric restriction induce an AMPK-dependent restoration of mitochondrial dysfunction in fibroblasts from Fibromyalgia patients**. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(7):1257-67.
3. Bullón P, Alcocer-Gómez E, Carrión AM, Marín-Aguilar F, Garrido-Maraver J, Román-Malo L, Ruiz-Cabello J, Culic O, Ryffel B, Apetoh L, Ghiringhelli F, Battino M, Sánchez-Alcazar JA, **Cordero MD**. **AMPK Phosphorylation Modulates Pain by Activation of NLRP3 Inflammasome**. *Antioxid Redox Signal*. 2015. In Press. doi:10.1089/ars.2014.6120.
4. **Cordero MD**. **The inflammasome in fibromyalgia and CRPS: a microglial hypothesis?** *Nat Rev Rheumatol*. 2015. doi: 10.1038/nrrheum.2015.131.
5. **Mario D. Cordero**, Elísabet Alcocer-Gómez, Fabiola Marín-Aguilar, Tatyana Rybkina, David Cotán, Antonio Pérez-Pulido, José Miguel Alvarez-Suarez, Maurizio Battino, José Antonio Sánchez-Alcazar, Angel M. Carrión, Ognjen Culic, José M Navarro-Pando, Pedro Bullón. **Mutation in Cytochrome b gene of mitochondrial DNA in a family with Fibromyalgia is associated with NLRP3-Inflammasome activation**. *J Med Genet*. 2015. **Aceptado**.

Patente:

USO DE INDUCTORES DE AMPK Y METFORMINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROMIALGIA. Mario David Cordero Morales, Pedro Bullón Fernández, Elísabet Alcocer Gómez. P201400296.

ANEXOS

ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

NLRP3 Inflammasome Is Activated in Fibromyalgia: The Effect of Coenzyme Q₁₀

Mario D. Cordero,^{1,*} Elísabet Alcocer-Gómez,^{1,*} Ognjen Culic,² Angel M. Carrión,³
Manuel de Miguel,¹ Eduardo Díaz-Parrado,¹ Eva M. Pérez-Villegas,³ Pedro Bullón,⁴ Maurizio Battino,⁵
and José Antonio Sánchez-Alcazar⁶

Abstract

Aims: Fibromyalgia (FM) is a prevalent chronic pain syndrome characterized by generalized hyperalgesia associated with a wide spectrum of symptoms such as fatigue and joint stiffness. Diagnosis of FM is difficult due to the lack of reliable diagnostic biomarkers, while treatment is largely inadequate. We have investigated the role of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) deficiency and mitochondrial dysfunction in inflammasome activation in blood cells from FM patients, and *in vitro* and *in vivo* CoQ₁₀ deficiency models. **Results:** Mitochondrial dysfunction was accompanied by increased protein expression of interleukin (IL)-1 β , NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) and caspase-1 activation, and an increase of serum levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-18). CoQ₁₀ deficiency induced by p-aminobenzoate treatment in blood mononuclear cells and mice showed NLRP3 inflammasome activation with marked algesia. A placebo-controlled trial of CoQ₁₀ in FM patients has shown a reduced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 serum levels. **Innovation:** These results show an important role for the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of FM, and the capacity of CoQ₁₀ in the control of inflammasome. **Conclusion:** These findings provide new insights into the pathogenesis of FM and suggest that NLRP3 inflammasome inhibition represents a new therapeutic intervention for the disease. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1169–1180.

Introduction

FIBROMYALGIA (FM) IS A common chronic pain syndrome accompanied by other symptoms such as fatigue and joint stiffness, which pathophysiological mechanisms are difficult to identify. Despite being a common disorder that affects at least 5 million individuals in the United States (1), routine laboratory investigations usually yield normal results (Table 2), and the diagnosis is not easy and may be frequently overlooked. Therefore, new diagnostic markers in FM are needed. Several pathological changes have been well documented in FM patients. For example, recent studies have implicated oxidative stress in the pathogenesis of FM (1, 2, 7,

Innovation

In recent years, inflammasome has attracted increasing interest among basic and clinical researchers. Its implication in the pathophysiology of several diseases generates new therapeutic strategies. Our study reveals that the inflammasome complex is implicated in the pathophysiology of fibromyalgia (FM) mediated by coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) deficiency. The oral CoQ₁₀ treatment reduced inflammasome activation. These findings provide new insights into the pathogenesis of FM and indicate new potential molecular targets for the therapy of this disease.

¹Dpto. Citología e Histología Normal y Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

²Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia.

³División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Sevilla, Spain.

⁴Dept. de Periodontología, Facultad de Odontología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

⁵Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche–Sez. Biochimica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy.

⁶Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Sevilla, Spain.

*These authors contributed equally to this work.

9, 18), indicating that mitochondrial dysfunction may be associated with this syndrome. Furthermore, there are some hypotheses suggesting that cytokines may play a role in FM (4, 22, 24). Indeed, a decrease in mitochondrial mass and coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) levels, as well as increased production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), have been detected in blood mononuclear cells (BMCs) from FM patients (7, 9). On the other hand, ROS have also been shown to be an important activator of inflammasome-mediated inflammation (31). The NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) inflammasome is a molecular platform activated upon signs of cellular danger to trigger innate immune defenses through the maturation of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β and IL-18 (30). To investigate a possible implication of mitochondria dysfunction in inflammasome activation in FM, we studied both pathological mechanisms in BMCs from FM patients and in two models, *in vitro* and *in vivo*, of CoQ₁₀ deficiency (20, 21).

Results

Mitochondrial characteristic in BMCs from FM patients

BMCs from FM patients showed a significant downregulation of several genes related to mitochondrial biogenesis (PGC-1 α , TFAM, NRF1) (Fig. 1A). In parallel, BMCs showed a reduction of mitochondrial complex protein expression levels (complex I, complex III, and cytochrome c) (Fig. 1B, C) accompanied by reduced activities of the mitochondrial chain complex between 50%–60% patients compared with control (Fig. 2). CoQ₁₀ is a key component of the mitochondrial respiratory chain transferring reducing equivalents from complexes I and II to complex III, and deficiencies of this electron and proton carrier are associated with mitochondrial dysfunction in a variety of human disorders (3). According to this, CoQ₁₀ levels were reduced to 46% of the average control value in BMCs from FM patients (Fig. 1D). Moreover, to determine the effect of mitochondrial dysfunction on cellular bioenergetics, we measured intracellular ATP levels in BMCs from control and FM patients. ATP levels were reduced to 76% respect to controls ($p < 0.001$) (Fig. 1E).

Oxidative stress in BMCs from FM patients

It is well established that mitochondrial dysfunction is associated with induction of ROS production in mitochondria. Furthermore, oxidative stress has been proposed as a relevant event in the pathogenesis of FM showing a significant positive correlation with clinical symptoms (5). To assess oxidative stress in FM, we determined mitochondrial ROS production in BMCs from control and FM patients by using MitoSOX, a mitochondrial superoxide indicator. Mitochondrial superoxide production was significantly increased in BMCs from FM patients respect to controls ($p < 0.001$) (Fig. 1F). Additionally, as an oxidative stress marker, we determined the expression levels of 8-oxoguanine glycosylase (OGG1), a DNA glycosylase enzyme responsible for the excision of 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), a mutagenic base byproduct that occurs as a result of exposure of DNA to ROS, and 8-oxoG levels in BMCs from patients. On average, FM patients significantly showed higher levels of OGG1 and 8-oxoG in BMCs from FM patients (Fig. 1B, G).

Inflammasome activation by oxidative stress involved in pain of FM

The postinflammatory induction of mitochondrial biogenesis supports metabolic function and cell viability while helping to control inflammation (19). Because mitochondrial biogenesis genes were downregulated in BMCs from FM patients, we analyzed the activation of inflammasome-related proteins. We found increased NLRP3 and caspase-1 gene expression, increased NLRP3 protein expression levels, and caspase-1 cleavage suggesting inflammasome activation (Fig. 3A, B). We have not found activation of caspase 3, so caspase-1 activation was not secondary to activation of cell death pathways in their cell populations. BMCs treated with lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* were used as a positive control of caspase-1 cleavage. Interestingly, it has been described that oxidized mitochondrial DNA (mtDNA) is a potent activator of the NLRP3 inflammasome (25). Furthermore, other proteins involved in inflammasome and inflammation activation, as IL-1 β and IL-18, were increased in serum from FM patients (Fig. 3D, E). BMCs isolated and cultured from FM patients shown increased levels of the IL-1 β protein showing that these cells are actively producing the cytokines, and interestingly, BMCs cultured with CoQ₁₀ 30 μ M showed after 24 h an important reduction of IL-1 β and caspase 1 protein levels (Fig. 3F). IL-1 β serum levels in FM patients showed a significant negative correlation ($p < 0.05$) with CoQ₁₀ levels and a significant positive correlation ($p < 0.001$) with mitochondrial ROS levels (Fig. 4A, B). The incubation of BMCs isolated from patients with CoQ₁₀ induced a reduction of the IL-1 β protein. Furthermore, IL-1 β serum levels showed a high positive correlation with pain scale scores of FM patients (Fig. 5A). These data suggest that high IL-1 β and IL-18 levels may have a role in the pathophysiology of FM. Interestingly, IL-1 β and IL-18 have been described to be involved in the increased sensibility of the sensory receptors, which means they directly cause or at least modulate pain (12, 28).

CoQ₁₀ deficiency induce inflammasome activation in FM

To verify the role of CoQ₁₀ in the inflammatory process in FM, we induced CoQ₁₀ deficiency in BMCs from five healthy controls by inhibiting endogenous CoQ₁₀ biosynthesis with 1 mM p-aminobenzoate (PABA) for 24 h. CoQ₁₀ deficiency was also induced in mice by the subchronic treatment with PABA (twice daily doses of 20 mg/kg/day). The inhibition of CoQ₁₀ (Fig. 6A) in BMCs had a remarkable effect on cellular bioenergetics, inducing a decrease of 57% of intracellular ATP levels, which were restored after 10 μ M CoQ₁₀ treatment (Fig. 6B). CoQ₁₀ deficiency in BMCs also induced increased DNA oxidation (OGG1) and inflammasome activation demonstrated by increased expression levels of NLRP3 and caspase-1 cleavage (Fig. 6C, D), associated with a significant increase of IL-1 β and IL-18 levels in the culture medium (Fig. 6E, F). Interestingly, 10 μ M of CoQ₁₀ supplementation induced a significant reduction in DNA oxidation, inflammasome activation, and IL-1 β and IL-18 levels in the culture medium of CoQ₁₀-deficient BMCs (Fig. 3C–F).

In mice, when compared with vehicle-treated controls, PABA treatment reduced CoQ₉ and CoQ₁₀ levels in BMCs by

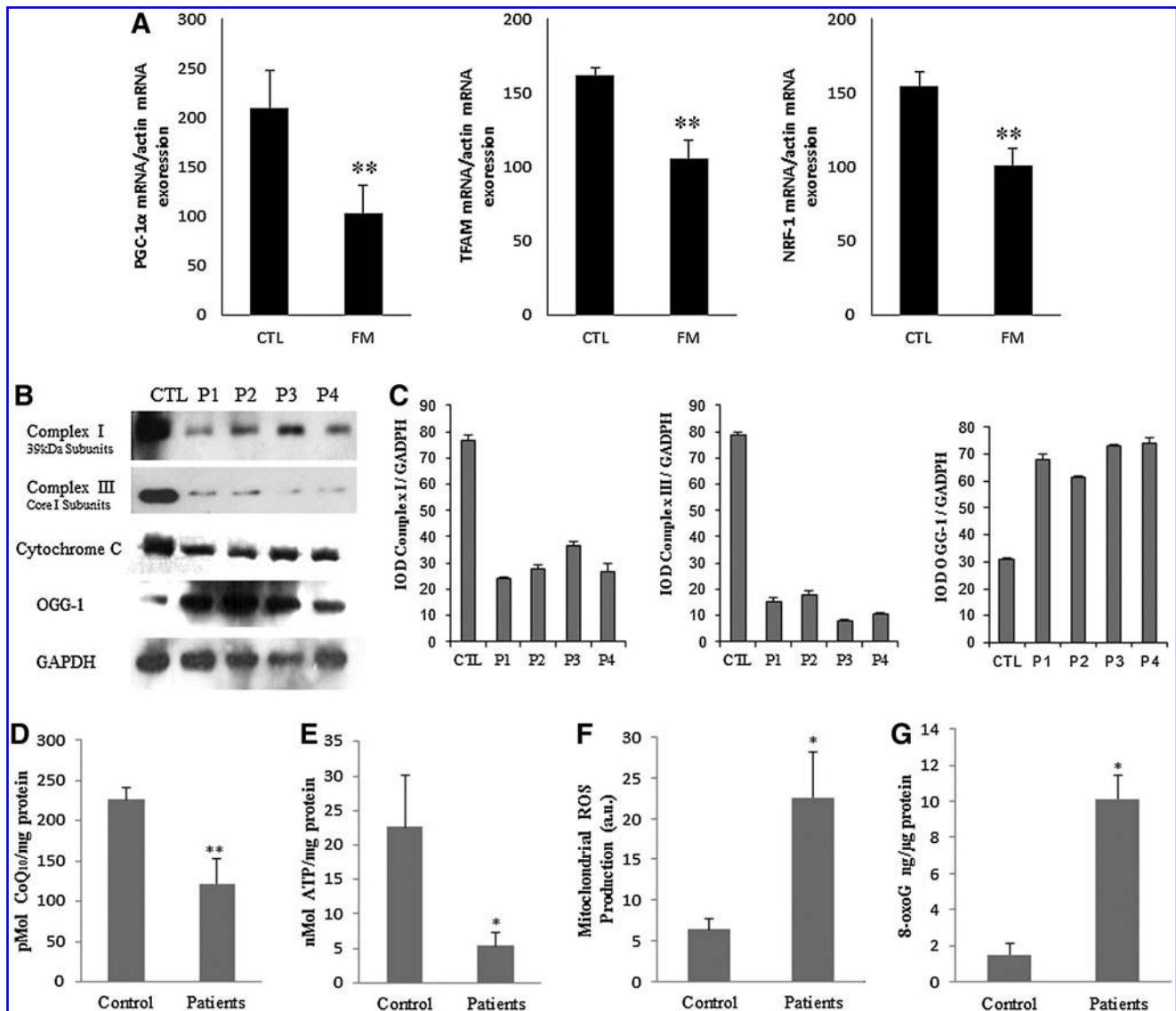


FIG. 1. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in fibromyalgia blood mononuclear cells (BMCs). $n=20$ and 30 for control and fibromyalgia groups, respectively. **(A)** Relative expression of mitochondrial biogenesis genes (mean \pm SE) determined by quantitative PCR in BMCs from fibromyalgia (FM) patients. **(B)** Protein expression levels of mitochondrial complex I (39 kDa Subunit), complex III (Core I Subunit), cytochrome c, and 8-oxoguanine glycosylase (OGG-1, a DNA glycosylase enzyme responsible for the excision of 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG)). **(C)** Protein levels were determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different western blots and normalized to the GAPDH signal, using BMCs from four representative FM patients, compared with a pool of five healthy age- and sex-matched control subjects. **(D)** Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) levels in control and FM cells were determined by hexane extraction and high-performance liquid chromatography (HPLC) separation as described in Material and Methods section. **(E)** ATP levels in control and FM BMCs were analyzed by bioluminescence as described in Material and Methods section. **(F, G)** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and 8-oxoG were analyzed in BMCs from control and FM patients by flow cytometry and EIA kit as described in Material and Methods section. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ between control and FM patients.

30% and 49%, respectively, $p < 0.001$ (Fig. 7A). This effect was accompanied by increased expression levels of NLRP3, induction of caspase-1 cleavage in BMCs (Fig. 7B), and increased IL-1 β and IL-18 levels in serum (Fig. 7C, D). Single injections of PABA in mice did not evoke any differential effect between vehicle- and drug-injected mice regarding thermal pain (data not shown). However, PABA administration during five consecutive days produced a marked allgesia in

the hot plate test when thermal stimuli were up of 45°C (hot plate test: for 50°C, latencies were 12.06 \pm 1.64 and 6.67 \pm 0.61 s for vehicle- and PABA-injected mice, respectively [$p = 0.013$]; for 52.5°C, latencies were 5.2 \pm 0.88 and 3.03 \pm 0.23 s for vehicle- and PABA-injected mice, respectively [$p = 0.041$]), and for tail flick (latencies were 5.95 \pm 0.13 and 3.64 \pm 0.26 s for vehicle- and PABA-injected mice, respectively [$p < 0.001$]) (Fig. 7E). Interestingly, IL-1 β serum levels showed high positive

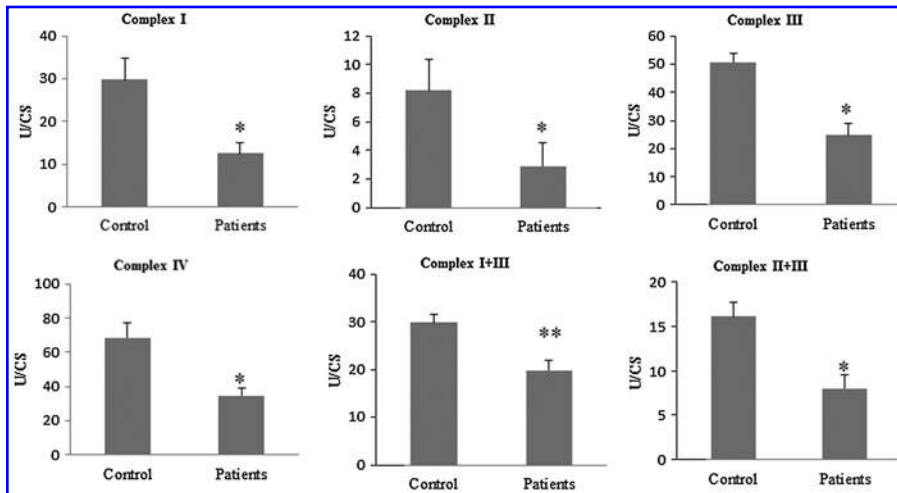


FIG. 2. Mitochondrial complexes enzymatic activities in fibromyalgia BMCs. $n = 20$ and 30 for control and fibromyalgia groups, respectively. Mitochondrial enzymatic activities were determined as described in Material and Methods section. Results (mean \pm SD) are expressed in U/CS (units per citrate synthase). Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ between control and FM patients.

correlations with pain scale scores in mice (Fig. 5B), similar to those observed in FM patients. Routine serum biochemical parameters were not affected by the subchronic administration of PABA in mice (data not shown).

Oral CoQ₁₀ supplementation in FM patients reduces inflammasome activation

A key obstacle to the successful treatment of FM is the limited effectiveness of the currently available pharmacological therapies. About half of all treated patients experienced only a mild reduction in their symptoms, indicating that many FM patients are in need of alternative therapies (26). In several cases, CoQ₁₀ has shown to be effective in the treatment of FM (6). Identification of pathophysiological mechanisms targeted by CoQ₁₀ treatment in FM is a key research goal. In this respect, we conducted a placebo-controlled, double-blinded trial with 20 patients, to evaluate the effect of CoQ₁₀ in inflammasome gene expression and inflammasome serum markers of FM patients. After CoQ₁₀ supplementation, NLRP3 and IL-1 β gene were downregulated. CoQ₁₀ levels from BMCs were restored after CoQ₁₀ treatment (data not shown). According to this, IL-1 β and IL-18 serum levels were significantly reduced respect to placebo. (Fig. 8A–E).

Discussion

Inhibition of complex I or III of the mitochondrial respiratory chain has been shown to induce ROS production and NLRP3 inflammasome activation (31). In BMCs from FM patients, we detected mitochondrial respiratory chain dysfunction, CoQ₁₀ deficiency, and increased mitochondrial ROS production and OGG-1 expression levels (a marker of oxidized DNA), both activators of inflammasome and inflammation (14, 31). Inflammasome has emerged recently as an unexpected sensor for metabolic danger and stress. Indeed, it has been implicated in the development of major diseases such as gout, type 2 diabetes, and obesity-induced insulin resistance. Moreover, the NLRP3 inflammasome is increasingly suspected of playing a major role in other human pathologies such as cancer, asbestosis, and Alzheimer's disease (15). FM patients have shown increased activation of inflammasome in BMCs and increased serum levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and IL-18. Interestingly,

compensatory activation of mitochondrial biogenesis genes was impaired in BMCs from FM patients. In response to mitochondrial dysfunction and inflammation, cells remove damaged mitochondria by autophagy and, as a compensatory mechanism, induce mitochondrial biogenesis and upregulate antioxidant and counter-inflammatory defense genes (19). Mitophagy in FM patients has been reported (9). However, it has been described that compensatory mechanisms are impaired in BMCs from FM patients that leads to reduced mitochondrial mass, reduced antioxidants levels (1, 2, 18), and an inflammatory damage predisposition. Inflammation has been shown to be associated with FM symptoms by high positive correlations between IL-1 β and IL-18 serum levels and pain scores suggesting an inflammatory component in the induction of pain. Despite this, there are discrepancies regarding the pathological role of IL-1 β serum levels in FM (4, 22, 24, 29). Feng and coworkers have shown the implication of MEFV, which encodes pyrin, a major regulator of the inflammasome platform controlling caspase-1 activation and IL-1 β (10); so, this preliminary data from Feng *et al.*, are according to our results. Respect to inflammatory cytokine involvement in FM pathogenesis, we have recently demonstrated a mitochondrial dysfunction-dependent increase of tumor necrosis factor (TNF)-alpha serum levels in FM patients, which was reduced by CoQ₁₀ treatment (8).

According to our results, the negative correlation between IL-1 β and IL-18 levels and CoQ₁₀ levels and positive correlation with mitochondrial ROS levels and pain scale scores supports the hypothesis that inflammation in FM is dependent on mitochondrial dysfunction. To our knowledge, this is the first report describing inflammasome activation and its association with increased levels of proinflammatory cytokines in FM patients. Furthermore, this study has nominated several new parameters that could be used as diagnostic biomarkers in FM. Their further validation (alone or in combination) could help in creating objective diagnostic testing in FM. However, despite our results about inflammasome in FM, we think that inflammasome contributes in the pathophysiology of this disease accompanied by other inflammasome nondependent inflammatory events, such as IL-6, IL-8, or TNF-alpha (4, 22, 24). These inflammatory parameters have been associated through NF-kappaB. Immunohistochemical studies in FM tissues revealed a stronger expression of

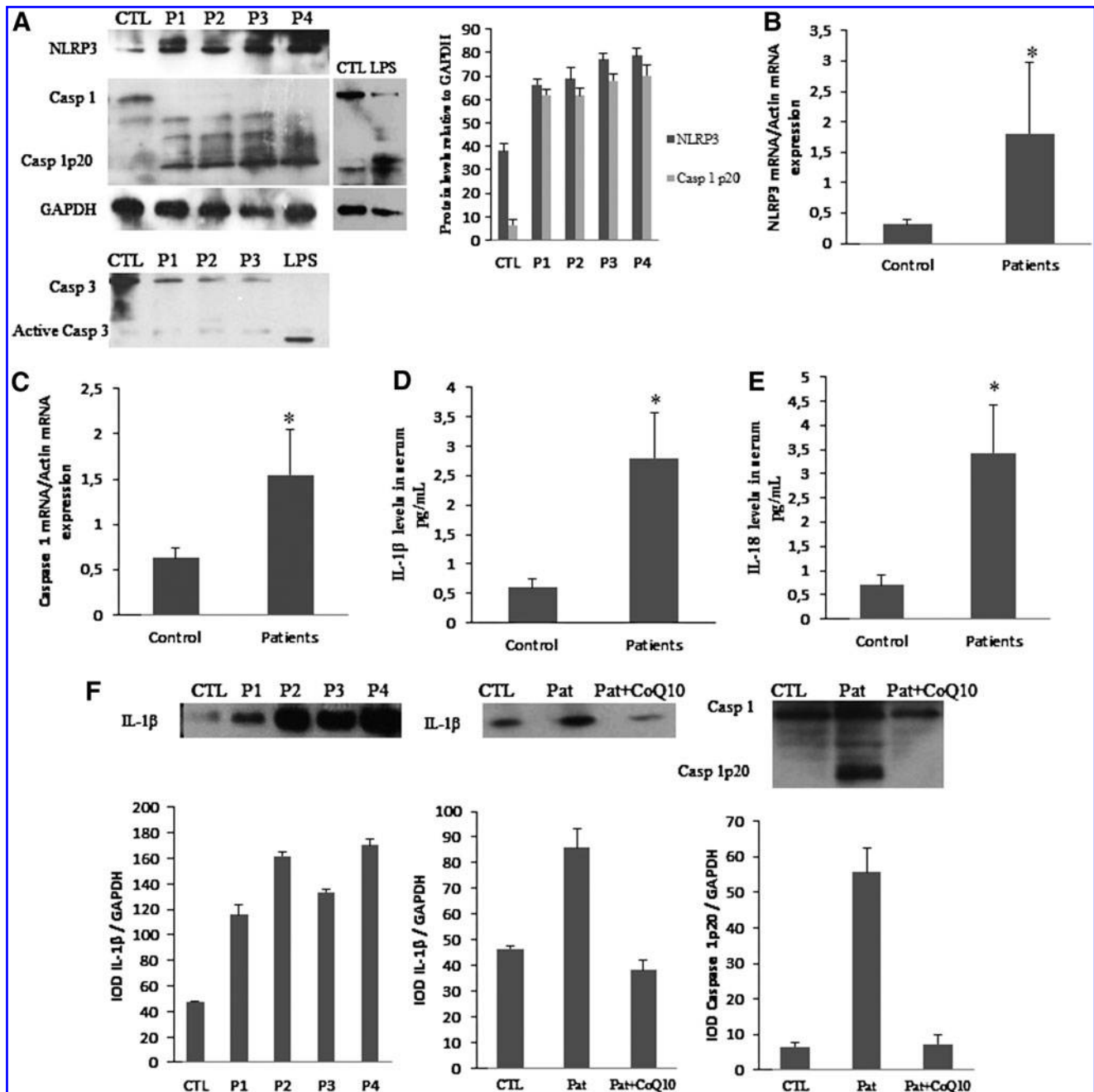


FIG. 3. Inflammasome activation in BMCs and proinflammatory cytokines in serum from FM patients. (A) NLRP3 protein levels, caspase 1 cleavage, and caspase 3 cleavage were analyzed by western blotting. We include a positive control of caspase 1 and 3 activation using lipopolysaccharides. Protein levels were determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different western blots and normalized to the GAPDH signal, using BMCs from four representative FM patients, compared with a pool of five healthy age- and sex-matched control subjects. (B, C) NLRP3 and caspase 1 cleavage transcript expression levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. $n=20$ for control and $n=30$ for FM groups, respectively. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. * $p < 0.05$ between control and FM patients. (D, E) IL-1 β and IL-18 levels in serum from control and FM patients were determined by ELISA as described in Material and Methods section. $n=20$ for control and $n=30$ for FM groups, respectively. (F) IL-1 β protein levels in several patients and IL-1 β and caspase 1 activation in patients before and after CoQ₁₀ treatment in BMCs isolated from FM patients and cultured. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. * $p < 0.001$ between control and FM patients.

NF-kappaB in muscle, and IL-6, IL-8, and TNF-alpha are NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokines (8).

In summary, we have shown (*in vitro* and *in vivo*) the involvement of CoQ₁₀ deficiency in the pathological process of inflammasome activation and release of proinflammatory

cytokines. Since pathological processes can be reversed by CoQ₁₀ supplementation, we propose that CoQ₁₀ could be a suitable therapy for FM patients. Larger controlled clinical trials are needed to provide data on the effectiveness of CoQ₁₀ in FM.

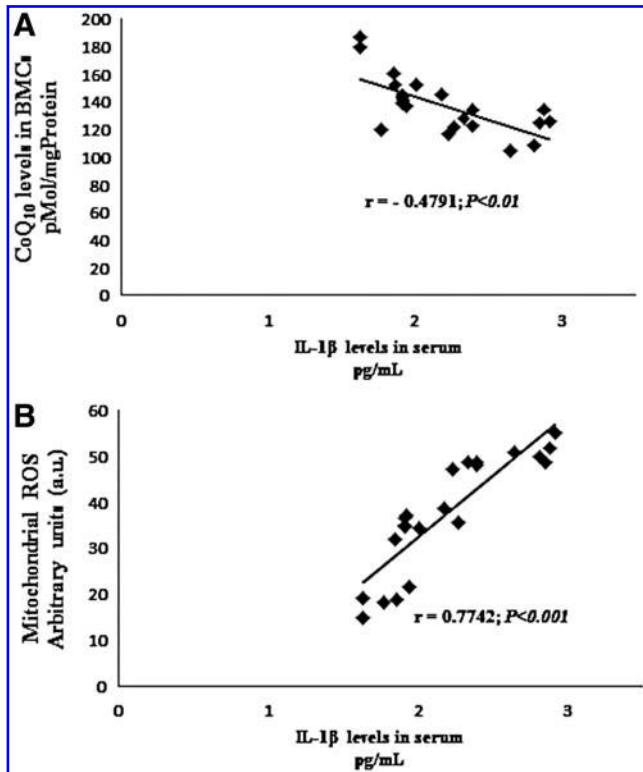


FIG. 4. Correlation of CoQ₁₀ (A), and mitochondrial ROS levels (B) in BMCs from FM patients and IL-1 β levels. $n=30$ for fibromyalgia groups. The correlation was established by calculating correlation coefficients.

Materials and Methods

Ethical statements

Written informed consent and the approval of the ethics committee of the University of Seville were obtained, according to the principles of the Declaration of Helsinki. The study was conducted in compliance with the International Conference on Harmonization Good Clinical Practice (ICH-GCP) guidelines and registered controlled-trials.com (ISRCTN 21164124).

Pain studies in mice were performed in accordance with the European Union guidelines (86/609/EU) and Spanish regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (BOE 67/8509-12, 1988). All experiments were approved by the local institutional animal care committee.

Patients

Briefly, 30 patients from the register of the Andalusian Federation of Fibromyalgia (ALBA ANDALUCÍA) and 20 healthy matched controls were enrolled on the study, having previously obtained informed consent and the approval of the local ethics committee. The inclusion criterion was FM, based on current American College of Rheumatology (ACR) diagnostic criteria (29), and diagnosed 2 to 3 years ago. The clinical characteristics of each group are shown in Table 1. Exclusion criteria were acute infectious disease within the previous 3 weeks; past or present neurological, psychiatric, metabolic, autoimmune, allergy-related, dermal, or chronic inflammatory disease; undesired habits (*e.g.*, smoking, alcohol); medi-

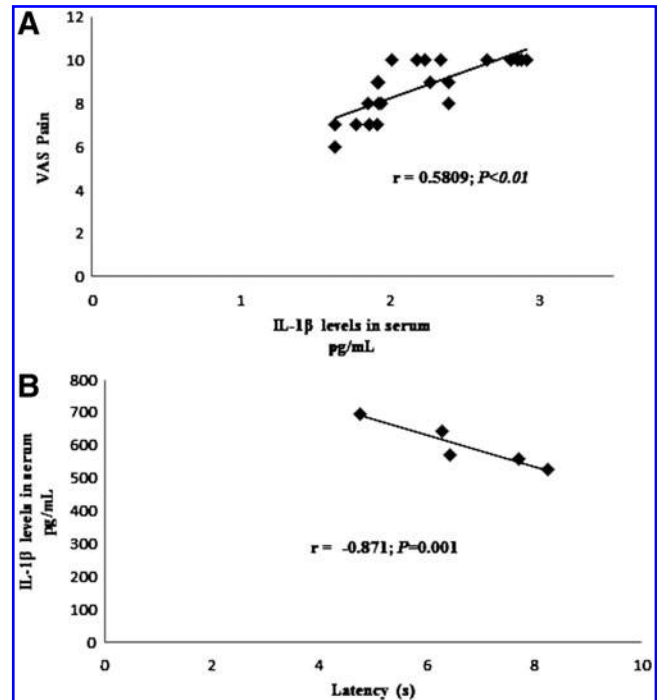


FIG. 5. Association of IL-1 β serum levels and pain scores in FM patients (A) and the mouse model of CoQ₁₀ deficiency (B). $n=30$ for fibromyalgia groups and $n=5$ for mice. The strength of the association was established by calculating correlation coefficients.

cal conditions that required glucocorticoid treatment, analgesics, or antidepressant drugs; past or current substance abuse or dependence; pregnancy or current breastfeeding. Twenty healthy volunteers (5 males, 15 females) were included in the study and matched with the recruited female FM patients for age range, gender, ethnicity, and demographic features (completion of at least 9 years of education and member of the middle socioeconomic class). Healthy controls had no signs or symptoms of FM and had not taken any medication for at least 3 weeks before commencing the study. None of the patients or controls had taken any drug or vitamin/nutritional supplements during the 3 weeks before blood sample collection. All patients and controls followed a standard balanced diet (carbohydrate 50%–60%, protein 10%–20%, and fat 20%–30%) for 3 weeks before blood collection, as established by a diet program. Clinical data were obtained by physical examination and the subjects were evaluated using the fibromyalgia impact questionnaire (FIQ) and the visual analogues scale (VAS). Tender points were identified by digital pressure at the 18 locations recommended by ACR, which included a minimum of 11 out of 18. Heparinized and coagulated blood samples were collected from patients and controls after 12 h of fasting, centrifuged at 3800 g for 5 min, and the plasma and serum was stored at -80°C until testing. Serum biochemical parameters were assayed by routine analytical methods. Routine laboratory tests yielded normal results for glucose, uric acid, creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholesterol, and triglycerides (Table 2)

To evaluate the therapeutic role of CoQ₁₀ in inflammatory activation in FM, we conducted a placebo-controlled,

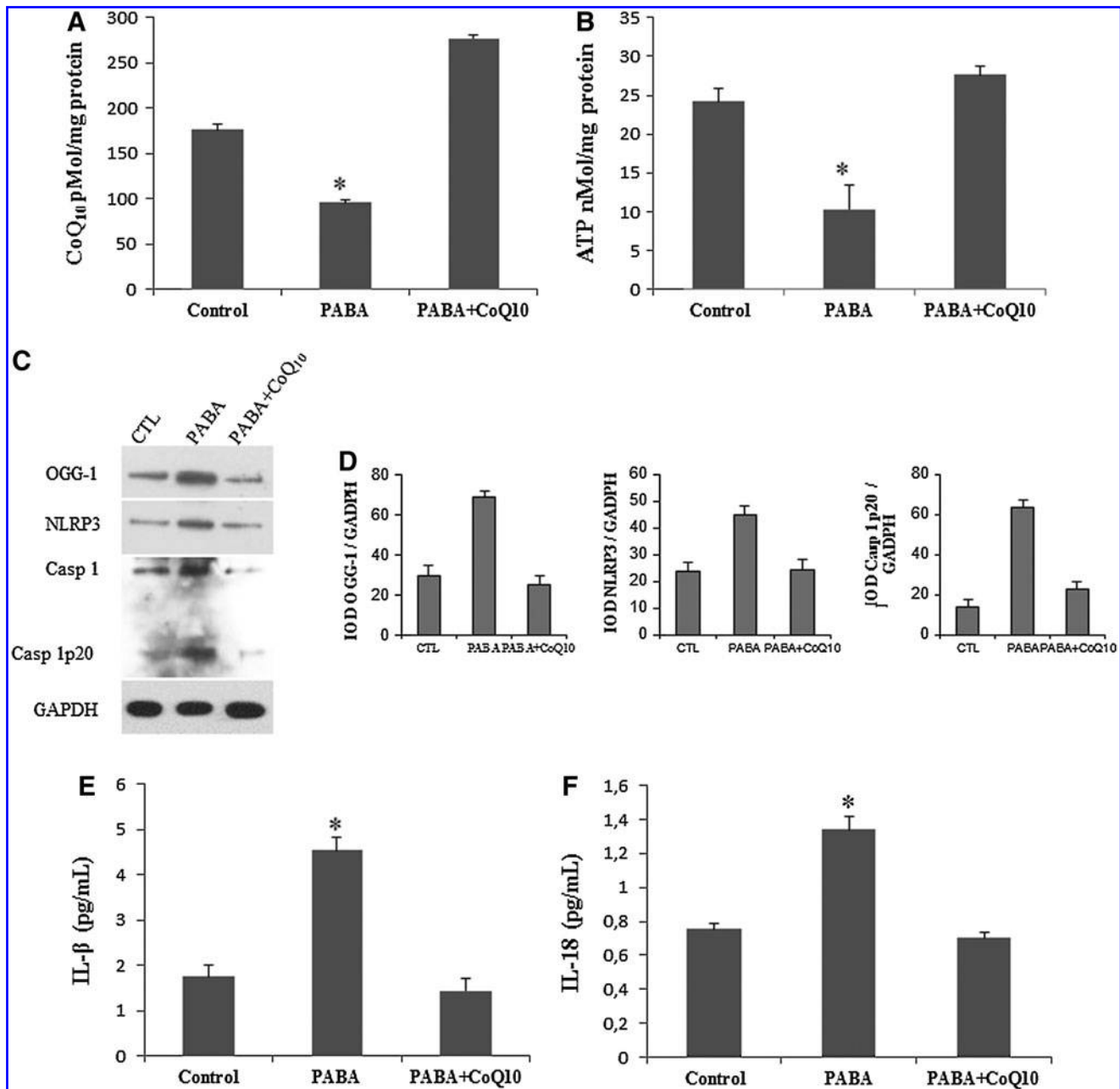


FIG. 6. CoQ₁₀ deficiency induction activates inflammasome complex in BMCs. (A, B) CoQ₁₀ deficiency and decreased ATP levels induced by 1 mM p-aminobenzoate (PABA) treatment for 24 h in BMCs from five healthy volunteers. (C) Protein expression levels of OGG-1 and NLRP3 and induction of caspase 1 cleavage analyzed by western blotting in a homogenate cell pool of BMCs from five controls. (D) Protein expression levels were determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different western blots and normalized to the GADPH signal. (E, F) IL-1 β and IL-18 levels in the culture media of BMCs incubated with PABA for 24h and analyzed by ELISA as described in Material and Methods section. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. * $p < 0.001$ between control and PABA, and between PABA and CoQ₁₀.

double-blinded trial with 20 patients, to evaluate the effect of CoQ₁₀ in inflammasome gene expressions of FM patients and inflammasome serum markers. The study protocol was registered (ISRCTN 21164124) and reviewed and approved by the Ethics Committee of the University of Sevilla. All study participants provided written informed consent before initiation of the study. This study was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki, and all Inter-

national Conference on Harmonisation Good Clinical Practice Guidelines.

Intervention

Subjects who met the enrolment criteria were randomized in a double-blind fashion, according to a 1:1 ratio, to one of the two treatment groups (CoQ₁₀ or placebo). All subjects receiving

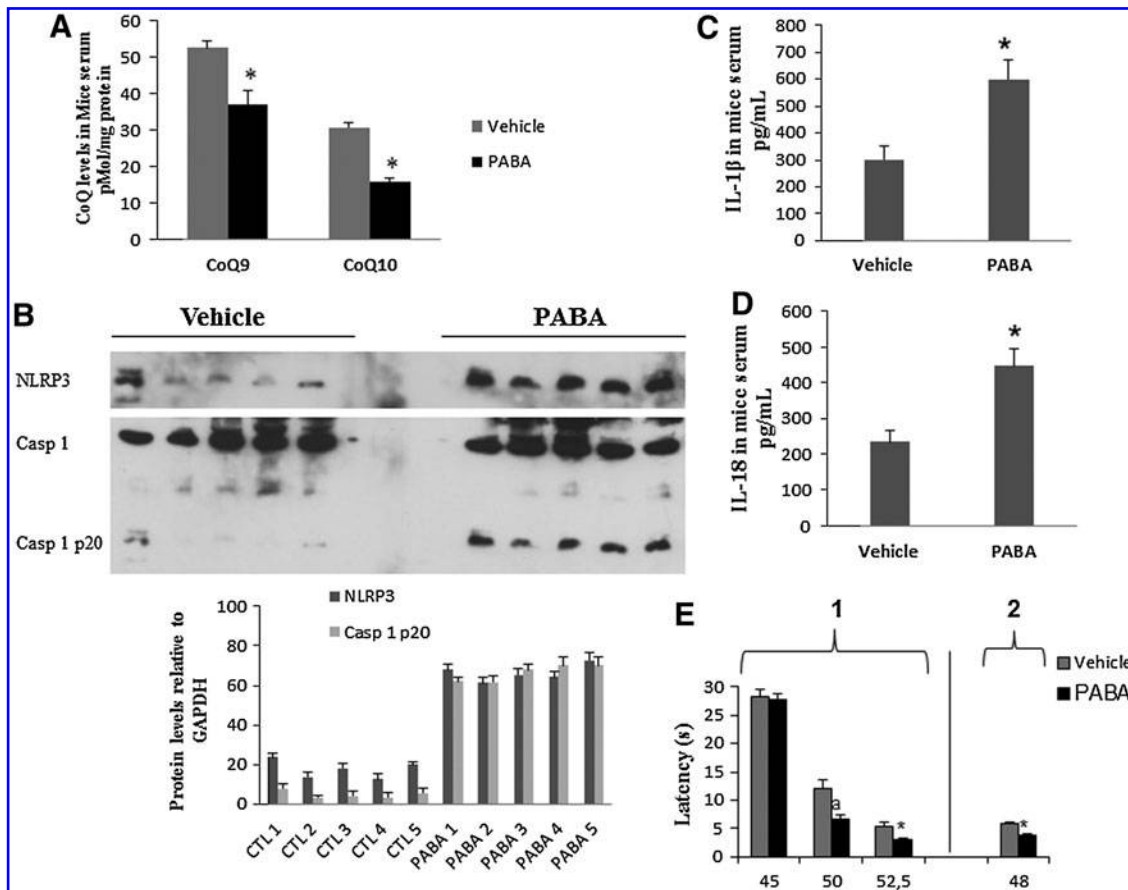


FIG. 7. Inflammation activation induced by CoQ₁₀ deficiency induction in mice. (A) CoQ levels were measured in BMCs isolated from mice treated with vehicle or PABA for 15 days ($n=5$ per group). $*p < 0.05$; between vehicle and PABA-treated mice. (B) NLRP3 protein expression levels and caspase 1 cleavage were analyzed by western blotting. Protein levels were determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different western blots and normalized to GAPDH signal, using BMCs isolated from mice treated with the vehicle or PABA. (C, D) IL-1 β and IL-18 in serum levels from mice treated with the vehicle or PABA-treated were determined by ELISA as described in Material and Methods section. $*p < 0.001$ between vehicle and PABA-treated mice. (E) Pain sensitivity in vehicle- and PABA-treated mice was evaluated in the hot plate test (1) at 45°C–52.5°C \pm 0.5°C and with the tail flick test (2) at 45°C \pm 0.5°C. $*p < 0.05$; $^{\#}p < 0.001$.

CoQ₁₀ (purchased from Pharma Nord) were given, in soft gel capsules for 40 days (300 mg/day CoQ₁₀ divided into three doses), and all subjects receiving placebo were given a matching placebo. The duration of the treatment and dose of CoQ₁₀ were selected accordingly to the preliminary studies (6, 8).

Isolation of BMCs

Peripheral BMCs (lymphocytes and monocytes) from all patients were purified from heparinized blood by isopycnic centrifugation using Histopaque-1119 and Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co.). BMCs were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in the RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, an antibiotic/antimycotic solution (Sigma Chemical Co.), and 10% fetal bovine serum. The number and subgroup distribution of BMCs (monocytes and lymphocytes) in FM patients were in the normal range (data not shown). We use in all experiments, BMCs from all patients except in western blot where we use BMCs from several representative patients. In several experiments, BMCs from FM patients were cultured with CoQ₁₀ 30 μ M during 24 h.

A positive control of activated caspase 1 was induced in BMC control by LPS 1 μ g/ml LPS for 2 h.

Partial CoQ₁₀ deficiency was induced by inhibiting endogenous biosynthesis in control BMCs by treatment with PABA (Sigma), a competitive inhibitor of polyprenyl-4-hydroxybenzoate transferase (27). To achieve this, cells were cultured for 24 h in the presence of 1 mM PABA and PABA + 10 μ M CoQ₁₀.

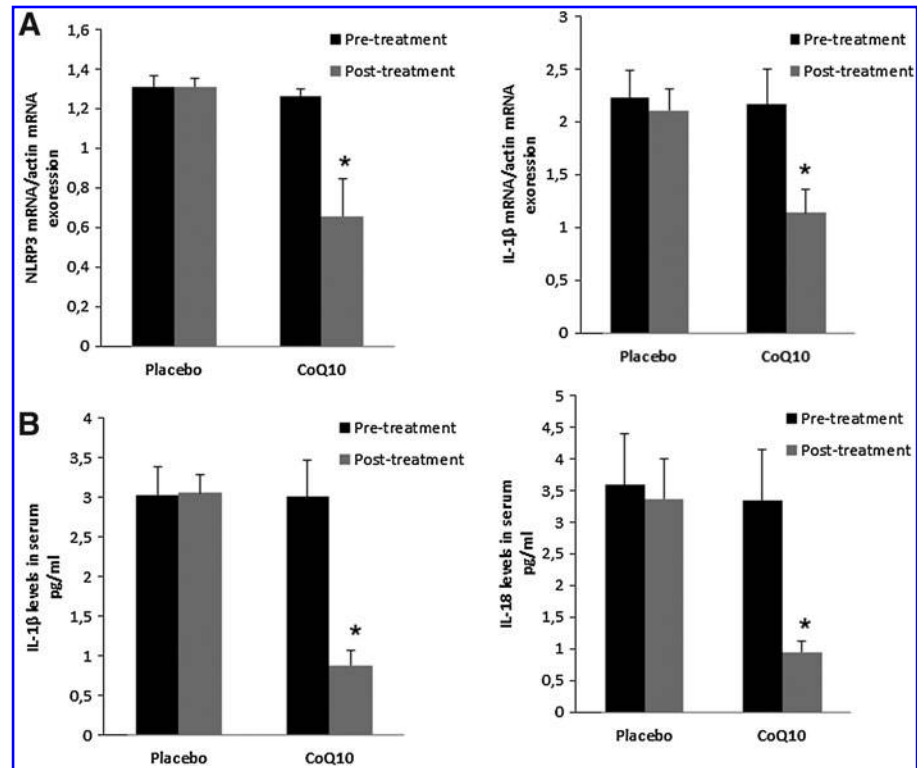
IL-1 β and IL-18 levels

IL-1 β (GenWay) and IL-18 (Biosensis) levels in serum or culture media were assayed in duplicates by commercial ELISA kits.

Mitochondrial enzyme activities

Activities of NADH:coenzyme Q1 oxidoreductase (complex I), succinate deshydrogenase (complex II), cytochrome c oxidase (complex IV), ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (complex III), succinate:cytochrome c reductase (complex II + complex III), and citrate synthase (CS) were determined in

FIG. 8. NLRP3 and IL-1 β gene expression and IL-1 β and IL-18 levels in FM patients pre- and post-treatment with oral CoQ₁₀ versus placebo. (A) Relative gene expressions of NLRP3 and IL-1 β (mean \pm SE) determined by quantitative PCR in BMCs from FM patients. (B) Serum IL-1 β and IL-18 levels in FM patients were measured as described in Material and Methods section. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. **p*<0.01 between FM patients after and before oral treatment.



homogenate extracts using previously described spectrophotometric methods (23). Results are expressed as Units/CS (mean \pm SD). Proteins of homogenates were analyzed by the Lowry procedure (13).

ATP levels

ATP levels were determined by a bioluminescence assay using an ATP determination kit from Invitrogen-Molecular Probes according to the instructions of the manufacturer.

TABLE 1. ANTHROPOMETRIC AND SYMPTOMATIC PARAMETERS IN HEALTHY VOLUNTEERS AND FIBROMYALGIA PATIENTS

Parameter	Controls	FM Patients
Age (years)	45.5 \pm 6.1	46.1 \pm 8
Tender points	—	14.5 \pm 1.8
Disease duration (years)	—	8.1 \pm 3.3
Sex (male/female)	5 \ 15	5 \ 25
BMI (kg/m ²)	23.2 \pm 2.5	22.9 \pm 1.2
FIQ total score, range 0–80	2.7 \pm 1.5	56.6 \pm 8.3 ^a
Pain	0.6 \pm 0.2	6.9 \pm 2.1 ^b
Fatigue	1.2 \pm 0.5	7.1 \pm 1.2 ^a
Morning tiredness	1 \pm 0.3	5.5 \pm 1 ^b
Stiffness	0.4 \pm 0.1	6.2 \pm 2.2 ^b
Anxiety	1 \pm 0.5	5.8 \pm 1.2 ^b
Depression	0.2 \pm 0.6	5.6 \pm 1.2 ^a
VAS pain total score 0–10	0.7 \pm 0.2	7.5 \pm 2.1 ^a

n=20 and 30 for control and fibromyalgia groups, respectively.

^a*p*<0.001.

^b*p*<0.01.

BMI, body mass index; FIQ, fibromyalgia impact questionnaire; VAS, visual analogical scale.

Oxidative stress

Mitochondrial ROS generation in BMCs was assessed by MitoSOX™ red, a red mitochondrial superoxide indicator. MitoSOX Red is a novel fluorogenic dye recently developed and validated for highly selective detection of superoxide in the mitochondria of live cells (17). The MitoSOX Red reagent is live-cell permeant and is rapidly and selectively targeted to the mitochondria. Once in the mitochondria, the MitoSOX Red reagent is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence.

DNA repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycolase-1 (OGG-1; Novus Biologicals, Inc.) levels were analyzed by western blotting.

The 8-oxoG levels in BMCs from patients were determined using a commercial EIA kit from Cayman Chemical.

Immunoblotting

Western blotting was performed using standard methods. After protein transfer, the membrane was incubated with

TABLE 2. SERUM BIOCHEMICAL PARAMETERS IN FIBROMYALGIA PATIENTS

Biochemical parameter	Control	FM patients
Glucose (mg/dL)	93.8 \pm 15.2	98.1 \pm 12.2
Uric acid (mg/dL)	3.9 \pm 1.5	3.1 \pm 1.6
Aspartate aminotransferase (mU/ml)	21.9 \pm 8.8	25.2 \pm 7.3
Alanine aminotransferase (mU/ml)	23.5 \pm 5.1	24.6 \pm 6.1
Creatine kinase (IU/L)	671.1 \pm 42.3	623.5 \pm 34.4
Cholesterol (mg/dl)	179.9 \pm 53.4	176.9 \pm 59.1
Triglycerides (mg/dl)	157.5 \pm 60.1	144.9 \pm 52.3

n=20 for controls and *n*=30 for FM patients, respectively.

various primary antibodies diluted 1:1000, and then with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase at a 1:10000 dilution. Specific protein complexes were identified using the Immun Star HRP substrate kit (Biorad Laboratories, Inc.).

Quantification of CoQ levels

The CoQ content in BMCs was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Beckmann 166–126 HPLC) with ultraviolet detection (275 nm), as described previously (15).

Reagents

PABA and LPS were purchased from Sigma Chemical Co. Monoclonal antibodies specific for oxidative phosphorylation, complex I (39 kDa subunit), and complex III (core 1 subunit) were purchased from Invitrogen/Molecular Probes. The anti-GAPDH monoclonal antibody from Calbiochem-Merck Chemicals Ltd. The anti-NLRP3 antibody from Adipogen. Anti-active caspase-1 was obtained from Cell Signaling Technology. A cocktail of protease inhibitors (complete cocktail) was purchased from Boehringer Mannheim. The Immun Star HRP substrate kit was from Bio-Rad Laboratories, Inc.

Animals and drug administration

Eight-week-old male Swiss mice weighing 25–30 g were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle. Behavioral studies were performed in accordance with the European Union guidelines (86/609/EU) and Spanish regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (BOE 67/8509-12, 1988). All experiments were approved by the local institutional animal care committee. PABA, a competitive inhibitor of polyprenyl-4-hydroxybenzoate transferase (Coq2p), an essential enzyme in CoQ₁₀ biosynthesis mediating the conjugation of 4-hydroxybenzoate with the completed polyprenyl side chain (26), was dissolved in saline (vehicle) and intraperitoneally administered at a dose of 20 mg/Kg/day for 15 days. Behavioral tests were performed 5 days after the first drug administration. After testing, mice were anesthetized with CO₂ and sacrificed by decapitation. Blood samples were collected for immediate biochemical analysis and BMCs were isolated. Serum samples were frozen at –80°C for further analyses.

Behavioral assays

Behavioral analyses were performed in a testing room with homogeneous noise and light levels. The testing apparatus was cleaned with 70% ethanol (Panreac Química S.A.U) between trials to eliminate any influence of animal odor on the exploratory behavior.

Pain assay

For the hot plate test, a glass cylinder (16 cm high, 16 cm in diameter) was used to constrain the mice to the heated surface of the plate. The plate surface was maintained at 45°C–52.5°C ± 0.5°C and the latency to commence paw licking was measured, with a cutoff of 30 s. For the tail flick test, a thermostatic water bath was maintained at a temperature of

48°C ± 0.5°C and the latency of the tail reflex measured, with a cutoff for responses of 15 s.

Serum markers

Biochemical parameters were determined in serum (glucose, triglyceride, cholesterol, uric acid, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and creatine kinase) using commercial kits from Randox Laboratories.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation in cells was determined by analyzing the accumulation of lipoperoxides using a commercial kit from Cayman Chemical. TBARS are expressed in terms of malondialdehyde (MDA) levels. In these assays, an MDA standard is used to construct a standard curve against which unknown samples can be plotted.

Real-time quantitative PCR

The expression of NLRP3 and caspase 1 gene was analyzed by SYBR Green quantitative PCR using mRNA extracts of BMCs from patients and controls. The thermal cycling conditions used were denaturation at 95°C for 20 s, alignment at 54°C for 20 s, and elongation at 72°C for 20 s, for 40 cycles. NLRP3 primers were 5'- GGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAA -3' (forward) and 5'- GCTGCTTCCTGGCATATCACA -3' (reverse), caspase 1 were 5'- CCGAAGGTGATCATCATCCA -3' (forward) and 5'- ATAGCATCATCCTCAAACCTTCTTG -3' (reverse), and IL-1 β were 5'- TTACAGTGGCAATGAGGA TGAC -3' (forward) and 5'- GTCGGAGATTTCGTAGCTGGAT -3' (reverse). We used a second pair of beta-actin primers as an internal control: forward, 5'- CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3' and reverse, 5'- ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'. All reactions were performed in duplicate. Reaction mixtures, without RNA, were used as negative controls in each run.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS package for Windows (SPSS). Unless otherwise indicated, data represent the mean ± SEM. The unpaired Student's *t* test was used to evaluate the significance of differences between groups, accepting *p* < 0.05 as the level of significance. Statistical analyses included Pearson's correlations between IL-1 β and IL-18 respect to VAS, CoQ₁₀, and mitochondrial ROS. Two-way analysis of variance was used to compare the behavioral results from animals treated with vehicle alone or with PABA. Chi-squared tests were used for statistical analysis in cases in which qualitative variables were compared.

Acknowledgments

This work has been supported by the FIS PI10/00543 grant, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER-Unión Europea), SAS 111242 grant, Servicio Andaluz de Salud-Junta de Andalucía, Proyecto de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía CTS-5725, Federación Andaluza de Fibromialgia y Fatiga Crónica (ALBA Andalucía), and FOICAM (Spanish research association). We thank Dr. Jaime Carvajal (CABD-CSIC-Universidad Pablo de Olavide) for critical reading and editing of the manuscript.

Author Disclosure Statement

All the authors declare that no conflicts of interest exist for any of them.

References

- Altindag O and Celik H. Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia. *Redox Rep* 11: 131–135, 2006.
- Bagis S, Tamer L, Sahin G, Bilgin R, Guler H, Ercan B, and Erdogan C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatol Int* 25: 188–190, 2005.
- Battino M, Fato R, Parenti-Castelli G, and Lenaz G. Coenzyme Q can control the efficiency of oxidative phosphorylation. *Int J Tissue React* 12: 137–144, 1990.
- Bazzichi L, Rossi A, Massimetti G, Giannaccini G, Giuliano T, De Feo F, Ciapparelli A, Dell'Osso L, and Bombardieri S. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 25: 225–230, 2007.
- Cordero MD, Alcocer-Gómez E, Cano-García FJ, De Miguel M, Carrión AM, Navas P, and Sánchez Alcázar JA. Clinical symptoms in fibromyalgia are better associated to lipid peroxidation levels in blood mononuclear cells rather than in plasma. *PLoS One* 6: e26915, 2011.
- Cordero MD, Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Cano-García FJ, Luque CM, Fernández-Riejo P, Fernández AM, and Sánchez-Alcazar JA. (Coenzyme Q(10): a novel therapeutic approach for Fibromyalgia? case series with 5 patients. *Mitochondrion* 11: 623–625, 2011.
- Cordero MD, De Miguel M, Moreno Fernández AM, Carmona López IM, Garrido Maraver J, Cotán D, Gómez Izquierdo L, Bonal P, Campa F, Bullon P, Navas P, and Sánchez Alcázar JA. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Res Ther* 12: R17, 2011.
- Cordero MD, Díaz-Parrado E, Carrión AM, Alfonsi S, Sánchez-Alcazar JA, Bullón P, Battino M, and de Miguel M. Is inflammation a mitochondrial dysfunction-dependent event in Fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal* 18: 800–807, 2013.
- Cordero MD, Moreno-Fernández AM, deMiguel M, Bonal P, Campa F, Jiménez-Jiménez LM, Ruiz-Losada A, Sánchez-Domínguez B, Sánchez Alcázar JA, Salviati L, and Navas P. Coenzyme Q10 distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia. *Clin Biochem* 42: 732–735, 2009.
- Feng J, Zhang Z, Li W, Shen X, Song W, Yang C, Chang F, Longmate J, Marek C, St Amand RP, Krontiris TG, Shively JE, and Sommer SS. Missense mutations in the MEFV gene are associated with fibromyalgia syndrome and correlate with elevated IL-1beta plasma levels. *PLoS One* 4: e8480, 2009.
- Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, and Wolfe F. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58: 26–35, 2008.
- Li WW, Guo TZ, Liang D, Shi X, Wei T, Kingery WS, and Clark JD. The NALP1 inflammasome controls cytokine production and nociception in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Pain* 147: 277–286, 2009.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
- Mabley JG, Pacher P, Deb A, Wallace R, Elder RH, and Szabó C. Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. *FASEB J* 19: 290–292, 2005.
- Menu P and Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* 166: 1–15, 2011.
- Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P, Hernández AR, Cordero MD, Trevisson E, Salviati L, Pineda M, García-Cazorla A, Navas P, and Artuch R. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin Biochem* 41: 697–700, 2008.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G, and Pacher P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 203–208, 2007.
- Ozgoçmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O, Ardicoglu O, and Yildizhan H. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide in fibromyalgia: etiologic and therapeutic concerns. *Rheumatol Int* 26: 598–603, 2006.
- Piantadosi CA and Suliman HB. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and its interface with inflammatory processes. *Biochim Biophys Acta* 1820: 532–541, 2012.
- Quinzii CM, López LC, Von-Moltke J, Naini A, Krishna S, Schuelke M, Salviati L, Navas P, DiMauro S, and Hirano M. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J* 22: 1874–1885, 2008.
- Rodriguez-Hernandez A, Cordero MD, Salviati L, Artuch R, Pineda M, Briones P, Gómez Izquierdo L, Cotán D, Navas P, and Sánchez-Alcázar JA. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* 5: 19–32, 2009.
- Ross RL, Jones KD, Bennett RM, Ward RL, Druker BJ, and Wood LJ. (2010). Preliminary evidence of increased pain and elevated cytokines in fibromyalgia patients with defective growth hormone response to exercise. *Open Immunol J* 3: 9–18, 2010.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, and Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228: 35–51, 1994.
- Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S, and Sprott H. Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *J Rheumatol* 30: 146–150, 2003.
- Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, and Arditi M. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* 36: 401–414, 2012.
- Staud R. Pharmacological treatment of fibromyalgia syndrome: new developments. *Drug* 70: 1–14, 2010.
- Turunen M, Olsson J, and Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochem Biophys Acta* 1660: 171–199, 2004.
- Verri WA, Jr., Cunha TM, Parada CA, Poole S, Liew FY, Ferreira SH, and Cunha FQ. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. *Brain Behav Immun* 21: 535–543, 2007.
- Wallace DJ. Is there a role for cytokine based therapies in fibromyalgia. *Curr Pharm Des* 12: 17–22, 2006.
- Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, Tugwell P, Campbell SM, Abeles M, and

- Clark P. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 33: 160–172, 1990.
31. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, and Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221–225, 2011.

Address correspondence to:
 Prof. Mario D. Cordero
 Dpto. Citología e Histología Normal y Patológica
 Facultad de Medicina
 Universidad de Sevilla
 Avda. Sánchez-Pizjuán s/n
 Sevilla 41009
 Spain

E-mail: mdcormor@us.es

Date of first submission to ARS Central, January 13, 2013; date of final revised submission, July 8, 2013; date of acceptance, July 25, 2013.

Abbreviations Used

8-oxoG = 7,8-dihydro-8-oxoguanine
 ACR = American College of Rheumatology
 BMCs = blood mononuclear cells
 BMI = body mass index
 CoQ₁₀ = coenzyme Q₁₀
 CS = citrate synthase
 FIQ = fibromyalgia impact questionnaire
 FM = fibromyalgia
 HPLC = high-performance liquid chromatography
 IL-(1 β ,18) = interleukins
 LPS = lipopolysaccharide
 MDA = malondialdehyde
 mtDNA = mitochondrial DNA
 NLRP3 = NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
 OGG-1 = 8-oxoguanine glycosylase
 PABA = P-aminobenzoate
 ROS = reactive oxygen species
 TNF = tumor necrosis factor
 VAS = visual analogues scale



Metformin and caloric restriction induce an AMPK-dependent restoration of mitochondrial dysfunction in fibroblasts from Fibromyalgia patients



Elísabet Alcocer-Gómez^{a,b}, Juan Garrido-Maraver^b, Pedro Bullón^{a,c}, Fabiola Marín-Aguilar^a, David Cotán^b, Angel M. Carrión^d, José Miguel Alvarez-Suarez^{e,f,g}, Francesca Giampieri^h, José Antonio Sánchez-Alcazar^b, Maurizio Battino^{e,i}, Mario D. Cordero^{a,*}

^a Research Laboratory, Oral Medicine Department, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

^b Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, 41013 Sevilla, Spain

^c Dept. of Periodontology, Dental School, University of Sevilla, Spain

^d División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Carretera de Utrera Km. 1, 41013 Sevilla, Spain

^e Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche (DISCO)-Sez. Biochimica, Facoltà di Medicina, Università Politecnica delle Marche, Ancona 60131, Italy

^f Area de Nutrición y Salud, Universidad Internacional Iberoamericana (UNINI), Campeche C.P.24040, Mexico

^g Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

^h Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (D3A), Università Politecnica delle Marche, Via Ranieri 65, Ancona 60131, Italy

ⁱ Director Centre for Nutrition & Health, Universidad Europea del Atlantico (UEA), Santander 39011, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2014

Received in revised form 4 March 2015

Accepted 7 March 2015

Available online 14 March 2015

Keywords:

Fibromyalgia

AMPK

Mitochondria

Oxidative stress

Metformin

Caloric restriction

ABSTRACT

Impaired AMPK is associated with a wide spectrum of clinical and pathological conditions, ranging from obesity, altered responses to exercise or metabolic syndrome, to inflammation, disturbed mitochondrial biogenesis and defective response to energy stress. Fibromyalgia (FM) is a world-wide diffused musculoskeletal chronic pain condition that affects up to 5% of the general population and comprises all the above mentioned pathophysiological states. Here, we tested the involvement of AMPK activation in fibroblasts derived from FM patients. AMPK was not phosphorylated in fibroblasts from FM patients and was associated with decreased mitochondrial biogenesis, reduced oxygen consumption, decreased antioxidant enzymes expression levels and mitochondrial dysfunction. However, mtDNA sequencing analysis did not show any important alterations which could justify the mitochondrial defects. AMPK activation in FM fibroblast was impaired in response to moderate oxidative stress. In contrast, AMPK activation by metformin or incubation with serum from caloric restricted mice improved the response to moderate oxidative stress and mitochondrial metabolism in FM fibroblasts. These results suggest that AMPK plays an essential role in FM pathophysiology and could represent the basis for a valuable new therapeutic target/strategy. Furthermore, both metformin and caloric restriction could be an interesting therapeutic approach in FM.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondria are essential organelles present in virtually all eukaryotic cells. One of the primary functions of mitochondria is ATP production via the oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathway. Moreover, they play crucial roles in many other metabolic, regulatory and developmental processes [1]. The involvement of mitochondria in a variety of pathological mechanisms has been partially ascribed to their central role in reactive oxygen species (ROS) production and to the damaging

effect mediated by ROS themselves on the same organelles [2]. In eukaryotic cells, mitochondrial biogenesis is triggered through modulation of the ATP/ADP ratio, activation of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) and the subsequent expression of peroxisomal proliferator activator receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α) and nuclear respiratory factor-1 (NRF1) transcription factors. The AMPK cascade is one of the intracellular pathways that have evolved to ensure that energy homeostasis is maintained even under pathological conditions or stress [3]. AMPK has also been involved in the cellular defense against oxidative stress damage induced by mitochondrial ROS through the increase of MnSOD and catalase expression levels [4].

Fibromyalgia (FM) is a common chronic pain syndrome accompanied by other symptoms such as fatigue, headache, sleep disturbances, and depression. Despite the fact that it affects up to 5% of the general

* Corresponding author at: Research Laboratory, Oral Medicine Department, Universidad de Sevilla, C/Avicena s/n, 41009 Sevilla, Spain. Tel.: +34 954 481120; fax: +34 954 486784.

E-mail address: mdcormor@us.es (M.D. Cordero).

population worldwide, its pathogenic mechanism remains elusive. Because not all FM patients have a mitochondrial dysfunction, it has recently been hypothesized that oxidative stress and mitochondrial dysfunction may be important events in pathogenesis of a subgroup of FM patients [5–9]. There is evidence supporting this hypothesis, and thus, reduced mitochondrial mass and impaired bioenergetics have been described in blood cells derived from FM patients [8–10]. Furthermore, different antioxidant enzymes have been observed to be drastically reduced in FM patients [5–7,9,11]. Recently, we have also found reduced AMPK gene expression levels in blood mononuclear cells (BMCs) from FM patients [9].

As AMPK has a central regulatory role in cell metabolism, mitochondrial biogenesis and oxidative stress response, we evaluate if AMPK down-regulation could be at least in part responsible for the impaired oxidative stress response and mitochondrial dysfunction observed in FM. Here, we assessed this hypothesis in cultured skin fibroblasts from patients enrolled in a trial concerning the study of inflammation and mitochondrial dysfunction in BMCs (all patients had mitochondrial dysfunction in BMCs) [8].

2. Material and methods

2.1. Ethical statements

The approval of the ethical committee of the University of Seville was obtained, according to the principles of the Declaration of Helsinki and all the International Conferences on Harmonization and Good Clinical Practice Guidelines. All participants in the study gave their written informed consent before initiating it.

2.2. Patients

The inclusion criterion was Fibromyalgia, based on current ACR diagnostic criteria [9], and diagnosed 2 to 3 years previously. The clinical characteristics of each group are shown in Supplementary Table 1. Exclusion criteria were: acute infectious disease within the previous 3 weeks; past or present neurological, psychiatric, metabolic, autoimmune, allergy-related, dermal or chronic inflammatory disease; undesired habits (e.g., smoking and alcohol); medical conditions that required glucocorticoid treatment, analgesics or antidepressant drugs; past or current substance abuse or dependence; pregnancy or current breastfeeding. Three FM female patients and two healthy female volunteers matched for age range, gender, ethnicity and demographic features (completion of at least 9 years of education and member of the middle socioeconomic class), were included in the study. Healthy controls had no signs or symptoms of FM and had not taken any medication for at least 3 weeks prior to commencing the study. None of the patients or controls had taken any drug or vitamin/nutritional supplements during the 3 weeks prior to blood sample collection. All patients and controls followed a standard balanced diet (carbohydrate 50–60%, protein 10–20% and fat 20–30%) for 3 weeks prior to blood collection, as established by a diet program. Clinical data were obtained from a physical examination and subjects were evaluated using the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), the visual analogues scale (VAS) and depression with the Beck Depression Inventory (BDI). Tender points were identified by digital pressure at the 18 locations recommended by ACR which included a minimum of 11 out of 18. Coagulated blood samples were collected from patients and controls after 12 h fasting, centrifuged at $3800 \times g$ for 5 min, and the serum was stored at -80°C until testing. Serum biochemical parameters were assayed by routine analytical methods. Routine laboratory test yielded normal results for glucose, uric acid, creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholesterol, and triglycerides (Supplementary Table 2).

2.3. Reagents

Trypsin and metformin were purchased from Sigma Chemical Co., (St. Louis, Missouri). Monoclonal Antibodies specific for mitochondrial respiratory chain complex subunits [Anti-human Complex I (39 kDa subunit), Complex II (30 kDa subunit I), Complex III (Core 1 subunit and Complex IV (COX II)], Mitosox™, PicoGreen, and Hoechst 3342, were purchased from Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, Oregon). Anti-cytochrome c antibodies were purchased from PharMingen (BD Bioscience, San Jose, California). Anti-GAPDH monoclonal antibody, clone 6C5, was purchased from Research Diagnostic, Inc., (Flanders, New Jersey). Complex I 8 kDa subunit and Complex II 70 kDa subunit, anti-PGC1- α and OGG-1 antibodies were from Abcam (Cambridge, UK); anti-AMPK-p antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); and MnSOD antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). A cocktail of protease inhibitors (complete cocktail) was purchased from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). The ImmunStar HRP substrate kit was from Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

2.4. Caloric restriction assay

For all experiments, only male mice were used. Eight-week-old male C57/BL6/J mice weighing 25–30 g were maintained on a 12 h light/dark cycle. All studies were performed in accordance with the European Union guidelines (86/609/EU) and Spanish regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (BOE 67/8509-12, 1988). All experiments were approved by the local institutional animal care committee. Calorie restriction (CR) regimen was progressively implemented: it was initiated with 10% restriction diet during the first week, followed by 20 and 30% during the second and third weeks, respectively, and maintained at 30% until the end of treatment. After testing, mice were sacrificed by decapitation. Blood samples were collected frozen at -80°C . In several experiments, fibroblasts were cultured using 10% mice serum fed *ad libitum* (AL) or CR. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Serum was heat activated for 30 min at 55°C .

2.5. Behavioral assays

Behavioral analyses were performed in a testing room with homogeneous noise and light levels. The testing apparatus was cleaned with 70% ethanol (Panreac Química S.A.U.) between trials to eliminate any influence of animal odor on the exploratory behavior.

2.6. Pain assay

For the hot-plate test, a glass cylinder (16 cm high, 16 cm in diameter) was used to constrain the mice to the heated surface of the plate. The plate surface was maintained at $50\text{--}55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and the latency to paw-licking was measured, with a cut-off of 30 s.

2.7. Fibroblast cultures

Control fibroblasts were human primary fibroblasts from healthy volunteers. Samples from patients and controls were obtained according to the Helsinki Declarations of 1964, as revised in 2001. Fibroblasts were cultured in DMEM media (4500 mg/L glucose, L-glutamine, piruvate), (Gibco, Invitrogen, Eugene, OR, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Invitrogen, Eugene, OR, USA) and antibiotics (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere.

2.8. Treatment

2 mM metformin (Sigma Aldrich) and/or 100 μ M of H₂O₂ at 48 h were used for *in vitro* experiments.

2.9. Mitochondrial respiratory chain enzyme activities

Activities of NADH:coenzyme Q1 oxidoreductase (complex I), succinate deshydrogenase (complex II), ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (complex III), cytochrome c oxidase (complex IV), NADH: cytochrome c reductase (complex I + III), succinate:cytochrome c reductase (complex II + complex III) and citrate synthase (CS) were determined in sonicated-permeabilized fibroblasts using spectrophotometric methods. Results are expressed as Units/CS (mean \pm SD). Proteins of fibroblast homogenates were analyzed by the Lowry procedure.

2.10. Western blotting

Whole cellular lysate from fibroblasts was prepared by gentle shaking with a buffer containing 0.9% NaCl, 20 mM Tris-CIH, pH 7.6, 0.1% triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride and 0.01% leupeptine. Electrophoresis was carried out in a 10–15% acrylamide SDS/PAGE. Proteins were transferred to Immobilon membranes (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). Mouse anti-Complex I (8 and 39 kDa subunit), mouse anti-complex II (30 kDa subunit I), mouse anti-Complex III (Core 1 subunit), mouse anti-complex IV (COX II), AMPK-P, PGC-1 α , MnSOD, catalase and DNA repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycolase-1 (OGG-1) antibodies were used to detect proteins by Western blotting. Proteins were electrophoresed, transferred to nitrocellulose membranes and, after blocking over night at 4 °C, incubated with the respective antibody solution, diluted at 1:1000. Membranes were then probed with their respective secondary antibody (1:2500). Immunolabeled proteins were detected by using a chemiluminescence method (Immun Star HRP substrate kit, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Protein was determined by the Bradford method.

2.11. Measurement of CoQ levels

CoQ levels in cultured fibroblasts were performed using a method previously described by our group [8].

2.12. Antioxidant enzyme activity

Catalase activity was determined in cellular lysate by monitoring H₂O₂ decomposition at 240 nm [12]. SOD activity was determined on the basis of the inhibition of the formation of NADH–phenazine methosulfate–nitroblue tetrazolium formazan [13].

2.13. Quantification of mtDNA

Nucleic acids were extracted from fibroblasts by standard cellular lysis. The primers used were: mtF3212 (5'-CACCAAGAACAGGGTTT GT-3') and mtR3319 (5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTAA-3') for mtDNA, and, 18S rRNA gene 18S1546F (5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3') and 18S1650R (5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT3') for nDNA for loading normalization. Arbitrary units were computed as the ratio between the optical density band corresponding to the mtDNA studied in the 20–30th cycle and that of the nDNA in the 15th amplification cycle. One unit was considered to be the ratio corresponding to the control patient. For imaging of mtDNA in living cells, control and FM fibroblasts cells were cultured in dishes with a glass bottom (MatTek Corporation, Ashland, MA) and stained with PicoGreen (3 μ L/mL) for 1 h at 37 °C. TMRM (100 nM) staining was used to visualize mitochondria.

2.14. Mitochondrial ROS production

Mitochondrial ROS generation in BMCs and fibroblasts were assessed by MitoSOX™ Red, a red mitochondrial superoxide indicator. MitoSOX Red is a novel fluorogenic dye recently developed and validated for highly selective detection of superoxide in the mitochondria of live cells. MitoSOX™ Red reagent is live-cell permeant and is rapidly and selectively targeted to the mitochondria. Once in the mitochondria, MitoSOX™ Red reagent is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence.

2.14.1. Fluorescence microscopy

Cells grown on microscope slides in 6-well plates for 24 h were incubated with MitoSOX™ Red for 30 min at 37 °C, washed twice in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 0.5–1 h at room temperature, and washed twice with PBS. After that, cells were incubated for 10 min at 37 °C with anti-cytochrome c antibody (Invitrogen, Barcelona, Spain) to label mitochondria. Slides were analyzed by immunofluorescence microscopy.

2.14.2. Flow cytometry

Approximately 1×10^6 cells were incubated with 1 μ M MitoSOX™ Red for 30 min at 37 °C, washed twice with PBS, resuspended in 500 μ L of PBS and analyzed by flow cytometry in an Epics XL cytometer, Beckman Coulter, Brea, California, USA (excitation at 510 nm and fluorescence detection at 580 nm).

2.15. Oxygen consumption rate (OCR)

The oxygen consumption rate (OCR) was assessed in real-time using the 24 well Extracellular Flux Analyzer XF-24 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's protocol, which allows measuring OCR changes after up to four sequential additions of compounds. Cells (5×10^4 /well) were seeded for 16 h in the XF-24 plate before the experiment in a DMEM/10% serum medium and then incubated for 24 h with the different compounds studied. Before starting measurements, cells were placed in a running DMEM medium (supplemented with 25 mM glucose, 2 mM glutamine, 1 mM sodium Pyruvate, and without serum) and pre-incubated for 20 min at 37 °C in the absence of CO₂ in the XF Prep Station incubator (Seahorse Bioscience, Billerica MA, USA). Cells were transferred to an XF-24 Extracellular Flux Analyzer and after an OCR baseline measurement a profiling of mitochondrial function was performed by sequential injection of four compounds that affect bioenergetics, as follows: 55 μ L of oligomycin (final concentration 2.5 μ g/mL) at injection in port A, 61 μ L of 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) (final concentration 1 mM) at injection in port B, and 68 μ L of antimycin/rotenone (final concentration 10 μ M/1 μ M) at injection in port C. A minimum of five wells was utilized per condition in any given experiment. Data are expressed as pMol of O₂ consumed per minute normalized to 1000 cells (pMol O₂/1000 cells/min).

2.16. Lipid peroxidation

Fibroblasts were cultured on coverslips and incubated with 1 μ M C11-Bodipy (BODIPY® 581/591 C11) for 30 min at 37 °C. Coverslips were then rinsed with PBS and mounted onto slides as described above for analysis with a fluorescence microscope. Fluorescent intensity was measured using the Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Lipid peroxidation in serum from mice was detected by measuring the concentration of TBARS in fluorescence at 532 nm (F7000, HITACHI), using a TBARS detection kit according to the manufacturer's instructions. Absorbance of samples was measured at 535 nm. TBARS concentrations of the samples were calculated using the extinction co-efficient of 156,000 M⁻¹ cm⁻¹.

2.17. PCR Amplification and mtDNA sequencing

The complete mtDNA was amplified from total DNA in 24 overlapping 800–1000-bp-long PCR fragments. Primers were carefully designed using the revised human mtDNA Cambridge reference sequence (www.mitomap.org/mitoseq.html).

The PCR fragments were sequenced in both strands in an ABI 3730 (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com; Foster City, CA) sequencer using a BigDye v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com; Foster City, CA). Assembly and identification of variations in the mtDNA were

carried out using the Staden package. For this purpose the revised human mtDNA Cambridge reference sequence (www.mitomap.org/mitoseq.html) was used. The whole process was carried out at Secugen (Madrid, Spain).

2.18. Analysis of apoptosis and viable cells

Viable cells were determined from their normal cell and nuclear morphology and exclusion of propidium iodide. In each case 10 random fields and more than 500 cells were counted.

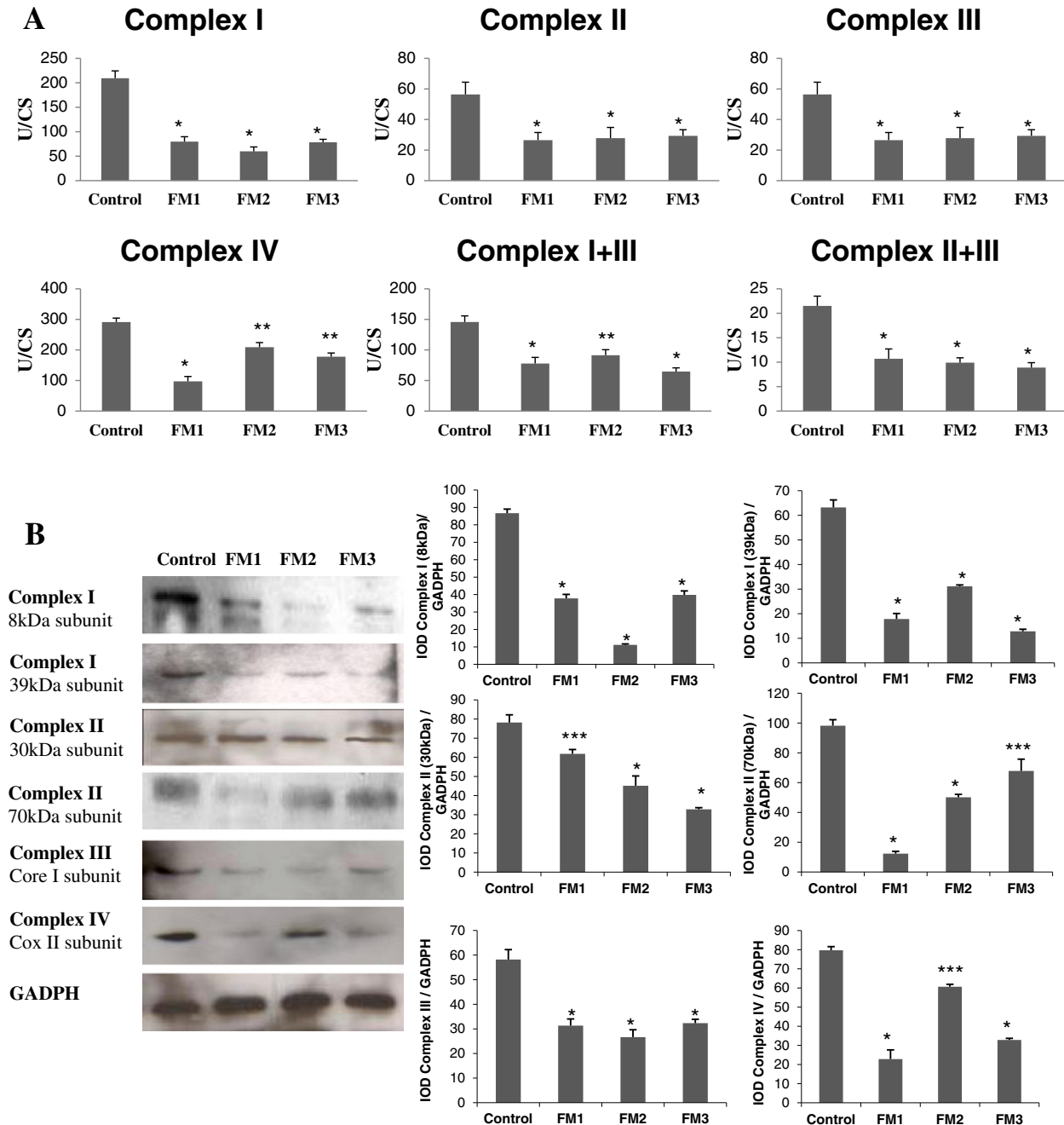


Fig. 1. Mitochondrial dysfunction in skin fibroblasts from FM patients. (A) Mitochondrial enzymatic activities were determined as described in [Material and methods](#). Results (mean \pm SD) are expressed in U/CS (units per citrate synthase). (B) Protein expression levels of mitochondrial subunits of complex I, II, III and complex IV. (C) Protein levels were determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different Western blots and normalized to GADPH signal, using fibroblasts from three representative FM patients, compared with a pool of fibroblasts from 5 healthy age- and sex-matched control subjects. * $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$ between control and FM patients.

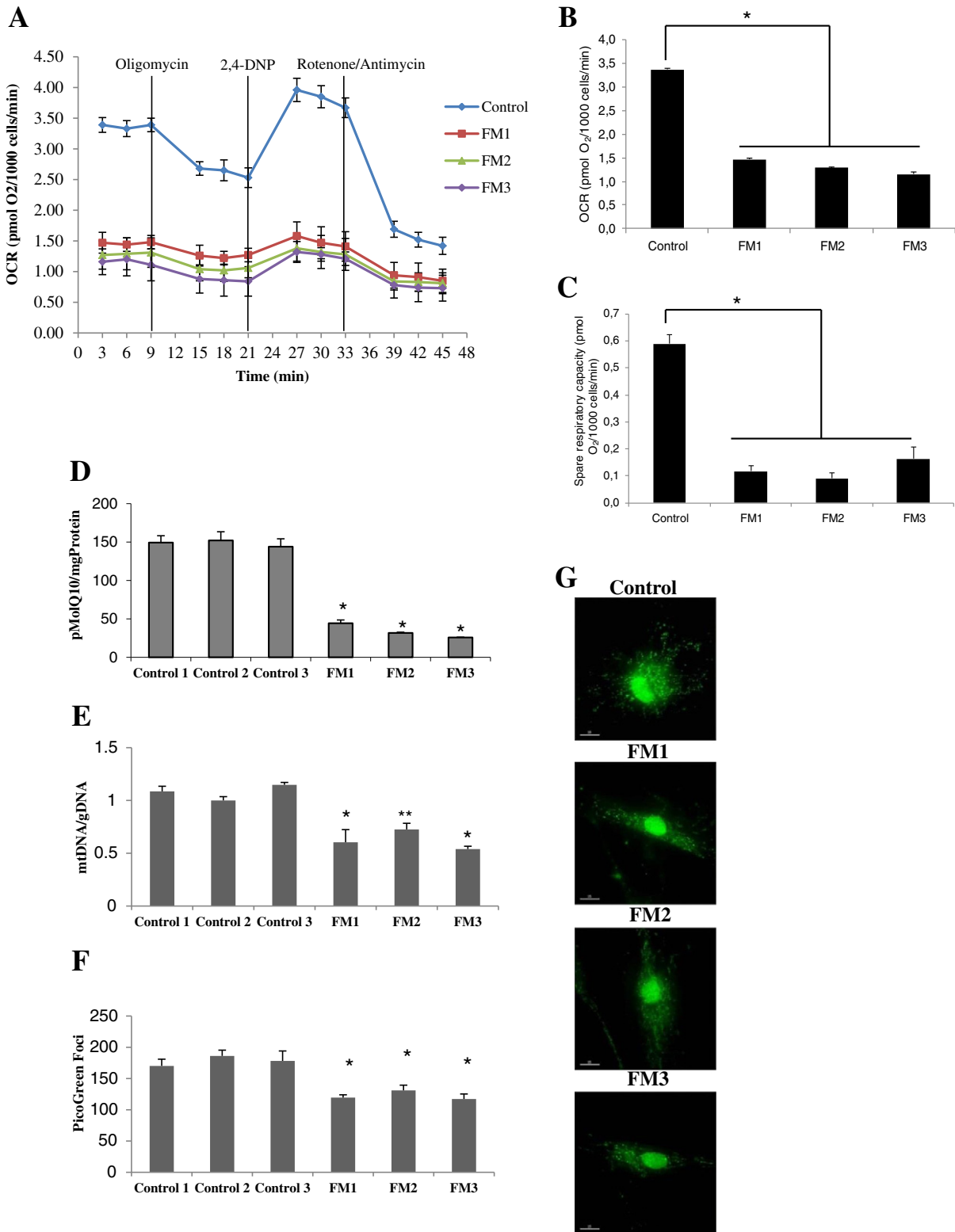


Fig. 2. Abnormalities in various aspects of bioenergetic function of mitochondria. Oxygen consumption rate (OCR) in cells from control and FM patients. (A) OCR was monitored using the Seahorse XF-24 Extracellular Flux Analyzer with the sequential injection of oligomycin (1 µg/mL), 2,4-DNP (100 µM), rotenone (1 µM) at the indicated time point (B) The basal OCR was markedly affected in cells from FM compared to control. (C) The spare respiratory capacity (SRC) of FM fibroblasts showed a significant decrease with respect to control fibroblasts. (D) CoQ₁₀ levels in control and FM cells. (E) mtDNA copy number was measured by RT-PCR as described in [Material and methods](#). (F and G) mtDNA imaging by PicoGreen staining and quantification of PicoGreen foci in control and FM fibroblasts. For the control cells, data are the means ± SD for experiments performed on two different control cell lines. Data represent the mean ± SD of three separate experiments. Bar = 15 µm.**P* < 0.001; ***P* < 0.01 between control and FM patients.

2.19. Statistical analysis

Data in figures is given as mean \pm SD. Data between different groups were analyzed statistically by using ANOVA on Ranks with Sigma Plot and Sigma Stat statistical software (SPSS for Windows, 19, 2010, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). For cell-culture studies, Student's t test was used for data analyses. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Mitochondrial metabolism

As AMPK signaling has been previously reported to be altered in BMCs from FM patients [9], we have next studied the role of AMPK in FM pathophysiology using isolated fibroblasts from three representative FM

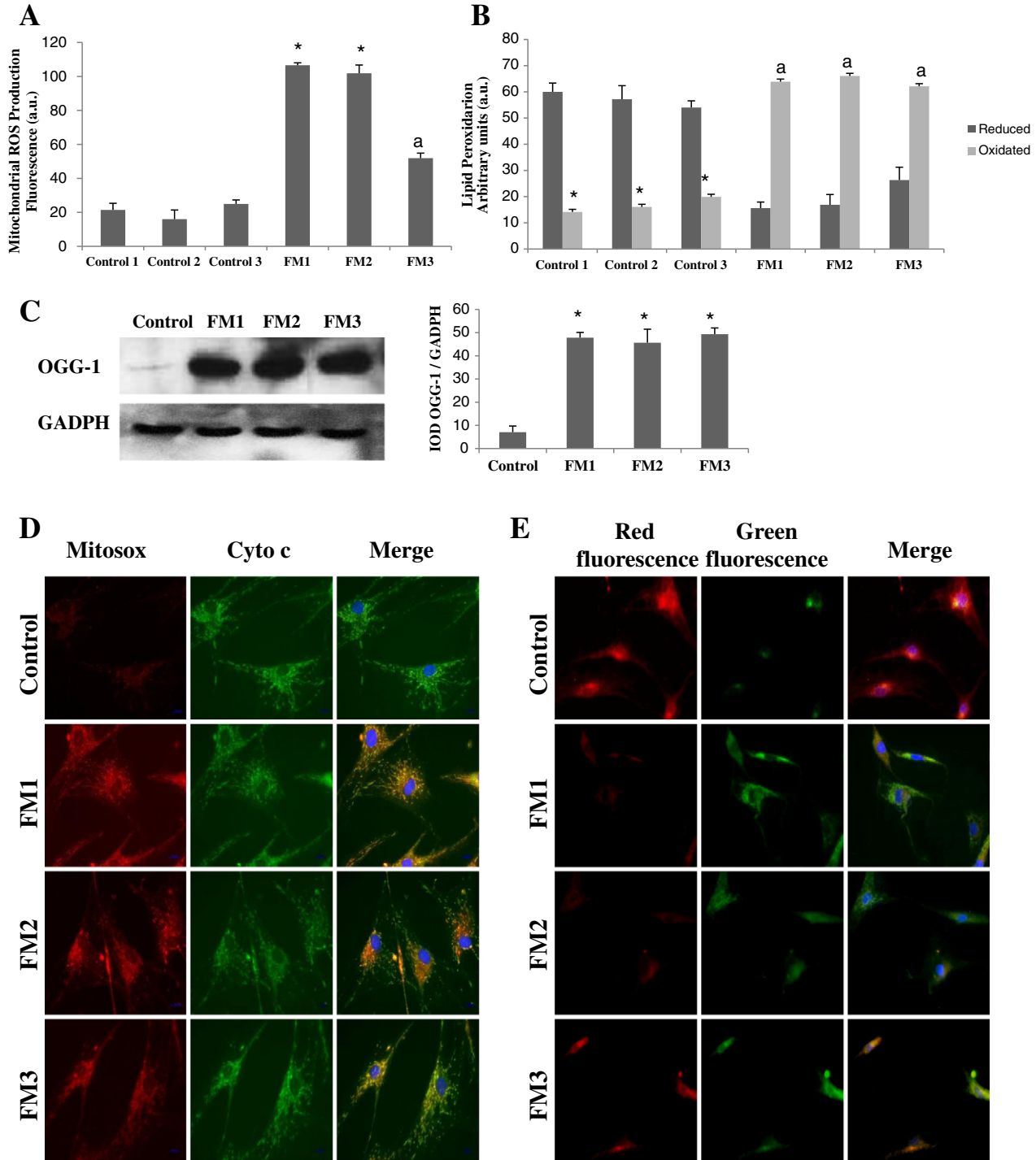


Fig. 3. Oxidative stress and oxidative damage levels in fibroblasts from FM patients. (A) Mitochondrial ROS production was analyzed in BMCs from control and FM patients by flow cytometry as described in Material and Methods. (B) Quantification of lipid peroxidation in control and FM fibroblasts. Data represent the oxidized lipid/reduced lipid ratio. Data represent the mean \pm SD of three separate experiments. * $P < 0.001$, ^a $P < 0.01$ between control and FM patients. (C) Protein expression levels of 8-oxoguanine glycosylase (OGG-1, a DNA glycosylase enzyme responsible for the excision of 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG)). (D) Mitochondrial ROS generation in fibroblasts cultured for 72 h in normal growth medium prior to analysis. MitoSOX Red staining revealed increased superoxide anion. MitoSOX Red colocalized with subunit II of cytochrome c oxidase (COX II) in merged images, indicating that superoxide anion production was mainly in mitochondria. (E) Lipid peroxidation in control and FM fibroblasts using C11-Bodipy staining. Red fluorescence represents non-oxidized lipids, and green fluorescence represents oxidized lipids. Scale bar 30 μ m.

patients. FM fibroblasts displayed a significant reduction in the activities of mitochondrial respiratory enzymes compared to control fibroblasts (Fig. 1A). Mitochondrial protein expression levels correlated with the depressed activities found in respiratory enzymes (Fig. 1B). Next, we investigated mitochondrial function by measuring the OCR values in control and FM fibroblasts, exposed sequentially to each of four modulators of oxidative phosphorylation (OXPHOS): oligomycin (an inhibitor of F1Fo-ATPase or complex V), 2,4-DNP (uncoupling of the OXPHOS electron transport chain) and antimycin/rotenone (complex I and III inhibitors respectively) (Fig. 2A). The basal OCR was markedly affected in fibroblasts from FM patients compared to controls (Fig. 2B). The spare respiratory capacity (SRC) of cells was obtained by calculating the mean of OCR values after injection of 2,4-DNP minus the basal respiration and could be used as an indicator of how close a cell is operating to its bioenergetic limit. Fibroblasts from FM patients showed a significant decrease of SRC compared to control cells (Fig. 2C). Furthermore, similarly to what was previously found in BMCs [8], FM fibroblasts also showed decreased CoQ₁₀ levels when compared to controls (Fig. 2D). CoQ₁₀ content of fibroblasts from patient 1 was reduced by 70%, from patient 2 by 78% and from patient 3 by 82%. FM fibroblasts also had a smaller number of mitochondria; we measured mtDNA content and compared it with control values. Results showed that mtDNA content was 30–50% lower in fibroblasts from FM (Fig. 2E). This finding was further confirmed by visualizing the number of mtDNA nucleoids per cell using PicoGreen staining and fluorescence microscopy. Mitochondrial nucleoids were significantly reduced in FM fibroblasts (Figs. 2F and G).

Since mitochondrial respiratory chain defects are usually associated with mtDNA mutations or deletions, we next sequenced the complete mtDNA from FM patients. Sequence analysis did not show any important alterations as mutations or deletions which could justify the mitochondrial defects. We only found mitochondrial polymorphisms which are also observed in control fibroblasts (Table S1).

3.2. AMPK is implicated in oxidative stress response in FM

Mitochondrial superoxide production was significantly increased in FM fibroblasts compared to controls ($P < 0.001$), accompanied by high levels of lipid peroxidation (Figs. 3A, B, D and E). To confirm these results, the expression of an additional oxidative stress marker such as 8-oxoguanine glycosylase (OGG1) was also determined. FM fibroblasts showed high levels of OGG1 (Fig. 3C).

As AMPK induces PGC-1 α phosphorylation which leads to increased antioxidant enzymes expression levels and mitochondrial biogenesis, we analyzed AMPK protein expression levels and activation in FM fibroblasts. Results showed low expression levels of active phosphorylated AMPK, PGC-1 α and MnSOD (Fig. 4A), suggesting that AMPK-dependent activation of PGC-1 α was indeed impaired in FM fibroblasts. As reduced antioxidant enzyme levels have been previously described in FM [5,6,11], we next investigated the response to moderate oxidative stress induced by exogenous addition of H₂O₂ in FM fibroblasts. Incubation of FM fibroblasts with H₂O₂ failed to activate AMPK and PGC-1 α and to increase MnSOD expression levels (Fig. 4A). As a consequence of an impaired defensive response to oxidative stress, cell death increased in FM fibroblasts treated with H₂O₂ (Fig. 4B).

Under oxidative stress condition, AMPK was found to lead to an increase in the NADPH generation [14]. However, as FM fibroblasts had reduced activity of phosphorylated AMPK, we found low levels of NADPH. Interestingly, metformin, an AMP mimetic that directly activates AMPK, induced an increase of NADPH levels and the activity of SOD and catalase (Figs. 5A–C).

FM fibroblasts under moderate oxidative stress conditions mediated by H₂O₂ treatment or induction of AMPK by metformin showed PGC-1 α activation (Fig. 5D) which increased protection against H₂O₂ exposure and reduced cell death (Fig. 5E). These results suggest that the induction of AMPK phosphorylation could be an interesting

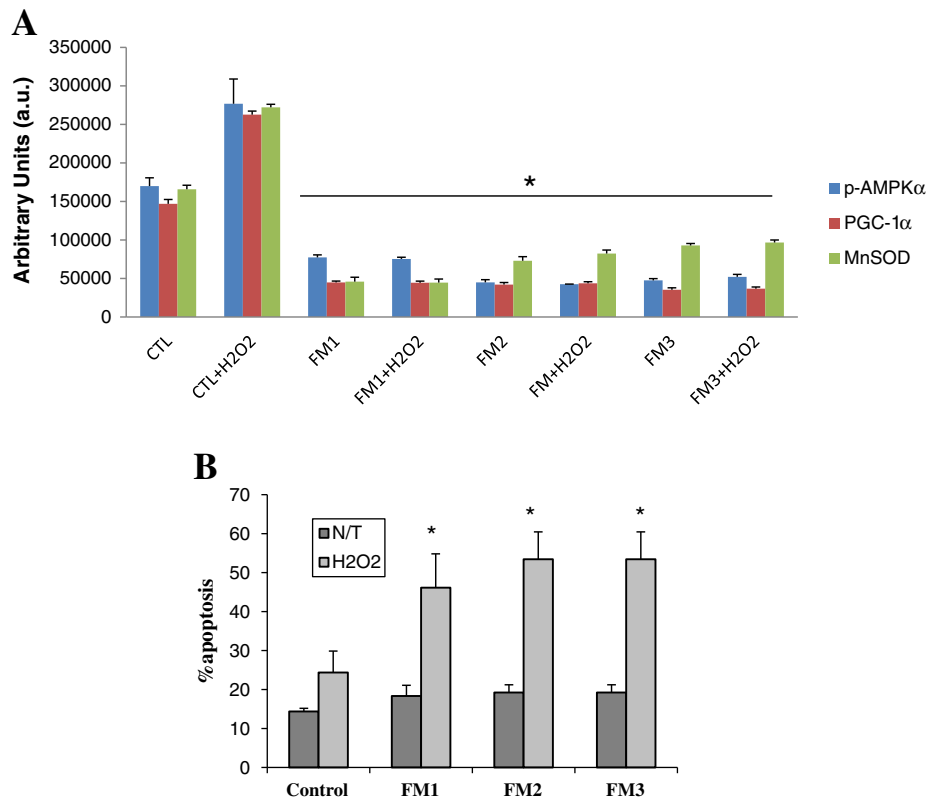


Fig. 4. Comparison of oxidative stress levels and metabolic response to H₂O₂ treatment of skin fibroblasts between FM patients and healthy subjects. (A) Protein expression levels of phosphorylated AMPK, PGC-1 α , and MnSOD after incubation with 100 mM H₂O₂ for 48 h. Protein levels were determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different Western blots and normalized to GAPDH signal. * $P < 0.001$ between control and FM patients. (B) Percentage of apoptosis in control and FM fibroblasts after incubation with 100 mM H₂O₂ for at 48 h. * $P < 0.001$ between control and FM patients.

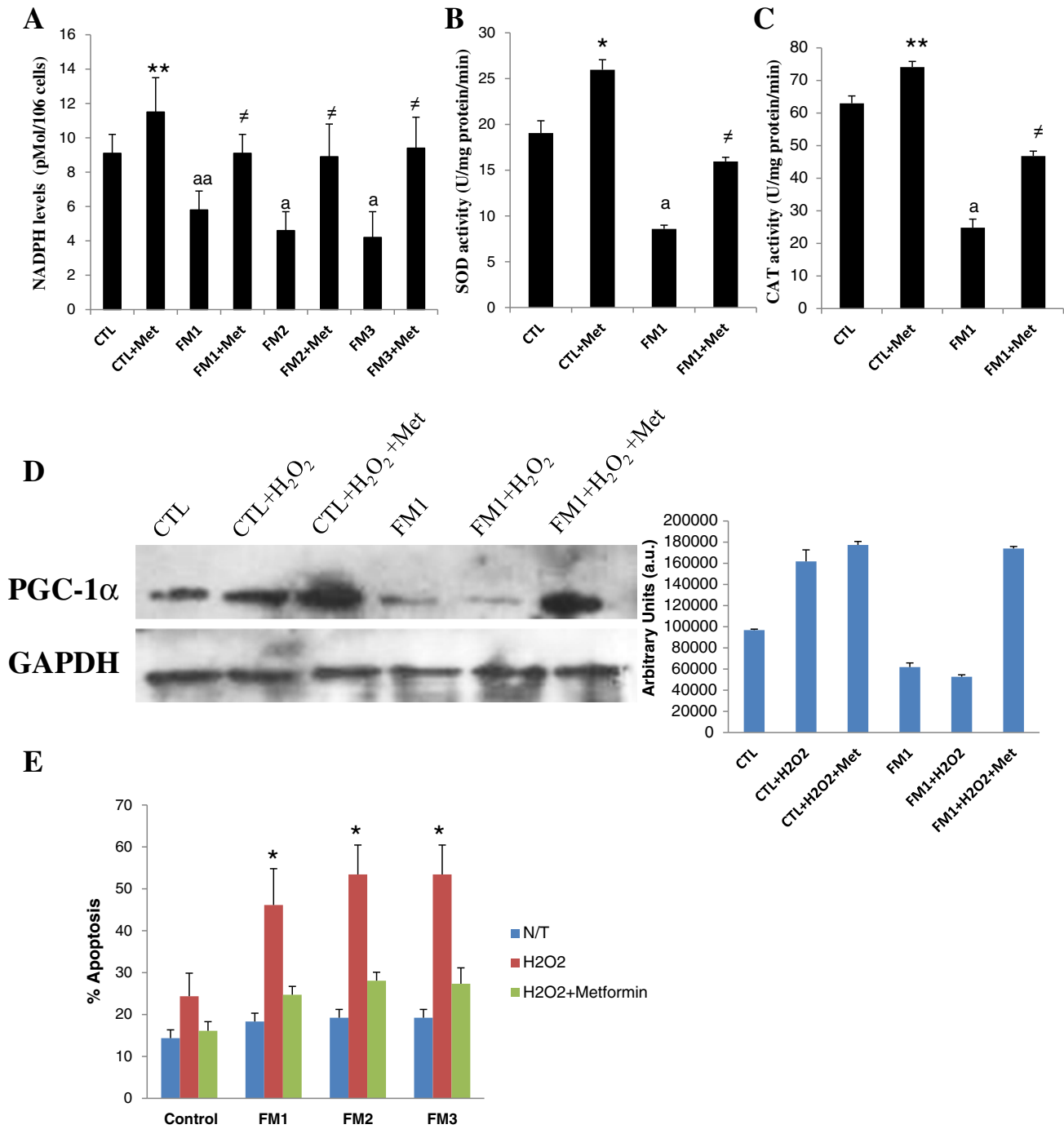


Fig. 5. Effects of metformin treatment on antioxidant defense and oxidative stress response of fibroblasts from FM patients. (A, B and C) NADPH levels and antioxidant enzymes SOD and catalase (CAT) activities in FM fibroblasts treated with metformin (Met). * $P < 0.001$ and ** $P < 0.05$ between control and control with Met. ^a $P < 0.001$ and ^{aa} $P < 0.005$ between FM and control. [#] $P < 0.001$ between FM and FM with Met. (D) Levels of phosphorylated PGC- α in FM fibroblasts after 100 mM H₂O₂ and 2 mM Met treatments for 48 h (representative subset is shown). (E) Percentage of apoptosis in control and FM fibroblasts after incubation with 100 mM H₂O₂ and 2 mM Met for 48 h. * $P < 0.001$ between control and FM patients and between H₂O₂ and H₂O₂ + Met.

therapeutic approach in FM. Given that it has been speculated that the beneficial effects of caloric restriction (CR) could be mediated by AMPK [3], CR could be a promising method to alleviate oxidative damage in FM. Taken into account the possible role of AMPK in FM pathophysiology and the results with metformin treatment, we next studied the implication of AMPK in the protective effect of CR on FM fibroblasts.

Thus, we performed an experiment with a mouse model of CR. Several mice were fed with a normal diet and with CR for one month. Mice submitted to the CR diet for one month developed a marked analgesia

when compared with *ad libitum* (AL) fed mice (Fig. 6A) accompanied by AMPK phosphorylation (Fig. 6B) and reduced levels of serum oxidative stress (Fig. 6C). To determine the potential effect of improvement of AMPK by CR, fibroblasts from FM patients were cultured with serum from AL and CR mice, and cell growth, ATP and mitochondrial mass were assessed. Serum from CR mice improved cell growth in controls and FM fibroblasts (Fig. 6D), accompanied by an increase in ATP levels and mitochondrial mass (determined by increased citrate synthase activity) and cell morphology normalization (Figs. 6E–G).

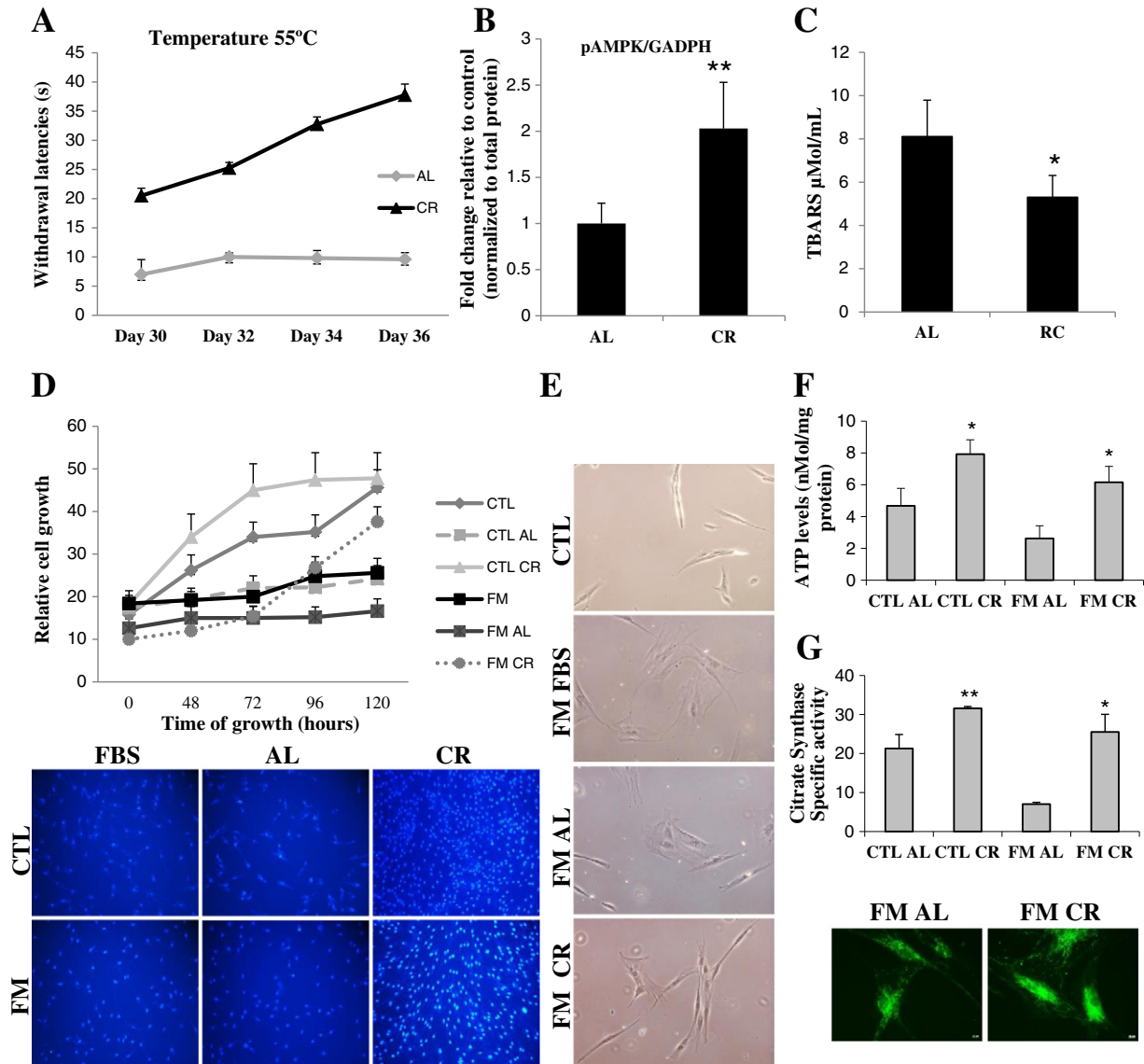


Fig. 6. Effects of caloric restriction on bioenergetics function of mice and skin fibroblasts from FM patients. (A) Evolution of pain sensitivity in *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) mice evaluated in the hot plate test at 55 °C. (B) Phosphorylation of AMPK after CR. (C) Oxidative stress in serum evaluated by TBARS levels. (D) Cell growth with AL and CR serum determined in healthy and FM fibroblasts. (E) Morphological changes of fibroblasts incubated with FBS or serum from AL or CR mice. (F) ATP levels in control and FM fibroblasts. (G) Mitochondrial mass determined by measuring citrate synthase levels and cytochrome c levels by immunofluorescence in control and FM fibroblasts. Data represents the means \pm SD of three separate experiments. * $P < 0.001$ AL or CR; ** $P < 0.01$ between AL or CR in control fibroblasts.

4. Discussion

Despite decades of intense research, the basic pathophysiological mechanisms of FM still remain elusive. Several important pathophysiological processes in FM onset and development have been described: oxidative stress, mitochondrial dysfunction, bioenergetic alterations and inflammation processes are only some of the most important mechanisms that have been postulated [5–11]. AMPK has been reported to play a master regulatory role in all these cellular processes and its dysregulation has been described in several other diseases [15]. Recently, we have reported alterations in AMPK signaling in BMCs from FM patients. However, the role of AMPK in FM remains unknown. In this study, we found a marked mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from 3 FM patients. It is interesting to remark that until now, all the studies in FM have explored the pathophysiological processes only in biological samples isolated directly from patients, e.g. BMCs, platelets, serum, plasma, saliva, muscle. In this work we have used human dermal fibroblasts that have a long track record of utility in mitochondrial

disease biochemistry and molecular studies [1]. Skin fibroblasts represent a useful biological model in which defined mutations and the cumulative cellular damage can be examined. We found reduced mitochondrial chain enzymatic activities and proteins, CoQ₁₀ levels, mitochondrial mass and ATP levels, accompanied by increased oxidative damage. We found no specific mutation after mtDNA sequencing; however, we cannot rule out the presence of mutations in nDNA or potential mtDNA mutations in other patients not included in this study.

Moreover, we observed reduced levels of phosphorylated PGC-1 α accompanied by low levels of antioxidant MnSOD and impaired oxidative stress response which are protective mechanisms controlled by AMPK. Furthermore, reduced levels of active phosphorylated AMPK were observed in FM fibroblasts. These data are interesting because AMPK has been involved in the control of peripheral sensitization of nociceptors, providing evidence of AMPK activation as a novel treatment avenue for acute and chronic pain states [16]. In addition, the exposition of fibroblasts to moderate oxidative stress, as induced by exogenously added H₂O₂, fails to up-regulate AMPK, PGC-1 α and

antioxidant enzymes. Concerning this, AMPK has been deeply involved in the regulation of oxidative stress and mitochondrial dysfunction [17–19]. In this sense, AMPK phosphorylation by metformin treatment induced activation of PGC-1 α accompanied by increased antioxidant enzyme activities and, as a consequence, protection of FM fibroblasts against stress exposure. PGC-1 α is a key player in the ROS-induced mitochondrial biogenesis, along with the NRF-1 and the mitochondrial transcription factor Tfam [20]. According to our data, metformin could induce PGC-1 α activation by AMPK phosphorylation. Furthermore, PGC-1 α has a key role in the antioxidant enzymes biosynthesis, and its genetic deletion has shown an inhibitory effect in SOD2 and catalase expression levels [4,20]. Furthermore, it has been shown that PGC-1 α induction by phosphorylation of AMPK increases SOD2 and catalase expression levels [21]. Our data show that PGC-1 α activation by metformin induces increased mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes expression levels, and, as a consequence, a more physiological response to oxidative stress. A chronic exposure to oxidative stress and dysregulation of the stress response are accepted causative factors involved in the pathophysiology of FM [11,22–24]. Our results could represent the basis for a valuable new therapeutic target/strategy. We found in FM fibroblasts: (i) a lack of AMPK phosphorylation and (ii) restoration of its phosphorylation by AMPK activators, such as metformin. These findings suggest that AMPK plays a central role in FM pathophysiology and stress response. Identification of AMPK as a regulating factor in FM would have implications for patient management and treatment. We can hypothesize that the loss of sensitivity of AMPK activation is responsible for increased oxidative stress and impaired bioenergetics in FM patients. Furthermore, other metabolic events have been related with AMPK down-regulation. Reduced AMPK activity has been found in obesity or metabolic syndrome [3], both reported to be implicated in FM [25,26]. AMPK dysfunction seems to explain many of the pathophysiological alterations found in FM. In this sense, activation of AMPK with other activators having similar effects to metformin must induce similar beneficial effects. To investigate whether AMPK could be responsible for the ability of CR to improve the cells of FM patients, we used an *in vitro* cell culture model that recapitulates key *in vivo* proliferative and phenotypic features of CR [27]. In this model, cells from patients were cultured in the presence of serum from caloric restricted mice resulting in an important improvement in FM fibroblasts alterations. Future research should be focused on studying the significance of AMPK in FM etiology and as a therapeutic target. Furthermore, an important challenge in FM is the moderate effectiveness of pharmacological therapies; in this sense, AMPK activators, such as AICAR, metformin, CoQ₁₀, resveratrol, CR or physical activity, can provide new therapeutic opportunities [3]. As not all patients have a mitochondrial dysfunction, our results could help to characterize a subgroup of patients in which mitochondrial target treatment could be the most appropriate strategy. In this sense, mitochondrial protector drugs or mitochondrial biogenesis activators may also be considered as new possible therapeutic approach in FM. Nevertheless, more research is needed in order to establish a possible primary causation link between AMPK and FM.

The results described in this article could serve as a new way of designing experiments to better understand the influence of oxidative stress on the development of FM and generate new therapeutic strategies.

Abbreviations

AL	<i>ad libitum</i>
CAT	catalase
CoQ ₁₀	Coenzyme Q ₁₀
CR	caloric restriction
FBS	fetal bovine serum
FM	Fibromyalgia
HPLC	high-performance liquid chromatography
Met	metformin
OCR	oxygen consumption rate

OGG1	8-oxoguanine glycosylase
PGC-1 α	peroxisomal proliferator activator receptor γ co-activator 1 α
NRF1	nuclear respiratory factor-1
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances

Author disclosure statement

All the Authors declare that no conflict of interest exists for any of them.

Author contributions

E.A.G. and M.D.C. conceived of the study and wrote the manuscript. A.M.C., E.A.G., F.M.A., and DC. performed mouse experiments. E.A.G., J.G.M., J.M.A.S., F.G. P.B. and J.A.S.A. performed cell culture experiments. J.A.S.A. conducted patient evaluations and skin biopsies isolation. All authors analyzed and discussed the data and commented on the manuscript.

Acknowledgments

This work has been supported by Federación Andaluza de Fibromialgia y Fatiga Crónica (ALBA Andalucía) and Grupo de Investigacion Junta de Andalucía CTS113. Authors are indebted with Ms Monica Glebocki for extensive editing of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.005>.

References

- [1] R.H. Haas, S. Parikh, M.J. Falk, R. Saneto, N.I. Wolf, N. Darin, L.J. Wong, B.H. Cohen, R.K. Naviaux, The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 16–37.
- [2] J.F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.* 552 (2003) 335–441.
- [3] G.R. Steinberg, B.E. Kemp, AMPK in health and disease, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 1025–1078.
- [4] S.L. Colombo, S. Moncada, AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells, *Biochem. J.* 421 (2009) 163–169.
- [5] O. Altindag, H. Celik, Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia, *Redox Rep.* 11 (2006) 131–135.
- [6] S. Bagis, L. Tamer, G. Sahin, R. Bilgin, H. Guler, B. Ercan, C. Erdogan, Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatol. Int.* 25 (2005) 188–190.
- [7] S. Ozgocmen, H. Ozyurt, S. Sogut, O. Akyol, Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide, *Rheumatol. Int.* 26 (2006) 585–597.
- [8] M.D. Cordero, E. Díaz-Parrado, A.M. Carrión, S. Alfonsi, J.A. Sánchez-Alcazar, P. Bullón, M. Battino, M. de Miguel, Is inflammation a mitochondrial dysfunction-dependent event in fibromyalgia? *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 800–807.
- [9] M.D. Cordero, E. Alcocer-Gómez, M. de Miguel, O. Culic, A.M. Carrión, J.M. Alvarez-Suarez, P. Bullón, M. Battino, A. Fernández-Rodríguez, J.A. Sánchez-Alcazar, Can coenzyme Q10 improve clinical and molecular parameter in fibromyalgia? *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 1356–1361.
- [10] L. Bazzichi, G. Giannaccini, L. Betti, L. Fabbrini, L. Schmid, L. Palego, C. Giacomelli, A. Rossi, L. Giusti, F. De Feo, T. Giuliano, G. Mascia, S. Bombardieri, A. Lucacchini, ATP, calcium and magnesium levels in platelets of patients with primary fibromyalgia, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 1084–1090.
- [11] M. Neyal, F. Yimenicioglu, A. Aydeniz, A. Taskin, S. Saglam, M. Cekmen, A. Neyal, S. Gursoy, O. Erel, A. Balat, Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and fibromyalgia, *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115 (2013) 736–740.
- [12] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [13] P. Kakkar, B. Das, P.N. Viswanathan, A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase, *Indian J. Biochem. Biophys.* 21 (1984) 130–132.
- [14] D.G. Hardie, F.A. Ross, S.A. Hawley, AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 251–262.
- [15] S.B. Wu, Y.H. Wei, AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 233–247.

- [16] O.K. Melemedjian, M.N. Asiedu, D.V. Tillu, R. Sanoja, J. Yan, A. Lark, A. Khoutorsky, J. Johnson, K.A. Peebles, T. Lepow, N. Sonenberg, G. Dussor, T.J. Price, Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain, *Mol. Pain* 7 (2011) 70.
- [17] K. Cao, A. Zheng, J. Xu, H. Li, J. Liu, Y. Peng, J. Long, X. Zou, Y. Li, C. Chen, J. Liu, Z. Feng, AMPK activation prevents prenatal stress-induced cognitive impairment: modulation of mitochondrial content and oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 75 (2014) 156–166.
- [18] S.B. Wu, Y.T. Wu, T.P. Wu, Y.H. Wei, Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2014) 1331–1344.
- [19] K. Takeuchi, Y. Morizane, C. Kamami-Levy, J. Suzuki, M. Kayama, W. Cai, J.W. Miller, D.G. Vavvas, AMP-dependent kinase inhibits oxidative stress-induced caveolin-1 phosphorylation and endocytosis by suppressing the dissociation between c-Abl and Prdx1 proteins in endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 20581–20591.
- [20] Z. Lu, X. Xu, X. Hu, J. Fassett, G. Zhu, Y. Tao, J. Li, Y. Huang, P. Zhang, B. Zhao, Y. Chen, PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1011–1022.
- [21] D. Marmolino, M. Manto, F. Acquaviva, P. Vergara, A. Ravella, A. Monticelli, M. Pandolfo, PGC-1alpha down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia, *PLoS One* 5 (2010) e10025.
- [22] D.J. Clauw, Fibromyalgia: a clinical review, *JAMA* 311 (2014) 1547–1555.
- [23] M.E. Bote, J.J. García, M.D. Hinchado, E. Ortega, Inflammatory/stress feedback dysregulation in women with fibromyalgia, *Neuroimmunomodulation* 19 (2012) 343–351.
- [24] R. Alok, S.K. Das, G.G. Agarwal, L. Salwahan, R. Srivastava, Relationship of severity of depression, anxiety and stress with severity of fibromyalgia, *Clin. Exp. Rheumatol.* 29 (2011) S70–S72.
- [25] L. Arranz, M.A. Canela, M. Rafecas, Relationship between body mass index, fat mass and lean mass with SF-36 quality of life scores in a group of fibromyalgia patients, *Rheumatol. Int.* 32 (2012) 3605–3611.
- [26] B.L. Loevinger, D. Muller, C. Alonso, C.L. Coe, Metabolic syndrome in women with chronic pain, *Metabolism* 56 (2007) 87–93.
- [27] R. de Cabo, S. Fürer-Galbán, R.M. Anson, C. Gilman, M. Gorospe, M.A. Lane, An in vitro model of caloric restriction, *Exp. Gerontol.* 38 (2003) 631–639.

Mutation in Cytochrome b gene of mitochondrial DNA in a family with Fibromyalgia is associated with NLRP3-Inflammasome activation

Journal:	<i>Journal of Medical Genetics</i>
Manuscript ID	jmedgenet-2015-103392.R1
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	05-Oct-2015
Complete List of Authors:	Cordero, Mario D.; IBiS Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío-CSIC-University of Seville, Spain, Alcocer-Gómez, Elisabet; Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía, Marín-Aguilar, Fabiola; IBiS Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío-CSIC-University of Seville, Spain, Rybkina, Tatyana; División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Carretera de Utrera Km. 1, Sevilla, Spain., Cotan, David; Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía, Pérez-Pulido, Antonio; Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía, Alvarez-Suarez, Jose M.; Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, Battino, Maurizio; Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche – Sez. Biochimica, Università Politecnica delle Marche, 60100, Ancona, Italy., Sánchez-Alcázar, José A.; Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-CSIC-Junta de Andalucía, Carrion, Angel M.; División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Carretera de Utrera Km. 1, Sevilla, Spain., Culic, Ognjen; Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovacica 1, 10000 Zagreb, Croatia., Navarro-Pando, José M.; Unidad de Reproducción Humana y Cirugía Endoscópica, Instituto para el Estudio de la Biología de la Reproducción Humana (INEBIR). Bullon, Pedro; IBiS Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío-CSIC-University of Seville, Spain,
Keywords:	Muscle disease, Immunology (including allergy)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Confidential: For Review Only

1
2
3 **Mutation in Cytochrome b gene of mitochondrial DNA in a family with**
4
5 **Fibromyalgia is associated with NLRP3-Inflammasome activation**
6
7

8 Mario D. Cordero^{1,2}, Elisabet Alcocer-Gómez^{3,4}, Fabiola Marín-Aguilar¹, Tatyana
9 Rybkina⁵, David Cotán^{3,4}, Antonio Pérez-Pulido³, José Miguel Alvarez-Suarez⁶,
10 Maurizio Battino⁷, José Antonio Sánchez-Alcazar^{3,4}, Angel M. Carrión⁵, Ognjen Culic⁸,
11 José M Navarro-Pando⁹, Pedro Bullón^{1,2}
12
13
14
15

16
17 ¹ IBiS Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío-CSIC-
18 University of Seville, Spain
19

20 ² Research Laboratory, Oral Medicine Department, University of Sevilla, Sevilla, Spain
21

22 ³ Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide-
23 CSIC-Junta de Andalucía
24

25 ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER),
26 ISCIII, Sevilla, Spain.
27

28 ⁵ División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Carretera de
29 Utrera Km. 1, Sevilla, Spain.
30

31 ⁶ Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias de la Salud,
32 Universidad de Las Américas, Campus Udlapark, via a Nayón, Quito, Ecuador.
33

34 ⁷ Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche – Sez.
35 Biochimica, Università Politecnica delle Marche, 60100, Ancona, Italy.
36

37 ⁸ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovacica 1, 10000
38 Zagreb, Croatia.
39

40 ⁹ Unidad de Reproducción Humana y Cirugía Endoscópica, Instituto para el Estudio de
41 la Biología de la Reproducción Humana (INEBIR).
42

43 **Running Title:** Mitochondrial diseases and inflammasome
44

45 All authors declare no Conflict of Interests
46

47 **Word count:** 3477
48

49 **† Corresponding Author:**
50

51 Mario D. Cordero
52 IBiS Institute of Biomedicine of Seville, Universidad de Sevilla,
53 C/ Calle Antonio Maura Montaner s/n, 41013 –Sevilla, SPAIN.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Tel.: +34 954 481120
4 Fax: +34 954 486784
5 Email: mdcormor@us.es
6
7
8
9

10 Abstract

11 **Background:** Fibromyalgia (FM) is a world-wide diffuse musculoskeletal chronic pain
12 condition that affects up to 5% of the general population. Many symptoms associated
13 with mitochondrial diseases are reported in FM patients such as exercise intolerance,
14 fatigue, myopathy and mitochondrial dysfunction. In this study, we report a mutation
15 cytochrome b gene of mitochondrial DNA in a family with FM with inflammasome-
16 complex activation.
17
18
19

20 **Methods:** mtDNA from blood cells of five patients with FM were sequenced. We
21 clinically and genetically characterized a FM patient and family with a new mutation in
22 mtCYB. Mitochondrial mutation phenotypes were determined in skin fibroblasts and
23 transmitochondrial cybrids.
24
25

26 **Results:** After mtDNA sequence in FM patients, we found a mitochondrial
27 homoplasmic mutation m.15804T>C, in the mtCYB gene in a patient and family which
28 was maternally transmitted. Mutation was observed in several tissues and skin
29 fibroblasts showed a very significant mitochondrial dysfunction and oxidative stress.
30 Increased NLRP3-inflammasome complex activation was observed in blood cells from
31 patient and family.
32
33
34

35 **Conclusions:** We propose further studies on mtDNA sequence analysis in FM patients
36 with evidences for maternal inheritance. The presence of similar symptoms in
37 mitochondrial myopathies could unmask mitochondrial diseases among FM patients.
38 On the other hand, the inflammasome complex activation by mitochondrial dysfunction
39 could be implicated in the pathophysiology of mitochondrial diseases.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Mitochondria are essential organelles present in virtually all eukaryotic cells. One of the primary functions of mitochondria is ATP production via the oxidative phosphorylation system through a series of reactions mediated by complexes encoded by both nuclear and mitochondrial DNA (mtDNA) (1,2). Moreover, mitochondria play crucial roles in many other metabolic, regulatory and developmental processes and in a variety of pathological mechanisms (2,3).

Fibromyalgia (FM) is a common chronic pain syndrome accompanied by other symptoms such as fatigue, headache, sleep disorders, and depression. Despite the fact that it affects up to 5% of the general population worldwide, its pathogenic mechanism remains still largely elusive. In recent years, oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been found to be important in FM pathogenesis (4-6). Supporting these hypothesis, cells from FM patients have reduced mitochondrial mass, reduced mitochondrial respiratory chain activity and impaired bioenergetics (6-12). Furthermore, cytokines, especially IL1 β , may play a role in FM (11-14) and ROS have also been shown to be an important activator of inflammasome-mediated inflammation (15).

Mutations in mtDNA have been associated with a wide range of human pathologies related with exercise intolerance, musculoskeletal and nervous system alterations (2). To understand the implication of mtDNA in the pathophysiology of FM, we explored alterations of mtDNA in peripheral blood mononuclear cells (BMCs) from five FM patients. The current study describes a mutation in the cytochrome b gene (mtCYB), a mitochondrial DNA (mtDNA) gene, in one patient and several family members diagnosed with FM. Functional analysis in cybrids cells carrying the mitochondrial mutation revealed the pathogenic role of the mutation and the activation of

1
2
3 inflammasome. Interestingly, NLRP3-inflammasome activation was observed in
4
5 Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke (MELAS)
6
7 syndrome with 3243 A>G mutation in the tRNA^{Leu} (UUR) gene, Myoclonic epilepsy
8
9 with ragged-red fibers (MERRF) with 8344A>G mutation in the gene MT-TK, and
10
11 Leber hereditary optic neuropathy (LHON) with 11778G>A in the gene MT-ND4.
12

13 14 15 **MATERIAL AND METHODS**

16 17 18 **Ethical Statements**

19
20 The approval of the ethical committee of University of Seville was obtained, according
21
22 to the principles of the Declaration of Helsinki and all the International Conferences on
23
24 Harmonization and Good Clinical Practice Guidelines. All the participants into the
25
26 study gave their written informed consent before initiating the study.
27
28

29 30 31 **Reagents.**

32
33 Trypsin was purchased from Sigma Chemical Co., (St. Louis, Missouri). Anti-GAPDH
34
35 monoclonal antibody from Calbiochem-Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK). Anti-
36
37 NLRP3 antibody from Adipogen (San Diego, USA) and anti-IL-1 β (p17) from Santa
38
39 Cruz Biotechnology. Anti-active caspase-1 was obtained from Cell Signaling
40
41 Technology. A cocktail of protease inhibitors (complete cocktail) was purchased from
42
43 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). The Immun Star HRP substrate kit was from
44
45 Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).
46
47

48 49 50 **Fibroblast cultures**

51
52 Patient and control fibroblasts were obtained according to the Helsinki Declarations of
53
54 1964, as revised in 2001. Fibroblasts were cultured in D-MEM media (4500 mg/L
55
56 glucose, L-glutamine, piruvate), (Gibco, Invitrogen, Eugene, OR, USA) supplemented
57
58
59
60

1
2
3 with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Invitrogen, Eugene, OR, USA) and
4
5 antibiotics (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Cells were incubated at 37°C in
6
7 a 5% CO₂ atmosphere.
8

9 10 **Mitochondrial disease fibroblasts**

11
12 MELAS cultured fibroblasts were derived from a patient who harbored a heteroplasmic
13
14 A to G mutation at nucleotide 3243 in the tRNA^{Leu}(UUR) gene. Clinically, the patient
15
16 had encephalomyopathy, stroke-like episodes, and lactic acidosis, plus short stature,
17
18 deafness diabetes mellitus, dementia, and ataxia. The level of the m.3243G>A mutation
19
20 was 43% in fibroblasts. Molecular pathophysiology is described in reference 16.
21

22
23 Merrf cultured fibroblasts were derived from a patient harboring a heteroplasmic
24
25 m.8344A>G mutation (57%). Molecular pathophysiology is described in reference 17.
26

27
28 LHON cultured fibroblasts were derived from a patient harboring a 11778G>A
29
30 mutation which has not yet been characterized.
31

32 33 **Biological samples**

34
35 Blood, urine, skin biopsy and saliva samples were collected from all of the probands
36
37 and their maternal relatives. DNA was extracted from peripheral leukocytes by the
38
39 method of Miller et al. (1988) (18). The first morning urine sample of 30–40 ml was
40
41 collected in a clean 50 ml centrifuge tube (produced by CORNING) and centrifuged at
42
43 1000 rpm for 10 min to obtain sediment. Total DNA was then extracted from urine, and
44
45 saliva by the silica method (19). Total skin DNA was obtained by the phenol–
46
47 chloroform extraction method.
48
49

50 51 52 **PCR Amplification and Sequencing**

53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Complete mtDNA was amplified from total DNA in 24 overlapping 800–1,000-bp-long
4
5 PCR fragments. Primers were carefully designed using the revised human mitochondrial
6
7 DNA Cambridge reference sequence (www.mitomap.org/mitoseq.html).
8
9

10 PCR fragments were sequenced in both strands in an ABI 3730 (Applied Biosystems;
11
12 www.appliedbiosystems.com; Foster City, CA) sequencer using a BigDye v3.1
13
14 sequencing kit (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com; Foster City, CA).
15
16 Assembling and identification of variations in the mitochondrial DNA was carried out
17
18 using the Staden package (20). For this purpose the revised human mitochondrial DNA
19
20 Cambridge reference sequence (www.mitomap.org/mitoseq.html) was used. The whole
21
22 process was carried out at Secugen (Madrid, Spain).
23
24

25 26 **Mitochondrial respiratory chain enzyme activities**

27
28 Activities of NADH:coenzyme Q1 oxidoreductase (complex I), succinate
29
30 deshydrogenase (complex II), ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (complex III),
31
32 cytochrome c oxidase (complex IV), NADH: cytochrome c reductase (complex I+III),
33
34 succinate:cytochrome c reductase (complex II +complex III) and citrate synthase (CS)
35
36 were determined on sonicated permeabilized fibroblasts using previously described
37
38 spectrophotometric methods (21). Results are expressed as Units/CS (mean±SD).
39
40 Proteins of fibroblast homogenates were analyzed by the Lowry procedure (22).
41
42

43 44 **Western Blotting for mitochondrial protein**

45
46 Whole cellular lysate from fibroblasts was prepared by gentle shaking with a buffer
47
48 containing 0.9% NaCl, 20 mM Tris-ClH, pH 7.6, 0.1% triton X-100, 1 mM
49
50 phenylmethylsulfonylfluoride and 0.01% leupeptine. Electrophoresis was carried out in
51
52 a 10–15% acrylamide SDS/PAGE. Proteins were transferred to Immobilon membranes
53
54 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). Proteins were electrophoresed, transferred to
55
56 nitrocellulose membranes and, after blocking over night at 4°C, incubated with the
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

respective antibody solution, diluted at 1:1000. Membranes were then probed with their respective secondary antibody (1:2500). Immunolabeled proteins were detected using a chemiluminescence method (Immun Star HRP substrate kit, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Protein was determined by the Bradford method (23). Western blot image was quantified using ImageJ software (see: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Measurement of CoQ levels

CoQ levels were performed using a method previously described by our group (11).

IL-1 β and IL-18 levels

IL-1 β (GenWay, San Diego CA, USA) and IL-18 (Biosensis, Australia) levels in serum or culture mediums were assayed in duplicates by commercial ELISA kits.

ATP levels

ATP levels were determined by a bioluminescence assay using an ATP determination kit from Invitrogen-Molecular Probes (Eugene, OR, USA) following the instructions of the manufacturer.

Quantification of mtDNA

Nucleic acids were extracted from fibroblasts by standard cellular lysis. The primers used were: for mitochondrial DNA, mtF3212 (5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3') and mtR3319 (5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTAA-3') and those for nuclear DNA for loading normalization, 18S rRNA gene 18S1546F (5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3') and 18S1650R (5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT3'). Arbitrary units were computed as the ratio between the optical density band corresponding to the mitochondrial DNA studied in the 20–30th cycle and that of the nuclear DNA in the 15th amplification cycle. One unit was considered to be the ratio corresponding to the control patient. For live cell imaging of

1
2
3 mtDNA, control and FM fibroblasts cells were cultured in dishes with a glass bottom
4 (MatTek Corporation, Ashland, MA) and stained with PicoGreen (3 l/ml) for 1 h at
5
6
7 37°C. TMRM (100 nM) staining was used to visualize mitochondria.
8

9 10 **Patients and cybrids mutation genotyping**

11
12 Once DNA was extracted, PCR amplification of the mtCYB fragment containing the
13
14 mutation, from 15700 to 16003 nucleotides of mtDNA, was performed using the
15
16 following primers: 5'-TCCATCAGGGTATCCTCTCC-3' and 5'-
17
18 GGAGGCAAGCATAAGACTGG -3', yielding a 300 bp product. Amplification
19
20 products were then digested with BbvI enzyme and fractionated in a 2.5% agarose gel.
21
22 After DNA gel electrophoresis non-mutant and mutant mtDNA fragments could be
23
24 discriminated because in BbvI restriction assay they generated differential band patterns
25
26 (non-mutant mtDNA: 300 bp fragment; and mutant mtDNA: 181 and 119 bp
27
28 fragments).
29
30

31 32 **Mitochondrial ROS production**

33
34 Mitochondrial ROS generation in BMCs and fibroblasts was assessed by MitoSOX™
35
36 red, a red mitochondrial superoxide indicator. MitoSOX Red is a novel fluorogenic dye
37
38 recently developed and validated for highly selective detection of superoxide in the
39
40 mitochondria of live cells. MitoSOX™ Red reagent is live-cell permeant and is rapidly
41
42 and selectively targeted to the mitochondria. Once in the mitochondria, MitoSOX™
43
44 Red reagent is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence.
45
46

47
48 Flow cytometry. Approximately 1×10^6 cells were incubated with $1 \mu\text{M}$ MitoSOX™
49
50 red for 30 min at 37°C, washed twice with PBS, resuspended in 500 μl of PBS and
51
52 analyzed by flow cytometry in an Epics XL cytometer, Beckman Coulter, Brea,
53
54 California, USA (excitation at 510 nm and fluorescence detection at 580 nm).
55
56

57 58 **Oxygen consumption rate (OCR)**

Oxygen consumption rate (OCR) was assessed in real-time using the 24 well Extracellular Flux Analyzer XF-24 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's protocol, which allows to measure OCR changes after up to four sequential additions of compounds. Cells (5×10^4 /well) were seeded for 16 hours in the XF-24 plate before the experiment in a DMEM/10% serum medium and then incubated for 24 hours with the different compounds studied. Before starting measurements, cells were placed in a running DMEM medium (supplemented with 25 mM glucose, 2 mM glutamine, 1 mM sodium Pyruvate, and without serum) and pre-incubated for 20 min at 37°C in the absence of CO₂ in the XF Prep Station incubator (Seahorse Bioscience, Billerica MA, USA). Cells were transferred to an XF-24 Extracellular Flux Analyzer and after an OCR baseline measurement a profiling of mitochondrial function was performed by sequential injection of four compounds that affect bioenergetics, as follows: 55 µl of oligomycin (final concentration 2.5 µg/mL) at injection in port A, 61 µl of 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) (final concentration 1 mM) at injection in port B, and 68 µl of antimycin/rotenone (final concentration 10 µM/1µM) at injection in port C. A minimum of five wells were utilized per condition in any given experiment. Data are expressed as pMol of O₂ consumed per minute normalized to 1000 cells (pMol O₂/1000 cells/min).

Structure and sequence conservation analysis

To obtain the structure for both CYB and COXIII proteins, the Swiss-Model server was used (24) with default parameters and they were visualized with the Rasmol program. Logo diagrams were created using Skylign to show the residue conservation in the surroundings of the studied mutation (25).

Statistical Analysis

1
2
3 Data in figures is given as mean \pm SD. Data between different groups were analyzed
4 statistically by using ANOVA on Ranks with Sigma Plot and Sigma Stat statistical
5 software (SPSS for Windows, 19, 2010, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). For cell-culture
6 studies, Student's t test was used for data analyses. A value of $p < 0.05$ was considered
7 significant.
8
9

10 11 12 13 14 15 **Results**

16
17 To assess if mitochondrial dysfunction is associated with mutations in mitochondrial
18 genes in FM, mtDNA from blood cells of five patients with FM and intolerance exercise
19 were sequenced. Mean age of the FM group was 44 ± 2 years. The mean duration of
20 symptoms in the FM group was 6.2 ± 1.7 years. Clinical data are shown in **Table S1**.
21
22 Sequence analysis of the entire mitochondrial genome revealed several known
23 polymorphic variants similar in all patients compared with the revised Cambridge
24 Reference Sequence (**Table S2**), and one homoplasmic mutation in patient 3:
25 m.15804T>C, in the mtCYB gene, predicting the substitution of the valine at codon 353
26 with an alanine (p.V353A). This is the only suspected change observed in patient 3 and
27 family not observed in other patients and controls. It was absent in the other 60 patients
28 and 40 controls, suggesting that it could be associated to the disease in this particular
29 family.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 We next analyzed the pathological implications of this mutation in patient 3 and her
46 family.
47
48

49 50 51 **Molecular analysis**

52
53 The T \rightarrow C transition in patient 3 generated a new restriction site for the BbvI enzyme
54 that allowed us to design a PCR assay for the diagnosis of the m.15.805 mutation (**Fig,**
55
56
57
58 **1A**). Molecular analysis in patient 3, a woman of 45 years old, showed that the 15804
59
60

1
2
3 mutation was homoplasmic in blood cells, urine, and saliva samples (**Fig. 1B**). In
4
5 addition, we evaluated several patient 3 family members from three generations (**Fig.**
6
7 **1C**). The pedigree clearly showed a typical pattern of maternal inheritance.
8
9 Furthermore, the mutation was present in several members with typical clinical
10
11 manifestation of FM whose diagnosis was established by an experienced rheumatologist
12
13 according to ACR criteria. Laboratory evaluation in patient 3 was normal, including
14
15 blood lactate, electrolytes, creatine kinase, and lipid profile (**Table S3**).
16
17

18 19 **Pathophysiological studies**

20
21
22 Consistent with the fact that the new mutation was detected in a complex III protein,
23
24 skin fibroblasts from patient 3 showed reduced levels of complex III activity (**Figure**
25
26 **2A**) associated with CoQ₁₀ deficiency (**Figure 2B**), reduced ATP levels, high levels of
27
28 mitochondrial ROS, reduced mtDNA contents (**Figure 2C-E**) and low rate proliferation
29
30 of the cells (**Figure 2F**). Evaluation of the effect of the amino acid change on the
31
32 protein structure showed that the mutation (yellow) was localized in an opposite area of
33
34 the ubiquinone binding site (green) (**Figure 2G**). Similar pathophysiological alterations
35
36 was observed in other biological samples from patient 3 such as blood cells, urine,
37
38 saliva samples and platelets (**Table S4**).
39
40
41

42
43 Mitochondrial dysfunction in FM fibroblasts was also assessed by a reduced oxygen
44
45 consumption rate (OCR) determined by exposition of cells sequentially to each of four
46
47 modulators of oxidative phosphorylation (OXPHOS) such as oligomycin (an inhibitor
48
49 of F₁F_o-ATPase or complex V), 2,4-DNP (uncoupling of the OXPHOS electron
50
51 transport chain) and antimycin/rotenone (complex I and III inhibitors respectively)
52
53 (**Figure 2H-J**).
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Under oxidative stress conditions, mitochondria can be damaged resulting in cellular
4 dysfunction and inflammation (11). Inhibition of complex I or III of the mitochondrial
5 respiratory chain has been shown to induce ROS production and NLRP3 inflammasome
6 activation (15,26,27). Therefore, we analyzed the activation of inflammasome related
7 proteins in patient 3 samples. We found increased NLRP3, active caspase 1 (p20) and
8 IL-1 β (p17) protein expression levels in patient 3 fibroblasts (**Figure 3A**) and increased
9 levels of IL-1 β and IL-18 in serum from the patient suggesting inflammasome
10 activation (**Figure 3B and C**). To examine the effect of inflammasome activation in cell
11 metabolism, patient 3 fibroblasts were treated with 16673-34-0 (5-chloro-2-methoxy-N-
12 [2-(4-sulfamoylphenyl)ethyl] benzamide (**Fig 3D**), a new specific inhibitor of NLRP3
13 (28), and cellular growth was evaluated. Inhibition of NLRP3 induced an increase of
14 cell growth in patient fibroblasts (**Figure 3D**). Interestingly, blood mononuclear cells
15 (BMCs), lymphocytes and monocytes, from the family members harboring the mutation
16 also showed increased IL-1 β (p17) protein expression levels as well as increased L-1 β
17 serum levels (**Figure 3E and F**). We also analyzed the activation of NLRP3-
18 inflammasome in fibroblasts from other mitochondrial diseases such as MELAS, Merrf
19 and LHON. Our data show increased NLRP3 and IL-1 β (p17) protein expression levels
20 in fibroblasts from these diseases (**Figure 3G**).

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43 To confirm the pathological condition of this mutation independently of the nuclear
44 background, we generated transmitochondrial cell lines (cytoplasmic hybrids or
45 cybrids) using the osteosarcoma 143B206 rho0 cell line (29) and platelet mitochondria
46 from patient 3. Control cybrids were also generated by using platelet mitochondria
47 from healthy individual. Then, we confirmed that control and mutant cybrids clones harbored
48 mtDNA from the corresponding donor platelets (**Figure 4A**). Complex III activity and
49 ATP levels in mutant cybrids were lower than in control cybrids (**Figure 4B and C**).

1
2
3 Mitochondrial ROS levels in mutant cybrids were also significantly higher than in
4 control cybrids (**Figure 4D**). Interestingly, active caspase 1 (p20) and IL-1 β (p17)
5
6 protein expression levels were increased in mutant cybrids (**Figure 4E**). These results
7
8 strongly suggest that the mutated mtDNAs are indeed responsible for the biochemical
9
10 alterations occurring in patient cells.
11
12

13
14 CoQ₁₀ deficiency has been commonly associated with mitochondrial diseases (30), and
15
16 its supplementation has been documented as an effective treatment in several clinical
17
18 cases (31,32,33). Given that we previously showed that CoQ₁₀ treatment induces a
19
20 marked clinical improvement in FM patients (34,35), and considering the favorable
21
22 effects of CoQ₁₀ on pathological cells, the patient started oral treatment with CoQ₁₀
23
24 (5mg/Kg/day). After 7 months, the patient showed a significant improvement in FM
25
26 clinical symptoms associated with restoration of altered biochemical parameters to
27
28 normal levels (**Table S4**).
29
30
31

32 33 **Structure and amino acid sequence analysis**

34
35
36 The mutation in CYB protein substitutes a partially conserved valine residue with an
37
38 alanine. This is a conservative change which does not seem to impair the function or
39
40 structure. But this same change has been previously found in another protein of the
41
42 mitochondrial respiratory chain, COXIII, where it was associated with Leigh syndrome
43
44 (36). Comparing the residues around the change and their conservation, we showed that
45
46 there is a high similarity in that region between both proteins (**Figure 5**). In both
47
48 proteins the valine residue appears in the middle of a trans membrane helix enriched in
49
50 hydrophobic residues with similar characteristics.
51
52
53

54 55 **Discussion**

1
2
3 Mitochondrial disorders are an important group of genetic conditions characterized by
4
5 impaired oxidative phosphorylation and bioenergetics which present a great variability
6
7 of symptoms, organ involvement, and clinical course. Furthermore, these diseases
8
9 considerably impact the quality of life of the patients and quite often shorten their life
10
11 expectancy. Many symptoms associated with mitochondrial diseases are commonly
12
13 presented in FM patients: exercise intolerance, fatigue, myopathy and various
14
15 neurological complaints (37).
16
17

18
19 Moreover, mitochondrial diseases have been usually related to maternal inheritance (2).
20
21 However, in FM patients, although the inheritance factor has been documented, the
22
23 absence of known pathogenic mechanisms complicates family studies. Familial
24
25 aggregation studies revealed high possibilities of inherited factors in FM. Thus, Arnold
26
27 and coworkers compared FM with other pain diseases such as arthritis rheumatoid and
28
29 they found a higher inherited factor in the FM group (38). In this respect, Buskila and
30
31 coworkers observed a high prevalence with FM among offspring of FM mothers (39).
32
33 Supporting these findings, in our study we show for the first time a mutation in mtDNA
34
35 in a family diagnosed of FM. As expected, the mutation was maternally transmitted and
36
37 was present in all family members with typical clinical manifestation of FM.
38
39 Pathophysiological studies showed evidences of a mitochondrial dysfunction in patient
40
41 cells that was restored by CoQ₁₀ treatment. The mutation was absent in the other
42
43 patients and healthy controls included in the study so, although more healthy controls
44
45 must be examined to confirm these results, our data suggests that it could be associated
46
47 to the disease in this family. The mutation found in our study converted a highly
48
49 conserved valine at position 353 to alanine in the transmembrane functional domain of
50
51 mtCYB, which could affect transfer of electrons from ubiquinol (reduced CoQ₁₀) to
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 cytochrome c, impair the utilization of energy to translocate protons from inside the
4
5 mitochondrial inner membrane the outside and increases ROS production (40).
6
7

8 Mitochondrial dysfunction in FM has been widely documented. Thus, studies in muscle
9
10 biopsies have demonstrated the presence of inflammatory markers, subsarcolemmal
11
12 mitochondrial accumulation, abnormal mitochondria, higher incidence of ragged red
13
14 fibers, and defects of cytochrome-c-oxidase (complex IV of oxidative phosphorylation)
15
16 (41,42,43). It is interesting to mention that ragged red fibers, subsarcolemmal
17
18 mitochondrial accumulation and alteration in ultrastructure, number and size of
19
20 mitochondria are typical defects and markers found in genuine mitochondrial diseases
21
22 (such as MELAS, MERRF, Kearns-Sayre syndrome, Pearson syndrome, Leigh
23
24 syndrome, etc) (2). Recently, we have studied mitochondrial dysfunction in skin
25
26 fibroblasts from FM patients (44). Despite a marked mitochondrial impairment in FM
27
28 patient cells, the mtDNA sequence analysis did not show any important alterations such
29
30 as mutations or deletions that could justify the mitochondrial defects. Therefore, it is
31
32 reasonable to postulate that mitochondrial DNA alterations can be only detected in a
33
34 reduced subgroup of patients diagnosed of FM. Mitochondrial dysfunction is implicated
35
36 in many diseases in a direct or indirect form (1,2). Mitochondrial diseases are a group of
37
38 diseases with a reduced prevalence (5.7 per 100,000 in the population over 14 years of
39
40 age) (45), and the symptoms can be confounded with other diseases and frequently
41
42 labelled as fibromyalgia or chronic fatigue syndrome (46). In this respect, Villanova and
43
44 coworkers reported in 1999 the case of a 45-year-old woman with FM and mtDNA
45
46 deletion of about 4 kb and propose the presence of patients with mitochondrial diseases
47
48 among labelled FM patients (47). In this sense, our data confirm this previous report in
49
50 a new family case.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In this study, we also propose the implication of the inflammasome complex in the
4
5 pathophysiology of mitochondrial diseases. Inflammasome has emerged recently as an
6
7 unexpected sensor for metabolic stress and it has been implicated in several diseases in
8
9 which mitochondria play a central pathogenic role (48). Inhibition of complex I or III of
10
11 the mitochondrial respiratory chain has been shown to induce ROS production and
12
13 NLRP3 inflammasome activation (15). Furthermore, inflammation has been proposed to
14
15 participate in the pathophysiological mechanisms of mitochondrial disorders (49). In
16
17 addition, inflammatory events has been observed in patients with a 3251A > G mutation
18
19 supporting the hypothesis that mitochondrial diseases induce a pathologic inflammatory
20
21 response (50). In this sense, we show the inflammasome activation implicated with
22
23 fibroblasts of three known mitochondrial diseases with mutation in Complex I,
24
25 mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene and MT-TK genes and our new mutation. So,
26
27 NLRP3-inflammasome could be induced for different mitochondrial mutations in which
28
29 oxidative stress has been involved. Another interesting result showed in this study is the
30
31 effect of the NLRP3 inhibition in the fibroblasts from the patient. A correct cell growth
32
33 is an important marker of metabolic status in the cell. Fibroblasts from mitochondrial
34
35 diseases have been shown to have a relatively reduced growth (51), so the increment of
36
37 cell growth of the fibroblasts from patient 3 is shows a possible improvement in cellular
38
39 metabolism. Furthermore, this improvement demonstrates that inflammasome activation
40
41 has a pathophysiological role in the phenotype of fibroblasts from patient 3. As
42
43 inflammation has been shown to induce mitochondrial dysfunction (11), an inhibition of
44
45 several cytokines could prevent mitochondrial damage and cell death. According to this,
46
47 the inhibition of inflammasome could be a new pharmacological target in mitochondrial
48
49 diseases.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 We have to take account that 15804T>C polymorphism is a rare variant identified in
4
5 20/29,867 sequences in Mitomap's GeneBank set (www.mitomap.org). Epidemiologic
6
7 studies have associated mitochondrial haplogroups to mitochondrial diseases.
8
9 Therefore, it is very difficult to find the etiology of these diseases due to its
10
11 multifactorial facet in which we find the combination of genetic and environmental
12
13 factors (52). All these factor individually contribute only in a small part to the
14
15 development of the illness. Thus, the haplogroup-defining mutations might behave as
16
17 susceptibility factors, but they could have only a small effect on the physiopathology.
18
19 Because the effects of these changes would be highly dependent on the 'context' in
20
21 which the genetic variant is acting, the activation of inflammatory events could help to
22
23 explain the pathological context induced by a haplogroup-defining mutations. In this
24
25 respect, a cellular approach is available that involves the use of what is known as
26
27 'cybrids' (52). In our study, cybrids showed the same pathophysiological events of
28
29 fibroblasts and inflammasome activation.
30
31
32
33

34
35 The most significant implication of these data could be the potential role of
36
37 inflammasome complex activation and the subsequent IL-1 β release in the different
38
39 affected tissues in mitochondrial diseases (brain, muscle, kidney, heart, eye) (53,54).
40
41 Probably, a high content of defective mitochondria could induce NLRP3-inflammasome
42
43 activation by increased ROS production. In this sense, inflammasome inhibition could
44
45 represent an interesting new therapeutic option in mitochondrial diseases. However,
46
47 taken into account that ROS serve as important inflammasome activating signals,
48
49 antioxidant treatment can also be effective in these diseases (54). Pharmacological
50
51 approach in mitochondrial diseases is based on removing noxious metabolites, using
52
53 reactive oxygen species scavengers and administering different compounds as CoQ₁₀
54
55 (55). Indeed, mitochondria-targeted lipophilic antioxidants selectively block
56
57
58
59
60

1
2
3 mitochondrial oxidative damage and prevent some types of cell death. Consequently,
4
5 inflammasome complex which is activated by mitochondrial ROS production could be
6
7 selectively inhibited by lipophilic antioxidants. Interestingly, it has been reported that
8
9 CoQ₁₀ inhibits NLRP3-inflammasome activation in FM patients (12). Furthermore,
10
11 MitoQ, a mitochondria-targeted derivative of CoQ₁₀, has also been reported to inhibit
12
13 NLRP3-inflammasome (56). As CoQ₁₀ is a common treatment for mitochondrial
14
15 diseases (30,31,32,57,58), here we report another potential mechanism by which CoQ₁₀
16
17 treatment can be effective in these patients.
18
19

20
21 In conclusion, we propose the indication of mtDNA sequence analysis in FM patients
22
23 with evidences for maternal inheritance. The presence of symptoms similar to
24
25 mitochondrial myopathies could unmask mitochondrial diseases among FM patients
26
27 who could benefit from genetic diagnostic testing by mtDNA sequence analysis and be
28
29 eligible for treatment with CoQ₁₀ and/or another mitochondrial targeting compound.
30
31 Furthermore, the implication of inflammasome complex as a stress sensor could to
32
33 encourage the damage and impairing the symptoms in mitochondrial diseases.
34
35
36

37 38 **Acknowledgments**

39
40 This work has been supported by Federación Andaluza de Fibromialgia y Fatiga
41
42 Crónica (ALBA Andalucía), Federación Onubense de Fibromialgia y Fatiga Crónica,
43
44 grants from the Fundación Ramón Areces and DGICYT (Departamento Gubernamental
45
46 de Investigaciones Científicas y Tecnológicas: BFU2011-27207), Grupo de
47
48 Investigación Junta de Andalucía CTS113 and Consejería de Salud of the Junta de
49
50 Andalucía (PI-0036-2014).
51
52
53
54

55
56 **Conflict of Interest:** The authors report no conflict of interest.
57
58
59
60

Author Contributions

P.B. and M.D.C. conceived of the study and wrote the manuscript. E.A.G., F.M.A., T.R., J.M.N.P., and D.C. performed cell experiments. J.A.S.A. and A.P.P performed bioinformatics approximation. J.M.A.S. and M.B. performed oxygen consumption rate and bioenergetics experiments. A.M.C., and O.C. performed cybrids experiments. P.B. and M.D.C. conducted patient evaluations. All authors analyzed and discussed data and commented on the manuscript.

References

1. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol.* 2012;226:274-86.
2. Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, Wong LJ, Cohen BH, Naviaux RK. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 2008; 94:16-37.
3. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552:335-441.
4. Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O. Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatol Int* 2006; 26:585-97.
5. Bagis S, Tamer L, Sahin G, Bilgin R, Guler H, Ercan B, Erdogan C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatol Int* 2005; 25:188-90.
6. Cordero MD, De Miguel M, Moreno-Fernández AM, Carmona López IM, Garrido Maraver J, Cotán D, Gómez Izquierdo L, Bonal P, Campa F, Bullon P, Navas P, Sánchez Alcázar JA. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implication in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Res Ther* 2010; 12:R17.
7. Gerdle B, Forsgren MF, Bengtsson A, Leinhard OD, Sören B, Karlsson A, Brandejsky V, Lund E, Lundberg P. Decreased muscle concentrations of ATP and PCR in the quadriceps muscle of fibromyalgia patients--a 31P-MRS study. *Eur J Pain.* 2013;17:1205-15.
8. Miyamae T, Seki M, Naga T, Uchino S, Asazuma H, Yoshida T, Iizuka Y, Kikuchi M, Imagawa T, Natsumeda Y, Yokota S, Yamamoto Y. Increased

- oxidative stress and coenzyme Q10 deficiency in juvenile fibromyalgia: amelioration of hypercholesterolemia and fatigue by ubiquinol-10 supplementation. *Redox Rep.* 2013;18:12-9.
9. Cordero MD, Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Culic O, Carrión AM, Alvarez-Suarez JM, Bullón P, Battino M, Fernández-Rodríguez A, Sánchez-Alcazar JA. Can Coenzyme Q10 Improve Clinical and Molecular Parameters in Fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:1356-1361.
10. Bazzichi L, Giannaccini G, Betti L, Fabbrini L, Schmid L, Palego L, Giacomelli C, Rossi A, Giusti L, De Feo F, Giuliano T, Mascia G, Bombardieri S, Lucacchini A. ATP, calcium and magnesium levels in platelets of patients with primary fibromyalgia. *Clin Biochem* 2008; 41: 1084-90.
11. Cordero MD, Díaz-Parrado E, Carrión AM, Alfonsi S, Sánchez-Alcazar JA, Bullón P, Battino M, de Miguel M. Is inflammation a mitochondrial dysfunction-dependent event in Fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal* 2013; 18:800-7.
12. Cordero MD, Alcocer-Gómez E, Culic O, Carrión AM, de Miguel M, Díaz-Parrado E, Pérez-Villegas EM, Bullón P, Battino M, Sánchez-Alcazar JA. NLRP3 Inflammasome Is Activated in Fibromyalgia: The Effect of Coenzyme Q10. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 20:1169-80.
13. Bazzichi L, Rossi A, Massimetti G, Giannaccini G, Giuliano T, De Feo F, Ciapparelli A, Dell'Osso L and Bombardieri S. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25:225-30.
14. Ross RL, Jones KD, Bennett RM, Ward RL, Druker BJ and Wood LJ. Preliminary Evidence of Increased Pain and Elevated Cytokines in Fibromyalgia

- 1
2
3 Patients with Defective Growth Hormone Response to Exercise. *Open Immunol*
4
5 J. 2010;3:9-18.
6
7
8 15. Zhou R, Yazdi AS, Menu P and Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3
9
10 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469:221-5.
11
12 16. Cotán D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Ávila M, Rodríguez-
13
14 Hernández A, Gómez Izquierdo L, De la Mata M, De Miguel M, Lorite JB,
15
16 Infante ER, Jackson S, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. Secondary coenzyme Q10
17
18 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS
19
20 fibroblasts. *FASEB J*. 2011;25:2669-87.
21
22
23 17. De la Mata M, Garrido-Maraver J, Cotán D, Cordero MD, Oropesa-Ávila M,
24
25 Izquierdo LG, De Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Ybot P, Jackson S, Sánchez-
26
27 Alcázar JA. Recovery of MERRF fibroblasts and cybrids pathophysiology by
28
29 coenzyme Q10. *Neurotherapeutics*. 2012;9:446-63.
30
31
32 18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for
33
34 extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid. Res*. 1988;16:1215.
35
36
37 19. Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA
38
39 purification. *Trends Genet*. 1995;11:8.
40
41
42 20. Bonfield JK, Rada C, Staden R. Automated detection of point mutations using
43
44 fluorescent sequence trace subtraction. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:3404-9.
45
46
47 21. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, and
48
49 Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain
50
51 deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994;228: 35–51.
52
53
54 22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the
55
56 Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
57
58
59
60

- 1
2
3 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of
4 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
5 Anal Biochem 1976; 72:248-254.
6
7
8
9 24. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F,
10 Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. SWISS-MODEL: modelling
11 protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic
12 Acids Res. 2014;42(Web Server issue):W252-8.
13
14
15
16
17 25. Wheeler TJ, Clements J, Finn RD. Skylign: a tool for creating informative,
18 interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov
19 models. BMC Bioinformatics. 2014;15:7.
20
21
22
23
24 26. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan
25 VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C,
26 Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T and Arditi M. Oxidized
27 Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis.
28 Immunity. 2012;36:401-14.
29
30
31
32
33 27. Ding Z, Liu S, Wang X, Theus S, Fan Y, Deng X, Mehta JL. LOX-1 - dependent
34 mitochondrial DNA damage and NLRP3 activation during systemic
35 inflammation in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2014;451:637-43.
36
37
38
39
40 28. Marchetti C, Chojnacki J, Toldo S, Mezzaroma E, Tranchida N, Rose SW,
41 Federici M, Van Tassell BW, Zhang S, Abbate A. A novel pharmacologic
42 inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury after ischemia-
43 reperfusion in the mouse. J Cardiovasc Pharmacol. 2014;63:316-22.
44
45
46
47
48
49
50 29. King, M.P. and Attardi, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with
51 exogenous mitochondria by complementation. Science. 1989;246:500-503.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 30. Quinzii CM, Hirano M. Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Dev Disabil*
4
5 Res Rev. 2010;16:183-8.
6
7 31. Hargreaves IP. Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease. *Int J*
8
9 Biochem Cell Biol. 2014;49:105-11.
10
11 32. Chen Z, Zhao Z, Ye Q, Chen Y, Pan X, Sun B, Huang H, Zheng A. Mild clinical
12
13 manifestation and unusual recovery upon coenzyme Q₁₀ treatment in the first
14
15 Chinese Leigh syndrome pedigree with mutation m.10197 G>A. *Mol Med*
16
17 Rep. 2015;11:1956-62.
18
19 33. Roos S, Lindgren U, Ehrstedt C, Moslemi AR, Oldfors A. Mitochondrial DNA
20
21 depletion in single fibers in a patient with novel TK2 mutations. *Neuromuscul*
22
23 Disord. 2014;24:713-20.
24
25 34. Cordero MD, Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Culic O, Carrión AM, Alvarez-
26
27 Suarez JM, Bullón P, Battino M, Fernández-Rodríguez A, Sánchez-Alcazar JA.
28
29 Can coenzyme q10 improve clinical and molecular parameters in fibromyalgia?
30
31 *Antioxid Redox Signal*. 2013;19:1356-61.
32
33 35. Cordero MD, Cotán D, del-Pozo-Martín Y, Carrión AM, de Miguel M, Bullón
34
35 P, Sánchez-Alcazar JA. Oral coenzyme Q10 supplementation improves clinical
36
37 symptoms and recovers pathologic alterations in blood mononuclear cells in a
38
39 fibromyalgia patient. *Nutrition*. 2012;28:1200-3.
40
41 36. Mkaouar-Rebai E1, Ellouze E, Chamkha I, Kammoun F, Triki C, Fakhfakh F.
42
43 Molecular-clinical correlation in a family with a novel heteroplasmic Leigh
44
45 syndrome missense mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III
46
47 gene. *J Child Neurol*. 2011;26:12-20.
48
49 37. Watson NF, Buchwald D, Goldberg J, Noonan C, Ellenbogen RG. Neurologic
50
51 signs and symptoms in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2839-44.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 38. Arnold LM, Hudson JI, Hess EV, Ware AE, Fritz DA, Auchenbach MB, Starck
4 LO, Keck PE Jr. Family study of fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2004;50:944-
5 52.
6
7
8
9
10 39. Buskila D, Neumann L, Hazanov I, Carmi R. Familial aggregation in the
11 fibromyalgia syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 1996;26:605-11.
12
13
14 40. Lanciano P, Khalfaoui-Hassani B, Selamoglu N, Ghelli A, Rugolo M, Daldal F.
15 Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial
16 versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta.*
17 2013;1827:1332-9.
18
19
20
21
22 41. Pongratz DE, Späth M. Morphologic aspects of fibromyalgia. *Z Rheumatol*
23 1998;57:47-51.
24
25
26
27 42. Kalyan-Raman UP, Kalyan-Raman K, Yunus MB, Masi AT. Muscle pathology
28 in primary fibromyalgia syndrome: a light microscopic, histochemical and
29 ultrastructural study. *J Rheumatol.* 1984;11:808-13.
30
31
32
33 43. Yunus MB, Kalyan-Raman UP, Kalyan-Raman K, Masi AT. Pathologic changes
34 in muscle in primary fibromyalgia syndrome. *Am J Med.* 1986;81:38-42.
35
36
37
38 44. Alcocer-Gómez E, Garrido-Maraver J, Bullón P, Marín-Aguilar F, Cotán D,
39 Carrión AM, Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Sánchez-Alcazar JA, Battino M,
40 Cordero MD. Metformin and caloric restriction induce an AMPK-dependent
41 restoration of mitochondrial dysfunction in fibroblasts from Fibromyalgia
42 patients. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852:1257-1267.
43
44
45
46
47 45. Arpa J, Cruz-Martínez A, Campos Y, Gutiérrez-Molina M, García-Rio F, Pérez-
48 Conde C, Martín MA, Rubio JC, Del Hoyo P, Arpa-Fernández A, Arenas J.
49 Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 46. van de Glind G, de Vries M, Rodenburg R, Hol F, Smeitink J, Morava E.
4
5 Resting muscle pain as the first clinical symptom in children carrying the MTTK
6
7 A8344G mutation. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007;11:243-6.
8
9
10 47. Villanova M, Selvi E, Malandrini A, Casali C, Santorelli FM, De Stefano R,
11
12 Marcolongo R. Mitochondrial myopathy mimicking fibromyalgia syndrome.
13
14 *Muscle Nerve*. 1999;22:289-91.
15
16
17 48. Menu P and Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the
18
19 good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol*. 2011;166:1-15.
20
21 49. Vattemi G, Marini M, Ferreri NR, Hao S, Malatesta M, Meneguzzi A, Guglielmi
22
23 V, Fava C, Minuz P, Tomelleri G. Overexpression of TNF- α in mitochondrial
24
25 diseases caused by mutations in mtDNA: evidence for signaling through its
26
27 receptors on mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2013;63:108-14.
28
29
30 50. Mancuso M, Orsucci D, Ienco EC, Ricci G, Ali G, Servadio A, Fontanini G,
31
32 Filosto M, Vielmi V, Rocchi A, Petrozzi L, Logerfo A, Siciliano G. An
33
34 "inflammatory" mitochondrial myopathy. A case report. *Neuromuscul Disord*.
35
36 2013;23:907-10.
37
38
39 51. Cotán D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Ávila M, Rodríguez-
40
41 Hernández A, Gómez Izquierdo L, De la Mata M, De Miguel M, Lorite JB,
42
43 Infante ER, Jackson S, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. Secondary coenzyme Q10
44
45 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS
46
47 fibroblasts. *FASEB J*. 2011;25:2669-87.
48
49
50 52. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya
51
52 J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Unmasking the causes of multifactorial
53
54 disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol*
55
56 *Genet*. 2010;19:3343-53.
57
58
59
60

- 1
2
3 53. Benetti E, Chiazza F, Patel NS, Collino M. The NLRP3 Inflammasome as a
4 novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders. *Mediators*
5 *Inflamm.* 2013; 2013:678627.
6
7
8
9
10 54. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction.
11 *Int Heart J* 2014;55:101-5.
12
13
14 55. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the
15 crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol.* 2014;5:352.
16
17
18 56. Scarpelli M, Cotelli MS, Mancuso M, Tomelleri G, Tonin P, Baronchelli C,
19 Vielmi V, Gregorelli V, Todeschini A, Padovani A, Filosto M. Current options
20 in the treatment of mitochondrial diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*
21 2010;5:203-9.
22
23
24
25
26
27 57. Dashdorj A, Jyothi KR, Lim S, Jo A, Nguyen MN, Ha J, Yoon KS, Kim HJ,
28 Park JH, Murphy MP, Kim SS. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ
29 ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-
30 mediated inflammatory cytokines. *BMC Med* 2013;11:178.
31
32
33
34
35
36 58. Montini G, Malaventura C, Salviati L. Early coenzyme Q10 supplementation in
37 primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med* 2008;358:2849-50.
38
39
40
41
42
43
44

45 46 **Figure legends**

47
48 **Figure 1. Genotyping analysis of mtCYB mutation.** A, Illustration of the mutation
49 found in patient 3 mtCYB gene. The transition m15.804 C→T generates a new
50 restriction site (GCAGC) for the BbvI enzyme. PCR amplification of genomic DNA
51 samples of patient 3 and patient without m15.803 C→T mutation with specific primers
52 followed by digestion of the amplification products with the BbvI enzyme allows to
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 identify a haplotype specific pattern by DNA agarose gel electrophoresis. **B**, Molecular
4 analysis in patient 3 showed that the m15.804 mutation was homoplasmic in blood cells,
5 urine, and saliva samples. **C**, Pedigree analysis of patient 3 family along three
6 generations. Black and white symbols denote people with or without FM symptoms,
7 respectively. Squares: man, circles: woman.
8
9

10
11
12
13
14 **Figure 2. Pathophysiology of mutant fibroblasts from patient 3.** **A**, Respiratory
15 complex activity in fibroblasts from patient 3 compared to control. **B**, CoQ₁₀ levels were
16 measured by high-performance liquid chromatography, as described in Materials and
17 Methods. **C**, Bioenergetic levels of fibroblasts showed by ATP determination. **D**,
18 Mitochondrial ROS production was analyzed in fibroblasts by flow cytometry as
19 described in Material and Methods. **E**, Reduced mtDNA contents in fibroblasts from
20 FM patient compared with healthy control. **F**, Cell growth with CoQ₁₀ determined in
21 healthy and FM fibroblasts. **G**, The three dimensional structure of the human mtCYB
22 show mutation (yellow) localized in area opposite the ubiquinone binding site (green).
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2. Pathophysiology of mutant fibroblasts from patient 3. **A**, Respiratory complex activity in fibroblasts from patient 3 compared to control. **B**, CoQ₁₀ levels were measured by high-performance liquid chromatography, as described in Materials and Methods. **C**, Bioenergetic levels of fibroblasts showed by ATP determination. **D**, Mitochondrial ROS production was analyzed in fibroblasts by flow cytometry as described in Material and Methods. **E**, Reduced mtDNA contents in fibroblasts from FM patient compared with healthy control. **F**, Cell growth with CoQ₁₀ determined in healthy and FM fibroblasts. **G**, The three dimensional structure of the human mtCYB show mutation (yellow) localized in area opposite the ubiquinone binding site (green). **H**, OCR was monitored through Seahorse XF-24 Extracellular Flux Analyzer with the sequential injection of Oligomycin (1 µg/mL), 2,4-DNP (100 µM), Rotenone (1 µM) at the indicated time point into each well, after baseline rate measurement. **I**, The basal OCR was markedly affected in cells from patient, and improved with CoQ₁₀. **J**, The spare respiratory capacity (SRC) in FM fibroblasts showed a significant decrease. Data represent the mean – SD of three separate experiments. *p < 0.001; **p < 0.005 between controls and FM patient.

51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3.- Inflammasome activation in fibroblasts and pro-inflammatory cytokines in serum from FM patient. **A**, NLRP3 protein levels, active caspase 1 (p20) and IL-1β (p17) were analysed by Western blotting. Protein levels were determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three different western blots

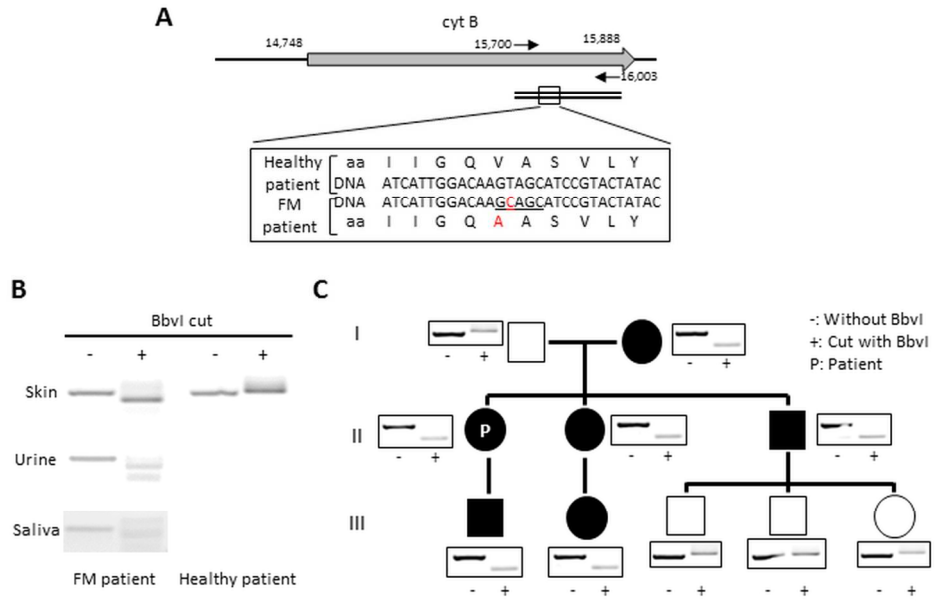
1
2
3 and normalized to GADPH signal compared with a pool of 5 healthy age- and sex-
4
5 matched control subjects. **B and C**, IL-1 β and IL-18 levels in serum from control and
6
7 FM patient were determined by ELISA as described in Material and Methods. **D**, Cell
8
9 growth with CoQ₁₀ determined in healthy and FM fibroblasts. **E and F**, IL-1 β (p17)
10
11 levels in blood mononuclear cells (BMCs), lymphocytes and monocytes and IL-1 β
12
13 serum levels were determined in several members of three generations from the
14
15 patient's family. Pedigree image shows affected family members with the mutation.
16
17 Squares: man, circles: woman. **G**, NLRP3 protein levels and IL-1 β (p17) were analyzed
18
19 in fibroblasts from MELAS, Merrf and LHON by Western blotting. Protein levels were
20
21 determined by densitometric analysis (IOD, integrated optical intensity) of three
22
23 different western blots and normalized to GADPH signal compared with a pool of 5
24
25 healthy age- and sex-matched control subjects. Data represent the mean \pm SD of three
26
27 separate experiments. *p < 0.001; **p < 0.005 between controls and FM patient.
28
29
30
31
32

33 **Figure 4. Genotyping analysis of cybrids.** **A**, Molecular analysis of cybrids generated
34
35 from osteosarcoma 143B206 rho0 cell line (C), as the common nuclear background, and
36
37 platelets from patient 3 (cy 1 and 2). The m15.804 mutation only was introduced in cy2
38
39 cells. **B**, Mitochondrial complex III activity, **C**, Cellular bioenergetics of mutant cybrids
40
41 was assessed by ATP determination. **D**, Mitochondrial ROS production was analyzed in
42
43 cybrids by flow cytometry as described in Material and Methods. **E**, Active caspase 1
44
45 (p20) and IL-1 β (p17) were analysed by Western blotting. Data represent the mean – SD
46
47 of three separate experiments. *p < 0.001 between controls and FM cybrids.
48
49
50

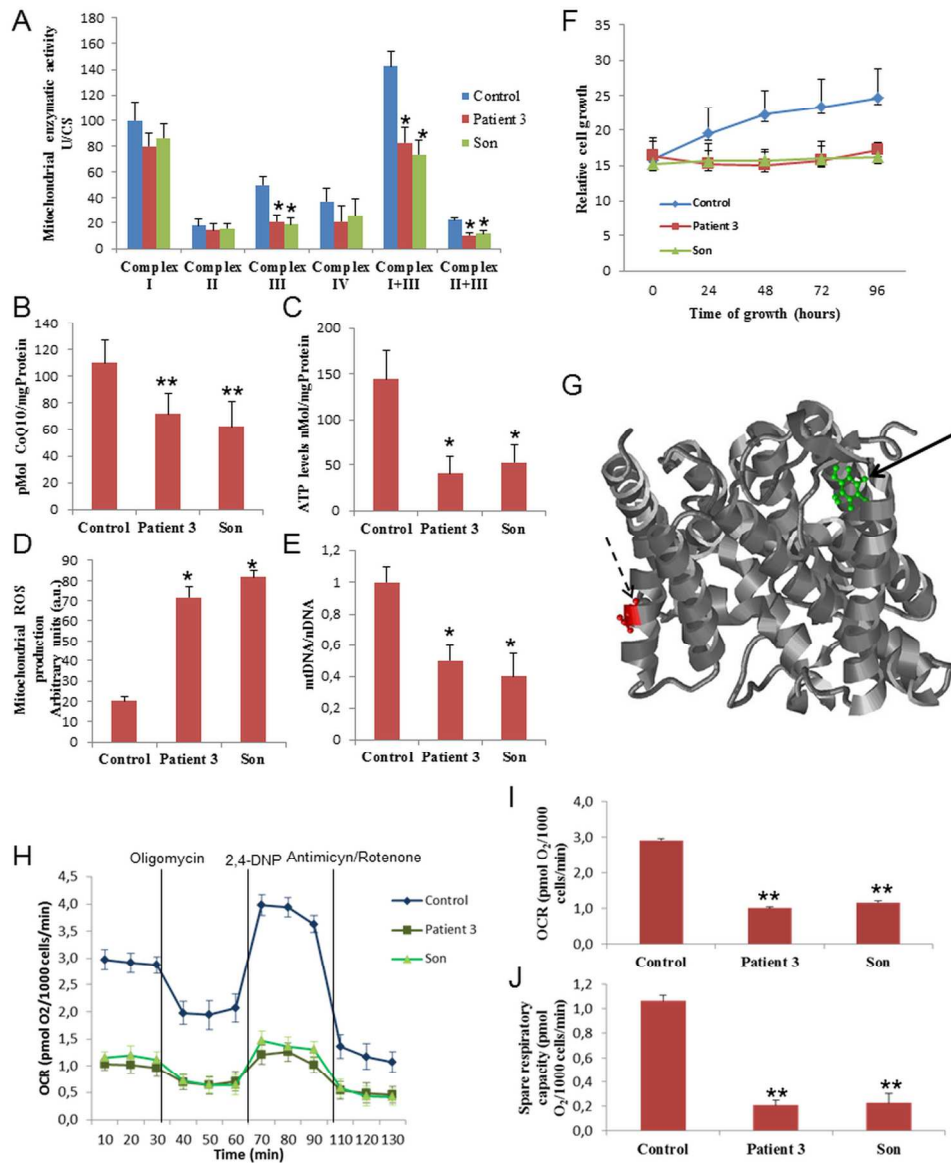
51 **Figure 5. Conservation and structure similarity of the mutation Val-Ala between**
52
53 **CYB and COXIII.** **A**, Logos showing the conservation of the mutation surrounding (6
54
55 residues on each side) the two proteins. The height of the stack corresponds to the
56
57 conservation at that position (information content), and the height of each letter is
58
59
60

1
2
3 related on the frequency of that letter at that position. The occupancy is the probability
4
5 of observing a letter at one position, and the insert probability and length depends on
6
7 putative inserts in the alignment. The mutation appears in different Pfam domains from
8
9 the two proteins: Cytochrome b C-terminal for CYB, and Cytochrome C oxidase
10
11 subunit III for COXIII. **B**, Enlarged mutation position showing residue probability. **C**,
12
13 Region structure from the two proteins, corresponding to part of a transmembrane helix.
14
15
16 The valine residue is highlighted in red color.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

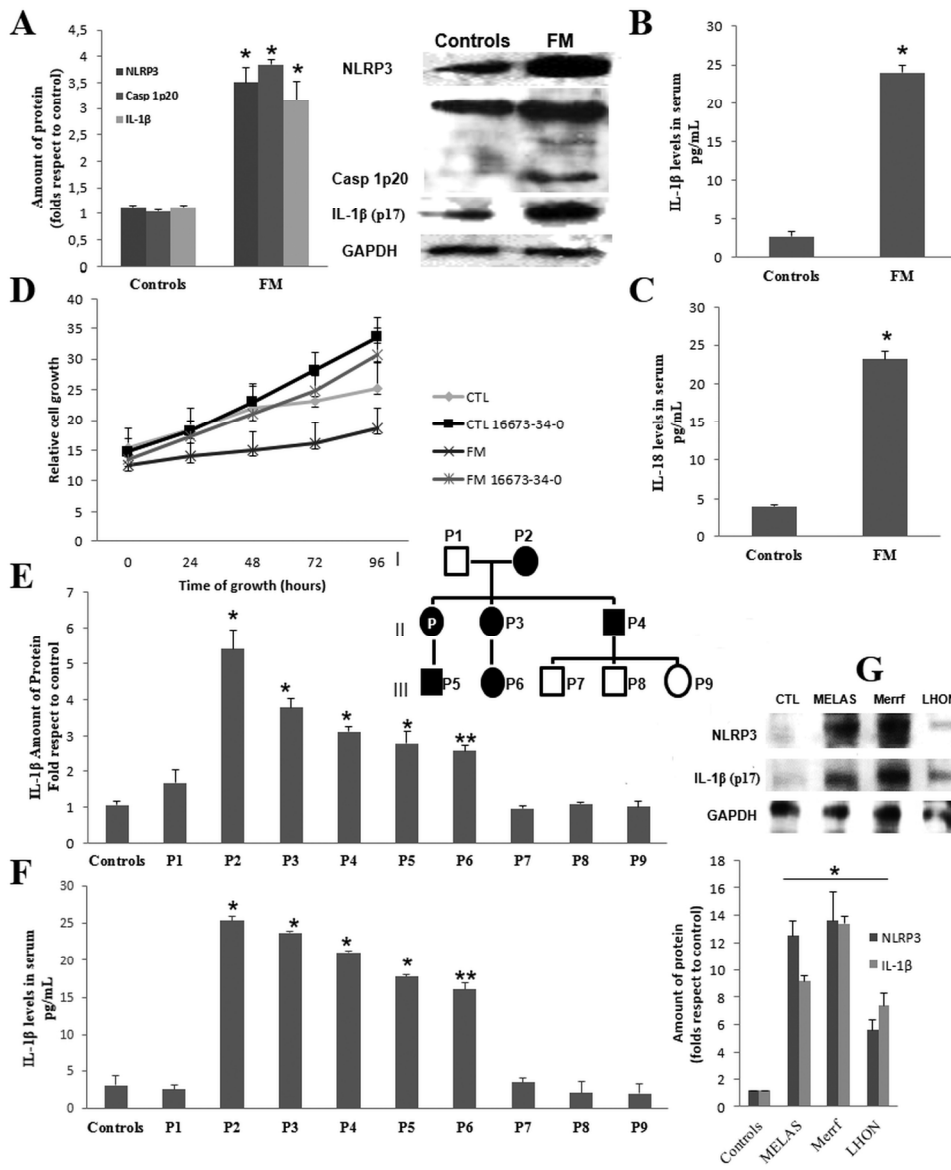


190x158mm (300 x 300 DPI)



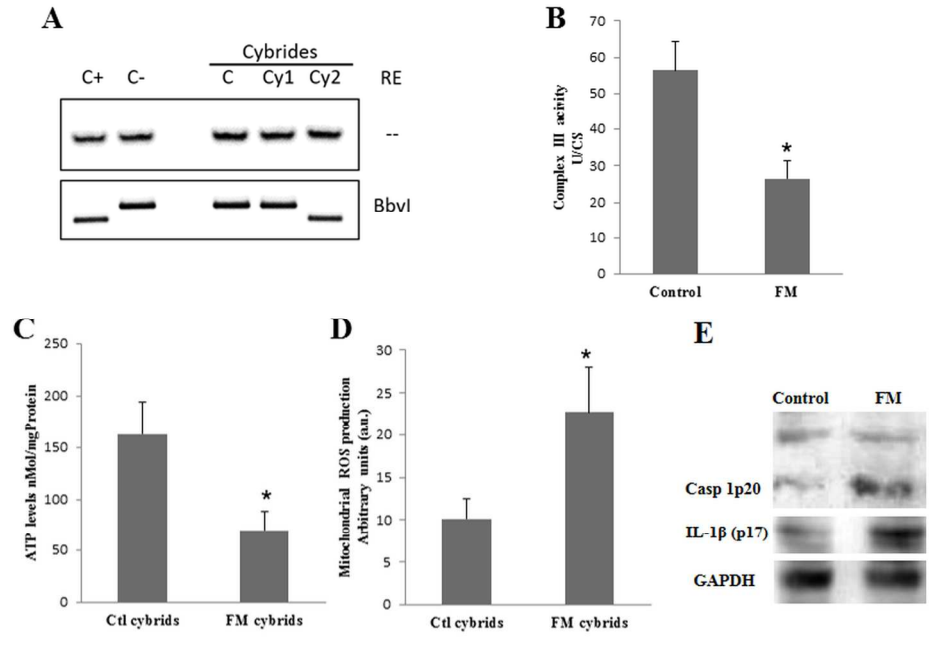
229x269mm (300 x 300 DPI)

Only



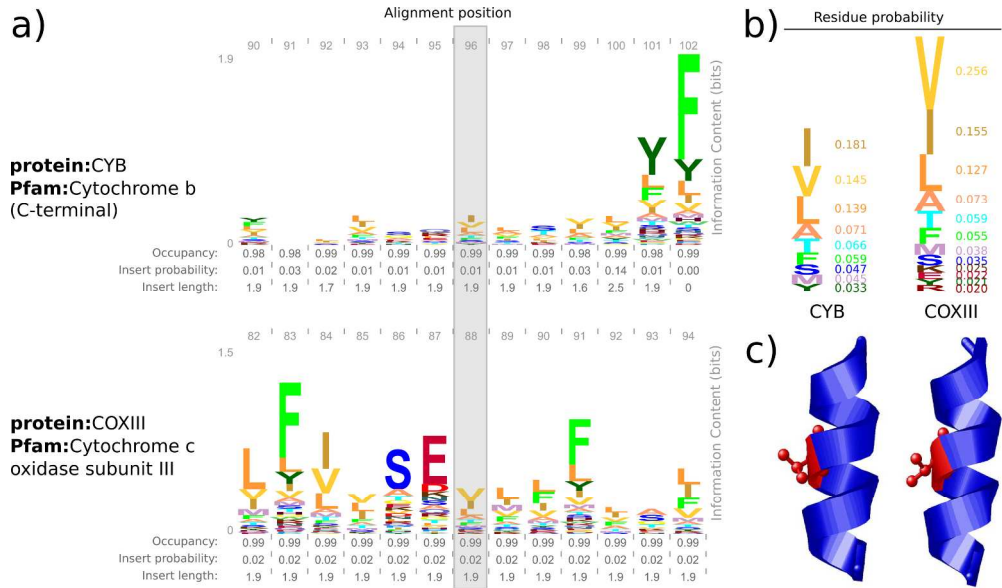
229x270mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



229x270mm (300 x 300 DPI)

Only



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Table S1. Symptomatic parameters in FM patients.

Parameter	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Age (years)	45	46	43	41	45
Tender points	15	14	12	11	13
Disease duration (years)	6	8	5	4	8
Sex	Female	Female	Female	Female	Female
BMI (kg/m ²)	23.2	22.9	24.9	22.1	23.8
FIQ Total score, range 0-80	68	70	66	71	75
Pain	7	6	8	4	5
Fatigue	8	9	7	8	6
Morning tiredness	8	8	5	4	5
Stiffness	7	8	9	9	5
Anxiety	7	10	6	7	2
Depression	7	6	7	2	2
VAS Pain Total score 0-10	7	6	8	7	6

BMI, Body Mass Index; FIQ, Fibromyalgia Impact Questionnaire; VAS, Visual Analogical Scale.

Table S2. Summary of sequencing results in blood cells from FM patients.

	FM1	FM2	FM3	FM4	FM5
MT-RNR1	A750G A1438G	G709A A750G A1438G	A750G A1438G	G709A A750G A1438G	A750G A1438G
MT-RNR2	G3010A	G1888A A2706G		G1888A A2706G	
MT-ND1		G3834A T4216C		G3834A T4216C	
MT-ND2	A4769G	A4769G A4917G T5105C	A4769G	A4769G A4917G T5105C	A4769G
MT-TW					
MT-CO1		C7028T	T6776C	C7028T	T6776C
MT-CO2	A8014G				
MT-ATP6	A8860G	G8697A A8701G A8860G	A8860G	G8697A A8701G A8860G	A8860G
MT-CO3					
MT-ND4		A11251G G11719A		A11251G G11719A	
MT-ND5		C12633A G13368A		C12633A G13368A	
MT-CYB	A15326G	C14766T G14905A A15326G C15452A A15607G	A15326G T15804C	C14766T G14905A A15326G C15452A A15607G	A15326G
MT-TT		G15928A		G15928A	
MT-DLOOP	T16519C A263G 302insCC- CCC 310insC 514inCA	T16126C A16163G C16186T T16189C C16294T T16519C A73G A263G 302insCC 310insC 514inCA	T16519C A263G T152C 310insC	T16126C A16163G C16186T T16189C C16294T T16519C A73G A263G 302insCC 310insC 514inCA	T16519C A263G T152C 310insC

Table S3. Serum biochemical parameters in FM patient 3.

Biochemical parameter	Patient	Range
Glucose (mg/dL)	99	76-110
Urea (mg/dL)	17	10-50
Total protein (g/dL)	6.8	6.6-8.7
Na (mEq/L)	142	135-145
K (mEq/L)	4.2	3.5-5
Uric acid (mg/dL)	3.9	2.4-5.7
Creatinine (mg/dL)	0.71	0.5-0.9
Ca (mg/dL)	9.4	8.5-10.5
Phosphate (mg/dL)	3.44	2.7-4.5
Bilirubin (mg/dL)	0.39	0.2-1
Alcaline phosphatase (U/L)	55	35-104
Aspartate aminotransferase (mU/mL)	21.9	5-37
Alanine aminotransferase (mU/mL)	23.5	5-41
Creatine kinase (U/L)	73	10-190
Cholesterol (mg/dL)	155	80-200
HDL Cholesterol (mg/dL)	65	50-100
LDL Cholesterol (mg/dL)	69	<120
Triglycerides (mg/dL)	50	50-150

Table S4. Biochemical data in several biological samples from patients 3. Data show percentage of change respect to controls.

	Blood cells	Urine cells	Salivary cells	Platelets
Complex III	49%	28%	33%	45%
CoQ₁₀	40%	31%	60%	50%
ATP	42%	36%	36%	70%
mtDNA/nDNA	37%	30%	32%	47%

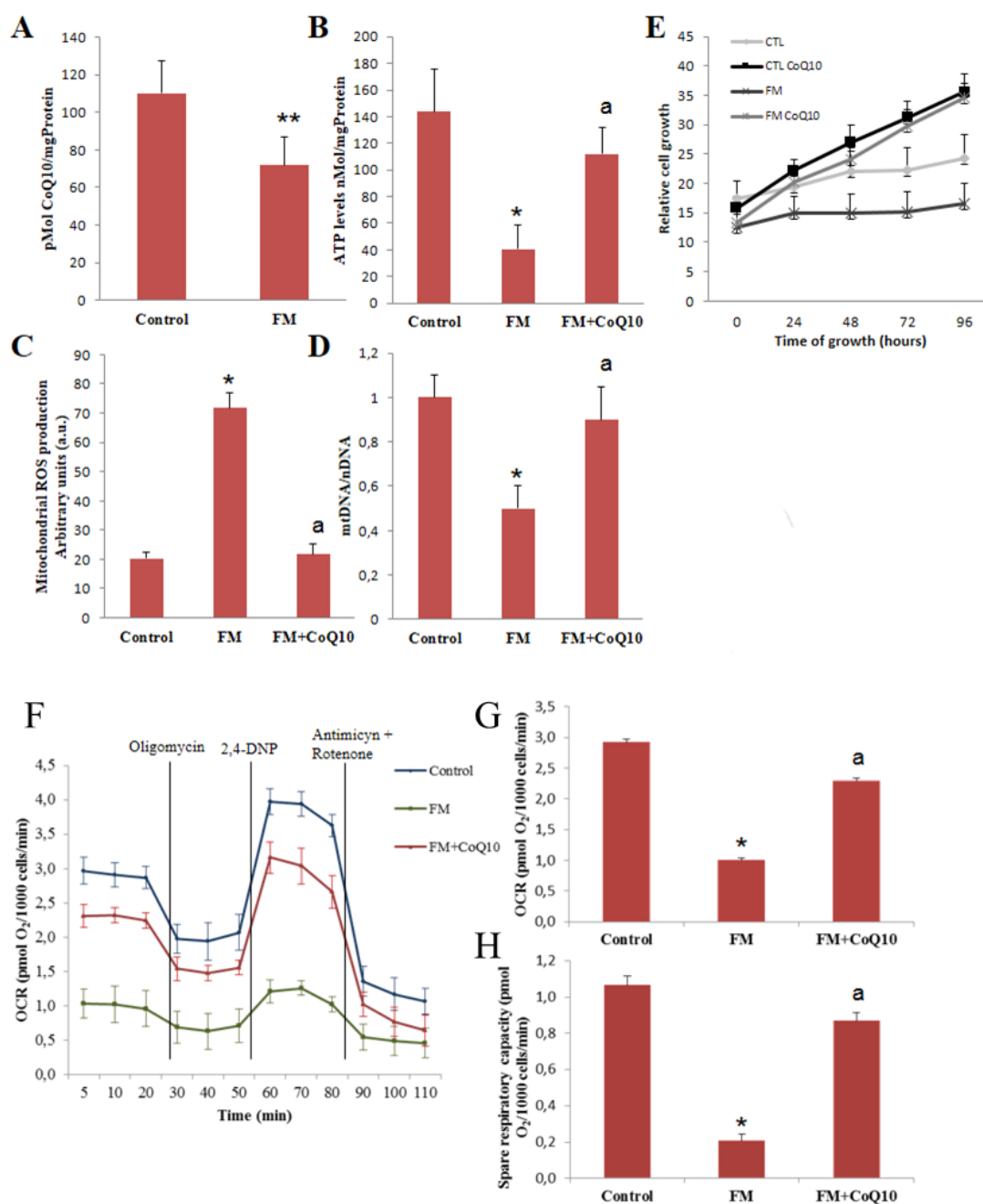


Figure S1. Pathophysiology of mutant fibroblasts from patient 3 after CoQ₁₀ treatment. **A**, CoQ₁₀ levels were measured by high-performance liquid chromatography, as described in Materials and Methods. **B**, Bioenergetics levels of fibroblasts showed by ATP determination. **C**, Mitochondrial ROS production was analyzed in fibroblasts by flow cytometry as described in Material and Methods. **D**, Reduced mtDNA contents in fibroblasts from FM patient compared with healthy control. **E**, Cell growth with CoQ₁₀ determined in healthy and FM fibroblasts. **F**, OCR was monitored through Seahorse XF-24 Extracellular Flux Analyzer with the sequential injection of Oligomycin (1 µg/mL), 2,4-DNP (100 µM), Rotenone (1 µM) at the indicated time point into each well, after baseline rate measurement. **G**, The basal OCR was markedly affected in cells from patient, and improved with CoQ₁₀. **H**, The spare respiratory capacity (SRC) in FM fibroblasts showed a significant decrease which was

1
2
3 improved by CoQ₁₀. Data represent the mean – SD of three separate experiments. *p <
4 0.001; **p < 0.005 between controls and FM patient. ^ap < 0.001 between FM patients
5 and treatment with CoQ₁₀
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Confidential: For Review Only

Table S5. Laboratory and clinical changes in the patient 3 (proband) and mutated family members (identified related to pedigree in figure 4) after seven months of oral CoQ₁₀ treatment.

Parameter	Proband		Patient 2		Patient 3		Patient 4		Patient 5		Patient 6	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Gender points	12	6	14	7	11	7	13	5	11	4	13	3
FIQ Total score, range 0-80	66	21	69	20	64	22	67	20	57	18	51	16
Pain	8	3	8	4	8	2	9	4	7	2	7	2
Fatigue	7	3	8	2	8	4	8	1	8	1	8	3
Morning tiredness	5	2	5	2	6	2	6	1	6	1	5	2
Stiffness	9	2	7	3	8	2	7	2	6	3	4	2
Anxiety	6	3	7	3	7	2	8	3	7	2	5	1
Depression	7	2	6	3	8	2	8	4	5	2	4	1
VAS Pain Total score 0-10	8	3	9	3	7	3	9	4	7	3	8	1
VAS Fatigue Total score 0-10	7	3	7	3	8	2	8	2	8	1	7	2
Citrate synthase (specific activity)	4.7	18.3	3.7	15.6	4.1	15.9	3.8	16.6	8.1	21.3	6.3	19.1
ATP levels (nMol/mgProtein)	5.2	20.4	4.1	19.4	5.8	17.4	3.9	22.1	5.4	26.4	3.7	23.4
IL-1 β (pg/ml)	24.3	5.4	26.1	6.1	21.3	7.1	26.3	4.8	25.2	4.4	27.1	3.4
mtDNA copy number(nDNA/mtDNA)	0.4	0.9	0.5	0.8	0.6	0.9	0.3	0.7	0.3	1	0.3	0.9