

**EFFECTES DE LA INFECCIÓ PEL VIH I DELS FÀRMACS  
ANTIRETROVIRALS ENVERS EL MITOCONDRI: LES  
CÈL·LULES MONONUCLEARS DE SANG PERIFÈRICA  
COM A MODEL D'ESTUDI**

**SÒNIA LÓPEZ MORENO**

**Tesi Doctoral**

## **4. MATERIALS I MÈTODES**



## 4.1. PACIENTS

Els individus inclosos en els diferents estudis realitzats durant la present tesi superen els 250, i es distribueixen en diferents grups d'estudi. De cada un d'ells s'han analitzat tots els paràmetres mitocondrials bàsics que poden aportar informació sobre el grau d'implicació mitocondrial en la etiopatogènia dels efectes adversos indesitjables, que es desenvolupen durant l'administració del tractament ARV en pacients infectats pel VIH.

Els grup d'individus sans no infectats pel VIH procedeixen, majoritàriament, de personal de l'Hospital Clínic que ha col·laborat de forma voluntària i altruista donant sang venosa per als estudis que aquí es presenten. La resta de mostres procedeixen de pacients atesos al Servei d'Urgències per alguna dolència aguda no associada a una alteració mitocondrial als que prèviament se'ls ha sol·licitat permís per realitzar l'extracció.

Els individus infectats pel VIH es divideixen en 3 grups: a) pacients que mai han rebut tractament ARV, b) pacients asimptomàtics que segueixen diferents combinacions ARVs contra la infecció pel VIH i c) pacients simptomàtics, que han desenvolupat LD com efecte secundari del tractament ARV.

Degut als canvis en les pautes ARVs als que freqüentment es veuen sotmesos els pacients en tractament (habitualment per fracàs terapèutic o perquè desenvolupen efectes secundaris), l'historial terapèutic de cada pacient sol ser ampli i heterogeni. Aquest fet, limita la selecció de pacients amb característiques terapèutiques similars que es requereix per a que els grups de tractament analitzats siguin homogenis i comparables. Aquests canvis terapèutics, igualment, dificulten l'obtenció de pacients que han de seguir un mateix tractament ARV de primera línia durant un mínim de 6 mesos. Per aquest motiu, ha estat necessària la col·laboració amb altres hospitals i, en aquest sentit, els individus infectats pel VIH procedeixen dels Departaments de Malalties Infeccioses de l'Hospital Clínic, de l'Hospital de Granollers, de l'Hospital Germans Trias i Pujol i de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Cap dels individus inclosos als estudis no presenten antecedents personals o familiars suggestius de malaltia mitocondrial o afectació neuromuscular. Els pacients tractats presenten una adherència al tractament ARV superior al 90%. Els efectes adversos que han desenvolupat durant l'administració del tractament ARV han estat confirmats pel metge assistencial del Departament de Malalties Infeccioses de cada Hospital col·laborador en els estudis.

Les dades clíniques i epidemiològiques de cada pacient com l'edat, sexe, cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, càrrega viral ( $\log_{10}$  de les còpies d'ARN del VIH-1) i temps que porten rebent tractament ARV han estat recopilades en el moment de l'estudi.

Tots els pacients van signar un consentiment informat previ a la inclusió a l'estudi.

El protocol de treball, en cada cas, ha estat aprovat pel Comitè Institucional d'Ètica de cada Hospital que ha col·laborat en els diferents estudis realitzats durant la Tesi Doctoral.

## 4.2. METODOLOGIA DE LABORATORI

Donat que els mitocondris juguen un paper de gran importància per a la viabilitat de les cèl·lules de qualsevol teixit, els estudis de funcionalisme mitocondrial esdevenen una eina indispensable per entendre el comportament d'aquests òrgans. A continuació es descriu la metodologia emprada per dur a terme els estudis de la funció mitocondrial.

### 4.2.1. Aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP)

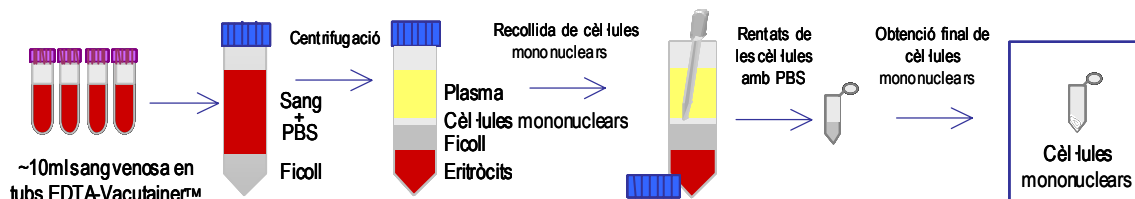
La tècnica d'aïllament de les CMSP no es troba descrita als articles científics que formen part de la Tesi, per aquest motiu es detalla a continuació el protocol de treball que s'ha fet servir.

#### PROTOCOL D'AÏLLAMENT DE LES CÈL·LULES MONONUCLEARS DE SANG PERIFÈRICA (CMSP)

(veure figura 20)

1. Deixar atemperar (temperatura ambient) la solució d'aïllament de CMSP (*Histopaque®-1077*, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) i la solució de PBS (*phosphate buffered saline*, Roche), que prèviament han estat a la nevera. És important mantenir la temperatura adequada perquè la solució d'aïllament mantingui la seva densitat de 1.077g/mL.
2. Recollir 30 mL de sang venosa en tubs que continguin EDTA (*Ethylenediamineteraacetic acid*) com anticoagulant (*Vacutainer™ EDTA tubes*).
3. Diluir la sang amb PBS en proporció 1:1.
4. Posar 10-15 mL de la solució d'aïllament en tubs de 50 mL, i a continuació dipositar-hi a sobre uns 30 mL de la sang diluïda amb el PBS (15 mL sang+15 mL PBS), amb molta cura, amb l'ajut d'una pipeta *Pasteur* de plàstic, procurant que no es barregin (deixar caure la sang a poc a poc, rellicant per la paret del tub). La solució d'aïllament i la sang quedaran ben diferenciades en dues fases, quedant la primera al fons del tub per la seva major densitat. Posar els altres 30 mL de sang diluïda amb PBS (15 mL sang+15 mL PBS) en un altre tub amb la solució d'aïllament, i procedir de la mateixa manera.
5. Centrifugar els tubs durant 30 minuts a 670 g, en una centrifuga refrigerada a 20°C. En aquest moment la sang total se separa en els seus components, en funció de la densitat que tinguin. Els eritròcits i granulòcits, s'agreguen a la polisucrosa de la solució d'aïllament i sedimenten ràpidament al fons del tub. Les CMSP (limfòcits i monòcits) queden a la interfase entre la solució d'aïllament i el plasma. El plasma correspon a la fase superior, on queden les plaquetes.
6. Recollir la interfase, que correspon a les CMSP, amb una pipeta *Pasteur* de plàstic i la dipositar-la en un altre tub amb uns 25-30 mL de PBS. Rentar les CMSP, i centrifugar-les durant 10 minuts a 350 g.
7. Decantar el sobrenedant i rentar el *pellet* de cèl·lules en 300-600 µL de PBS. Traspasar aquest volum a un *ependorf* de 2 mL i tornar a centrifugar durant 10 minuts a 350 g. La majoria de les plaquetes que puguin quedar a la fracció de CMSP s'eliminen als rentats.
8. Eliminar el sobrenedant amb una micropipeta i resuspendre les CMSP aïllades en uns 100-150 µL de PBS. En aquest moment les CMSP en suspensió es poden fer servir directament pels estudis polarogràfics, ja que es necessiten que les cèl·lules estiguin vives i intactes per mesurar l'activitat oxidativa. Per a la resta de determinacions (espectrofotometria per a determinar les activitats enzimàtiques, extracció d'ADN, peroxidació lipídica, etc.) les cèl·lules resuspeses en PBS es poden mantenir congelades a -80°C fins a la seva utilització.

NOTA: Si volem minimitzar la contaminació plaquetària a la fracció de CMSP cal realitzar un pas previ abans de començar el protocol d'aïllament. Aquest pas previ consisteix en una centrifugació inicial de la sang total a 100 g durant 25 minuts a temperatura ambient. Obtindrem una primera fracció que contindrà el plasma i les plaquetes, que eliminarem amb l'ajut d'una pipeta *Pasteur* de plàstic. La resta de cèl·lules sanguínies romandran al fons del tub, i les reconstituïrem amb PBS fins a obtenir el volum inicial de sang total del que partíem. En aquest punt continuarem amb el protocol d'extracció normalment.



**Figura 20. Aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica.**

#### 4.2.2. Determinació de la quantitat de proteïna cel·lular

L'activitat enzimàtica de cada complex multiproteic que conforma la CTE del sistema OXPHOS mitocondrial i de l'enzim citrat sintasa del cicle de Krebs (que utilitzarem com a marcador de contingut mitocondrial) s'expressa relativitzada pel contingut total de proteïna cel·lular, en mil·ligrams per mil·lilitre (mg/ml).

La quantitat total de proteïna cel·lular es determina mitjançant el mètode de *Bradford* (Bradford M, Anal Biochem 1976). És una tècnica colorimètrica que depèn de la concentració de proteïna present a la mostra. Es basa en el desplaçament que experimenta el màxim d'absorció d'una solució àcida de *Coomassie Brilliant Blue G-250*, des de 465 nm a 595 nm, quan aquest reactiu s'enllaça amb les proteïnes.

L'interval de concentració en què és sensible aquest mètode oscil·la entre 20 i 140 µg de proteïna pel procediment estàndard, segons el protocol de treball de BIO-RAD (*BIO-RAD Laboratories, München, Germany*).

Mitjançant l'aplicació d'aquest mètode s'obté una resposta acurada, tot i que no sempre lineal en marges grans de concentració de proteïna. Per aquest motiu, es treballa amb una corba de calibració elaborada a partir de concentracions conegudes d'una solució de proteïna estàndard i es dilueix la mostra problema fins que el valor d'absorbància entri dins els marges de la corba. El valor d'absorbància obtingut per a cada mostra s'interpol·la a la corba estàndard per determinar la quantitat de proteïna corresponent a la mostra problema.

#### 4.2.3. Extracció d'ADN total de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

La tècnica d'extracció d'ADN total a partir de CMSP no es troba descrita als articles científics que formen part de la Tesi, per aquest motiu es detalla a continuació el protocol de treball que s'ha fet servir.

## PROTOCOL D'EXTRACCIÓ DE L'ADN TOTAL A PARTIR DE CMSP

(veure figura 21)

### A. Lisat de les CMSP i digestió de proteïnes.

- Preparar:
- Un falcon de 50 ml per mostra.
  - Gel.
  - Proteinasa k (2 mg/ml) (congelador  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
  - Tampó de lisi de les cèl·lules blanques (*WCLB*, *White Cell Lysis Buffer*) ( $T^{\circ}$  ambient).
  - *SDS* (*sodium dodecyl sulfate*) 10 % ( $T^{\circ}$  ambient).
  - Puntetes amb filtre.

- A.1. Afegir 1,5 mL de *WCLB* al pellet de cèl·lules.
- A.2. Vortejar i fer un pols de centrifuga i traspasar-ho a un tub de 50 mL.
- A.3. Afegir 100  $\mu\text{L}$  de *SDS* 10 % i 250  $\mu\text{L}$  de Proteinasa k (2 mg/ml).
- A.4. Deixar incubar tota la nit en agitació a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### B. Separació de l'ADN total a partir del lisat.

- Preparar:
- 4 *ependorfs* de 2 mL per mostra.
  - Fenol-cloroform-isoamílic 25:24:1 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) TÒXIC! Manipular sota campana d'extracció de gasos!
  - Cloroform ( $T^{\circ}$  ambient) TÒXIC! Manipular sota campana d'extracció de gasos!

- B.1. Pel matí, un cop incubat durant tota la nit traspasar tot el volum del tub de 50 mL dividit en dos *ependorfs* de 2 ml. A cada *ependorf* hi ha uns 900  $\mu\text{L}$  i afegim el mateix volum de fenol-cloroform-isoamílic. NOTA: El fenol/cloroform és tòxic i s'ha de manipular a la campana. Conté dues fases, la més superficial correspon al tampó Tris pH 8 i no s'ha d'agafar.
- B.2. Barrejar fins que agafi aspecte lletós.
- B.3. Centrifugar 8 minuts a 16100 g.
- B.4. Recollir en *ependorfs* nous la fase inorgànica (fase superior) que conté l'ADN, sota campana d'extracció de gasos i amb una punta de 1000  $\mu\text{L}$  retallada. La fase orgànica de fenol-cloroform (fase inferior), que conté les proteïnes digerides i lípids, i la interfase, que conté productes que no s'han acabat de digerir s'eliminen a un contenidor de residus especial per a productes clorats.
- B.5. Afegir al nou *ependorf* on s'ha recuperat la fase superior, que conté l'ADN, el mateix volum de cloroform (~900  $\mu\text{L}$ ) per acabar d'eliminar restes de proteïnes.
- B.6. Centrifugar 3 minuts a 16100 g.
- B.7. Recollir sota campana d'extracció de gasos la fase superior, que conté l'ADN. Eliminar el cloroform, que conté restes de proteïnes, al recipient de residus.

### C. Precipitació de l'ADN total.

- Preparar:
- Acetat Sòdic 3M pH 5,2 ( $T^{\circ}$  ambient)
  - Etanol absolut (congelador  $-20^{\circ}\text{C}$ )
  - Tampó TE 10:1 (Tris 10 mM / EDTA 1 mM), pH 7,5 (Autoclavat, conservar a  $4^{\circ}\text{C}$ )

- C.1. Afegir 40  $\mu\text{L}$  d'acetat sòdic 3 M pH 5,2 i 1 mL d'etanol absolut fred. NOTA: Per a una precipitació correcta mantenir l'ordre: afegir primer l'acetat sòdic i a continuació l'etanol.
- C.2. Deixar ~2 h al congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$  (en aquest punt ho podem deixar tota la nit).
- C.3. Passades les 2 h treure els *ependorfs* del congelador i centrifugar 15-20 minuts a 16100 g. Es veurà un petit *pellet* blanc que correspon a l'ADN total.
- C.4. Decantar el sobrenedant en un pot vigilant de no perdre el *pellet*. (en aquest punt es pot tornar a congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  sense decantar i separa-ho després). Deixar l'*ependorf* obert, no cal eixugar.

(continua a la pàgina següent)

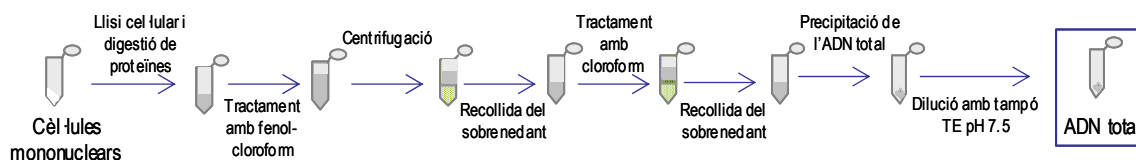


(continua de la pàgina anterior)

- C.5. Afegir 600  $\mu\text{L}$  d'etanol al 70 % i resuspendre el *pellet*.
- C.6. Centrifugar 20 minuts a 16100 g.
- C.7. Decantar suaument el sobrenedant vigilat de no perdre el *pellet* i re-enganxar amb una punta per capillaritat possibles gotetes d'etanol que hagin pogut quedar.
- C.8. Deixar els *ependorfs* oberts per evaporar restes d'etanol.
- C.9. Afegir  $\sim 75 \mu\text{L}$  de TE 10:1 (Tris 10 mM / EDTA 1 mM) a cada *ependorf*. La quantitat de TE dependrà de la quantitat de *pellet* d'ADN obtingut.
- C.10. Vortejar i fer un pols de centrifuga. Incubar en agitació durant  $\sim 2-3$  h en una estufa o bany a  $37^\circ\text{C}$ .
- C.11. Treure les mostres de l'estufa i juntar els dos volums de  $75 \mu\text{L}$  en un sol tub. Conservar-les a la nevera o a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### D. Lectura espectrofotomètrica de l'ADN total.

- D.1. Fer una dilució 1/25 (3  $\mu\text{L}$  ADN + 72  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada estèril) si està molt concentrat o bé una dilució 1/15 (4  $\mu\text{L}$  ADN + 56  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada estèril) si està prou diluït.
- D.2. Determinar la lectura espectrofotomètrica a 260 nm (mesura la quantitat d'ADN) i a 280 nm (mesura la quantitat de proteïnes) de l'ADN diluït.
- D.3. Determinar la ratio 260 nm / 280 nm per a determinar la puresa de l'ADN. Una ratio entre 1,5 i 2 significa bona puresa de l'ADN, lliure de proteïnes.
- D.4. Per a determinar la concentració de l'ADN cal tenir en compte que:  $1 \text{ UA}_{260 \text{ nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$ .
- D.5. Expressar la concentració d'ADN en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .



**Figura 21: Aïllament d'ADN total (mètode d'extracció per fenol-cloroform).**

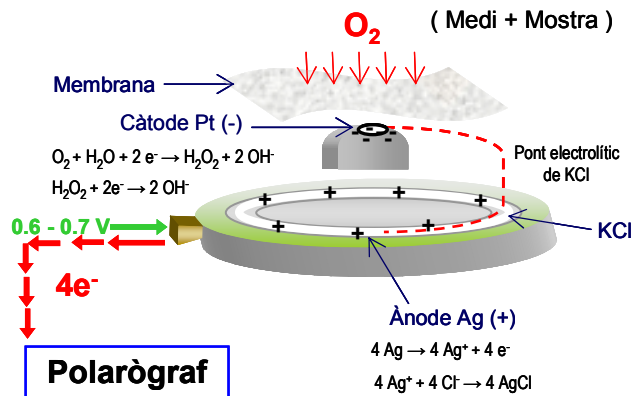
#### 4.2.4. Estudis mitocondrials

Els estudis mitocondrials bàsics que permeten avançar en la investigació dels efectes del VIH i del tractament ARV sobre el funcionalisme mitocondrial són l'estudi del contingut d'ADNmt i del contingut de subunitats proteiques mitocondrials, l'estudi de l'activitat enzimàtica dels diferents complexos proteics de la CTE, que conforma el sistema OXPHOS mitocondrial, l'estudi de l'activitat oxidativa mitocondrial, i l'estudi del dany oxidatiu mitocondrial.

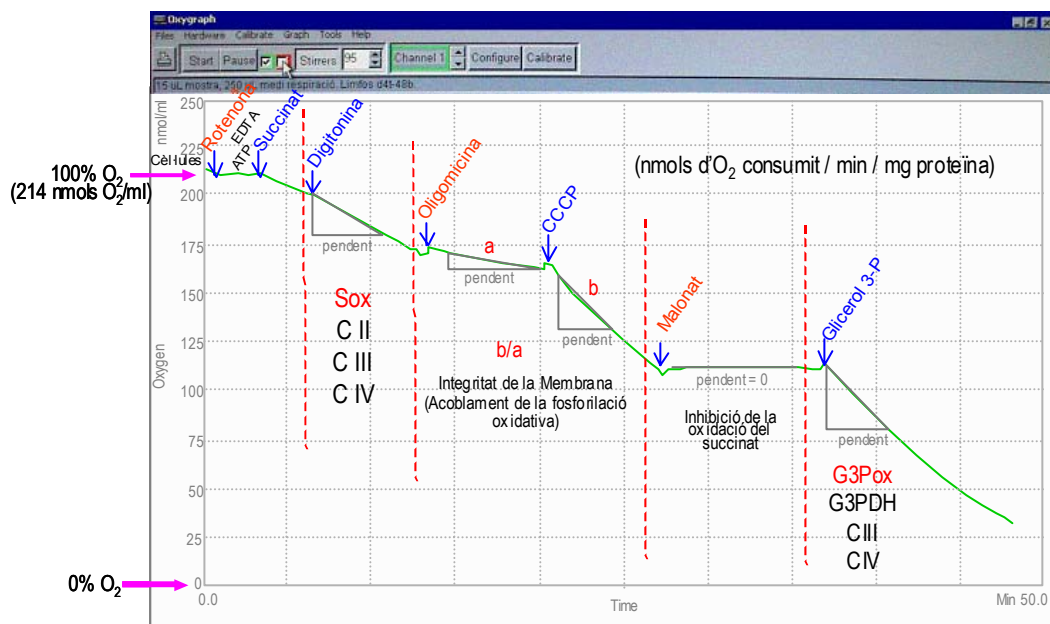
Tots els assajos anteriorment esmentats, i que es descriuen en detall a continuació, aporten informació completa del funcionalisme mitocondrial, que va des de les etapes inicials de la biologia del mitocondri, com és la genètica mitocondrial, fins a les etapes posteriors de traducció proteica, funcionalisme de les proteïnes que formen la CTE del sistema OXPHOS i finalment, la capacitat oxidativa del sistema OXPHOS en el seu conjunt, que defineix, en últim terme, la capacitat energètica mitocondrial.

#### 4.2.4.1. *Activitat oxidativa mitocondrial*

L'estudi de l'activitat oxidativa o respiració mitocondrial fa referència a la determinació del consum d'oxigen per part dels mitocondris, que es mesura per **polarografia**. Es tracta, per tant, d'una valoració global de la funció de la CTE, de tots els complexos enzimàtics que conformen el sistema OXPHOS en el seu conjunt. Aquest estudi es pot portar a terme en diversos tipus cel·lulars, però habitualment s'utilitzen cèl·lules mononuclears aïllades de sang perifèrica, o bé mitocondris aïllats de múscul esquelètic, pel fet de ser dos teixits de relativa fàcil obtenció. Per a la realització d'aquest estudi és condició *sine qua non* disposar de teixit fresc, doncs s'han d'utilitzar cèl·lules vives, o bé mitocondris intactes. La monitorització del consum d'oxigen es realitza mitjançant un polarògraf o elèctrode de Clark (veure figura 22), que consisteix en una microcubeta envoltada per una cambra de termostatització que manté les cèl·lules o mitocondris a una temperatura òptima de 37°C en un medi isotònic tamponat i en constant agitació. Sota la microcubeta, que conté el material en estudi, es localitza un elèctrode cobert amb una membrana de tefló permeable a l'oxigen, que es troba en contacte directe amb la mostra i detecta la disminució d'oxigen a la microcubeta al llarg del temps, com a conseqüència del consum per part dels mitocondris (veure figura 23). Podem determinar l'activitat oxidativa de les cèl·lules intactes a través de la oxidació dels substractes endògens propis de la cèl·lula, que cedeixen els seus e<sup>-</sup> a la CTE, o bé mitjançant l'addició de substractes específics, que estimulen la oxidació a través dels diferents complexos o enzims mitocondrials (p.e., l'addició de glutamat i piruvat estimula la oxidació a través del CI, l'addició de succinat estimula l'activitat oxidativa a través del CII). És important la utilització d'inhibidors específics dels diferents complexos, per així determinar l'activitat oxidativa específica, que finalment s'expressa en nanomols d'oxigen consumit per minut i per mil·ligram de proteïna cel·lular, o mitocondrial. Mitjançant l'estimulació de la respiració mitocondrial en punts concrets de la CTE es pot determinar en quin nivell existeix un dèficit d'un determinat complex. Les condicions metodològiques específiques es troben detallades en els articles de la Tesi (veure la secció 5 de resultats).



**Figura 22. Elèctrode d'oxigen.** L'elèctrode, situat sota la microcubeta que conté la mostra, presenta un ànode de plata (Ag) i un càtode de platí (Pt) cobert amb una membrana de tefló permeable a l'oxigen ( $O_2$ ), que es troba en contacte directe amb la mostra. En aplicar un voltatge elèctric, el càtode es carrega negativament i l'ànode positivament i l' $O_2$  present a la cubeta difon a través de la membrana i es redueix. Els  $e^-$  que es generen viatgen a través d'un pont electrolític (KCl, clorur de potassi) cap a l'ànode i contacten amb la plata generant un corrent elèctric directament proporcional a la concentració d' $O_2$  present a la microcubeta, que queda enregistrat al polarògraf. D'aquesta manera, al llarg del temps, es pot valorar la disminució d' $O_2$  a la microcubeta com a conseqüència del consum per part dels mitocondris.



**Figura 23. Determinació de l'activitat oxidativa mitocondrial.** L'activitat oxidativa mitocondrial fa referència al consum d'oxigen ( $O_2$ ) que té lloc per part dels mitocondris durant la síntesi d'ATP. La figura mostra una gràfica corresponent a la monitorització del consum d' $O_2$  d'una mostra de CMSP, mitjançant un polarògraf o elèctrode de Clark. En primer lloc, el polarògraf es calibra per establir el 0% i el 100% d' $O_2$ , que equival a la concentració d' $O_2$  atmosfèric. A continuació, s'afegeix a la cubeta de reacció el medi de respiració i la mostra, i es van afegint seqüencialment diferents reactius segons l'activitat oxidativa que es vulgui avaluar. Els substrats que cedeixen  $e^-$  a la CTE es mostren a la figura marcats de color blau i els inhibidors de color vermell. Els pendents decreixents indiquen el consum d' $O_2$  que té lloc en aquell moment al llarg del temps, i les rectes planes indiquen que hi ha inhibició de l'activitat oxidativa d'un complex determinat, que impideix el flux d' $e^-$  al llarg de la CTE. (continua a la pàgina següent)

(continua de la pàgina anterior)

A la figura es pot observar l'activitat oxidativa estimulada per l'addició de succinat (Sox), que indica la capacitat oxidativa de la CTE a partir del C II fins l'últim complex de la cadena. En aquest cas, s'afegeix rotenona per inhibir el C I i succinat, que és un substrat que cedeix els seus e- al C II.

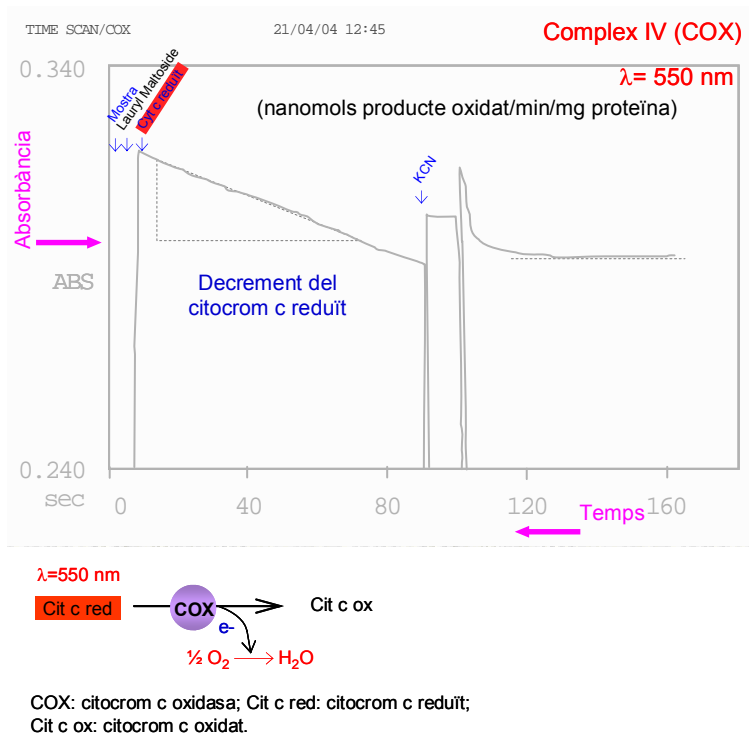
Igualment, es mostra l'activitat oxidativa estimulada per l'addició de glicerol-3-fosfat (G3Pox), que indica la capacitat oxidativa de la CTE a partir del CIII fins l'últim complex de la cadena. Per mesurar l'activitat G3Pox, s'inhibeix el C I amb rotenona i el C II amb malonat. En aquest cas, s'afegeix el substrat glicerol-3-fosfat que cedeix els seus e- al C III, i en conseqüència es detecta consum d'O<sub>2</sub>.

Mitjançant l'addició d'un inhibidor de l'ATP sintasa (oligomicina) i l'addició d'un reactiu capaç de desacoblar o trencar el vincle entre la síntesi d'ATP i el consum d'O<sub>2</sub> (cccp), es pot establir un índex (b/a) que indica la qualitat dels mitocondris, doncs valora la integritat de la membrana mitocondrial i el grau d'associació entre la síntesi d'ATP i el consum d'O<sub>2</sub>.

Finalment, el resultat s'expressa en nanomols d'O<sub>2</sub> consumit per minut i per mil·ligram de proteïna cel·lular.

#### *4.2.4.2. Activitat enzimàtica dels complexos de la CTE mitocondrial*

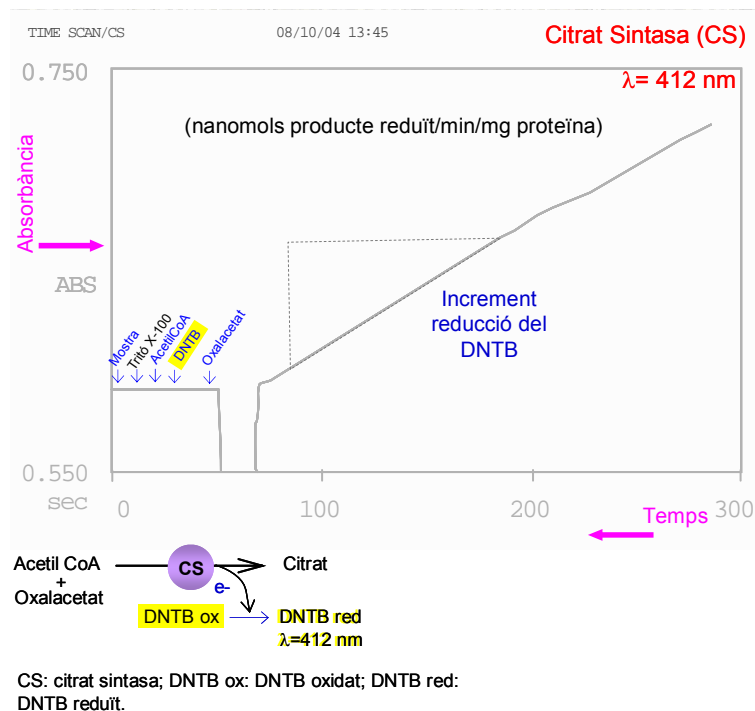
L'estudi de l'activitat enzimàtica mitocondrial fa referència a la determinació de la funció de cada complex enzimàtic de la CTE de forma individual. Es porta a terme per **espectrofotometria**, a través de la qual es monitoritza el curs de les reaccions enzimàtiques. La variació d'absorbància que es detecta al llarg del temps, es tradueix en el pendent d'una recta, que després d'aplicar diferents factors de conversió permet obtenir l'activitat específica de l'enzim en nanomols de substrate (o producte) oxidat (o reduït) per minut i per mil·ligram de proteïna cel·lular o mitocondrial, mitjançant la utilització de substrates i inhibidors específics per a cada complex (veure figura 24). Aquest estudi es pot portar a terme en diversos tipus cel·lulars, en mitocondris aïllats o bé en homogenat de diferents teixits. Per a la realització d'aquest estudi espectrofotomètric no és necessari treballar sobre material fresc, sinó que es poden guardar les cèl·lules, mitocondris o homogenat a -80°C durant un temps i determinar les activitats en qualsevol altre moment. La determinació de les activitats enzimàtiques dels diferents complexos de la CTE permet confirmar un dèficit enzimàtic, prèviament detectat mitjançant l'estudi polarogràfic. Igualment, permet detectar un dèficit enzimàtic aïllat que es pot haver vist emmascarat en l'estudi polarogràfic per efectes de compensació enzimàtica per part d'altres complexos, per la qual cosa es poden considerar estudis complementaris. Quan es realitza un estudi sobre mitocondris aïllats, es recomana realitzar en paral·lel el mateix estudi sobre homogenat del mateix teixit, ja que durant el procés d'extracció de mitocondris, mitjançant centrifugació diferencial, els mitocondris anòmals, de major mida i amb un coeficient de sedimentació més gran que els normals, podrien ser eliminats i, en conseqüència, s'obtindria un valor normal erroni (Casademont J, Med Sci Monit 2004). Les condicions particulars per a cada assaig enzimàtic es troben detallades en els estudis que es presenten a la secció de resultats (veure secció 5).



**Figura 24. Determinació enzimàtica del complex IV mitocondrial.** Activitat enzimàtica específica del Complex IV o Citocrom c Oxidasa (COX). La capacitat que té el citocrom c (cit c) reduït d'absorbir a una  $\lambda$  (longitud d'ona)=550 nm permet fer el seguiment de la reacció enzimàtica. El citocrom c reduït afegit a la mostra s'oxida al llarg del temps per l'acció enzimàtica de la COX i, en conseqüència, s'observa un decrement de l'absorbància del cit c reduït al llarg del temps, que indica l'activitat enzimàtica de la COX. Els  $e^-$  que es generen redueixen l'oxigen ( $\text{O}_2$ ) present a la mostra per formar aigua ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

#### 4.2.4.3. Contingut mitocondrial

Un dels mètodes per a mesurar el contingut mitocondrial d'una mostra consisteix en l'anàlisi espectrofotomètrica de l'enzim citrat sintasa (CS) (veure figura 25). La CS és un enzim ampliament reconegut com un bon marcador de massa mitocondrial, que es localitza a la matriu mitocondrial i intervé al cicle de Krebs (Barrientos A, Methods 2002) (Pallotti F, Methods in Cell Biology 2001) (Zeviani M, Lancet 1991). L'activitat oxidativa mitocondrial, l'activitat enzimàtica dels complexos de la CTE i el contingut d'ADNmt es poden expressar dividits per l'activitat de la CS amb la finalitat de conèixer el valor relatiu, estimat en funció del contingut mitocondrial real de la mostra. El contingut mitocondrial es pot determinar sobre material congelat a  $-80^\circ\text{C}$ . La metodologia completa es presenta en els articles de la Tesi (veure la secció 5 de resultats).

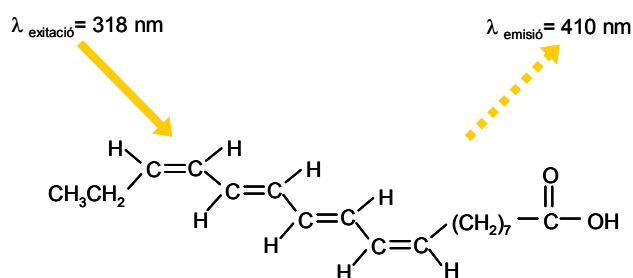


**Figura 25. Determinació enzimàtica del contingut mitocondrial.** Activitat enzimàtica específica de l'enzim Citrat Sintasa (CS). La capacitat que té el DNTB reduït d'absorbir a una  $\lambda$  (longitud d'ona)=412 nm permet fer el seguiment de la reacció enzimàtica catalitzada per la CS acoblada a la reducció del DNTB. El DNTB afegit a la mostra actua com a acceptor dels e<sup>-</sup> que s'alliberen en la reacció i, en conseqüència, s'observa un increment de l'absorbància del DNTB reduït al llarg del temps, que indica l'activitat enzimàtica de la CS. DNTB: 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

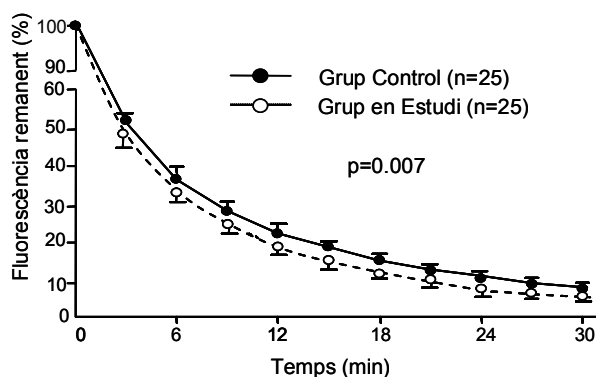
#### 4.2.4.4. Dany oxidatiu mitocondrial

L'estudi del dany oxidatiu mitocondrial fa referència al dany causat per les espècies reactives d'oxigen (ROS, '*reactive oxygen species*') a les membranes lipídiques de les cèl·lules o dels mitocondris. Les espècies ROS es generen com a conseqüència d'un mal funcionament de la CTE i presenten e<sup>-</sup> desaparellats altament reactius, que ataquen les membranes lipídiques mitjançant reaccions de peroxidació. Igualment, l'ADNmt, localitzat a la matriu mitocondrial, bastant proper a la membrana interna i a la CTE, també es pot veure atacat pels radicals lliures i generar mutacions. Una forma de determinar el dany oxidatiu és per **fluorimetria** a través de la mesura del grau de peroxidació lipídica, en presència de l'àcid cis-parinàric (veure figura 26). L'àcid cis-parinàric emet fluorescència de forma natural. Un cop afegit a la cubeta de reacció que conté la mostra s'intercala ràpidament entre els lípids de membrana i és igualment atacat pels radicals lliures en les reaccions de peroxidació. Com a

conseqüència de la peroxidació, l'àcid cis-parinàric perd la seva fluorescència natural. Aquest descens de fluorescència es pot monitoritzar al llarg del temps (veure figura 27), de manera que, com més gran sigui el grau de peroxidació lipídica, menys fluorescència es detecta i, en conseqüència major és el dany oxidatiu. Els estudis de peroxidació lipídica es poden realitzar sobre material prèviament conservat mitjançant congelació a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Els detalls metodològics es presenten descrits en els treballs de la Tesi (veure la secció 5 de resultats).



**Figura 26. Estructura de l'àcid cis-parinàric.** L'àcid cis-parinàric és un àcid gras conjugat amb quatre dobles enllaços, que emet fluorescència de forma natural a una  $\lambda$  (longitud d'ona)=410 nm, quan és excitat a una  $\lambda$ =318 nm.



**Figura 27. Peroxidació lipídica.**

Monitorització de la pèrdua de fluorescència de l'àcid cis-parinàric al llarg del temps, a mida que és atacat pels radicals lliures. A la figura es pot observar com el grup en estudi presenta major grau de peroxidació lipídica que el grup control, ja que la pèrdua de fluorescència al llarg del temps és major i, en conseqüència, el dany oxidatiu és significativament superior que el del grup control.

#### 4.2.4.5. Quantificació del contingut d'ADNmt

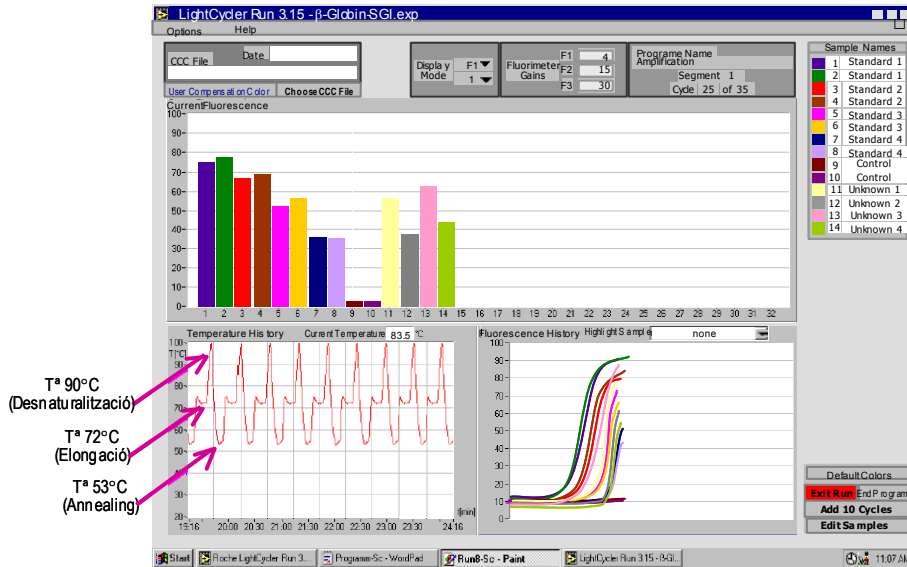
Una de les metodologies de recent aparició cada vegada més utilitzada en la determinació del contingut d'ADNmt consisteix en la **PCR quantitativa a temps real** (*Quantitative real time Polymerase Chain Reaction*), i és la que actualment utilitzem al nostre laboratori (veure figura 28). Aquesta metodologia presenta múltiples avantatges respecte a tècniques convencionalment utilitzades per a la determinació del contingut d'ADNmt, com el

*Southern-blot* (taula 12). A més a més, permet monitoritzar a temps real l'amplificació de l'ADN, a través de la incorporació d'un fluorocrom, que quan s'uneix a l'ADN de doble cadena (*dsDNA*) emet fluorescència amb molta intensitat. Per a cada extracte d'ADN, s'amplifica per separat un gen *housekeeping* nuclear i un gen mitocondrial altament conservat (veure figura 29). La quantitat de fluorescència emesa és proporcional a la quantitat de productes de *PCR* que s'estan formant. El valor que interessa obtenir és el *crossing point* (*Cp*), que correspon al nombre de cicles d'amplificació que es necessiten per a que es pugui començar a detectar la fluorescència. Per tant, com més petit sigui el *Cp*, abans es començarà a detectar la fluorescència, i per tant, més quantitat d'ADN hi havia inicialment (veure figura 28). Després de l'amplificació, es procedeix a la detecció específica dels productes de la *PCR* mitjançant l'anàlisi de les corbes de fusió o *melting* (veure figura de les corbes de fusió a l'article S López, Antivir Ther 2004 que es presenta en la secció 5 de resultats a la Tesi). Per a la quantificació de l'ADNmt, s'elaboren dues rectes patró (una pel gen mitocondrial i una altra pel gen nuclear) (veure figura de les rectes patró a l'article S López, Antivir Ther 2004 que es presenta en la secció 5 de resultats a la Tesi). A partir de l'equació de la recta s'extrapola el valor del *Cp* i es determina la quantitat d'ADN inicial per cada mostra. Finalment, l'expressió dels resultats es presenta com la quantitat relativa de l'ADNmt respecte l'ADN nuclear. Les condicions experimentals es troben descrites en els articles de la Tesi (veure la secció 5 de resultats).

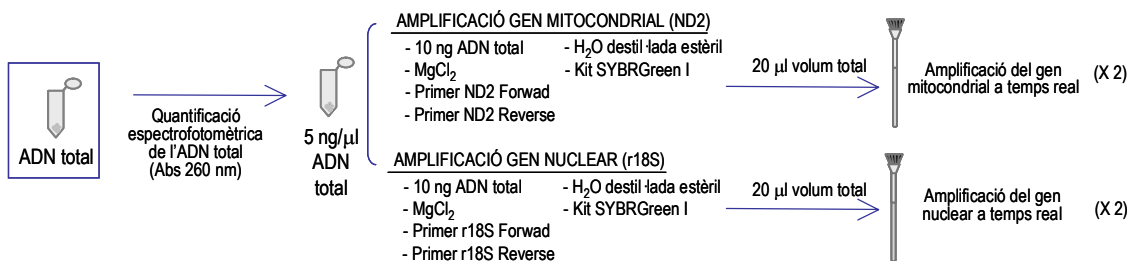
**Taula 12.** Avantatges de la *PCR* quantitativa a temps real.

Amplificació a temps real	Seguiment de la cinètica d'amplificació del fragment d'ADN a temps real, observant la fluorescència emesa en cada cicle.
Quantificació	Relació lineal entre el nombre de cicles necessaris per a detectar la fluorescència de l'amplificació i la concentració de l'ADN diana de la mostra.
Ràpida i senzilla	Optimizació del temps total de quantificació: - Extremadament ràpida (~30 min, 35 cicles, 32 mostres). - Anàlisi de les corbes de fusió (o <i>melting curves</i> ), evita la necessitat de realitzar l'anàlisi electroforètic dels productes de la <i>PCR</i> .
Elevada Especificitat	Utilitza una ADN polimerasa <i>hot start</i> , únicament funcional després d'un procés d'activació a elevada temperatura.
Elevada reproducibilitat	Múltiples repeticions d'una mateixa mostra presenten un coeficient de variabilitat molt baix (CV<0.3%).
Elevada sensibilitat	Es requereixen quantitats d'ADN bastant inferiors a les utilitzades convencionalment.
Minimitza la contaminació	Amplificació i detecció es porten a terme en el mateix tub. S'eviten manipulacions posteriors.





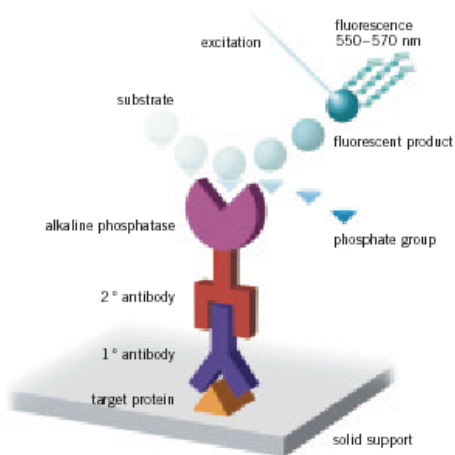
**Figura 28. Amplificació d'un gen per PCR quantitativa a temps real.** La figura correspon a la pantalla típica d'amplificació d'un gen mitjançant PCR quantitativa a temps real. Es vol amplificar un fragment específic d'ADN mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR implica tres passos que tenen lloc a diferent temperatura (desnaturalització de l'ADN, unió dels oligonucleòtids o encebadors específics (anellament; o *annealing*), i elongació de la cadena d'ADN que s'està replicant). Aquests passos es repeteixen de forma cíclica, tal com mostra la figura. En cada cicle de temperatura, el nombre de còpies del fragment que s'està amplificant augmenta exponencialment. A diferència d'una PCR convencional, el termociclador de la PCR quantitativa a temps real on té lloc l'amplificació porta incorporat un fluorímetre que permet el seguiment de l'amplificació a temps real gràcies a la incorporació en la barreja de reacció d'un fluorocrom conegut com a *SYBR Green*. Aquest fluorocrom té la capacitat d'unir-se a l'ADN de doble cadena i emetre fluorescència amb gran intensitat, de forma que la quantitat de fluorescència emesa és proporcional a la quantitat de productes de PCR que s'estan formant. L'amplificació també es pot seguir a través del creixement de les barres que es mostren a la figura. Cada color identifica una mostra diferent. Al final de l'amplificació s'assoleix la fase de saturació. Un cop ha finalitzat l'amplificació, obtenim el valor de *crossing point* (*Cp*) per quantificar el contingut d'ADN. El *Cp* correspon al nombre de cicles d'amplificació a partir dels quals es comença a detectar la fluorescència. Com més petit sigui el *Cp* d'una mostra, abans es comença a detectar la fluorescència, la qual cosa significa que la mostra en concret té una major quantitat gènica.



**Figura 29: Preparació de l'ADN total per a l'amplificació per PCR quantitativa a temps real.**

#### 4.2.4.6. Quantificació específica de subunitats proteiques mitocondrials

L'estudi específic del contingut de les subunitats proteiques mitocondrials permet comprovar si els nivells proteics arriben als valors normals que garanteixen el correcte funcionament de la CTE. Aquest estudi es realitza mitjançant **Western-blot** (veure figura 30) i es pot portar a terme en diversos tipus cel·lulars. Podem realitzar els estudis específics de quantificació proteica sobre material congelat a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En primer lloc, separem les proteïnes de la mostra, en funció del seu pes molecular, mitjançant electroforesi en un gel desnaturalitzant d'acrilamida. Un cop separades, es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa. A continuació, es bloqueja la membrana amb una solució rica en proteïnes per evitar, d'aquesta forma, interaccions inespecífiques dels anticossos. Un cop bloquejada la membrana, la incubem amb un anticòs primari específic per un determinat epítop de la proteïna en estudi. Seguidament, s'incuba amb un anticòs secundari que reconeix específicament al primari. L'anticòs secundari porta unit l'enzim peroxidasa, que un cop reacciona amb un substracte afegit genera un producte, el qual emet una luminiscència que incideix en un film fotogràfic generant una banda fosca. La intensitat de la banda és proporcional a la quimioluminiscència emesa i aquesta última és proporcional a la quantitat de subunitats proteiques presents a la mostra. D'aquesta forma, valorant la intensitat de la banda per densitometria, podem determinar específicament el contingut relatiu de subunitats proteiques. Quantifiquem una proteïna de codificació mitocondrial (p.e., COX-II, subunitat II de la citocrom c oxidasa o CIV de la CTE del sistema OXPHOS), una proteïna localitzada al mitocondri però codificada pel genoma nuclear com a marcador de càrrega de proteïna mitocondrial (p.e., VDAC, 'voltage-dependent anion carrier' o porina), i una proteïna citosòlica codificada pel genoma nuclear com a marcador de càrrega de proteïna cel·lular (p.e.,  $\beta$ -actina). Els valors s'expressen, finalment, normalitzats pel marcador de proteïna mitocondrial i pel marcador de proteïna cel·lular. Les condicions experimentals de l'assaig s'expliquen en detall als treballs de la Tesi (veure la secció 5 de resultats).

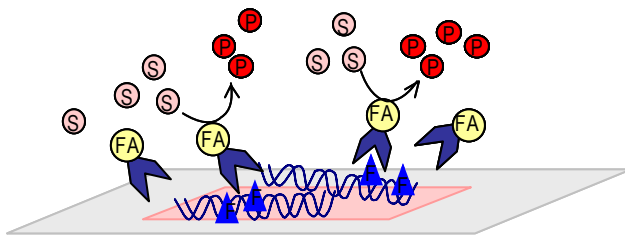


**Figura 30. Mètode de transferència de Western-blot.**

- Separació de les proteïnes segons el seu pes molecular (gel electroforètic).
- Transferència de les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa.
- Bloqueig de la membrana (evita interaccions inespecífiques).
- Incubació amb anticòs primari (Ab 1ri) específic per a la proteïna en estudi.
- Incubació amb Ab 2ri (incorpora lligand fluorescent) específic per l' Ab 1ri.
- Revelat i obtenció de les bandes específiques de la proteïna.
- Quantificació de les bandes de la proteïna per densitometria.

#### 4.2.4.7. Determinació del grau d'apoptosis

L'estudi de l'apoptosi es pot portar a terme, entre d'altres metodologies, mitjançant la tècnica de detecció immunohistoquímica **TUNEL** (*deoxyribonucleotidyl-Transferase-mediated-dUTP-biotin Nick-End Labeling*) (veure figura 31). Aquesta tècnica permet detectar al teixit *in situ* el trencament nuclear que té lloc com a característica final del procés de mort cel·lular programada. El trencament del genoma nuclear genera fragments d'ADN de doble cadena de baix pes molecular, anomenats mono- i oligonucleosomes, així com trencaments puntuals en cadenes simples (o *nicks*) de fragments d'ADN d'elevat pes molecular. Aquests fragments d'ADN trencat poden ser detectats a través de la reacció **TUNEL**, que consisteix en el marcatge de l'extrem 3'-OH lliure amb nucleòtids modificats, que s'uneixen mitjançant una reacció enzimàtica catalitzada per la proteïna deoxynucleotidyl transferasa (TdT). Els nucleòtids modificats porten incorporat el fluoròfor fluoresceïna, a on s'uneix un anticòs específic anti-fluoresceïna conjugat amb l'enzim fosfatasa alcalina. L'addició del substracte cromogènic de la fosfatasa alcalina dona lloc a una reacció enzimàtica que genera un producte colorimètric que serà el senyal que es detecta per microscopia òptica, i que ens indicarà la localització dels nuclis que han entrat en apoptosi. Aquesta tècnica detecta específicament l'apoptosi, per la qual cosa permet discriminar els processos necròtics durant l'anàlisi de les mostres. La descripció de la tècnica es resumeix a la taula 13, i s'explica en detall al treball de la Tesi (veure la secció 5 de resultats).



**Figura 31. Determinació de l'apoptosi cel·lular per TUNEL.** Teixit muscular fixat, amb l'ADN trencat, marcat amb fluoresceïna (F). L'anticòs específic, conjugat amb la fosfatasa alcalina (FA), s'uneix a la fluoresceïna. El substrate (S) afegit a la mostra reacciona amb la FA generant un producte (P) colorimètric. El marcatge dels nuclis trencats s'observa per microscopia òptica.

**Taula 13.** Metodologia de la tècnica TUNEL

### Metodologia TUNEL

- Fixació amb Paraformaldehyd (4% en PBS, pH 7.4).
- Rentat en PBS.
- Permeabilització amb solució de Tritó X-100 en citrat sòdic 0.1%.
- Rentat en PBS.
- Marcatge amb reacció TUNEL en cambra humida a 37°C.
- Rentat en PBS.
- Incubació amb solució de conversió amb FA.
- Rentat en PBS.
- Revelat de la reacció amb substrate cromogènic (NBT/BCIP\* o Fast Red\*).
- Rentat en PBS.
- Opcional: contratinció amb hematoxilina.
- Montatge de les preparacions amb medi aquós (glicerol).
- Anàlisi per microscopia òptica.

