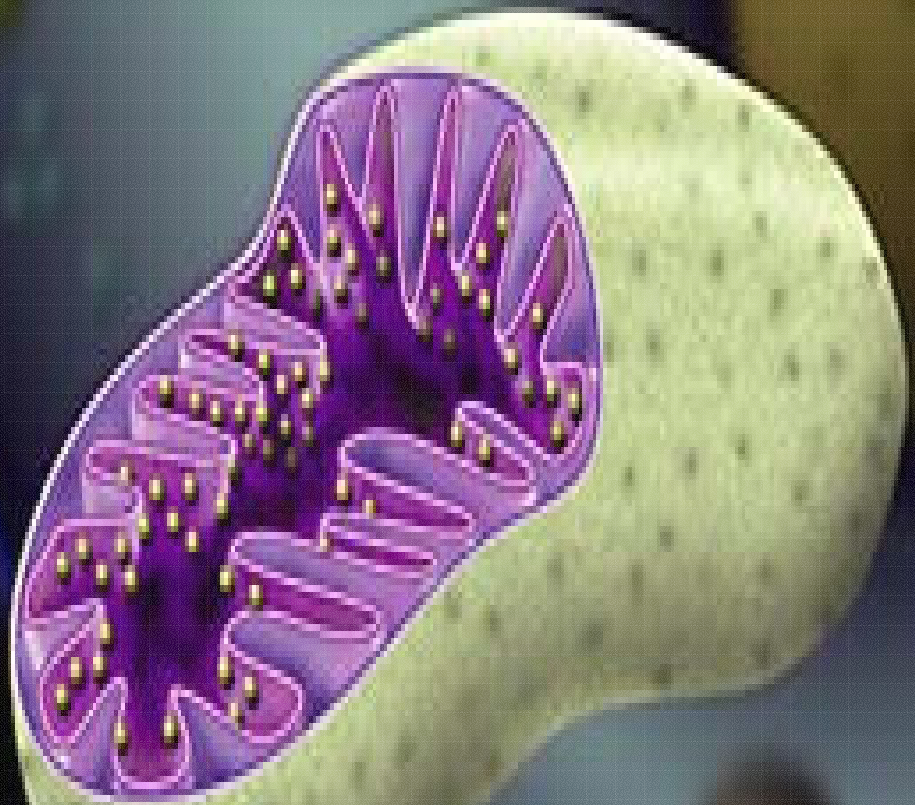


TESIS DOCTORAL

**Papel de las mutaciones del ADNmt
en la producción de daño oxidativo
mediado por ROS en un modelo de
cíbridos transmitocondriales**



Ricardo Gonzalo Sanz

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,
Facultat de Ciències, UAB. Juliol, 2005



TESIS DOCTORAL

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR**

Papel de las mutaciones del ADNmt en la producción de daño oxidativo mediado por ROS en un modelo de cíbridos transmitocondriales

Tesis doctoral realizada en el Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona.

Tesis adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona.

Dr. A.L. Andreu Pérez
Co-director

Dra. E.García Arumí
Co-directora

Dra. M. Sentís Vilalta
Tutora

*A mis padres,
a mi esposa,
a mi hermano.*

Con mucho cariño.

AGRADECIMIENTOS

A **Elena** el haberme ayudado tanto a llegar hasta aquí. Desde el primer día has estado conmigo, guiando mis pasos en este camino. Te has esforzado en que no fuese “tan creativo” en el trabajo y has tenido la paciencia de comentar y discutir cada resultado obtenido. Muchas gracias por todo.

A **Toni**, por transmitirme las ganas y la ilusión por investigar, orientándome y apoyándome en todo momento. Por haberme descubierto el mundo de la mitocondria, porque siempre has estado ahí y porque espero poder seguir contando contigo en el futuro. Gracias por esforzarte en crear un ambiente positivo en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio, posiblemente los mejores que me podían haber tocado. A **Tòfol** con quien he compartido tantas cosas dentro como fuera del laboratorio. Gracias por ofrecerme tu amistad, entusiasmo y tu piso de Manhattan. Se que he hecho un amigo con el que espero seguir contando en el futuro. A **Israel**, porque aunque no fueras una chica alta y morena me caes genial y porque estoy seguro que no voy a perderte de vista en mucho tiempo. A **Mari** por ser tan buena compañera, por estar siempre dispuesta a echar una mano y por soportarnos (ya se que no es fácil). A **Gisela** por dejar que te tratáramos como una reina, por introducir un toque femenino en el becariódromo y por tu inyección de carácter al grupo. A **Ramón** porque tu llegada al laboratorio fue muy positiva, me has ayudado a intentar comprender la estadística, eres un tío cachondo, aunque los dos tenemos claro que “juntos no podemos estar en una cocina”. A **David**, por introducir en el laboratorio grandes dosis de vitalidad y energía, por amenizar musicalmente los cultivos y por las risas que nos hemos echado. A **Ramiro**, por intentar hacernos trabajar “con cierto orden” en el laboratorio y por las tertulias deportivas de los lunes. Te has ganado mi aprecio. A **Marc**, en el poco tiempo que hemos compartido ya has dejado entrever que eres tío guay, sigue así, derrochando ese buen humor.

A los vecinos de al lado, especialmente a **Laura** que nos ha empapelado las paredes intentando conseguir que trabajáramos con seguridad, por tus pasteles y por todos estos años compartidos. A **Hafid** por intentar que aprendiera un poco de árabe y por tu peculiar sentido del humor ([mizbiæn] Hafid por mucho tiempo). A **Enric**, **Vero** y **Laia** por las horas compartidas en la campana y las risas durante las comidas.

A **Nuria** porque sin tu ayuda, probablemente trabajar en investigación en el hospital sería demasiado complicado. Por ayudarme en el pasado y porque seguro me

ayudarás en el futuro. A **Isabel** por coger el relevo de una manera formidable, por ayudarnos en cada momento y facilitarnos el trabajar a gusto.

A **Luchi**, que tantas risas y buenos momentos nos ha hecho pasar. Por recordarnos cada día lo “majos” que éramos. Disfruta mucho de tu jubilación que te la mereces. A **Raquel** por echarnos una mano en el día a día del laboratorio y por hacernos el trabajo más sencillo.

A **Mariano**, porque has estado cuando te he necesitado y eso lo valoro en un amigo. Por los ratos compartidos con la bicicleta de montaña y por los años de vecinos que nos esperan (estoy deseando conocer la pista de paddle...).

Al pasillo de Bioquímica en general, porque a veces a lo largo de estos años de aventuras he necesitado ayuda de un laboratorio u otro. Especialmente a **Juan Antonio** porque nos has alegrado las mañanas con tu buen humor y nos has ayudado cuando te lo hemos pedido. A Hormonas y a **Gabi** por las tardes compartidas en el uso del fluorímetro, y a la Dra. **Leonor Pou** por prestarme su equipo de HPLC cuando el nuestro “no quería trabajar”.

A **Maya** que me has enseñado tantas cosas de este mundillo, aunque aún no olvido lo de “nene” (que lo sepas). Muchas gracias por todo. A **Joan** por estar ahí desde el primer día, por alegrarnos las comidas, por tu buen humor y cachondeo. Al laboratorio de **Ana Meseguer** porque muchas veces nos hemos dirigido allí en busca de ayuda y experiencia. A **Lluís** por las conversaciones compartidas nunca reproducibles en un público mayor de dos personas. A **Cristina, Joan y Olga** porque en algún momento u otro os he atormentado con mis dudas y me habéis ayudado. A **Guillermo** por tu buen rollo, a **Marta, Neus y Gloria** por animar el laboratorio.

A **M^a José** por facilitarnos la tarea burocrática tantas veces aterradora, por tus tertulias político-deportivas y por ayudarme siempre que te he necesitado.

A **Mónica Tejada** que empezamos juntos en el negocio y compartimos aquellos primeros momentos siempre inolvidables. Espero que tengas mucha suerte.

Al Dr. **Simó Schwartz** por haberme permitido realizar la tesis en el Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular.

A mis nuevos compañeros de la UCTS, **Fátima, Paqui, Marta, M^a Ángeles y Alex** por lo bien que me habéis acogido y porque espero que formemos un buen equipo a partir de ahora.

A **Jesús, Pep, Ana, Pilar** y demás gente de planta 14, por haber hecho que los ratos que he pasado por aquellas alturas fuesen de lo más agradable.

A los clínicos que colaboran con nosotros **Pep Gámez** y **Manel Roig**, que sin vuestra ayuda y colaboración tesis como esta serían muy difíciles de sacarlas adelante.

A **Julio Montoya** por ser un referente y un ejemplo a seguir en este mundo de las mitocondrias.

A mi tutora **Margarita Sentís** por los consejos y charlas de las tardes, intentando mejorar un poco la calidad de la tesis.

Y en último lugar, aunque seguramente tendrían que ir en primer lugar, a mi familia que siempre ha estado a mi lado. En primer lugar a mis padres **Jesús** y **Teresa**, a los que quiero un montón, que siempre han estado a mi lado apoyándome y a la vez recordándome que en algún momento tendría que “dejar de estudiar para ponerme de una vez a trabajar”. A mi compañera, amiga y mejor esposa del mundo **Almudena**, por la paciencia que has tenido (y la que tendrás que tener...), porque espero que tu inversión de una vez de frutos, y porque te quiero siempre a mi lado. Muchas gracias por todo. A mi hermano **David** por ser un referente y un ejemplo a seguir, porque siempre te he tenido cuando te he necesitado y espero poder seguir contando contigo. A mis cuñadas y cuñado **Mónica, Ana** y **Gerardo**, por la paciencia que tenéis con el cuñado que os ha tocado, que sepáis que os aprecio un montón. A mis suegros **Alejandro** y **Pilar**, porque me habéis acogido como a un hijo y me habéis apoyado para sacar la tesis adelante. Al resto de la familia en general, especialmente a mi abuela **Paula**, que sepáis que os aprecio mucho a todos.

Al resto de amigos: de la facultad o de los de toda la vida, especialmente a **Iván** y **Albert**, que ya se que no nos vemos tanto como antes pero bueno eso no es problema ¿verdad?

Por último pedir disculpas de toda aquella gente que se me ha olvidado nombrar aquí, no os enfadéis, no es que os aprecie menos es que cada vez son menos las neuronas...

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La mitocondria.....5

1.1.1 El genoma mitocondrial

1.1.1.1 Replicación del genoma mitocondrial

- a) Replicación del ADNmt según el modelo clásico
- b) Replicación del ADNmt según el modelo de Holt y colaboradores

1.1.1.2 Transcripción del ADNmt

1.1.1.3 Traducción del genoma mitocondrial

1.1.1.3.1 Importación de proteínas del citosol a la mitocondria

1.1.2 Genética mitocondrial

1.1.2.1 Heteroplasmia y efecto umbral

1.1.2.2 Segregación mitótica

1.1.2.3 Herencia materna

1.1.2.4 Haplotipos mitocondriales

1.1.2.5 Sistema de reparación del ADNmt

1.1.3 Cadena de transporte electrónico. Fosforilación oxidativa (OXPHOS)

1.1.3.1 Control de la fosforilación oxidativa.

1.1.3.2 Complejos del sistema de fosforilación oxidativa.

1.1.3.2.1 Complejo I: NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa (EC 1.6.5.3)

1.1.3.2.2 Complejo II: Succinato-ubiquinona oxidoreductasa (EC 1.3.5.1)

1.1.3.2.3 Complejo III: Ubiquinol-Citocromo *c* reductasa (EC 1.10.2.2)

1.1.3.2.4 Complejo IV: Citocromo *c* oxidasa (EC 1.9.3.1)

1.1.3.2.5 Complejo V: ATPsintasa, F₁F₀-ATPasa (EC 3.6.1.34)

1.2 Estrés oxidativo y mitocondria.....26

1.2.1 Especies reactivas de oxígeno

1.2.1.1 Producción de ROS en la cadena de transporte electrónico

1.2.2 Defensas Antioxidantes celulares

1.2.2.1 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

a) Cu,Zn-Superóxido dismutasa (SOD-1)

b) Mn-Superóxido dismutasa (SOD-2)

c) EC-Superóxido dismutasa (SOD-3)

1.2.2.2 Catalasa (EC 1.11.1.6)

1.2.2.3 Glutati6n Peroxidasa (EC 1.11.1.19)

1.2.3 Daño oxidativo a estructuras celulares y marcadores de oxidación	
1.2.3.1 Daño oxidativo a lípidos	
1.2.3.2 Daño oxidativo a proteínas.	
1.2.3.3 Daño oxidativo al ADN.	
1.3 <u>Enfermedades mitocondriales</u>	39
1.3.1 Clasificación de las enfermedades mitocondriales	
1.3.1.1 Enfermedades debidas a alteraciones primarias del ADNmt	
A) Enfermedades debidas a mutaciones puntuales en el ADNmt.	
Síndrome de MERRF	
Síndrome de MELAS	
Síndrome de NARP / Síndrome de MILS	
Síndrome de LHON o de Leber	
B) Enfermedades debidas a reordenamientos del ADNmt.	
Síndrome de Pearson	
Síndrome de CPEO	
Síndrome de Kearns-Sayre	
1.3.1.2 Enfermedades debidas a alteraciones del ADN nuclear	
1.3.2 Modelos de estudio de enfermedades mitocondriales	
2- <u>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</u>	49
3- <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	
3.1 <u>Diagnóstico de pacientes</u>	51
3.1.1 Pacientes a estudiar	
3.1.1.1 Paciente 1	
3.1.1.2 Paciente 2	
3.1.1.3 Paciente 3	
3.1.1.4 Paciente 4	
3.1.2 Estudio bioquímico de la cadena respiratoria	
3.1.2.1 Actividad NADH Citocromo C Oxidoreductasa: Complejo I + III	
3.1.2.2 Actividad Succinato DCPIP Oxidoreductasa: Complejo II (SQ)	
3.1.2.3 Actividad Succinato-Citocromo C Oxidoreductasa: Complejo II + III	
3.1.2.4 Actividad del Complejo IV (Citocromo C oxidasa)	
3.1.2.5 Actividad citrato cintaza	

3.1.3	Estudio morfológico. Citoquímica mitocondrial en secciones de tejidos	
3.1.3.1	Succinato deshidrogenasa (SDH)	
3.1.3.2	Citocromo oxidasa (COX)	
3.1.4	Estudio Molecular	
3.1.4.1	Extracción de ADN	
3.1.4.2	Cuantificación del ADN extraído	
3.1.4.3	Reacciones de PCR	
3.1.4.4	Electroforesis en geles de agarosa	
3.1.4.5	Secuenciación automática	
3.1.4.6	Análisis de mutaciones mediante RFLP (del inglés <i>restriction fragment length polymorphism</i>)	
3.1.4.7	Electroforesis en geles de acrilamida	
3.1.4.8	Haplotipaje del ADNmt por enzimas de restricción	
3.2	<u>Líneas celulares</u>	65
3.2.1	Generación de los cíbridos transmitocondriales	
3.2.1.1	Soluciones y medios utilizados en la preparación de cíbridos transmitocondriales	
3.2.1.2	Aislamiento de las plaquetas	
3.2.1.3	Fusión de las plaquetas con las células rho ⁰	
3.2.2	Mantenimiento de los cultivos de cíbridos transmitocondriales	
3.2.2.1	Medios de cultivo	
3.2.2.2	Tripsinización de las placas de cultivo	
3.3	<u>Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno</u>	69
3.3.1	Fundamentos del método	
3.3.2	Preparación de las células para el ensayo	
3.3.3	Procesamiento de las muestras	
3.3.4	Preparación de la recta patrón	
3.3.5	Procesamiento de datos	
3.4	<u>Determinación de la oxidación lipídica</u>	71
3.4.1	Fundamentos del método	
3.4.2	Preparación de las muestras	
3.4.2.1	Optimización del método de determinación de MDA: estudio de la concentración de BHT o EDTA	

3.4.2.2	Preparación de las muestras a partir de las células	
3.4.2.3	Preparación de la recta patrón	
3.4.2.4	Procesamiento de los controles	
3.4.3	Separación cromatográfica por HPLC	
3.5	<u>Determinación de la oxidación de proteínas</u>	74
3.5.1	Fundamentos del método	
3.5.2	Procedimiento	
3.5.2.1	Obtención y derivatización de las proteínas	
3.5.2.2	Separación de las muestras mediante un gel SDS-PAGE	
3.5.2.3	Tinción y secado del gel con Coomassie	
3.5.2.4	Transferencia y revelado de la membrana.	
3.5.2.5	Análisis de resultados	
3.6	<u>Determinación de la oxidación del ADN</u>	78
3.6.1	Fundamentos del método	
3.6.2	Procedimientos	
3.6.2.1	Extracción y cálculo de la concentración del ADN	
3.6.2.2	PCR cuantitativa y gel de visualización de los productos	
3.6.2.3	Cálculo de la eficiencia de amplificación	
3.7	<u>Determinación de proteínas</u>	81
3.8	<u>Análisis estadístico</u>	82

4-.RESULTADOS

4.1	<u>Diagnóstico de pacientes</u>	83
4.1.1	Paciente 1	
4.1.2	Paciente 2	
4.1.3	Paciente 3	
4.1.4	Paciente 4	
4.2	<u>Estudio de la producción de ROS y daño oxidativo</u>	88
4.2.1	Generación de cíbridos mitocondriales	
4.2.2	Análisis del haplotipo mitocondrial de las diferentes líneas celulares	
4.2.3	Producción de peróxido de hidrógeno de las diferentes líneas celulares	
4.2.3.1	Línea MERRF	

- 4.2.3.2 Línea MELAS
- 4.2.3.3 Línea COX
- 4.2.3.4 Línea ND6
- 4.2.4 Estudio de la peroxidación lipídica en las diferentes líneas
 - 4.2.4.1 Optimización del método de determinación de MDA: estudio de la concentración de BHT o EDTA
 - 4.2.4.1.1 Estudio de la concentración de BHT
 - 4.2.4.1.2 Estudio de la concentración de EDTA
 - 4.2.4.1.3 Estudio del mejor inhibidor. ¿Sólos o combinados?
 - 4.2.4.1.4 Efecto del BHT y el EDTA en la reacción MDA-TBA
 - 4.2.4.2 Estudio de la peroxidación lipídica en MERRF
 - 4.2.4.3 Estudio de la peroxidación lipídica en MELAS
 - 4.2.4.4 Estudio de la peroxidación lipídica en COX
 - 4.2.4.5 Estudio de la peroxidación lipídica en ND6
- 4.2.5 Estudio de la oxidación de proteínas
 - 4.2.5.1 Estudio de la oxidación de proteínas en MERRF
 - 4.2.5.2 Estudio de la oxidación de proteínas en MELAS
 - 4.2.5.3 Estudio de la oxidación de proteínas en COX
 - 4.2.5.4 Estudio de la oxidación de proteínas en ND6
- 4.2.6 Estudio de la oxidación del ADNmt
 - 4.2.6.1 Estudio de la oxidación del ADNmt en MERRF
 - 4.2.6.2 Estudio de la oxidación del ADNmt en MELAS
 - 4.2.6.3 Estudio de la oxidación del ADNmt en COX
 - 4.2.6.4 Estudio de la oxidación del ADNmt en ND6
- 4.2.7 Resumen de resultados sobre la producción de ROS y el daño oxidativo

5-. DISCUSIÓN

5.1 <u>Estudio molecular de los pacientes</u>	115
5.1.1 Paciente 1	
5.1.2 Paciente 2	
5.1.3 Paciente 3	
5.1.4 Paciente 4	
5.2 <u>Células transmitocondriales</u>	122

- 5.2.1 Haplotipos mitocondriales
- 5.2.2 Optimización del método de determinación de MDA: estudio de la concentración de BHT o EDTA.
- 5.2.3 Estudio bioquímico del estrés oxidativo en las células transmitocondriales
 - 5.2.3.1 Estudio de la producción de ROS
 - 5.2.3.2 Estudio del daño oxidativo a lípidos
 - 5.2.3.3 Estudio del daño oxidativo a proteínas
 - 5.2.3.4 Estudio del daño oxidativo al ADNmt

6- CONCLUSIONES133

7- BIBLIOGRAFÍA135

Apéndice. Abreviaturas. Lista de Cebadores. Artículos Publicados..161

INTRODUCCIÓN

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 La mitocondria

La mitocondria es el orgánulo celular encargado de obtener, a partir de sustratos energéticos, energía en forma de ATP mediante un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Las mitocondrias son pequeños orgánulos localizados en el citoplasma de casi todas las células eucariotas. Dentro de ella tienen lugar importantes funciones vitales como pueden ser la biosíntesis de aminoácidos, el ciclo del ácido cítrico, la oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa entre otras.



Figura 1. Fotografía tomada por microscopía electrónica de una mitocondria. Se observan claramente los repliegues de la membrana mitocondrial interna (De Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology, Chapman and Hall, 12th edition, 1994)

Su pequeño tamaño refleja su origen evolutivo, el ahora ampliamente aceptado origen endosimbiótico, que plantea que la mitocondria fue originariamente una bacteria, que fue internada por una célula eucariota en los primeros estadios de la evolución. Su tamaño permite que sean observadas al microscopio óptico, aún así no fueron identificadas por primera vez hasta el siglo XIX.

Las mitocondrias normalmente son cilindros alargados y rígidos, de un diámetro comprendido entre 0,5 y 1 μm . Este orgánulo presenta una membrana externa y una membrana interna que define dos compartimentos internos. Estas dos membranas desempeñan un papel crucial en las actividades de la mitocondria:

- **la membrana mitocondrial externa**, que contiene unas proteínas llamadas porinas que hacen que esta membrana sea permeable a todas las proteínas de peso molecular inferior o igual a 10 kDa. Existen otras proteínas en esta membrana que intervienen en la síntesis de lípidos y en la transformación de sustratos lipídicos.
- **la membrana mitocondrial interna**, que está replegada en numerosas crestas, contiene proteínas que participan en la oxidación de la cadena

respiratoria, la síntesis de ATP, y otras proteínas de transporte que regulan el paso de metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior.

Estas dos membranas definen dos espacios dentro de la mitocondria:

- el primero de ellos es la **matriz**, que contiene multitud de enzimas diferentes que intervienen en las principales reacciones bioquímicas que tienen lugar en la mitocondria. Además, en la matriz se encuentran muchas copias idénticas del genoma del ADN mitocondrial (en adelante ADNmt), ribosomas y la maquinaria necesaria para la expresión de los genes mitocondriales.
- el otro espacio que se encuentra en la mitocondria es el **espacio intermembranoso** que contiene varias enzimas que utilizan el ATP procedente de la matriz, para fosforilar otros nucleótidos. (Alberts B, 1989)

1.1.1 El genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial humano es una molécula circular de doble cadena de 16569 pares de bases (Anderson S, 1981). Cada cadena de la doble hebra presenta una proporción muy diferente de bases: la llamada cadena pesada (o H, de “heavy”), que tiene una elevada proporción de bases purínicas (guanina y adenina), mientras que la llamada ligera (o L, de “light”), es rica en bases pirimidínicas (citosina y timina). La nomenclatura ligera o pesada, tiene que ver con la diferente movilidad que presentan las cadenas separadas en un gradiente desnaturalizante de cloruro de cesio.

La mayoría de la información se encuentra localizada en la cadena pesada, es en la que encontramos codificada la información para la síntesis de dos ARN ribosómicos (en adelante ARNr), el *12s rRNA* y el *16s rRNA*, catorce ARN de transferencia (en adelante ARNt) y de doce polipéptidos. En la cadena ligera se encuentra codificada la información para ocho ARNt y un único polipéptido (*ND6*). Los trece polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial son subunidades proteicas constituyentes de los complejos enzimáticos de la fosforilación oxidativa: siete subunidades del complejo I (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* y *ND6*); una del complejo III (*Cyt b*); tres del complejo IV (*COI*, *COII*, *COIII*) y dos del complejo V (*ATPase 6* y *ATPase 8*). Los otros veinticuatro genes del genoma mitocondrial humano son necesarios para su traducción dentro del orgánulo (2 ARNr y 22 ARNt).

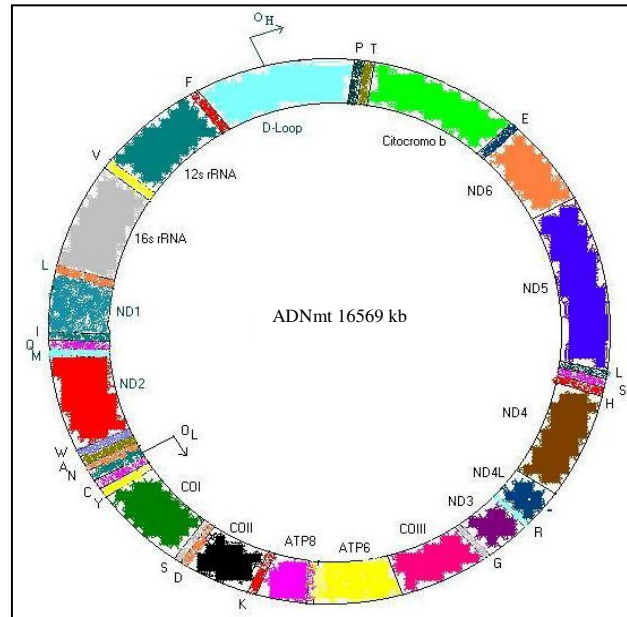


Figura 2. Esquema de la distribución de los genes en el ADNmt humano. En la circunferencia interior se muestra el nombre de los polipéptidos codificados más los dos ARNr, y en la circunferencia exterior la localización de los diferentes ARNt, nombrados según el aminoácido que codifican. Con dos flechas se indica el origen de replicación de la cadena ligera (O_L) y el de la cadena pesada (O_H).

El genoma mitocondrial humano presenta varias características que lo hacen diferenciarse del nuclear. Una de ellas es la no presencia de intrones en toda la molécula y exceptuando la zona reguladora, conocida como D-loop, comprendida más o menos entre los nucleótidos 16160 y 570 (1112 nucleótidos), todo el resto de la molécula es codificante. Algunos de los genes proteicos están superpuestos, y parte de los codones de terminación no están codificados pero son generados post-transcripcionalmente por poliadenilación de los ARN mensajeros (en adelante ARNm) (Schon E, 1997).

1.1.1.1 Replicación del genoma mitocondrial

En el 1982 Clayton describió la forma en que el ADNmt se replicaba de forma asimétrica para generar copias idénticas de si mismo (Clayton DA, 1982). Esa forma de replicación fue la aceptada hasta que en el año 2000 Holt y colaboradores la cuestionaron, y propusieron otra forma de replicación del ADNmt mucho más parecida a la del genoma nuclear (Holt IJ, 2000). A continuación se comentarán de forma breve las dos formas de replicación.

a) Replicación del ADNmt según el modelo clásico

Estudios de microscopía electrónica indicaron que el genoma mitocondrial presentaba dos orígenes de replicación, uno en la cadena pesada (O_H), y otro en la cadena ligera (O_L) (Kasamatsu H, 1974). El origen de replicación de la cadena pesada se encuentra dentro de la zona conocida como D-loop, mientras que el origen de replicación de la cadena ligera está separado dos terceras partes sobre el genoma, del origen de la cadena pesada en la dirección del origen de replicación. La replicación se origina en O_H y se empieza sintetizando una cadena H idéntica a la original. Una vez la horquilla de replicación ha pasado sobre O_L , empieza la síntesis de la cadena L “hija” en dirección opuesta a la síntesis de la nueva cadena H.

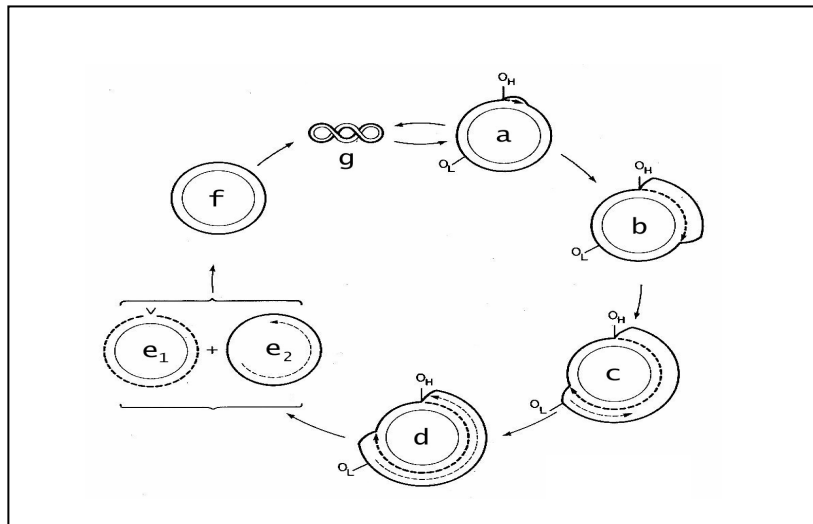


Figura 3. Modelo asimétrico de replicación. O_H y O_L orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera respectivamente. (a) Empieza síntesis de cadena pesada en O_H . (b) Continúa la síntesis de la cadena pesada una vez a superado el D-loop. (c) La síntesis de la cadena pesada deja expuesto el origen de replicación de la cadena ligera, y comienza la síntesis de la misma. (d) Avanza la síntesis de las dos cadenas en sentido contrario. (e1) y (e2) Acaba la replicación de cada cadena en cada molécula hija. (f) y (g) Cada molécula hija queda covalentemente cerrada y es superenrollada. (Modificado de Clayton, 1982)

Para comenzar la replicación de la cadena H se requiere la síntesis de un cebador de ARN. Este cebador se creía sintetizado por una ARN polimerasa mitocondrial, pero recientemente se ha observado actividad transcriptasa reversa a la ADN polimerasa gamma (en adelante ADNp γ), que es la ADN polimerasa mitocondrial (Murakami E, 2003). La síntesis de este ARN se localiza justo al lado de unas secuencias muy conservadas llamadas CSB I, II y III (del inglés *conserved sequence blocks*). Este ARN hibrida con la cadena L y desplaza una porción de la cadena H en la región de control (D-loop), creando una zona de tres hebras (dos de ADN y una de ARN). La replicación

del ADN no empieza hasta que el precursor de ARN es procesado en un lugar preciso por una ARNasa mitocondrial (MRP, del inglés *mitochondrial RNA-processing ribonuclease*). Este enzima solo corta estructuras de triple hélice, y también se ha observado que necesita de la secuencia CSB I para actuar (Clayton DA, 2000).

Cuando dos terceras partes de la cadena H están sintetizadas queda expuesta una zona del genoma mitocondrial con secuencias invertidas repetidas, esta zona es el origen de replicación de la cadena L (O_L). Las secuencias invertidas repetidas favorecen la formación de una estructura secundaria característica. Un segundo cebador de RNA complementario a una zona de la estructura secundaria es sintetizado, y entonces empieza la síntesis de la nueva cadena L en sentido contrario a la síntesis de la nueva cadena H.

Las dos hebras que se van sintetizando en sentido contrario continúan hasta que acaban de duplicar toda la cadena, y con la ayuda de una topoisomerasa mitocondrial se separan las cuatro cadenas, dando lugar a dos moléculas de ADNmt. La duración del proceso de replicación del genoma mitocondrial depende de la situación en la que se encuentran las células (cultivos celulares, etc.).

La síntesis del ADN en la mitocondria se realiza mediante la acción de la ADNp γ . Esta ADN polimerasa es una enzima multifuncional que participa en multitud de procesos como son la síntesis de ADN, reparación del ADN por excisión de bases (de 3' a 5') y la síntesis de ARN utilizando ADN como molde (Murakami E, 2003). La ADNp γ es un enzima formado por dos subunidades, una catalítica (125-140 KDa) y una unidad accesoria (35-40 kD). La unidad catalítica por si sola es capaz de sintetizar ADN, en cambio, la unidad accesoria no tiene actividad enzimática conocida, pero estudios donde se ha mutado esta subunidad han mostrado que es esencial *in vivo* (Iyengar B, 2002). Recientemente se ha descrito que pudiera existir una estructura secundaria del ADN parecida a la de un ARNt, cerca del origen de replicación, y que la subunidad accesoria por si sola se uniría tanto a ADN de cadena doble como sencilla (Carrodegua JA, 2002). Así se piensa que esta subunidad no solo activa la polimerización del ADN sino que también está implicada en el reconocimiento del cebador durante la iniciación de la replicación del ADNmt (Fan L, 1999).

b) Replicación del ADNmt según el modelo de Holt y colaboradores

En el año 2000 Holt y colaboradores publicaron un trabajo donde analizaban la replicación del ADN mitocondrial utilizando geles bidimensionales de agarosa, donde

conseguían separar intermediarios de replicación (IR). En este primer trabajo encontraron dos IR: uno que era resistente a la digestión por nucleasa S1, que degrada ADN de cadena sencilla, y otro IR que sí era sensible a la digestión por nucleasa S1. El IR resistente a la digestión por S1 ya contradecía al modelo clásico de replicación ya que en ese modelo durante mucho tiempo existen moléculas de ADN de cadena sencilla. Fueron más allá y observaron que este IR (resistente a nucleasa S1), presentaba una replicación muy similar a la del genoma nuclear, es decir, unidireccional y con la intervención de una cadena de replicación rápida, y otra de replicación más lenta. Los autores concluyen que los dos modelos de replicación coexisten, y que cada uno predomina en unas determinadas condiciones. El modelo de replicación clásico parece que predomina en células en cultivo en condiciones basales, mientras que el modelo unidireccional de replicación análogo al nuclear, predomina en células en cultivo que se están recuperando de una depleción o de otro tipo de estrés que pudiera afectar al número de copias del ADN mitocondrial (Holt II, 2000).

En el siguiente artículo del grupo, (Yang MY, 2002) los autores describen que los IR de cadena sencilla encontrados con anterioridad eran posiblemente debidos a la presencia de RNasa H en la extracción de las mitocondrias. Esta RNasa H habría degradado el RNA que hay unido a ADN a todo lo largo del genoma mitocondrial, dejando zonas de ADN de cadena sencilla. La presencia de RNA en el ADNmt de mamíferos ya fue descrita con anterioridad por Grossman y colaboradores en el año 1973 (Grossman LI, 1973). En este trabajo extraen las mitocondrias mediante un gradiente de sucrosa y obtienen ADNmt de doble cadena que contiene híbridos ADN:RNA. Al analizar los IR de este ADNmt obtienen que todos son de doble cadena; así los autores concluyen que la replicación del ADNmt principalmente o casi exclusivamente se da siguiendo el modelo análogo al nuclear.

Más recientemente este mismo grupo ha publicado otro artículo (Bowmaker M, 2003) donde han intentado delimitar la zona del origen de replicación. Han descrito que la replicación comienza de forma bidireccional en una zona comprendida entre los genes del citocromo *b* y los genes que codifican las subunidades 5 y 6 de la NADH deshidrogenasa. La replicación en su origen es bidireccional, pero una vez la horquilla de replicación alcanza por un extremo el O_H , ésta queda aquí parada, y la replicación sigue de forma unidireccional.

de transcripción. mtTFA es una proteína de 25 kDa de dos dominios, y que presenta afinidad para unirse al ADN.

Como se ha comentado previamente la transcripción del genoma mitocondrial es policistrónica, lo que implica que en un principio se produce la misma cantidad de ARN de todos los genes codificados. Esto genera un problema, ya que para la traducción de los ARNm se necesitan grandes cantidades de ARNr y ARNt, por lo que estos genes deberían ser transcritos en mayor cantidad. Para solucionar el problema en el caso de los rRNAs, existe una proteína llamada mTERF (del inglés *mitochondrial transcription termination factor*) (Kruse B, 1989) que facilita que además de sintetizarse el gran transcrito policistrónico de 16 kb, se sintetice otro transcrito más pequeño de 3 kb. La proteína mTERF se une a una secuencia específica localizada en el medio del gen *Leu(UUR)*, bloqueando el avance de la RNA polimerasa, y así el transcrito de 3 kb es liberado. Este transcrito incluye diferentes genes, entre ellos los dos ARNr además de los tRNAs que lo flanquean, y es sintetizado unas 25 veces más con respecto al transcrito largo. Así, la mitocondria se asegura la existencia de suficiente cantidad de rRNAs para crear todos los ribosomas necesarios. Cuando mTERF no se une a la secuencia del gen *Leu(UUR)*, ya sea porque no existe la suficiente cantidad de proteína o porque se ha unido a otro factor, la polimerasa no es bloqueada y el transcrito largo es sintetizado (Dubin DT, 1982) (Van Etten RA, 1983)

Al no existir intrones en el genoma mitocondrial el procesamiento de los dos transcritos policistrónicos es relativamente sencillo. Los genes que codifican los ARNt están flanqueando los dos genes ribosomales así como el resto de genes polipeptídicos, por lo que se piensa que esta especial distribución de los ARNt genera unas señales específicas que serán reconocidas por endonucleasas (Ojala D, 1981), que cortarán en los extremos 5' y 3' de los ARNt.

1.1.1.3 Traducción del genoma mitocondrial

La traducción de los ARNm mitocondriales tiene lugar en los ribosomas mitocondriales, que están formados por los ARNr 5S, 12S y 16S, codificados por el genoma mitocondrial y por otras proteínas codificadas por el genoma nuclear (Magalhaes PJ, 1998).

Existen algunas diferencias entre la traducción de proteínas que tiene lugar en el citoplasma, y la que tiene lugar en la mitocondria, como por ejemplo que los ARNm mitocondriales no tienen estructura CAP (guanina metilada) en la posición 5' y además

no tienen casi secuencia 5' UTR (del inglés *untranslated region*), por lo que no está muy clara la unión del ribosoma al ARNm para comenzar su traducción. Además otra diferencia importante es que el código genético mitocondrial presenta algunas variaciones en la lectura de los codones respecto al código genético universal, como se puede apreciar en la siguiente tabla:

	Código universal	Código mitocondrial
	UGA	STOP
	AUA, AUU	Isoleucina
	AGG, AGA	Arginina
		Triptófano
		Metionina
		STOP

Tabla 1. Codones que varían entre el código genético universal y el código genético mitocondrial.

Otra peculiaridad del sistema genético mitocondrial es que presenta un sistema de reconocimiento de codones inusual, que permite la lectura del código genético con sólo 22 tRNAs, en lugar de los 32 requeridos según la hipótesis del balanceo de Crick. El sistema mitocondrial se basa en el reconocimiento de las dos primeras bases del codón (Lagerkvist U, 1978). Para 8 aminoácidos la tercera base no es discriminativa: CUX es traducido como Leucina, GUX como Valina, UCX como serina, CCX como prolina, ACX como treonina, GCX como Alanina, CGX como Arginina y GGX como Glicina. Para cada uno de estos aminoácidos sólo existe un ARNt, y para el resto de aminoácidos las dos primeras bases son discriminatorias, y dependiendo de si la tercera base es A-G o U-C, el aminoácido varía.

Aunque se ha conseguido sintetizar proteínas mitocondriales en mitocondrias aisladas, todavía no se ha podido desarrollar un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* a partir de extractos mitocondriales. Por este motivo muchos de los detalles de la síntesis proteica no se conocen y sólo se han caracterizado unos pocos factores auxiliares involucrados en la iniciación y elongación de la traducción en los mamíferos.

1.1.1.3.1 Importación de proteínas del citosol a la mitocondria

De las casi mil proteínas que se pueden encontrar en la mitocondria, solamente 13 derivan del genoma mitocondrial. Por lo tanto la gran mayoría de proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear, traducidas en el citosol e importadas al interior de la mitocondria. Para que las proteínas codificadas en el

genoma nuclear se dirijan a la mitocondria es necesario marcarlas con un “péptido señal” en el extremo N-terminal (von Heijne G, 1989). Este péptido que es eliminado en el interior de la mitocondria para formar el polipéptido maduro, es normalmente muy básico (contiene muchos residuos de arginina y lisina), y contiene secuencias específicas que determinarán el lugar preciso de procesamiento dentro de la mitocondria (Hendrick JP, 1989). Las proteínas citosólicas antes de ser importadas, son desplegadas por chaperonas y vueltas a plegar una vez están dentro de la mitocondria. La importación de proteínas a la matriz, al espacio intermembrana o a la membrana mitocondrial interna, requiere de potencial de membrana.

Existen unos complejos multiproteicos de membrana que se encargan de la translocación de los polipéptidos a través de la membrana. Esta especie de canales de membrana se conocen como Tim y Tom (del inglés *translocase of the inner/outer membrane* respectivamente) (Schatz G, 1998) (Koehler CM, 1999). Además los polipéptidos son transportados de la membrana externa a la interna por dos complejos proteicos diferentes en el espacio intermembrana (Tim9p-Tim10p y Tim8p-Tim13p) (Curran SP, 2002) (Davis AJ, 2000).

1.1.2 Genética mitocondrial

La genética del ADNmt presenta algunas características respecto a la genética del ADN nuclear, que hay que tener en cuenta a la hora de trabajar con enfermedades que tienen su origen en mutaciones en el ADNmt. En los siguientes subapartados se comentan las más representativas.

1.1.2.1 Heteroplasmia y efecto umbral

Como se ha comentado anteriormente, en el interior de cada célula se pueden encontrar cientos o miles de copias del ADNmt (poliplasmia). Este número puede fluctuar dependiendo del tejido o del tipo de célula y su dependencia del metabolismo oxidativo o de su estado metabólico. Durante la división celular, las moléculas de ADNmt se distribuyen de forma aleatoria entre las nuevas células. En tejidos sanos, todas las copias del ADNmt son idénticas, y a esta situación se le llama *homoplasmia*. Las mutaciones patogénicas del ADNmt afectan normalmente a alguna pero no a todas las copias del ADNmt de una célula, de un tejido, o de un individuo, lo cual resulta en una mezcla de genomas mitocondriales mutados y no mutados. Esta situación recibe el nombre de *heteroplasmia*.

El fenotipo clínico de una mutación puntual particular en el ADNmt viene determinado principalmente por la proporción relativa de genomas sanos y mutados en los diferentes tejidos. Dependiendo de la demanda energética de una célula en particular, el nivel de genomas mutados requeridos para producir la expresión fenotípica de la mutación varía, y recibe el nombre de *efecto umbral*. Este umbral es diferente en los distintos tejidos, pero cuando el umbral es sobrepasado, la producción de ATP es menor a la demanda de energía.

1.1.2.1 Segregación mitótica

La división de las mitocondrias y la replicación del ADNmt son procesos independientes del ciclo celular. Durante la división celular las mitocondrias se distribuyen de forma aleatoria en las células hijas por lo que el fenotipo puede variar respecto a la célula madre. Este fenómeno explica cómo ciertos pacientes con desórdenes relacionados con el ADNmt varían de un fenotipo clínico a otro conforme van aumentando la edad.

1.1.2.3 Herencia materna

En la fecundación todo el ADNmt proviene del óvulo, en consecuencia, el patrón de transmisión del ADNmt es radicalmente diferente de la herencia mendeliana. Una madre que tenga un genoma mitocondrial mutado, lo transmitirá a todos sus hijos (varones y mujeres), pero sólo las hijas la transmitirán a la progenie. Esto es debido a que aunque el ADNmt paterno entra al interior del óvulo en el momento de la fertilización, este es selectivamente destruido como si fuese un antígeno externo (Sutovsky P, 1999). La cantidad de moléculas que contenga cada uno de los óvulos puede ser muy variable debido a un fenómeno de restricción y amplificación conocido como fenómeno de cuello de botella. Este hecho hace que el número de moléculas de ADNmt que se transmiten de madre a hijo sea muy pequeño (Chinnery PF, 2000).

La concepción clásica de la transmisión del ADNmt exclusivamente por vía materna quedó en entredicho en el año 2002, por la aparición del primer caso de herencia paterna del ADNmt. Se trataba de un paciente con intolerancia al ejercicio debida a una mutación restringida al músculo esquelético. El músculo había heredado el ADNmt del padre, mientras que el ADNmt del resto de tejidos había sido heredado de la madre (Schwartz M, 2002)

1.1.2.4 Haplotipos mitocondriales

El ADNmt humano es altamente polimórfico en la población, ya que presenta una elevada tasa de mutación. Suele presentar una serie de polimorfismos que se pueden presentar de forma combinada, su estudio y clasificación ha permitido la creación de haplogrupos mitocondriales, que agrupa a los ADNmt según la presencia de estos polimorfismos característicos. Se ha utilizado el estudio de los haplogrupos para analizar el origen, dispersión y evolución de las poblaciones humanas (Cann RL, 1987). Algunos autores han sugerido que ciertos polimorfismos del ADNmt en la población pueden interactuar con factores ambientales o con mutaciones patogénicas del ADNmt y así ADNmt que pertenezcan a diferentes haplogrupos podrían dar lugar a mitocondrias con diferente funcionalidad (Wallace DC, 1999).

Haplogrupo	Frecuencia	Haplogrupo	Frecuencia
H	50,0	U4	1,0
I	2,0	U5	7,0
J	11,0	U6	1,0
K	7,0	V	4,0
T	8,0	W	1,0
U3	1,0	X	2,0

Tabla 2. Haplogrupos más habituales y frecuencias en las que se encuentran en la población caucásica. (Helgason A, 2000)

1.1.2.5 Sistema de reparación del ADNmt

Como se explicará más adelante en la fosforilación oxidativa se generan especies reactivas de oxígeno (en adelante ROS, del inglés *reactive oxygen species*), que pueden reaccionar con el ADNmt y provocar diferentes modificaciones como pueden ser modificaciones de las bases, sitios abásicos, etc. (Wiseman H, 1996). El ADNmt también puede ser dañado por carcinógenos químicos (Bandy B, 1990).

Desde hace mucho tiempo se pensaba que el ADNmt no poseía sistema de reparación, así que todas las modificaciones y alteraciones que padecían sus bases no podían ser reparadas. Clayton y colaboradores fueron los primeros en estudiar un posible sistema de reparación del ADNmt y descubrieron que los dímeros de pirimidina inducidos por radiación ultravioleta no eran reparados (Clayton DA, 1974).

En los últimos años diversos estudios han demostrado que el ADNmt posee mecanismos de reparación, aunque son mucho más simples y menos eficientes que los sistemas de reparación del ADN nuclear. El principal sistema de reparación del ADN en la mitocondria y el más estudiado es el sistema de reparación por excisión de base (también “BER” del inglés *base excision repair*). Este sistema es el más utilizado para reparar daño oxidativo en las bases del ADNmt. Estudios de reparación *in vitro* han demostrado que la mitocondria contiene todos los enzimas necesarios para realizar este sistema de reparación, y que además lo realiza de una forma muy similar al nuclear (Pinz KG, 1998). Este sistema se inicia por la acción de una glicosilasa que elimina el enlace glucosídico entre la base dañada y su azúcar. Una endonucleasa apurínica/apirimidínica elimina el enlace 5' fosfodiéster, dejando un hueco en la cadena de ADN sin nucleótido, que es rellenado por la ADNp γ . Por último actúa la ADN ligasa III que une la nueva base al resto de la cadena.

1.1.3 Cadena de transporte electrónico. Fosforilación oxidativa (OXPHOS)

La mitocondria genera la mayor parte de la energía que requieren las células eucariotas mediante la oxidación aeróbica de sustratos, que genera potencial reductor en forma de NADH y FADH₂. Los electrones generados por oxidación del NADH y del FADH₂, pasan a través de cuatro complejos proteicos, la cadena de transporte electrónico, hasta reducir el oxígeno y formar agua. Este proceso ocurre en varios pasos de oxidación-reducción y por eso recibe el nombre de cadena. La cadena respiratoria almacena la energía en forma de gradiente de concentración de protones. Este gradiente es el que se aprovechará para sintetizar ATP en la matriz mitocondrial, con la ayuda de una ATPsintasa.

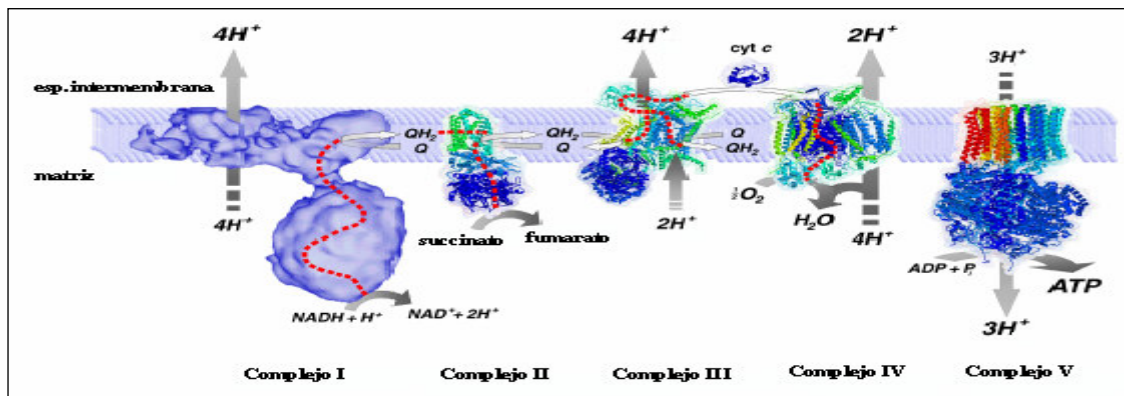


Figura 5. Representación del sistema OXPHOS. Las líneas punteadas representan la dirección del flujo de electrones, mientras que las flechas rellenas muestran la translocación de los protones. Q, ubiquinona; QH₂, ubiquinol; cyt c, citocromo c (Modificada de Nijtmans L, 2004)

La cadena respiratoria está constituida por cuatro complejos multienzimáticos y dos moléculas móviles que unen a los anteriores. Las moléculas móviles son la ubiquinona y el citocromo c. Los complejos I, III, IV participan en la oxidación de NADH, produciendo tres ATPs por cada NADH, mientras que la oxidación del FADH₂, en la que participan los complejos II, III y IV, produce solo dos ATPs por cada FADH₂. Los electrones que llegan a la cadena de transporte electrónico siempre lo hacen desde el interior de la mitocondria, es decir que el NADH y el FADH₂ se encuentran en la matriz mitocondrial. Cuando los electrones se transfieren desde el complejo I o II hasta el oxígeno, que también está en el interior de la mitocondria, los protones se bombean hacia el espacio intermembranoso, generando un gradiente. La ATPsintasa utilizando este gradiente, genera ATP en la matriz mitocondrial.

La ruta seguida por los electrones a través de la cadena de transporte electrónico se conoce, en gran parte, por el uso de inhibidores del transporte electrónico. Algunos de estos inhibidores son:

- Complejo I: rotenona y amital
- Complejo III: antimicina A
- Complejo IV: cianuro
- Complejo V: oligomicina

El grupo flavina mononucleótido (en adelante FMN) del complejo I traspasa dos electrones desde el NADH y pasa a la forma reducida FMNH₂, cogiendo para ello un protón de la matriz. Los electrones del FMNH₂ pasan a una agrupación hierro-azufre, que los transporta de uno en uno quedando los protones libres que pasan al espacio intermembranoso. Los electrones saldrán del complejo I hasta la ubiquinona (UQ), que es capaz de transportar dos electrones y dos protones. El paso de los electrones por el complejo I provoca un bombeo de protones desde el interior de la mitocondria. La ubiquinona coge los dos protones del medio que le hacen falta para reducirse a UQH₂, y cede los electrones al complejo III. El primer componente que actúa de este complejo es el citocromo *b*, que contiene un grupo hemo con un átomo de hierro, que pasa de Fe³⁺ a Fe²⁺ y los cederá a una agrupación hierro-azufre quedando de nuevo en estado oxidado. Esta agrupación cede el electrón al citocromo *c*₁ que lo pasa al citocromo *c* que está fuera del complejo III. Este citocromo *c* los pasa al complejo IV, cediéndoselos a un átomo de cobre. De aquí pasan al citocromo *a*, a otro átomo de cobre y finalmente al citocromo *a*₃ que se los cede al oxígeno. El complejo IV actúa como una bomba de

protones que funciona gracias a la energía obtenida por las reacciones redox. La formación de agua requiere de electrones y protones de la matriz mitocondrial. Cada vez que el NADH se reoxida cede dos electrones, por lo que sólo es capaz de reducir un átomo de oxígeno. Se necesita que se reoxiden dos moléculas de NADH para que lleguen cuatro electrones a la vez. Hasta que no lleguen cuatro electrones juntos no se reduce el oxígeno para dar dos moléculas de agua.

Los electrones que cede el FAD a la cadena de transporte electrónico, provienen del ciclo de Krebs a partir del succinato, que se encuentra en el matriz mitocondrial. Este succinato da lugar al fumarato mediante la pérdida de dos protones que recoge el FAD dando lugar al FADH₂. Los electrones pasarán a una agrupación hierro-azufre y de ahí a la UQ. De aquí en adelante el proceso es el mismo que cuando cede los electrones el NADH. El complejo II no transporta protones a través de la membrana mitocondrial interna.

Los diferentes complejos de la cadena de transporte electrónico no están organizados de forma individual, sino que están agrupados entre ellos. Mediante el análisis de estructuras cristalinas se ha visto, por ejemplo, que el complejo III y IV forman dímeros (Tsukihara T, 1995) (Xia D, 1997). Además actualmente se piensa que los dímeros podrían estar organizados entre ellos formando supercomplejos, estabilizados por interacciones hidrofóbicas (Shägger H, 2000).

1.1.3.1 Control de la fosforilación oxidativa

En los últimos años ha habido un gran avance en el estudio del control metabólico de la fosforilación oxidativa, principalmente motivados por el hecho de que mutaciones en el ADNmt puedan producir defectos en la obtención de energía, incluso en la presencia de ADNmt salvaje. Experimentos sobre tejido aislado de rata utilizando concentraciones crecientes de inhibidores del complejo I, III o IV, han sugerido que la actividad de cada componente de la cadena de transporte electrónico es mucho más elevada que la cantidad requerida para soportar la tasa de respiración endógena (Letellier T, 1994) (Taylor RW, 1994).

El control de la respiración fue originalmente definido como la estimulación de la respiración de mitocondrias aisladas por ADP, seguido por su consumo después de la conversión de ADP en ATP (Lardy HA, 1952). Este fenómeno fue explicado por la teoría quimiosmótica de Mitchell (Mitchell P, 1961): la entrada de ADP a la mitocondria estimula la ATPsintasa acompañado por una disminución del potencial de

membrana, que en consecuencia estimula la actividad de tres bombas de protones y así la respiración mitocondrial.

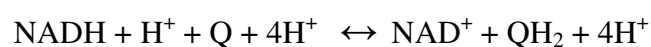
Más recientemente se ha postulado un segundo mecanismo de control de la respiración basado en la inhibición alostérica por ATP de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV), a valores elevados del ratio ATP/ADP (Arnold S, 1997). Tanto el ATP como el ADP se unen al mismo sitio por el lado de la matriz mitocondrial, en la subunidad transmembrana de la subunidad IV (Napiwotzki J, 1997). Este sitio de unión al complejo IV fue descubierto utilizando un anticuerpo contra el complejo IV, con lo que se impedía la unión del ATP, y su efecto inhibitorio sobre la fosforilación oxidativa. Este segundo mecanismo de regulación es independiente del potencial de membrana, y ocurre cuando el ATP desplaza al ADP del lugar de unión en el complejo IV, a elevados valores del ratio ATP/ADP (Arnold S, 1999). Esta inhibición por ATP de la citocromo *c* oxidasa no se da en bacterias y puede ser alterado por hormonas como por ejemplo pueden ser las hormonas tiroideas.

1.1.3.2 Complejos de la fosforilación oxidativa

En la fosforilación oxidativa están involucrados cinco complejos proteicos que están asociados con diferentes grupos prostéticos, con actividad redox y con potenciales de reducción sucesivamente crecientes. Estos complejos pueden moverse lateralmente dentro de la membrana mitocondrial interna. A continuación describiremos brevemente cada uno de ellos.

1.1.3.2.1 Complejo I: NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa (EC 1.6.5.3)

El complejo I es el punto de entrada para la mayoría de electrones que atraviesan la cadena de transporte electrónico. Este complejo asocia la oxidación del NADH y la reducción de la ubiquinona, con la generación de un gradiente de protones que se usará en la síntesis de ATP. Este complejo se encuentra en la mitocondria de las células eucariotas y en la membrana plasmática de las bacterias fotosintéticas púrpuras. La reacción catalizada por este complejo es la siguiente:



El complejo I de mamíferos es un holoenzima de casi 980 kDa formado por dos partes funcionales: una de ellas es un brazo catalítico que está localizado en la cara de la

membrana que da a la matriz mitocondrial, y la otra un brazo inmerso en la membrana mitocondrial interna que se encarga de bombear los protones. Este complejo está formado por al menos 39 proteínas estructurales diferentes codificadas por el genoma nuclear y siete subunidades codificadas por el genoma mitocondrial (Carrol J, 2003). Además este complejo contiene una molécula de FMN (grupo prostético con actividad redox) y seis o siete centros de hierro-azufre que participan en el transporte electrónico.

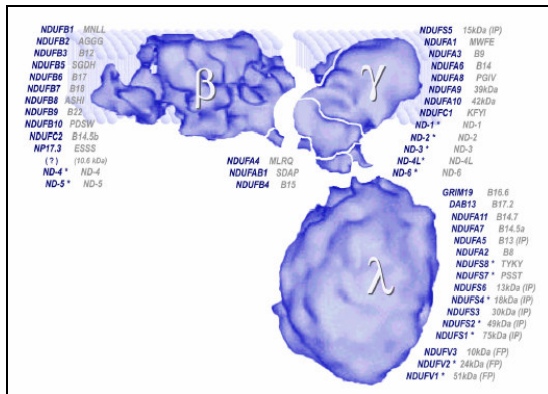


Figura 6. Representación esquemática de las diferentes subunidades que forman el complejo I y su posible topología dentro del complejo. Los homólogos bovinos están escritos en gris, y las subunidades humanas en las que se han encontrado mutaciones están marcadas con un asterisco. (Obtenido de Nijtmans L, 2004)

Tanto la FMN como la Coenzima Q (en adelante CoQ) pueden adoptar tres estados de oxidación. A pesar de que el NADH puede participar sólo en la transferencia de dos electrones, tanto la FMN como el CoQ son capaces de aceptar y dar, ya sea uno o dos electrones, debido a que sus formas semiquinona son estables. La CoQ tiene una cola hidrofóbica que la hace soluble en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna.

En los últimos años los estudios sobre el complejo I han adquirido mucha relevancia ya que se ha visto que muchas enfermedades mitocondriales tienen su origen en problemas estructurales o funcionales de este complejo. Aunque muchas veces estas mutaciones se han encontrado en genes codificados por el ADNmt, la proporción es mínima con respecto a las mutaciones que se han descrito en los genes de las subunidades del complejo I codificadas en el núcleo. Estudios recientes se han centrado en cómo afectan estas mutaciones al ensamblaje de las diferentes subunidades del complejo I (Ugalde C, 2004).

1.1.3.2.2 Complejo II: Succinato-ubiquinona oxidoreductasa (EC 1.3.5.1)

Este es el complejo más pequeño de la cadena de transporte electrónico. Este complejo cataliza una reacción en el ciclo de Krebs, la conversión de succinato a fumarato y

además en la cadena de transporte electrónico, transfiriendo electrones del succinato a la ubiquinona.

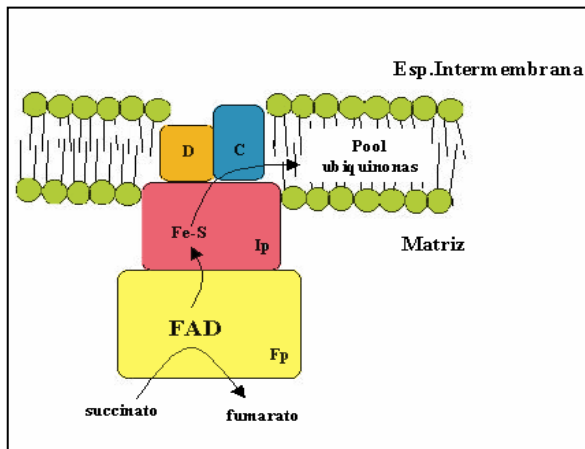


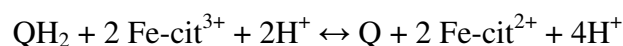
Figura 7. Vista esquemática del complejo II de la cadena respiratoria. El dibujo muestra el enzima SDH formado por las subunidades Fp e Ip, anclado a la membrana mitocondrial interna por las subunidades C y D. (modificado de Rustin P, 2002)

A diferencia de los complejos I y III, este complejo no transloca protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El complejo II está formado por cuatro polipéptidos codificados por el genoma nuclear (Hagerhall C, 1997) y se puede dividir en dos partes, una formada por la succinato deshidrogenasa y otra formada por las proteínas necesarias para anclarlo a la membrana. Además de las cuatro subunidades contiene tres centros hierro-azufre, una molécula FAD y un citocromo b_{558} .

El déficit de complejo II se caracteriza por una disminución en la oxidación de los sustratos FADH₂ dependientes, como el succinato, y por una oxidación de los sustratos NADH dependientes, como son el malato y el aspartato. Las primeras mutaciones de este complejo fueron encontradas en el año 1995 en la subunidad que contiene el grupo FAD (SDHA), y cursan con un desorden neurológico, leucodistrofia y síndrome de Leigh (Bourgeron T, 1995).

1.1.3.2.3 Complejo III: Ubiquinol-Citocromo c reductasa (EC 1.10.2.2)

El complejo III cataliza la transferencia electrónica entre la ubiquinona y el citocromo c. Está compuesto por once unidades y muchos grupos redox, incluyendo un citocromo b_{562} , un citocromo b_{566} , un citocromo c_1 y un centro de hierro-azufre (Berry EA, 2000). Este complejo utiliza la energía liberada en el transporte de electrones, para hacer pasar protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. La reacción que cataliza este complejo es la siguiente:



La subunidad III de este complejo es la que está codificada por el genoma mitocondrial, y contiene el citocromo *b*, de bajo potencial b_{566} , y de alto potencial b_{562} . La subunidad IV contiene el citocromo c_1 y la subunidad V contiene el centro hierro-azufre, llama proteína de Rieske. El mecanismo de acción del complejo III se conoce con el nombre de “ciclo Q”. Existen dos centros distintos de reacción de ubiquinonas en el complejo

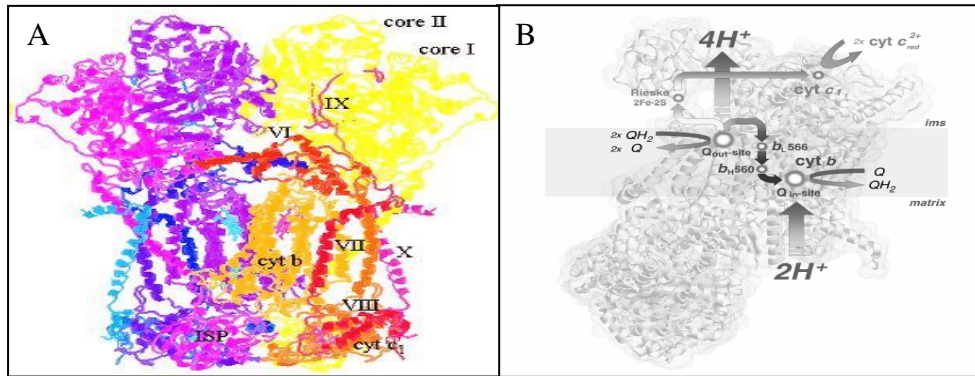


Figura 8. (A) Estructura del complejo bc1 de mitocondria de corazón de pollo. (obtenida de www.life.uiuc.edu/crofts/bc-complex-site/; estructura deducida por Ed Berry); (B) Ciclo Q describiendo los movimientos de los electrones y protones a través del complejo III. Los electrones son transferidos desde el ubiquinol (QH_2), mediante el centro proteico Rieske 2Fe-2S, el citocromo c_1 (*cyt c₁*), el citocromo *c* (*cyt c*) y los grupos hemo b_{566} y b_{562} a la ubiquinona (Q). *ims*, espacio intermembrana (obtenida de Nijtmans L, 2004)

III, uno en el exterior (Q_{ext}) y otro en el interior (Q_{int}). En un primer paso en el centro Q_{ext} el primer electrón es transferido desde el ubiquinol (QH_2) al centro hierro-azufre para formar una ubisemiquinona inestable. El electrón es más adelante transferido desde el citocromo c_1 al citocromo *c*. Después, otro electrón es transferido desde el grupo hemo b_{566} al grupo hemo b_{562} y de aquí a la ubiquinona en el centro Q_{int} , para formar una ubisemiquinona estable, la cual permanece unida en Q_{int} . En un segundo ciclo donde la QH_2 está unida en Q_{ext} , la ubisemiquinona es reducida a QH_2 por un segundo electrón y por la asociación de dos protones provenientes de la matriz mitocondrial. El resultado neto es que un ubiquinol (QH_2) es oxidado a ubiquinona (Q), dos moléculas de citocromo *c* son reducidas, dos protones son recogidos de la matriz y otros dos protones son liberados al espacio intermembrana.

Las primeras mutaciones que se encontraron en la subunidad codificada por el genoma mitocondrial (citocromo *b*), provocaban el síndrome de LHON (Johns DR, 1991). Otras mutaciones encontradas en este gen provocaban miopatía e intolerancia al ejercicio (Andreu AL, 1998) (Andreu AL, 1999). Recientemente se han encontrado mutaciones en los genes que codifican proteínas que participan en el ensamblaje del complejo III,

como es la proteína BCS1L. Esta proteína se ha encontrado mutada en pacientes con tubulopatía, encefalopatía y fallo hepático (De Lonlay P, 2001).

1.1.3.2.4 Complejo IV: Citocromo *c* oxidasa (EC 1.9.3.1)

Este complejo es el último enzima de la cadena respiratoria y cataliza la oxidación del citocromo *c* y la consecuente reducción del oxígeno a agua. En esta reacción cuatro electrones son transferidos al oxígeno para formar agua y cuatro electrones son translocados a través de la membrana mitocondrial interna.

El complejo IV de mamíferos está formado por trece subunidades. Las tres subunidades más largas están codificadas por el ADNmt, mientras que todas las demás están codificadas por el genoma nuclear. Las subunidades codificadas en el ADNmt contienen grupos prostéticos y forman el centro catalítico del enzima. La subunidad I contiene el grupo hemo *a* y el grupo *a*₃, y el átomo de cobre B (Cu_B). La subunidad II contiene otro átomo de cobre (Cu_A) y es el sitio de unión del citocromo *c*. El centro hemo *a*₃-Cu_B binuclear es el sitio donde se reduce el oxígeno (Tsukihara T, 1995). La función de las subunidades codificadas por el genoma nuclear no están muy claras, pero se piensa que pueden participar en el correcto ensamblaje, el funcionamiento del enzima o como moduladores alostéricos que regularían la actividad catalítica del enzima.

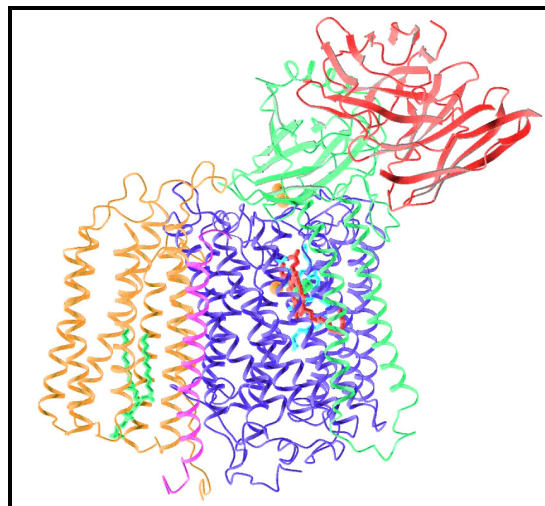


Figura 9. Estructura de la citocromo oxidasa donde se pueden observar las subunidades codificadas por el genoma mitocondrial: I (azul), II (verde) y III (naranja). (Modificada de www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/images/cyt-ox/)

Se han encontrado mutaciones en las subunidades codificadas en el genoma mitocondrial I, II y III, pero en cambio no se han encontrado en las subunidades

codificadas por el genoma nuclear. Como se ha comentado con anterioridad, muchos de los pacientes en los que se ha diagnosticado déficit de actividad del complejo IV, son portadores de mutaciones en genes que codifican proteínas que participan en el ensamblaje del complejo (*SURF1*, *Sco1*, *Sco2*, *COX10* y *COX15*) (Barrientos A, 2002) (Antonicka H, 2003).

1.1.3.2.5 Complejo V: ATPsintasa, F₁F₀-ATPasa (EC 3.6.1.34)

La ATP sintasa es el quinto complejo de la fosforilación oxidativa. Cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, utilizando el gradiente de protones generado a través de la membrana mitocondrial interna, por la cadena de transporte electrónico. El complejo está formado por dos dominios funcionales, F₁ y F₀, los cuales están conectados entre sí por otra subunidad. La estructura de la subunidad hidrofílica F₁ fue resuelta en el año 1994 y está formada por cinco subunidades (α , β , δ , γ , ϵ) (Abrahams JP, 1994). En la subunidad que conecta los dos dominios funcionales y en F₀, se encuentran las dos únicas subunidades codificadas por el genoma mitocondrial (*ATPase 6* y *ATPase 8*).

La subunidad F₀ está inmersa en la membrana mitocondrial interna y funciona como un poro de protones, transfiriendo la energía liberada por el flujo de protones hacia la subunidad catalítica F₁, donde se forma el ATP. Se acepta un mecanismo del tipo motor rotatorio como forma a través de la cual la energía es transferida desde la bomba de protones (subunidad F₀) a la subunidad catalítica (subunidad F₁) (Stock D, 1999).

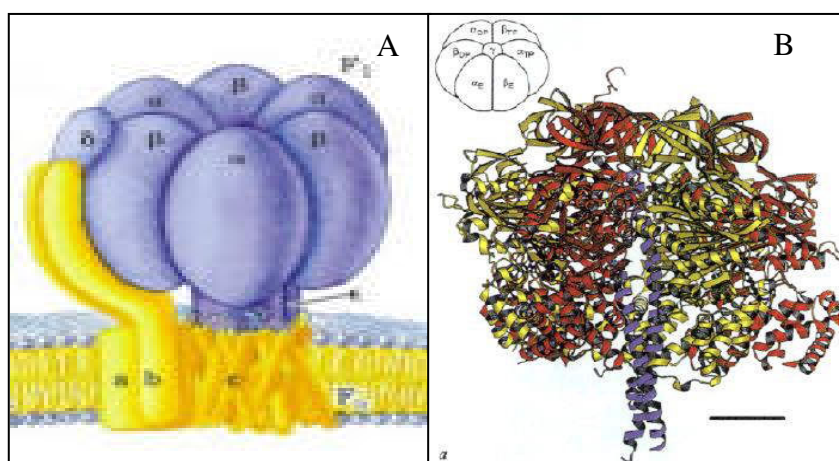


Figura 10. (A) Representación esquemática de la ATP sintasa mitocondrial, donde se distinguen la subunidad F₀, anclada en la bicapa lipídica y la subunidad F₁ inmersa en la matriz mitocondrial (obtenido de www.unfiasi.ro/mg/biochimie/rom/energetica.htm). (B) Estructura cuaternaria de la ATP sintasa. (obtenido de www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/lect10.html)

Se ha visto además que la ATPasa en determinadas condiciones puede funcionar de modo inverso al habitual, es decir, hidrolizando ATP para formar ADP y bombeando protones al espacio intermembrana, para contribuir al mantenimiento del potencial de membrana. Esta actividad hidrolítica está regulada por la unión de la proteína inhibidora IF1 (Cabezón E, 2001).

La primera mutación puntual del genoma mitocondrial en un gen estructural de la ATP sintasa (*ATPase 6*) fue descubierta en el año 1990 (Holt IJ, 1990). Esta mutación estuvo asociada primero a NARP y después al síndrome de Leigh. Hasta el momento no se han encontrado mutaciones en ninguna de las subunidades codificadas por el genoma nuclear.

1.2 Estrés oxidativo y mitocondria

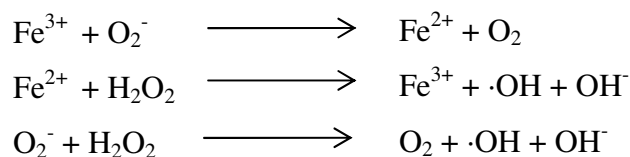
1.2.1 Especies reactivas de oxígeno

Clásicamente se asocia a la mitocondria como la gran productora de energía del organismo en forma de ATP durante el metabolismo aeróbico, pero también es una fuente muy importante de producción de ROS por la cadena de transporte electrónico, jugando un papel muy importante en el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades.

La denominación de ROS es normalmente utilizada para describir una variedad de moléculas y de radicales libres derivados del oxígeno molecular. Químicamente un radical libre se define como cualquier átomo, grupo de átomos o moléculas en un estado particular con un electrón desapareado ocupando un orbital externo. Este electrón desapareado en el último orbital proporciona unas características y una reactividad química muy elevada a estas moléculas. El electrón desapareado tiene una fuerte tendencia a interactuar con otros electrones, para así ganar una configuración electrónica más estable, y formar un enlace químico. Mediante esta acción, la molécula atacada se convierte a su vez en un radical con lo que empieza una reacción en cadena.

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es el producto de la reducción de un electrón del oxígeno, es el precursor de muchas ROS y un mediador en reacciones en cadena de carácter oxidativo. La dismutación del anión superóxido, que puede ser espontánea o por una reacción enzimática catalizada por la superóxido dismutasa, produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez puede ser totalmente reducido a agua o parcialmente reducido al radical hidroxilo (OH^{\cdot}), uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza. El radical hidroxilo es tan reactivo que puede reaccionar con casi todas las moléculas biológicas. Así, cuando se forma el radical hidroxilo *in vivo*, este reaccionará con

cualquier molécula presente en el mismo sitio de su formación ya sean lípidos proteínas o ADN. La formación del radical hidroxilo está catalizada por metales de transición reducidos, mediante la conocida reacción de Haber-Weiss. A continuación se muestra una reacción típica tomando como ejemplo el hierro como metal reducido:



El radical superóxido puede reaccionar con otros radicales incluyendo el óxido nítrico (NO·), en una reacción controlada por la difusión de ambos radicales. El producto formado se denomina peroxinitrito y es un oxidante muy potente (Bechkman JS, 1996). El anión superóxido puede ser producido de forma enzimática por acción de las NADPH oxidasas, localizadas en la membrana celular de las células polimorfonucleadas, macrófagos y células endoteliales (Babior BM, 2000) (Vignais PV, 2002), o por las oxigenasas citocromo P₄₅₀ dependientes (Coon MJ, 1992). La conversión proteolítica de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa proporciona otra fuente enzimática de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Existe también una fuente no enzimática de anión superóxido, que se da cuando un solo electrón es directamente transferido al oxígeno por coenzimas o grupos prostéticos reducidos, o por xenobióticos previamente reducidos por otros enzimas. La cadena de transporte electrónico mitocondrial contiene muchos centros redox que pueden ceder electrones al oxígeno, constituyendo la principal fuente de anión superóxido en muchos tejidos. El potencial estándar de reducción para la conversión del oxígeno molecular a anión superóxido es de -0,160 V (Wood PM, 1987). En el interior de la mitocondria existe un ambiente altamente reductor por lo que varios componentes de la cadena respiratoria, incluyendo las flavoproteínas, los centros hierro-azufre y las ubisemiquinonas, son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno. La velocidad de formación de anión superóxido por la cadena de transporte electrónico puede aumentar cuando el flujo de electrones decrece y así aumenta la concentración de donantes de electrones y cuando la concentración de oxígeno aumenta (Turrens JF, 1982). La formación de anión superóxido también puede aumentar debido a la presencia de algunos inhibidores (por ejemplo rotenona, que inhibe el complejo I, o antimicina que

inhibe el complejo III), que pueden provocar que los transportadores anteriores al sitio de inhibición estén altamente reducidos.

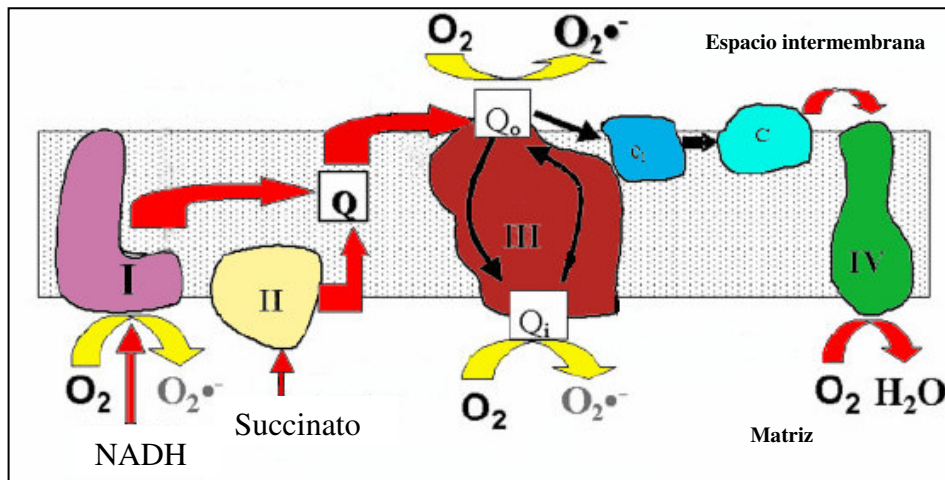


Figura 11. Representación esquemática de los principales lugares de generación de ROS en la cadena de transporte electrónico. El complejo I genera anión superóxido solamente en la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III, lo genera tanto en la matriz como en el espacio intermembrana (Modificado de Chen Q, 2003)

La producción de anión superóxido se puede dar en la membrana mitocondrial externa, en la matriz, y a ambos lados de la membrana mitocondrial interna (tabla 3). El complejo III de la cadena de transporte electrónico parece ser el responsable de la mayoría del anión superóxido producido en las mitocondrias del corazón y pulmones (Turrens JF, 1982) (Turrens JF, 1980), mientras que la formación de anión superóxido en el cerebro en condiciones normales, parece ser producido por el complejo I (Barja G, 1999).

ENZIMA PRODUCTOR	LUGAR DE PRODUCCIÓN	BIBLIOGRAFÍA
Complejo I (NADH DH)	Membrana interna-cara interna	(Turrens JF, 1982)
Complejo II (Succinato DH)	Membrana interna-cara interna	(Zhang Z, 1998)
Complejo III (ubiquinol Cit c reductasa)	Membrana interna-cara interna	(Boveris A, 1976)
Complejo III (ubiquinol Cit c reductasa)	Membrana interna-cara externa	(Han D, 2001)
Glicerol fosfato DH	Membrana interna -cara externa	(Drahota Z,2002)
Dehidroororato DH	Matriz mitocondrial	(Forman HJ, 1976)
Mono aminoxidasa	Membrana externa	(Hauptmann N, 1996)

Tabla 3. Localización mitocondrial de las principales fuentes de anión superóxido en la mitocondria. (DH; deshidrogenasa) (Obtenida de Turrens JF, 2003)

Mientras que el anión superóxido que se ha generado en la matriz es eliminado en este compartimento, parte del anión superóxido producido en el espacio intermembrana puede ser transportado hasta el citoplasma por canales aniónicos dependientes de voltaje (Han D, 2003).

Aunque en condiciones normales existe un balance entre la formación y la destrucción de ROS, por acción de las defensas antioxidantes, se postula que en muchas patologías las defensas antioxidantes pueden resultar insuficientes y se puede producir una situación de estrés oxidativo que podría desembocar en apoptosis y muerte celular (Kroemer G, 1998). Una de las situaciones que suelen desembocar en apoptosis o muerte celular programada sucede porque al incrementar las ROS, aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa mediante la abertura de los poros de transición. Esta abertura se produce por la oxidación del glutatión intracelular y otros grupos sulfhidrilo (Chernyak BV, 1997). Como resultante de este proceso el citocromo *c* pasa del espacio intermembrana al citoplasma donde se une al factor Apaf-1. En presencia de ATP este complejo polimeriza con un oligómero conocido con el nombre de apoptosoma, que activa una cascada de reacciones proteolíticas, donde están involucradas diversas caspasas. Esta cascada a su vez activa diferentes ADNasas, dando como resultado final la muerte de la célula (Li P, 1997).

Como se ha comentado con anterioridad otra especie reactiva de oxígeno muy importante es el peroxinitrito, que se forma por la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico. El óxido nítrico es un vasodilatador que se origina cuando la arginina pasa a citrulina, en una reacción catalizada por las óxido nítrico sintasas. Recientemente se ha descubierto que en la matriz mitocondrial se encuentra una forma de este enzima (Ghaufourifar P, 1997). Aunque no se conoce mucho su función, la formación de óxido nítrico en la mitocondria puede tener importantes consecuencias porque este compuesto se une a los grupos hemo de los citocromos (en particular a la citocromo oxidasa) y puede inhibir la respiración e estimular a su vez la formación de anión superóxido.

1.2.1.1 Producción de ROS en la cadena de transporte electrónico

Como se ha comentado en el apartado anterior las principales fuentes de anión superóxido en la cadena de transporte electrónico son el complejo I y el III. Existen muchos estudios en la literatura encaminados a dilucidar el lugar exacto de la producción del anión superóxido en estos complejos. Todos estos estudios se han realizado con la ayuda de diferentes inhibidores de la cadena, que según el lugar de

inhibición específico en cada complejo, pueden aumentar o no la producción de ROS. En estos estudios ha sido muy útil la resolución de la estructura por rayos X del complejo III (Iwata S, 1998) (Crofts A, 2004), no así en el caso del complejo I, que debido a su gran complejidad y número de subunidades, todavía no se ha podido resolver. En este complejo, en un estudio reciente realizado sobre mitocondrias de cerebro de rata, se ha visto que el lugar más probable de producción del anión superóxido está cercano al FMN (Kudin AP, 2004).

En un estudio sobre el lugar de producción de anión superóxido por el complejo III, se observó que el lugar desde donde se cede el electrón al oxígeno es el sitio de oxidación del ubiquinol llamado Q_0 y que está situado en el lado del espacio intermembrana y alejado de la cara de la matriz (Muller F, 2004). Además este trabajo ha demostrado que el complejo III produce anión superóxido a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, si bien no queda muy claro como el anión superóxido se puede generar en la matriz, si el lugar Q_0 está en la cara del espacio intermembrana. Los autores de este artículo plantean diferentes hipótesis para resolver este problema. La primera de ellas postula que una semiquinona sin carga podría escapar del sitio Q_0 a través de un túnel hidrofóbico que la dejaría en medio de la membrana mitocondrial interna. A partir de aquí la semiquinona podría difundir a ambos lados de la membrana. En la interfase lípido/acuosa la semiquinona perdería su protón y reaccionaría con el oxígeno formando el anión superóxido. La segunda hipótesis postula que el oxígeno reacciona con una semiquinona sin carga en la parte hidrofóbica del sitio Q_0 , para dar lugar a la forma protonada del anión superóxido (HO_2^{\cdot}). Esta especie protonada se puede formar en ambientes no acuosos, mientras que la no protonada no se puede formar (Nohl H, 1990), y además la especie protonada puede atravesar fácilmente las membranas mientras que la no protonada no puede atravesarlas (Takahashi MA, 1983). Desde el sitio Q_0 , el HO_2^{\cdot} podría difundir a través del túnel hidrofóbico al medio de la membrana mitocondrial interna, y a partir de aquí difundir a ambas caras de ella.

1.2.2 Defensas Antioxidantes celulares

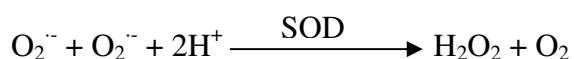
Los sistemas de defensa antioxidante son esenciales para detoxificar las ROS en las células aeróbicas. Halliwell en el año 1995 definió a los antioxidantes como sustancias que ya sea directa o indirectamente, protegen a las células contra los efectos adversos de xenobióticos, drogas, carcinógenos y reacciones tóxicas radicalarias (Halliwell B, 1995). Las sustancias antioxidantes pueden directamente destruir el anión superóxido u

otros radicales libres, o pueden estimular los mecanismos de detoxificación dentro las células, previniendo así el desarrollo de numerosos procesos patológicos.

Las principales defensas antioxidantes son los llamados enzimas antioxidantes, entre los que se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. A continuación se comentará brevemente cada uno de ellos.

1.2.2.1 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión del radical libre superóxido a peróxido de hidrógeno, que a su vez puede ser eliminado por la catalasa o la glutatión peroxidasa. La reacción que cataliza este enzima es la siguiente:



Otra función de la superóxido dismutasa es proteger a las deshidratasas (fumarasa, 6-fosfogluconato deshidratasa, etc.) contra la inactivación por el radical superóxido (Benov L, 1998).

En humanos se han encontrado tres formas del enzima: la citosólica (Cu,Zn-SOD), la mitocondrial (Mn-SOD) y la extracelular (EC-SOD), que se describen a continuación.

a) Cu,Zn-Superóxido dismutasa (SOD-1)

Este enzima está formado por dos subunidades idénticas de unos 32 kDa y cada una contiene en su centro activo un átomo de zinc y uno de cobre. Estos dos átomos se encuentran anclados al residuo histidina número 61 (Banci L, 1998). La SOD-1 se suele encontrar en el citoplasma de las células, aunque estudios recientes también la han encontrado en el espacio intermembrana de las mitocondrias (Takeuchi H, 2002).

Este enzima se puede inactivar por acción del peróxido de hidrógeno, al oxidar el residuo de histidina donde están anclados los dos átomos metálicos (Liochev SI, 1998).

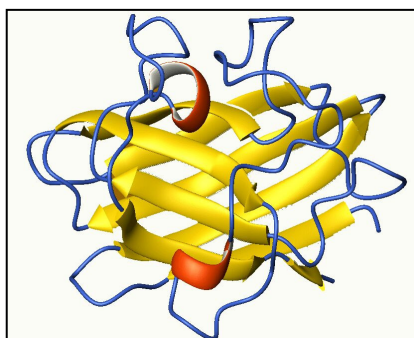


Figura 12. Estructura de un monómero de la SOD cobre-zinc humana. El enzima estaría formado por dos monómeros como el de la imagen (modificado de Battistoni A, 1996)

El gen que codifica para la SOD-1 está localizado en el genoma nuclear en el cromosoma 21. Durante un tiempo se pensó que podía estar relacionado con el síndrome de Down, pero posteriormente se vio que ninguno de los síntomas más importantes de la enfermedad se debía a la sobreexpresión de este enzima.

En estudios realizados sobre ratones knock-out para este gen se ha observado que son aparentemente normales y solo se aprecian diferencias después de lesiones traumáticas (Reaume A, 1996)

b) Mn-Superóxido dismutasa (SOD-2)

Este enzima es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de manganeso por subunidad. El átomo de manganeso cambia su valencia durante la dismutación del anión superóxido de forma cíclica (de Mn^{3+} a Mn^{2+} y otra vez a Mn^{3+}).

La SOD-2 está codificada en el genoma nuclear, la proteína se sintetiza en el citoplasma, y gracias a un péptido señal es redirigida a la matriz mitocondrial (Weisiger RA, 1973).

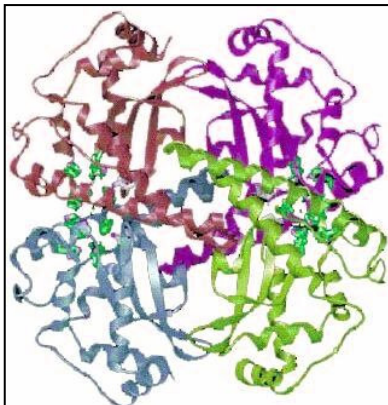


Figura 13. Estructura cuaternaria de la SOD manganeso humana. Cada subunidad que forma el tetrámero se muestra de un color diferente, y el centro activo está coloreado de color verde oscuro (modificado de Leveque VJ, 2000)

La expresión de SOD-2 se da en la mayoría de tejidos y tipos celulares, además a niveles elevados. En un estudio del año 1995 utilizando un ratón knock-out para este enzima, se observó que los animales no sobrevivían más allá de las tres semanas de edad (Li Y, 1995). Por lo tanto parece claro que la actividad de este enzima es necesaria para la vida.

c) EC-Superóxido dismutasa (SOD-3)

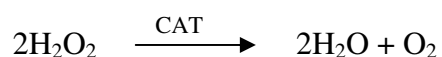
La SOD extracelular es un glicoproteína enzimática secretada, de estructura tetramérica, que contiene al igual que la SOD-1 un átomo de cobre y otro de zinc. Su peso molecular

es de unos 135 kDa. Se encuentra en los espacios intersticiales de tejidos y también en fluidos extracelulares. Es la principal fuente de actividad SOD en plasma, linfa y fluido sinovial (Adachi T, 1998).

Este enzima controla la disponibilidad del anión superóxido extracelular, hecho muy importante para la regulación de muchas vías metabólicas, incluyendo la vía de inactivación del ácido nítrico (Levin ED, 1998).

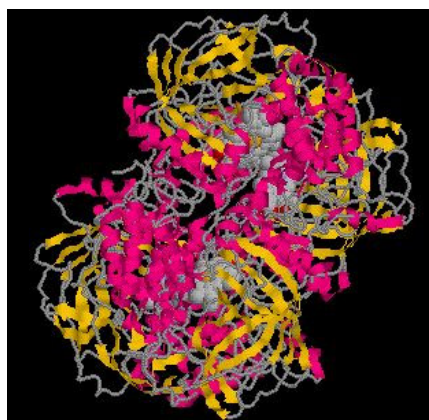
1.2.2.2 Catalasa (EC 1.11.1.6)

La catalasa es una enzima tetramérica formada por cuatro subunidades idénticas de 60 kDa. Esta enzima reacciona con el peróxido de oxígeno para formar agua y oxígeno molecular, según la siguiente reacción:



La catalasa es un enzima peroxisomal presente en casi todos los organismos aeróbicos, y tiene la función de proteger a la célula ante los efectos tóxicos de los peróxidos de hidrógeno. Siendo uno de los enzimas más eficientes que se conocen. Esta enzima se une al cofactor NADPH, y aunque no está muy claro cual puede ser su función, parece ser que este cofactor protegería al enzima de la oxidación mediada por su propio sustrato (Kirkman HN, 1999).

Figura 14. Estructura cuaternaria de la catalasa, donde se aprecian los cuatro monómeros que forman el enzima (obtenido de Ko TP, 2000).

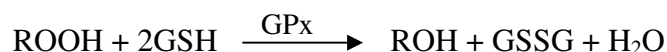


La catalasa podría tener un papel importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Hunt C, 1998). En un estudio muy reciente sobre un ratón knock-out para este enzima, se ha visto que fenotípicamente era igual que el ratón salvaje y que sólo presentaba alguna diferencia en determinados tejidos y determinados modelos de estrés oxidativo a los que se sometían los tejidos,

destacando que la actividad catalasa puede tener mayor importancia en un tejido que en otro (Ho YS, 2004)

1.2.2.3 Glutación Peroxidasa (EC 1.11.1.19)

Este enzima cataliza la reducción de una amplia variedad de hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) utilizando glutatión reducido. La reacción catalizada es la siguiente:



El gasto de glutatión reducido producido por la actividad de la glutatión peroxidasa es regenerado por acción de otro enzima, la glutatión reductasa que a su vez necesita del cofactor NADPH. La vía principal de producción de NADPH es la vía de las pentosas, por lo que también es necesaria su activación.

En mamíferos existen por los menos hasta cinco isoenzimas de la glutatión peroxidasa (GPx), y aunque su expresión es ubicua, los niveles de cada isoforma pueden variar de un tejido a otro. La forma citosólica o mitocondrial (GPX1) se localiza en la mayoría de tejidos aunque predomina en eritrocitos, riñón e hígado. La GPX4 se localiza en el citosol, está asociada a la membrana de muchos tejidos y puede reducir directamente hidroperóxidos de fosfolípidos, de ácidos grasos y de colesterol, que se pueden producir en membranas y lipoproteínas (Imai H, 1998). La forma GPX2 es citosólica y se expresa abundantemente en el tracto gastrointestinal y la forma GPX3 es la plasmática. La forma GPX5 se expresa específicamente en epidídimo y es seleno-independiente (De Haan J, 1998).

La forma GPX1 es un tetrámero de 80 kDa que contiene un residuo de selenocisteína en cada subunidad, que es esencial para su actividad (Ding L, 1998). Se ha visto que el ciclo redox del glutatión es una de las formas más importantes de protección contra niveles bajos de estrés oxidativo, mientras que la catalasa sería más importante a niveles elevados (Yan H, 1997). Se han construido ratones transgénicos que no expresan las isoenzimas GPX1 (De Haan JB, 1998), GPX2 (Esworthy RS, 2000), y GPX4 (Yant LJ 2003). Los ratones que no expresan GPX1 o GPX2 no presentan ninguna diferencia con los ratones salvajes en condiciones normales, simplemente parecen ser más susceptibles al estrés oxidativo. En cambio la falta de la isoenzima GPX4 es mucho más severa ya que los embriones de estos ratones no son viables. Recientemente se ha publicado un trabajo donde han sobreexpresado en ratón la isoforma humana de GPX4, observándose

que las células del ratón son mucho más resistentes al estrés oxidativo y a la apoptosis (Ran Q, 2004)

1.2.3 Daño oxidativo a estructuras celulares y marcadores de oxidación

El estrés oxidativo en los sistemas biológicos se da cuando la producción de ROS o de óxido nítrico supera la actividad de las defensas antioxidantes. Estas especies son capaces de modificar químicamente todas las biomoléculas de la célula (por ejemplo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), cambiando su estructura y también su función. En los apartados siguientes se verán las alteraciones más comunes de estas biomoléculas así como los marcadores que se utilizan en cada caso para su detección.

1.2.3.1 Daño oxidativo a lípidos

Los fosfolípidos de la membrana son muy vulnerables al ataque de ROS debido a la susceptibilidad de sus cadenas poliinsaturadas. Esto puede provocar cambios en la fluidez y permeabilidad de la membrana, perjudicando su habilidad para mantener gradientes iónicos a través de ella (Slater TF, 1984). La peroxidación lipídica se puede dividir en tres fases: inicio, propagación y terminación. Se puede iniciar por acción de un radical libre que tiene suficiente reactividad, para extraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) (Figura 15). El proceso va seguido por un reordenamiento de enlaces que resulta en la estabilización de la molécula por la formación de un dieno conjugado.

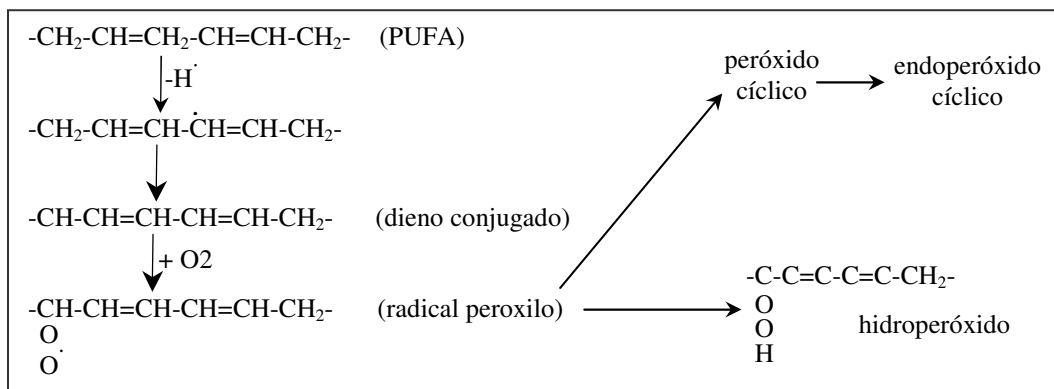


Figura 15. Esquema de las reacciones que tienen lugar durante la peroxidación lipídica. Se inician con la sustracción de un átomo de hidrógeno por acción de un radical libre, posteriormente existe una reordenación de los dobles enlaces, dando lugar a un radical lipídico que puede reaccionar con el oxígeno y formar el radical peróxido. Este radical puede nuevamente atacar a otros lípidos e iniciar una reacción en cadena o a proteínas de la membrana.

Entonces el radical lipídico reacciona con un oxígeno para formar el radical peróxido, que puede atacar proteínas de membrana o puede abstraer otro hidrógeno de una cadena

de ácido graso adyacente y así iniciar un proceso en cadena que puede oxidar a cientos de lípidos de membrana. Este proceso seguirá hasta que el radical peroxilo ataque una proteína o exista una molécula antioxidante en la membrana.

Una de los productos de la peroxidación lipídica más estudiado, ya que es el principal marcador de daño a lípidos, es el malondialdehido (MDA). El MDA es una molécula altamente reactiva de tres carbonos con un grupo aldehido producida por los hidroperóxidos lipídicos. También se puede producir por la hidrólisis de las pentosas, deoxirribosas, hexosas, a partir de algunos aminoácidos y del ADN (Pryor WA, 1976).

Los primeros ensayos que se realizaron para cuantificar esta molécula, utilizaron su capacidad de reaccionar con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) para dar un compuesto coloreado, fácilmente cuantificable por absorbancia a 535nm (Yagui K, 1976). (Figura 16)

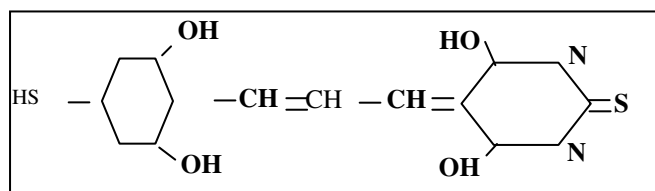


Figura 16. Aducto formado por dos moléculas de ácido tiobarbitúrico y una de malondialdehido

Un problema que presentaba esta técnica es que existen otros compuestos a parte del MDA que también reaccionan con el TBA y que absorben a 535nm, sobrevalorando los resultados. Para evitar este problema se han desarrollado aproximaciones que separan específicamente el aducto formado por el MDA y el TBA mediante técnicas cromatográficas (Bird RP, 1983). Un segundo problema asociado con este método es que el MDA también se puede formar artificialmente debido a las condiciones de acidez y alta temperatura, necesarias para obtener el aducto MDA-TBA (Fraga CG, 1988), por la auto-oxidación de los PUFA o por la descomposición de los lípidos oxidados en la muestra. Para evitarlo se ha propuesto añadir diferentes antioxidantes a la mezcla de reacción. Los dos compuestos más utilizados son el EDTA, utilizado como quelante de metales para evitar la reacción del peróxido de hidrógeno con ellos para formar el ión hidroxilo y el hidroxitolueno butilado (BHT), como antioxidante.

1.2.3.2 Daño oxidativo a proteínas

Las ROS pueden llegar a oxidar las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de las proteínas y formar uniones proteína-proteína o fragmentar el esqueleto de la proteína

(Thérond P, 2000). El principal marcador de oxidación en las proteínas es la formación de grupos carbonilo (CO), que son aldehidos y cetonas. Entre todos los residuos de aminoácidos de las proteínas susceptibles de oxidarse, los residuos prolina, arginina, lisina y treonina, son los que con más frecuencia dar lugar a la formación de grupos carbonilo (Figura 17).

A parte de reacciones directas de estos residuos con ROS, los grupos carbonilo pueden ser introducidos en una proteína por reacciones con aldehidos producidos durante la peroxidación lipídica, o con derivados carbonilo reactivos generados durante la reacción de reducción de azúcares o de sus productos de oxidación con los residuos de lisina, con la eventual formación de productos avanzados de glicosilación (Davies MJ, 1999). Por esto se ha de tener en cuenta que la presencia de grupos carbonilo en una proteína no es necesariamente indicativa de la oxidación de los residuos aminoácidos de las proteínas.

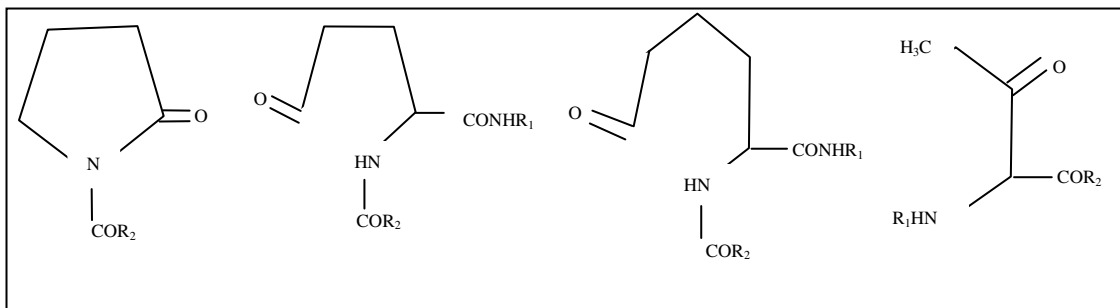


Figura 17. Estructura oxidada de los principales aminoácidos susceptibles de padecer oxidación.

La acumulación de grupos carbonilo se ha observado en muchas patologías humanas como puede ser el Alzheimer, diabetes o artritis (Chevion M, 2000).

La mayoría de métodos que se utilizan para detectar la existencia de grupos carbonilo en las proteínas, requieren la derivatización del grupo carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina, con lo que se forma el producto estable 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP) (Levine RL, 1990). El producto DNP puede ser detectado de diversas maneras, una de ellas es utilizar su propiedad de absorber luz ultravioleta y así medir el conjunto total de grupos carbonilo de una mezcla de proteínas por espectrofotometría (Levine RL, 1990), también se puede fraccionar esta mezcla mediante cromatografía líquida de alta presión y así analizar proteínas con una gran sensibilidad y especificidad (Levine RL, 1994), o utilizar un anticuerpo específico que detecta el producto DNP.

Uno de los métodos más utilizados es el de western-blot, en el cual las proteínas son separadas según su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en la presencia del detergente SDS. Posteriormente las proteínas del gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF y utilizando el anticuerpo anti-DNP podemos visualizar específicamente las proteínas donde se ha formado este producto. La detección de grupos carbonilos como marcador de oxidación puede tener algunas ventajas sobre la detección de peroxidación lipídica, ya que los grupos carbonilos son mucho más estables una vez formados que los derivados lipídicos oxidados. Se sabe que las células degradan las proteínas oxidadas en horas o días (Grune T, 1996), mientras que los derivados lipídicos oxidados son detoxificados en minutos (Siems WG, 1997).

1.2.3.3 Daño oxidativo al ADN

Como se ha comentado con anterioridad el ADNmt se encuentra en la matriz mitocondrial, muy cercano a la membrana mitocondrial interna. Debido a su proximidad a la cadena de transporte electrónico, origen de las ROS en la célula, es muy susceptible de padecer lesiones oxidativas (Miquel J, 1991). El daño oxidativo observado en el ADNmt puede ser en forma de modificaciones en las bases, creación de sitios ácidos y rotura de una o de las dos hebras del ADN (Wiseman H, 1996). Uno de los primeros marcadores utilizados para saber si el ADN estaba oxidado, fue la medición de los niveles de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG), que se forma cuando la deoxiguanosina (dG) es atacada por el radical hidroxilo (Richter C, 1988).

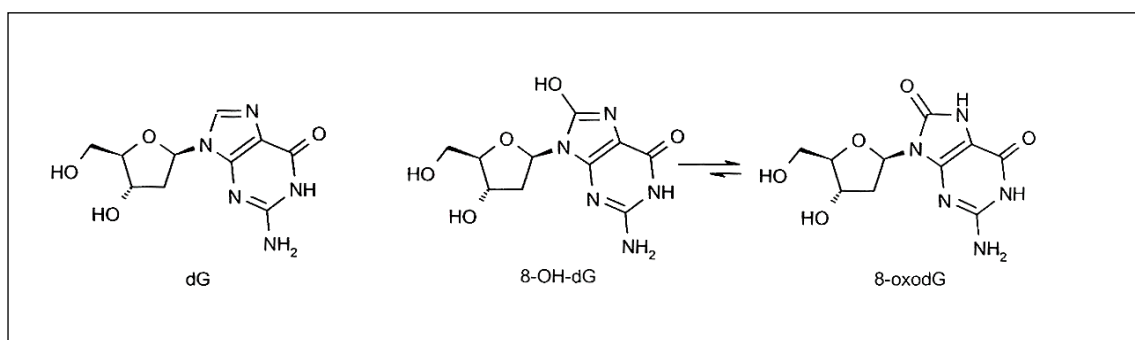


Figura 18. Estructura molecular de la deoxiguanosina y de la 8-hidroxideoxiguanosina, que se forma una vez la deoxiguanosina es atacada por el radical hidroxilo. La 8-hidroxideoxiguanosina está en equilibrio con otra estructura llamada 8-oxodeoxiguanosina.

El daño oxidativo se puede dar tanto al ADN nuclear como al mitocondrial, pero diversos estudios en los que se han detectado los niveles de 8-OH-dG, han demostrado

que el ADN mitocondrial siempre es más susceptible de ser dañado que el nuclear (Richter C, 1988) (Ames BN, 1993). Existen diversas teorías que intentan explicar este hecho, como por ejemplo la ausencia de una organización compleja del tipo cromatina en el ADNmt, que pudiera servir de protección en el ADN nuclear, o alteraciones en el sistema de reparación del ADNmt (que como se ha comentado antes es bastante simple), la presencia de átomos metálicos que puedan actuar como catalizadores en la generación de ROS, y por último la posible oxidación por reacciones con lípidos ya oxidados, debido a su proximidad. Hasta hace poco tiempo se pensaba que el hecho de que el ADNmt no estuviera asociado a proteínas del tipo histonas, le confería una especial vulnerabilidad frente al daño oxidativo, y se solía argumentar que esta era la principal causa. En el año 2003 se publicó un trabajo donde se demostraba que el ADNmt parece estar completamente rodeado de una proteína, el factor de transcripción A (TFAM), que actuaría como una histona protegiéndolo y plegándolo de una manera determinada (Alam TI, 2003) (Kanki T, 2004).

La detección de daño oxidativo mediante la medición de los niveles de 8-OH-dG ha sido ampliamente utilizada y no siempre obteniendo resultados comparables. Esto se debe a que esta técnica presenta una gran variabilidad debido que el ADN se puede oxidar durante su extracción, sobrevalorando los resultados (Helbock HJ, 1998). Este factor ha promovido recientemente el desarrollo de otros métodos para medir la oxidación del ADN. Uno de los métodos se basa en la técnica de la PCR cuantitativa (QPCR) (Santos JH, 2002). Este método no necesita de la extracción de mitocondrias y requiere muy poca cantidad de ADN. El ensayo de QPCR se basa en que un nucleótido dañado bloqueará la progresión de la ADN polimerasa, resultando en una disminución de la amplificación de la secuencia diana. De esta manera sólo las moléculas de ADN no dañadas participarán en la reacción de PCR, por lo que la amplificación será inversamente proporcional a la cantidad de daño (Santos JH, 2002).

Otro punto a favor de la utilización de esta técnica es que la modificación 8-OH-dG, representa solamente un 10% del total del daño recibido por el ADNmt, por lo que su determinación no incluye otras muchas modificaciones (Jaruga P, 1996).

1.3 Enfermedades mitocondriales

El concepto de enfermedad mitocondrial fue introducido en el año 1962, cuando Luft y colaboradores (Luft R, 1962) describieron a una mujer joven suiza, con un cuadro de hipercatabolismo severo no causado por disfunción tiroidea. En la década siguiente los

estudios se centraron en los desórdenes musculares y fundamentalmente los estudios que se realizaron fueron de morfología muscular. El reconocimiento de diferentes estructuras o conformaciones mitocondriales se consiguió gracias al estudio sistemático de las biopsias musculares de distintas enfermedades por parte de Shy y colaboradores (Shy GM, 1964). La introducción de la tinción de tricromo de Gomori modificada, que revela la presencia de acumulaciones de mitocondrias subsarcolémicas en forma de gránulos púrpura (Engel WK, 1963), aumentó el conocimiento de este grupo de enfermedades. La principal característica patogénica de las miopatías humanas mitocondriales fueron estas agrupaciones de mitocondrias, también llamadas “fibras rojo-rasgadas” (del inglés *ragged-red fibers*, *RRF*).

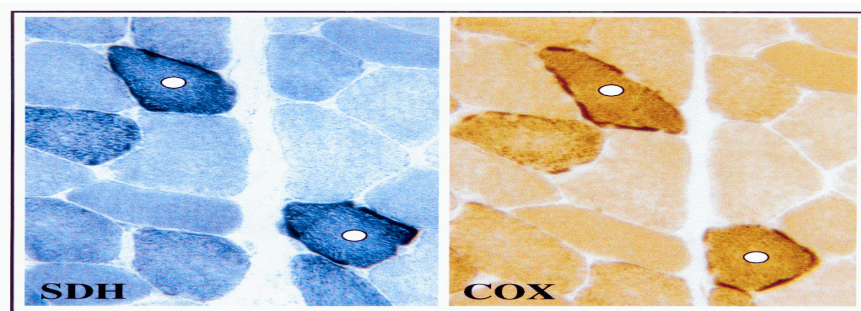


Figura 19. En el panel de la izquierda se muestra una tinción para la actividad succinato deshidrogenasa, revelando la acumulación de mitocondrias en la periferia de las células. En el panel de la derecha se muestra una tinción de las mismas células para la actividad citocromo oxidasa, revelando las células que eran positivas para esa enfermedad. (Obtenida de Andreu AL, 1999).

Hasta la década de los setenta no se realizaron estudios bioquímicos sistemáticos sobre mitocondrias, debido a la dificultad de aislar mitocondrias funcionales intactas de biopsias musculares humanas. En esta década se observó que los defectos bioquímicos de estas enfermedades no estaban restringidos a músculo esquelético, sino que había multitud de tejidos implicados. Dos de los tejidos principalmente implicados y además de forma más severa, eran el cerebro y el músculo, por lo que en el año 1977 se introdujo el término de encefalomiopatía mitocondrial (Shapira Y, 1977).

En los años ochenta hubo un gran avance en el campo de las encefalomiopatías mitocondriales. Con la ayuda de datos bioquímicos descubiertos en esta década se formuló la primera clasificación bioquímica de este tipo de enfermedades (DiMauro S, 1987). Más importante aún fue el adelanto que se produjo sobre las causas moleculares de estas enfermedades. Así en el año 1988 se publicaron dos artículos que describieron

por primera vez alteraciones en el ADNmt que eran la causa de miopatías mitocondriales. El primer artículo describía una mutación puntual en pacientes con enfermedad de Leber (LHON, del inglés *Leber hereditary optic neuropathy*) (Wallace DC, 1988), y el segundo artículo describía grandes deleciones sobre el ADNmt (Holt IJ, 1988). Desde este momento se han descrito más de 100 alteraciones patogénicas en el ADNmt (mutaciones puntuales, deleciones, depleciones y duplicaciones). Una lista actualizada de las mutaciones se puede encontrar en la página web del MITOMAP: <http://www.mitomap.org>.

Las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy variadas, y entre las más comunes encontramos: demencia, ptosis, trastornos motores, intolerancia al ejercicio, accidentes cerebrovasculares, cardiomiopatía, convulsiones, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, oftalmoplegia, ceguera, sordera, disfunciones pancreáticas y hepáticas, hepatitis, etc. En general, son trastornos multisistémicos que afectan a los tejidos y órganos que más dependen de la energía mitocondrial, como son el sistema nervioso central, músculo esquelético y cardíaco, riñones y sistema endocrino.

Entre los indicadores del laboratorio que se han relacionado con estas patologías encontramos aumento de las proteínas en el líquido cefalorraquídeo, aumento de la creatina quinasa, acidosis láctica y mioglobulinuria. A nivel morfológico como se ha comentado previamente lo más destacable son las fibras rojo-rasgadas, que consisten en acúmulos subsarcolémicos de mitocondrias anormales en la periferia de la fibra muscular. También se pueden detectar por tinción histoquímica si las fibras musculares reaccionan a la tinción de la citocromo *c* oxidasa.

1.3.1 Clasificación de las enfermedades mitocondriales

La clasificación más habitual que se suele hacer de las enfermedades mitocondriales es según un punto de vista genético. De esta manera se pueden clasificar las encefalomiopatías mitocondriales en dos grandes categorías, las enfermedades debidas a alteraciones del ADNmt y las enfermedades debidas a alteraciones del ADN nuclear.

1.3.1.1 Enfermedades debidas a alteraciones primarias del ADNmt

Podemos encontrar dos grandes grupos de enfermedades: las debidas a mutaciones puntuales y las debidas a reordenamientos del ADNmt. A continuación se describirán las principales características de algunas de las enfermedades que están dentro de estos dos grandes grupos.

A) Enfermedades debidas a mutaciones puntuales en el ADNmt.

- Síndrome de MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas): Se caracteriza por epilepsia mioclónica, miopatía mitocondrial y ataxia cerebelar. Otros síntomas menos comunes incluyen demencia, sordera, neuropatía periférica y múltiples lipomas (DiMauro S, 1997). La mutación más frecuente de este síndrome es la A8344G en el gen del tRNA^{Lys}, aunque otras mutaciones puntuales en el mismo gen se han asociado a este síndrome (Shoffner JM, 1990). La mutación A8344G siempre se presenta de forma heteroplásmica. Estudios con cíbridos transmitocondriales han demostrado que la mutación causa una aminoacilación defectiva del tRNA lisina y una terminación prematura de la síntesis proteica (Enriquez JA, 1995).
- Síndrome de MELAS (Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares): Se presenta normalmente en niños o adolescentes que han tenido un desarrollo previo normal. La típica presentación incluye vómitos recurrentes, dolores de cabeza similares a la migraña y episodios de infartos cerebrales que causan ceguera cortical o hemiparesis. La mutación más común en el ADNmt es la A3243G en el tRNA^{Leu(UUR)} (Goto Y, 1990), pero se han descrito una decena más de mutaciones asociadas a este síndrome. Estudios en cultivo de cíbridos transmitocondriales con la mutación A3243G han demostrado disminución de los niveles de síntesis proteica mitocondrial así como actividades reducidas de los complejos I y IV de la cadena respiratoria (Chomyn A, 1992) (King MP, 1992). Al igual que la mutación A8344G en el síndrome de MERRF, el cambio A3243G también provoca una disminución de la aminoacilación del tRNA^{Leu(UUR)} (Chomyn A, 2000).
- Síndrome de NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa), Síndrome de MILS (síndrome de Leigh de herencia materna): El síndrome de NARP principalmente afecta a personas jóvenes causando retinitis pigmentosa, demencia, ataques, debilidad proximal y neuropatía sensorial. Fue descrito en el año 1990 por Holt y colaboradores (Holt I, 1990), que lo asociaron a una mutación puntual en el gen *ATPase 6*, T8993G. El síndrome de MILS se presenta como una encefalomiopatía infantil muy severa con lesiones simétricas características en los ganglios basales y el tronco cerebral. El

origen de este síndrome es la misma mutación que provoca el síndrome de NARP, pero con un porcentaje de mutación siempre superior al 90% (Tatuch Y, 1992).

- Síndrome de LHON o de Leber (neuropatía óptica hereditaria de Leber): Se caracteriza por una pérdida de visión aguda o subaguda en personas jóvenes, más frecuentemente en varones, debido a una atrofia óptica bilateral. A este síndrome se han asociado muchas mutaciones puntuales del ADNmt en genes estructurales (principalmente genes que codifican subunidades del complejo I). De todas estas mutaciones, sólo tres parecen ser patogénicas, incluso cuando se presentan de forma aislada (son las llamadas mutaciones primarias). Estas son: G11778A en el gen *ND4*, G3460A en el gen *ND1* y T14484C en el gen *ND6* (Carelli V, 2002)

Cabe remarcar que las mutaciones puntuales en el ADNmt en genes que codifican proteínas, a menudo no siguen las reglas de la genética mitocondrial, por el hecho que sólo afectan a determinados individuos y tejidos aislados, normalmente el músculo esquelético. Así, pacientes con intolerancia al ejercicio, mialgia y algunas veces mioglobinuria recurrente, pueden tener defectos aislados del complejo I, complejo III o complejo IV, debido a mutaciones patogénicas en los genes que codifican sus subunidades. La falta de herencia materna y el hecho de que solo el músculo esquelético está implicado, sugiere que estas mutaciones se han originado *de novo* en las células embrionarias miogénicas, después de la diferenciación de la línea germinal y que se han acumulado durante la replicación en el tejido afectado. Son las llamadas mutaciones somáticas (Andreu AL, 1999).

B) Enfermedades debidas a reordenamientos del ADNmt.

En este apartado se incluyen deleciones simples, deleciones múltiples, inserciones y duplicaciones. Las deleciones y las inserciones suelen ser espontáneas, aunque también se han publicado casos de herencia materna. Se presentan de forma heteroplásmica y pueden aumentar la gravedad de la enfermedad con la edad. Algunos de los síndromes clínicos causados por alguno de estos reordenamientos están descritos a continuación:

- Síndrome de Pearson: es una enfermedad fatal habitualmente caracterizada por anemia sideroblástica y una disfunción exocrina del páncreas. Los pacientes afectados por esta enfermedad acostumbran a desarrollar problemas hepáticos, atrofia de las

vellosidades intestinales, diabetes mellitus y disfunción tubular renal (Leonard JV, 2000). Los pacientes presentan grandes deleciones únicas que en general son esporádicas, aunque se ha descrito algún caso de herencia materna.

- Síndrome de CPEO (Oftalmoplegia crónica externa progresiva): Se caracteriza por oftalmoplegia y ptosi bilateral de los párpados. Se puede presentar con o sin debilidad de la musculatura proximal y es a menudo compatible con una esperanza de vida normal. Se debe a la presencia de deleciones simples en el ADNmt de músculo, pero también se han encontrado formas de este síndrome asociadas a mutaciones puntuales de herencia materna. Las deleciones pueden variar en tamaño y localización dentro de la secuencia del ADNmt.
- Síndrome de Kearns-Sayre: La edad de aparición de esta enfermedad es normalmente antes de los veinte años de edad. La presentación típica consiste en dificultad de los movimientos de los ojos, retinopatía pigmentaria, y bloqueo de la conducción cardiaca. A menudo estos síntomas clínicos están acompañados por otros como demencia, ataxia y disfunción endocrina (diabetes mellitus, hiperparatiroidismo y corta estatura). El síndrome también se presenta con alteraciones en la analítica del laboratorio como acidosis láctica y niveles incrementados de proteínas en el líquido cefalorraquídeo. La biopsia muscular normalmente presenta RRF.

1.3.1.2 Enfermedades debidas a alteraciones del ADN nuclear

Mutaciones en genes codificados en el genoma nuclear que codifican proteínas mitocondriales también pueden causar enfermedades, y además siguen una herencia típicamente mendeliana. Normalmente se trata de mutaciones autosómicas recesivas. Los defectos en el genoma nuclear pueden involucrar genes que codifican proteínas específicas de un tejido o genes que codifican proteínas comunes en todos los tejidos. Las enfermedades debidas a alteraciones del ADN nuclear se pueden dividir en tres grandes grupos:

- en el primero de ellos y más importante, estarían incluidas todas las mutaciones en genes que codifican proteínas estructurales de la cadena respiratoria. Como se ha comentado previamente el ADNmt solamente codifica 13 subunidades de la cadena respiratoria, mientras que el ADN nuclear codifica para todas las subunidades del complejo II, la mayoría de las subunidades de los otros cuatro complejos, así como para

la coenzima Q10 y el citocromo *c*. Existe un número importante de mutaciones en genes que codifican subunidades de la cadena respiratoria, incluyendo subunidades del complejo I (Triepels RH, 2001) y del complejo II (Bourgeron T, 1995). Estos defectos moleculares han sido principalmente asociados con formas autosómicas recesivas del síndrome de Leigh (Shoubridge EA, 2001).

- Otro grupo estaría formado por las mutaciones en genes que codifican proteínas necesarias para el funcionamiento de la fosforilación oxidativa. Estas proteínas son necesarias para el correcto ensamblaje de los diferentes complejos de la cadena respiratoria. Las mutaciones en las proteínas de ensamblaje para la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) son las primeras que se han identificado (Zeviani M, 2001). Mutaciones en *SURF1*, *SCO2*, *COX10*, *COX15* y *SCO11* se han asociado con síndrome de Leigh y deficiencia de citocromo oxidasa (en adelante COX) u otros desórdenes fatales infantiles multisistémicos, en los cuales la encefalopatía está acompañada de cardiomiopatía (*SCO2*, *COX15*), neuropatía (*COX10*), o hepatopatía (*SCO1*) (Antonicka H, 2003).

- El tercer gran grupo de enfermedades con origen en el ADN nuclear, estaría formada por mutaciones en aquellos genes que codifican proteínas que intervienen en lo que se ha llamado “señalización intergenómica”. Como se ha mencionado antes, el ADNmt es altamente dependiente para su correcto funcionamiento y replicación de numerosos factores codificados por genes nucleares (Hirano M, 2001). Mutaciones en estos genes son la causa de enfermedades mitocondriales caracterizadas por alteraciones cuantitativas o cualitativas del ADNmt. Algunos de estos desórdenes han sido recientemente caracterizados molecularmente, como es el caso de síndrome multisistémico autosómico recesivo MNGIE (del inglés *mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy*), producido por mutaciones en el gen de la timidina fosforilasa (Nishino I, 1999). Mutaciones en el gen de una isoforma del transportador de nucleótidos de adenina (*ANT1*), han sido identificadas en algunos pacientes con CPEO autosómica dominante (Kaukonen J, 2000).

En los últimos años se han descrito además mutaciones en genes de proteínas que intervienen en el mantenimiento del *pool* de nucleótidos dentro de la mitocondria. Dos de estos genes son la timidina quinasa 2 (*TK2*), identificada en pacientes con depleción de ADNmt y miopatía aislada (Saada A, 2001), y el gen de la deoxiguanosina quinasa (*dGK*), identificada en pacientes que presentan una forma sistémica de depleción del ADNmt, a menudo acompañada de miopatía y daño hepático (Mandel H, 2001). Todas

estas mutaciones parecen inhibir el control del *pool* mitocondrial de dinucleótidos, cuya homeóstasis es probablemente esencial para el control de la replicación del ADNmt, y acaban provocando una disminución del número de moléculas de ADNmt por célula.

1.3.2 Modelos de estudio de enfermedades mitocondriales

Tanto las mutaciones puntuales como las deleciones en el ADNmt, como se ha comentado con anterioridad, suelen tener como resultado final una deficiencia de la capacidad de fosforilación oxidativa, afectando principalmente a los tejidos que tienen una demanda de energía más elevada.

Existen diferentes modelos de estudio de este tipo de enfermedades. Los más directos y los primeros en ser utilizados, fueron el cultivo de células del paciente, principalmente fibroblastos y mioblastos. Este modelo de estudio tiene el inconveniente del lento crecimiento de este tipo de cultivos y la posible falta de fenotipo en ese tipo celular.

Otro modelo de estudio en el cual se está trabajando mucho en los últimos años, es en la creación de ratones transgénicos mitocondriales. Este modelo presenta muchas dificultades, entre ellas se pueden citar (Inoue K, 2002):

- dificultad de introducir mutaciones en el ADNmt debido a que su capacidad de recombinación es muy baja,
- resulta difícil introducir ADN exógeno dentro de mitocondrias intactas
- se necesita introducir mucho ADNmt mutado para conseguir obtener fenotipo clínico

Hasta ahora la mayoría de los ratones transgénicos creados en los que la mitocondria tenía un papel importante, han sido ratones en los que los genes diana alterados estaban codificados en el genoma nuclear y la proteína tenía su función en el interior de la mitocondria (Graham BH, 1997) (Trifunovic A, 2004). El único ratón con defecto molecular en el ADNmt es un ratón transgénico con una deleción de 4696 pares de bases en su ADNmt (Inoue K, 2000).

Un modelo de estudio muy utilizado en la actualidad son los cultivos de cíbridos transmitocondriales, que son células creadas a partir de la fusión de una célula enucleada procedente del paciente, con una célula tumoral con mitocondrias a las cuales se les ha eliminado su ADN por un tratamiento con bromuro de etidio (King MP, 1989). Como resultado se obtienen líneas celulares inmortales que únicamente difieren en la proporción de la mutación que tienen en su ADNmt. Esta proporción puede variar desde

el 0% hasta el 100% de genomas mitocondriales mutados. Así este parece ser hasta el momento, el modelo de estudio idóneo para estudiar las enfermedades mitocondriales, ya que como se ha comentado se trata de células totalmente idénticas en todos los aspectos, y que únicamente difieren en una mutación del ADNmt. De esta manera se podrán conocer los efectos de la mutación sin influencia del ADN nuclear. Desde su desarrollo en el año 1989 son muchos los trabajos publicados utilizando este sistema celular.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las enfermedades mitocondriales se caracterizan por presentar una gran heterogeneidad de síntomas clínicos. Esta heterogeneidad provoca que idénticas mutaciones pueden dar lugar a diferentes fenotipos, y a su vez diferentes mutaciones pueden dar lugar a un mismo fenotipo. Este hecho complica el diagnóstico clínico de estas enfermedades. La heterogeneidad de las enfermedades mitocondriales desde siempre se ha atribuido a los diferentes grados de heteroplasmia de una mutación en diferentes tejidos, y a la diferente demanda energética de cada uno de ellos.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es determinar si diferentes mutaciones en el ADNmt provocan un efecto en la cadena de transporte electrónico incrementando la producción de ROS, y si a su vez esta sobreproducción de ROS provoca daño oxidativo a diferentes componentes celulares, pudiendo así ser un factor modulador importante del fenotipo de cada mutación mitocondrial.

Objetivos concretos

1. Diagnóstico molecular de pacientes con enfermedades de origen mitocondrial.
2. Creación líneas de cíbridos transmitocondriales a partir de plaquetas de los pacientes diagnosticados.
3. Estudio de la producción de ROS en las líneas de cíbridos transmitocondriales obtenidas.
4. Optimización del método de determinación de MDA: estudio de la concentración de BHT o EDTA
5. Daño oxidativo en las líneas de cíbridos transmitocondriales:
 - a. Estudio de la oxidación lipídica.
 - b. Estudio de la oxidación de proteínas.
 - c. Estudio de la oxidación del ADNmt.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diagnóstico de pacientes

3.1.1 Pacientes a estudiar

En todos los pacientes las muestras utilizadas para el diagnóstico se recogieron bajo consentimiento informado del paciente, aprobado por el comité ético del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona.

3.1.1.1 Paciente 1

Mujer diabética de 39 años que acudió a la Unidad de Enfermedades Neuromusculares para la valoración de un cuadro de debilidad muscular e intolerancia al ejercicio, que llevaba padeciendo desde los últimos seis años. A los treinta años se le diagnosticó Diabetes Mellitus, después de haber sufrido durante los dos últimos años astenia, poliuria y polidipsia.

En la anamnesis, la paciente refirió cansancio en determinadas actividades cotidianas, como subir escaleras, levantarse de la silla o levantar objetos. Si se esforzaba aparecían palpitations y dificultades respiratorias. El cuadro clínico había empeorado en los dos últimos años. Últimamente la paciente había empezado a desarrollar una progresiva disminución de la percepción auditiva.

En la exploración neurológica se observó debilidad muscular simétrica afectando a los músculos proximales, tanto de la cintura escapular como de la pélvica. No se observaron atrofas musculares. Los reflejos musculares estaban hipoactivados. No se detectaron alteraciones en las sensibilidades. Se detectó sordera bilateral de características neurosensoriales, confirmando por audiometría hipoacusia neurosensorial bilateral.

En las determinaciones analíticas en sangre la glucemia basal en ayuno era de 229 mg/dL (valores de referencia 71-110 mg/dL. Las concentraciones plasmáticas de lactato y CK fueron normales.

En el examen neurofisiológico, el electromiograma (en adelante EMG) paradójicamente fue normal, sin evidencia electrofisiológica de miopatía. La tomografía axial computerizada (en adelante TAC) cerebral no mostró lesiones ni calcificaciones anómalas. Investigando los antecedentes familiares se observó que tanto la abuela materna como la madre habían padecido Diabetes Mellitus, y que además la madre también estaba afectada de hipoacusia bilateral.

3.1.1.2 Paciente 2

Mujer de 34 años con una historia de progresiva fatigabilidad muscular. A los veinte años empezó a desarrollar lipomas confluentes simétricos alrededor del cuello y en la parte superior del tronco, sin deformaciones en el esqueleto, que se han tratado en tres intervenciones quirúrgicas en el último año. El examen neurológico mostró hipoacusia neurosensorial bilateral, ataxia y afectación de los nervios craneales. El examen oftalmoscópico fue normal, sin afectación de los músculos oculares. Poco tiempo después, la paciente desarrolló una severa intolerancia al ejercicio, hasta el punto de que no era capaz ni de andar distancias muy cortas. El EMG mostró un patrón miopático con polineuropatía axonal sensitiva. Rápidamente debutó con disartria, disfagia y ptosis palpebral, sugiriendo un accidente vascular cerebral. Sumado a estos síntomas, presentó insuficiencia ventilatoria, fallo multiorgánico y acidosis láctica. La historia familiar de la paciente mostró lipomatosis múltiple simétrica sin evidencias neuromusculares en cinco familiares maternos. Ninguna de las características clínicas frecuentemente asociadas al síndrome de MERRF fue constatada en ninguno de estos cinco familiares maternos estudiados.

3.1.1.3 Paciente 3

Mujer caucásica de 21 años, fruto de un embarazo y parto normales, con desarrollo cognitivo y motor normal hasta los tres años. A esta edad se le detectó una catarata bilateral que requirió tratamiento quirúrgico. A los siete años empezó a desarrollar una progresiva pérdida auditiva neurosensorial. Durante los años siguientes la paciente debutó con síntomas de epilepsia mioclónica con evidencias electroencefalográficas de ondas lentas e impulsos aislados, ataxia cerebral, fatigabilidad muscular y progresiva pérdida visual. El ácido láctico basal a los doce años era elevado, 5,8 mmol/L (normal <1,8 mmol/L), y la CK en suero era de 1000 UI/L (normal <150 UI/L). El examen clínico a los 21 años mostró atrofia muscular difusa, fatigabilidad muscular generalizada, ataxia de las extremidades, severa deficiencia visual con atrofia óptica y sordera total. El EMG desveló un claro patrón miopático. Los estudios de conducción motora mostraron neuropatía sensorimotora severa en las piernas. Las imágenes de resonancia magnética del cerebro desvelaron atrofia cerebelar difusa con hiperintensidades nodulares simétricas en los ganglios basales. La historia familiar era negativa para enfermedades neuromusculares.

3.1.1.4 Paciente 4

Adolescente caucásico de 15 años de edad, fruto de un embarazo y parto normales. En los primeros años de la infancia no desarrolló ninguna irregularidad, hasta que a los cuatro años acudió a nuestro hospital afectado de molestias subagudas al caminar, después de haber superado una neumonía. El examen neurológico evidenció hipotonía generalizada con clonus en el tendón de Aquiles izquierdo y efecto Babinski. Se evidenciaron movimientos típicos de distonia espástica al caminar. Las imágenes de MRI del cerebro mostraron la presencia de necrosis bilateral del estriado (en adelante BSN). No tenía aumentados los niveles de ácido láctico ni en el plasma ni en el fluido cerebro-espinal.

El paciente ha sido seguido por el servicio de Neurología infantil del Hospital Vall d'Hebron desde su primer episodio, evidenciando que la enfermedad ha progresado hacia una distonia asimétrica generalizada. A los trece años, una nueva MRI mostraron nuevas lesiones necróticas de los ganglios basales. Actualmente el paciente presenta un cuadro severo de disartria y retraso mental moderado con distonia generalizada. La historia familiar para los desórdenes neurológicos fue negativa.

3.1.2 Estudio bioquímico de la cadena respiratoria

La actividad de los enzimas de la cadena respiratoria se determina en homogeneizados de tejido muscular o de células en cultivo por espectrofotometría. En el caso de la biopsia muscular, se homogeneizan 40 mg de tejido en 450 µL de medio SETH (sacarosa 250 mM, EDTA 2mM, Tris-HCL 10mM, heparina 50 U/mL, pH 7,4). Posteriormente se centrifuga a 800 xg durante diez minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo. Todas las determinaciones se realizan sobre este sobrenadante (Barrientos A, 2002a).

3.1.2.1 Actividad NADH Citocromo C Oxidoreductasa: Complejo I + III

Se determina la actividad NADH citocromo C oxidoreductasa sensible a la rotenona (CI+CoQ+Complejo III).

Procedimiento: En una cubeta del espectrofotómetro se ponen 12,5 µL del sobrenadante y 1000 µL de agua milliQ, previamente atemperada a 37°C. Se deja preincubar la mezcla durante 1 minuto a 37°C dentro de el espectrofotómetro para que se rompan las membranas mitocondriales. Inmediatamente se añade a la cubeta:

- 250 μL de tampón Tris 50 mM a pH 8 (con BSA al 5%), previamente atemperado a 37°C
- 3,75 μL de KCN 80 mM
- 25 μL de citocromo c 2 mM

Después se agita la cubeta ligeramente, y se lee la absorbancia durante un minuto a 550 nm a 37°C. Pasado este tiempo se añaden 12,5 μL de NADH 40 mM y se vuelve a agitar la mezcla. Se lee la absorbancia durante 3 minutos a 550 nm y a 37°C. Se añaden 2,5 μL de rotenona 2 mM y se agita la mezcla. Se vuelve a leer la absorbancia durante 3 minutos a 550 nm 37°C.

Cálculos: Se calcula la pendiente antes y después de la adición de rotenona y se calcula la diferencia de pendientes entre las dos ($\Delta A/\text{min}$) según la fórmula:

$$[\Delta A/\text{min} \times V_f \times 1000] / [21,1 \times V_m] \text{mL} \times \text{SN}$$

donde SN es el contenido proteico del sobrenadante en mg de proteína / mL; V_f es el volumen final en mL (=1,306); V_m es el volumen de la muestra en mL (=0,0125); y 21,1 es el coeficiente de extinción molar del citocromo c.

3.1.2.2 Actividad Succinato DCPIP Oxidoreductasa: Complejo II (SQ y SP)

Se mide la actividad diclorofenol indofenol oxidoreductasa (en adelante DCPIP) (Complejo II + CoQ) y succinato deshidrogenasa (SP).

Para romper las membranas celulares se congela y se descongela tres veces una alícuota del sobrenadante.

Procedimiento: En una cubeta del espectrofotometro se mezcla:

- 900 μL de tampón fosfato potásico 62,5 mM pH 7,4
- 45 μL de sobrenadante + 67,5 μL de SETH
- 22,5 μL de DCPIP 0,5 mM, previamente atemperado a temperatura ambiente.

Se preincuba esta mezcla durante 20 minutos a 30°C y después se añade:

- 55,5 μL de acida sódica 100 mM
- 4,5 μL de rotenona 2 mM
- 108 μL DCPIP 0,5 mM

Inmediatamente, se agita lentamente la cubeta con un vórtex y se registra la absorbancia de 3 a 5 minutos a 600 nm a 25°C. Pasado este tiempo, se añaden 55,5 µL de metasulfato de fenacina (PMS) 24 mM y se lee durante 4 minutos más.

Cálculos: se calcula la pendiente, midiendo los incrementos de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$) antes (SQ) y después (SP) de añadir PMS. Se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\text{SQ} = 1504,3 \times \Delta A_{\text{min}}/P$$

$$\text{SP} = 1568,9 \times \Delta A_{\text{min}}/P$$

$$[\Delta A_{\text{min}}/\text{min} \times V_f (\text{mL}) \times 1000] / [19,1 \times V_m (\text{mL}) \times \text{SN}]$$

donde $V_f = 1,293$ mL para SQ y 1,3485 para SP. El coeficiente de extinción milimolar del DCPIP es de 19,1. El V_m (volumen de la muestra en mL) es de 0,045. SN es el contenido proteico en mg de proteína/mL del sobrenadante.

3.1.2.3 Actividad Succinato-Citocromo C Oxidoreductasa: Complejo II + III

Se rompen las membranas celulares descongelando y volviendo a congelar tres veces una alícuota del sobrenadante.

Procedimiento: En una cubeta del espectrofotómetro se mezclan los siguientes reactivos:

- 900 µL de tampón fosfato potásico 62,5 mM pH 7,4
- 45 µL de sobrenadante + 67,5 µL de SETH
- 90 µL de succinato 250 mM
- 22,5 µL de agua milliQ

Se preincuba durante 30 minutos a 30°C y después se añaden:

- 55,5 µL de acida sódica 100 mM
- 4,5 µL de rotenona 2 mM
- 168 µL de citocromo c 0,5%

Inmediatamente se agita la cubeta en un vórtex y se lee la absorbancia a 550 nm durante 5 minutos a 25°C.

Cálculos: Se calcula la pendiente mediante la siguiente fórmula:

$$[\Delta A/\text{min} \times V_f (\text{mL}) \times 1000] / [21,1 \times V_m \times \text{SN}]$$

donde V_f es 1,353 mL; 21.1 es el coeficiente de extinción molar del citocromo C; V_m es 0,045 mL, SN es el contenido proteico en mg de proteínas/mL de sobrenadante.

3.1.2.4 Actividad del Complejo IV (Citocromo C oxidasa)

Para calcular esta actividad la muestra se diluye cinco veces el sobrenadante con SETH.

Procedimiento: en una cubeta del espectrofotómetro se mezcla:

- 1116 μL de tampón fosfato 10 mM pH 7, previamente atemperado a 25°C
- 84 μL citocromo C 1% (10 mg/mL), previamente reducido con unos pocos gramos de ditionita y posteriormente centrifugado a 6500 xg durante 5 minutos.
- 6 μL lauril maltósido 125 mM
- 30 μL de sobrenadante

Inmediatamente se agita la cubeta suavemente con un vórtex y se lee la absorbancia durante 10 minutos a 550 nm a 25°C.

Cálculos: Para calcular la pendiente se utilizan los incrementos de absorbancia entre el minuto 5 y el 10. Se utiliza la siguiente fórmula:

$$[\Delta A/\text{min} \times V_f (\text{mL}) \times 1000 \times 5 \text{ mL muestra diluída/mL SN}] / [21,1 \times V_m \times \text{SN}]$$

donde $V_f = 1,236$; 21,1 es el coeficiente de extinción molar del citocromo c; $V_m =$ es el volumen de la muestra diluida añadida a la cubeta (0,030 mL); SN es el contenido proteico en mg de proteína/mL del sobrenadante.

3.1.2.5 Actividad citrato sintasa

Para calcular esta actividad la muestra también se diluye cinco veces el sobrenadante con SETH.

Procedimiento: en una cubeta del espectrofotómetro se mezclan los siguientes reactivos:

- 120 μL de 5,5'-ditibis(ácido 2-nitrobenzoico) 1 mM (en adelante DTNB) *
- 36 μL de acetil CoA 10 mM
- 12 μL de tritón X-100 10%
- 912 μL de agua milliQ atemperada a 25°C
- 30 μL de sobrenadante diluído en SETH

Inmediatamente se agita la cubeta en un vórtex y se lee durante 3 minutos a 412 nm y 25°C. Pasado este tiempo, se añaden 60 µL de oxalacetato 10 mM* en Tris-HCL 0,1M pH 8, y se continua registrando la absorbancia durante 3 minutos más.

Cálculos: Se calcula la pendiente antes y después de la adición de oxalacetato, y se mide la diferencia entre las dos ($\Delta A/\text{min}$). La fórmula utilizada es la siguiente:

$$[\Delta A/\text{min} \times V_f (\text{mL}) \times 1000 \times 5 \text{ mL muestra diluída/mL SN}] / [13,6 \times V_m \times \text{SN}]$$

donde $V_f = 1,170 \text{ mL}$; el coeficiente de extinción molar del DTNB es 13,6; el volumen de la muestra diluida añadida a la cubeta (V_m) es 0,030 mL; SN es el contenido proteico en mg de proteína/mL del sobrenadante.

* La solución de DTNB 1mM se preparó en una solución 1M Tris-HCL pH 8.1. El oxalacetato se preparó en fresco para impedir su degradación.

3.1.3 Estudio morfológico. Citoquímica mitocondrial en secciones de tejidos

Para visualizar la presencia de mitocondrias patogénicas y normales en secciones titulares hay diversos procedimientos histoquímicos, de los cuales el más utilizado es el tricrómico de Gomori modificado por Engel (Engel WK, 1963). En este trabajo se optó por la detección histoquímica de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH), que es un marcador mitocondrial específico de la fibra muscular que refleja la presencia de proliferación mitocondrial y la citocromo oxidasa, marcador del complejo IV de la cadena de respiratoria (Sciacco M, 1996).

3.1.3.1 Succinato deshidrogenasa (SDH)

Este método se basa en la utilización del nitroazul de tetrazolio como aceptor de los electrones, combinado con el metilsulfato de fenazina, que sirve como dador intermedio del electrón al nitroazul de tetrazolio. La especificidad del método puede estudiarse haciendo secciones control, añadiendo un inhibidor de la SDH al medio de incubación, en este caso malonato sódico 10 mM.

Procedimiento: se utilizan secciones de criostato de 8 micras que se depositan encima de un cubreobjetos recubierto de polilisina (0,1%). La solución de incubación está compuesta de tampón fosfato 5 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, metilsulfato de fenazina 0,2 mM, cianuro potásico 1 mM, ácido succínico 50 mM y nitroazul de tetrazolio 1,5 mM.

Se ajusta el pH a 7,6 y se filtra la solución con papel Whatman número 1. Las secciones se incuban durante 20 minutos a 37°C. Después se realizan tres lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada a temperatura ambiente. Las secciones se montan sobre un portaobjetos de vidrio con gel de glicerina y se observan al microscopio.

3.1.3.2 Citocromo oxidasa (COX)

El método se basa en la utilización de la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como dador de electrones para el citocromo c. El producto de la reacción de la oxidación de la DAB aparece como una pigmentación marrón que corresponde a la distribución de las mitocondrias en el tejido. La especificidad del método puede estudiarse añadiendo un inhibidor de la COX (por ejemplo cianida potásica 10 mM) al medio de incubación.

Procedimiento: Se utilizan secciones de criostato de 8 micras que se colocan sobre un cubreobjetos recubierto con polilisina (0,1%). La solución de incubación está compuesta de tampón fosfato 5 mM pH 7,4, DAB 0,1%, citocromo c (de corazón de caballo) 0,1% y catalasa al 0,02%. Se ajusta el pH a 7,4 y se filtra la solución con papel Whatman 1. Las secciones se incuban durante una hora a 37°C. Después se realizan tres lavados con agua destilada de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Las secciones se montan sobre un portaobjetos de vidrio con gel de glicerina y se observan al microscopio.

3.1.4 Estudio Molecular

3.1.4.1 Extracción de ADN

A) Protocolo para biopsia de músculo, piel y grasa subcutánea: Con un mortero se pulverizan aproximadamente 50 mg de tejido muscular congelado en nitrógeno líquido. Se coloca el tejido pulverizado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril, y se añaden rápidamente 500 µL de una solución que contiene:

- proteinasa K (1 mg/mL)
- 10 mM Tris-HCl pH 7,4
- 10 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 1% SDS

Se incuba durante 2 horas a 50°C o durante toda la noche a 37°C. Se añaden 50 µL de NaCl 5M y se agita por inversión. Seguidamente se añade 1 volumen de fenol-Tris saturado, y se vuelve a agitar por inversión durante 15 segundos. Se centrifuga durante

10 minutos a 10000 xg y se pasa la fase acuosa a un tubo nuevo. Se añaden 250 µL de isoamilalcohol:cloroformo (1:24) y 250 µL de fenol. Se agita de nuevo durante 15 segundos y se centrifuga 10 minutos a 10000 xg. La fase acuosa se pasa a un tubo nuevo, donde se añaden 500 µL de la mezcla de isoamilalcohol:cloroformo (1:24). Se agita durante 15 segundos y se centrifuga 10 minutos a 10000 xg. Se pasa la fase acuosa a un tubo nuevo.

Se precipita el ADN añadiendo dos volúmenes de isopropanol frío. Se centrifuga a 10000 xg durante 20 minutos y se descarta el sobrenadante. Se lava el pellet con 500 µL de etanol 95% frío. Se centrifuga a 10000 xg durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet. Se resuspende el pellet en 20 µL de tampón TE (Tris 10 mM pH 8,5, EDTA 1mM)

B) Protocolo para sangre: se procede de la misma manera que si se tratara de biopsia muscular, pero en este caso el material de partida es un pellet de células obtenido a partir de centrifugar 5 mL de sangre total a 5000 xg durante 20 minutos.

C) Protocolo para fibroblastos y híbridos mitocondriales: se procede de la misma manera que si se tratara de biopsia muscular, pero en este caso el material de partida es un pellet de células obtenido a partir de centrifugar 2,5 millones de células tripsinizadas, a 1000 xg durante 5 minutos.

3.1.4.2 Cuantificación del ADN extraído

La concentración de ADN se determina por espectrofotometría, leyendo a la longitud de onda de 260 nm. En esta longitud de onda, una unidad de absorbancia es equivalente a 50 µM/mL de ADN doble hebra. La muestra se diluye previamente 50 veces (1/50). La concentración de ADN se calcula siguiendo la fórmula:

$$[\text{ng ADN}/\mu\text{L}] = \text{Abs}_{260} \times 50 \times 50$$

Para determinar la pureza de la muestra, se lee además la absorbancia a 280 nm y se calcula el cociente: $\text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280}$. Se considera que la muestra está libre de proteínas cuando el resultado de este cociente está entre 1,8 y 2.

3.1.4.3 Reacciones de PCR

Las amplificaciones de los productos de PCR se realizan a partir de ADN purificado extraído de músculo, sangre, cultivo de fibroblastos, piel y grasa subcutánea. Las reacciones se hacen sobre un volumen final de 50 μL y las concentraciones de los diferentes componentes de la mezcla son las siguientes:

	Concentración Stock	Concentración Final
Cebadores	5 μM	0,1 μM
DNTPs	2,5 mM	0,05 μM
Tampón Taq *	10X	1X
Taq ADN polimerasa *	5 unidades/ μL	0,1 unidades/ μL
ADN		100 ng/ μL

* Subministrados por TaKaRa® (TaKaRa Shuzo, Shifo, Japan). El tampón contiene Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 0,1%, MgCl_2 25 mM.

Las condiciones de las reacciones de PCR para los 24 pares de cebadores (ver apéndices) que amplifican todo el ADNmt entero (Kogelnik AM, 1998) son las siguientes:

Desnaturalización	94°C	1 minuto	
desnaturalización	94°C	30 segundos	} x 30 ciclos
hibridación	61°C	45 segundos	
elongación	72°C	1 minuto	
elongación final	72°C	5 minutos	

Las condiciones de PCR para amplificar los genes de los ARN de transferencia también están estandarizadas y son las siguientes (secuencia de los cebadores en apéndices):

Desnaturalización	94°C	1 minuto	
desnaturalización	94°C	15 segundos	} x 25 ciclos
hibridación	50°C	30 segundos	
elongación	72°C	1 minuto	
elongación final	72°C	5 minutos	

Para amplificar fragmentos superiores a 3 Kb se utiliza el enzima TaKaRa LA TaqTM (TaKaRa Shuzo, Shifo, Japan). En esta reacción de PCR las cantidades de los diferentes componentes de la mezcla son las siguientes:

TaKaRa LA Taq (5 U/ μ L)	0,5 μ L
Tampón II LA PCR sin Mg ²⁺ (10X)	5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	5 μ L
Mezcla dNTPs (2,5 nM cada uno)	8 μ L
Cebador 1	0,2-1,0 μ M
Cebador 2	0,2-1,0 μ M
ADN	< 1 μ g
Agua MilliQ	csp 50 μ L

Las condiciones de la PCR son las siguientes:

Desnaturalización	95°C	1 minuto	
desnaturalización	98°C	5 segundos	} x 30 ciclos
hibridación + elongación	68°C	15 minutos	
elongación final	72°C	10 minutos	

3.1.4.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de la PCR se separan por electroforesis en geles de agarosa horizontales para comprobar los bandas amplificadas. Los geles se preparan al 1%, disolviendo 0,5 g de agarosa en 50 mL de TBE 1X (Tris-base 50 mM, ácido bórico 1 mM, EDTA 1 mM), y se añade 1,5 μ L de bromuro de etidio. Las muestras se cargan mezcladas 1/5 con tampón de carga (disolución de Ficoll al 33% y azul de bromofenol al 0,2%). Para comprobar el tamaño amplificado se utiliza un marcador de peso molecular.

La electroforesis se realiza en tampón TBE 1X, aplicando un voltaje de 100 V durante unos 30 minutos (dependerá del tamaño de las bandas amplificadas). Las bandas se visualizan exponiendo el gel a una fuente ultravioleta.

3.1.4.5 Secuenciación automática

Una vez comprobado mediante un gel de agarosa que el producto amplificado por PCR tiene el tamaño deseado y que es una banda única, se procede a secuenciar. Para ello previamente se purifica utilizando el kit comercial de purificación QiAquick PCR Purification kit (QiAgen GmbH, Germany) y a continuación se realiza la siguiente reacción de secuenciación, que está compuesta por:

Big Dye [®] Terminator Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK)	2-4* μL
Producto de PCR purificado (100 ng/ μL)	2 μL
Cebador (5 μM)	1 μL
Agua	csp 10 μL

* 2 μL para fragmentos de peso molecular inferior a 500 pares de bases y 4 μL para fragmentos de tamaño superior

Las condiciones de la reacción de secuencia son las siguientes:

Desnaturalización	94°C	1 minuto	} x 25 ciclos
desnaturalización	96°C	10 segundos	
hibridación	50°C	5 segundos	
elongación	60°C	4 minutos	

Los productos de la reacción de secuencia se purifican mediante centrifugación por columna Autoseq[™] G-50 (Amersham Biosciencias, Piscataway, NJ), siguiendo el protocolo:

- se agita la columna en un vortex,
- se centrifuga la columna dos veces durante 1 minuto a 2000 xg para eliminar el tampón de conservación,
- se añade el producto de la reacción de secuenciación en el centro de la columna y se centrifuga durante 1 minuto a 2000 xg, para eluir el ADN,
- a 8 μL del producto eluido se añaden 12 μL de TSR (del inglés *template supressor reagent*) (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- la muestra se desnaturaliza durante 3 minutos antes de inyectarlas en el secuenciador automático (modelo 310, PerkinElmer, Foster City, CA)

3.1.4.6 Análisis de mutaciones mediante RFLP (del inglés *restriction fragment length polymorphism*)

El análisis de mutaciones mediante la técnica de RFLP se utiliza para cuantificar el grado de heteroplasmia de las mutaciones encontradas en los diferentes pacientes. Las amplificaciones de PCR se realizan a partir de ADN purificado extraído de músculo, sangre, piel, fibroblastos y grasa subcutánea, siguiendo el protocolo del apartado 3.1.4.1. En el último ciclo de la PCR convencional, se procede a realizar un ciclo más, llamado ciclo caliente, añadiendo 0,1µL de α -³²P deoxiadenosina trifosfato (dATP) (3000 Ci/mmol) a cada tubo de PCR, con la finalidad de evitar la infraestimación de los niveles de ADNmt mutante, producida por la formación de heteroduplex entre las moléculas mutadas y salvajes.

El producto amplificado es digerido por un enzima restricción diferente para cada mutación (ver tabla 4) a 37°C de temperatura durante toda la noche. La mezcla de reacción es la misma en todos los casos:

- 26 µL del producto amplificado
- 3 µL de tampón del enzima de restricción (10X)
- 1 µL de enzima

ENZIMA	MUTACIÓN	CEBADOR 1	CEBADOR 2
Hae III	A3243G	3116-3134	3353-3333
Ban II	A8344G	7955-7979	8372-8345
Alu I	G6930A	6744-6771	7018-6988
Gsu I	T14487C	14287-14309	14465-14489

Tabla 4. Listado de enzimas de restricción utilizados para cuantificar por RFLP las mutaciones. Se indican los cebadores que se utilizan para amplificar las regiones que contienen las mutaciones. La numeración de los cebadores es según la secuencia de Anderson (Anderson S, 1981). (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

3.1.4.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para analizar los diferentes fragmentos de ADN generados por la digestión enzimática, se separan en un gel de poliacrilamida vertical. Según el tamaño de los fragmentos a analizar se utilizan diferentes porcentajes de poliacrilamida. En la tabla siguiente se muestran las cantidades necesarias de los diferentes componentes para realizar un gel de poliacrilamida a una determinada concentración:

Concentración Poliacrilamida	12%	20%
Tamaño fragmentos a separar	40-200 pares de bases	6-100 pares de bases
Bisacrilamida 30%	20 mL	33,3 mL
TBE 5X	10 mL	10 mL
Agua destilada	19,65 mL	6,35 mL
Persulfato amónico 10%	0,35 mL	0,35 mL
Temed	0,020 mL	0,020 mL

La electroforesis se realiza en tampón TBE 1X, aplicando un voltaje de 300 voltios durante unas 2 o 4 horas, según el porcentaje de acrilamida del gel y de los tamaños de los fragmentos a separar. Una vez acaba la electroforesis, el gel se cubre con plástico y se expone a una pantalla del Phosphoimager (BioRad, Hercules, CA) durante una hora. A continuación se revela la pantalla con un lector Phosphoimager. Para cuantificar los porcentajes de los productos de la digestión se utiliza el programa informático Quantity One[®] (Biorad, Hercules, CA).

3.1.4.8 Haplotipaje del ADNmt por enzimas de restricción

Existen cuatro polimorfismos que definen los principales haplotipos del ADNmt. Estos polimorfismos son: T4216C, C7028T, G12308A y G13708A. El haplotipaje de las células se realiza amplificando un pequeño fragmento de ADNmt por PCR, y posteriormente se digiere con un enzima de restricción adecuado. En la siguiente tabla se muestran los cebadores necesarios para amplificar los diferentes fragmentos y los enzimas necesarios en cada caso:

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Tamaño	Tª hibridación	Enzima
L4216	CTACTTCTAACCTCCCTGTT	313 bp	58	Nla III
H4216	CTTACTTTAGGATGGGGTGT			
L7028	TCGCCACACTCCACGGAAG	261 bp	60	Alu I
H7028	TGGCGTAGGTTTGGTCTAGG			
L12308	CTCAACCCCGACATCATTACC	235 bp	60	Hinf I
H12308	ATTACTTTTATTGGAGTTGCACCAAGATT			
L13708	TCTTCTCACCTAACAGGTC	248 bp	63	Mva I
H13708	GTTGGTTAGGTAGTTGAGGT			

A continuación se describen las condiciones de la PCR:

desnaturalización	94°C	3 minuto	
desnaturalización	94°C	30 segundos	} x 30 ciclos
hibridación	X	30 segundos	
elongación	72°C	1 minuto	
elongación final	72°C	5 minutos	

La digestión de los diferentes fragmentos y su posterior análisis por electroforesis, se realiza de igual manera que en los apartados 3.1.4.6 y 3.1.4.7. Los fragmentos se visualizan tiñendo el gel de poliacrilamida en una solución que contenga TBE con bromuro de etidio (60 µL de bromuro de etidio en un litro de TBE 1X), durante una hora.

Los haplotipos se definen según la siguiente tabla:

HAPLOTIPO	POLIMORFISMO			
	C7028T	T4216C	A12308G	G13708A
H	-	-	-	+
T	+	+	-	+
J	+	+	-	-
UK	+	-	+	+
Y	+	-	-	+

+ → Diana de restricción presente - → Diana de restricción ausente

3.2 Líneas celulares

3.2.1 Generación de los cíbridos transmitocondriales

Los cíbridos transmitocondriales humanos se crean a partir de líneas celulares que contienen mitocondrias que carecen de ADNmt (células rho⁰ (ρ⁰)), que son repobladas con mitocondrias (y a su vez con ADNmt) exógenas mediante la fusión con plaquetas de pacientes. Se utilizan células rho⁰ derivadas de una línea celular deficiente en timidina quinasa (143b TK⁻), por lo que el medio de cultivo utilizado para crecer estas células necesita la adición de uridina. El medio utilizado para seleccionar las células fusionadas (células transmitocondriales), se suplementa con 5-bromodeoxiuridina

(BrdU). De esta manera, cualquier célula contaminante en el medio, al tener timidina quinasa, incorporará BrdU en su ADN y morirá.

3.2.1.1 Soluciones y medios utilizados en la preparación de cíbridos transmitocondriales

- solución fisiológica salina para aislar plaquetas:
 - 0,15 M NaCl,
 - 15 mM Tris-HCl pH 7,4
- medio de fusión de las células
 - 0,1 M citrato sódico dihidratado,
 - DMEM sin calcio,
 - 0,15 M NaCl
- Solución de polietilén glicol (PEG) al 42%: esta solución se prepara el mismo día unas horas antes de la fusión. Primero se autoclavan 8,4 g de PEG 1500 (BDH Laboratory Supplies, Poole, England) en un erlenmeyer de 50 mL, durante 15 minutos. Antes de que el PEG se solidifique, se añaden 2 mL de DMSO y 9,6 mL de DMEM (del inglés *Dubelcco's modified Eagle's medium*) sin calcio. La solución se guarda a 37°C hasta su uso.
- Medio rho⁰: medio DMEM suplementado con 10% FBS (suero fetal bovino), 50 µg/mL de uridina y 0,5% de una solución de penicilina y estreptomicina.
- Medio de selección: medio DMEM suplementado con 10% de FBS dializado, 100 µg/mL de BrdU y 0,5% de antibióticos (penicilina/estreptomicina).
- Solución TD: 0,137 M NaCl, 10 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 25 mM Tris-HCl pH 7,4
- Solución TD + EDTA: solución TD suplementada con EDTA disódica 1mM.
- Solución de tripsina (10X): 0,5% (w/v) tripsina (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) en agua. Se guarda a 4°C. La solución de trabajo se diluye 10 veces en el tampón TD + EDTA.
- Medio de congelación: 17,5 mL de DMEM, 5 mL de FBS y 2,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO).

3.2.1.2 Aislamiento de las plaquetas

Se recogen de 15 a 20 mL de sangre del paciente en tubos con heparina para evitar su coagulación. Se mide el volumen total de la sangre del paciente, y se transfiere a un tubo falcon de 50 mL. Se añade una novena parte del volumen de solución fisiológica salina. Se mezcla bien por inversión y se centrifuga a 200 xg durante 20 minutos a 12°C. Se recogen tres cuartas partes del sobrenadante (plasma) y se cuentan las plaquetas en un hemocitómetro. Seguidamente se centrifuga el plasma en tubo falcon de 15 mL a 1500 xg durante 20 minutos a 15°C. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 11 mL de solución fisiológica salina.

3.2.1.3 Fusión de las plaquetas con las células rho⁰

Se transfieren 7 mL de la suspensión de plaquetas a un tubo falcon estéril de 15 mL y se centrifuga a 1500 xg durante 15 minutos a 15°C. Posteriormente se aspira el sobrenadante dejando unos 100 por encima del pellet.

De forma paralela se tripsiniza una placa de cultivo con células receptoras (rho⁰). Para tripsinizar las células primero se lava la placa de cultivo con PBS, y después se añade la tripsina y se deja actuar durante 5 minutos a 37°C. Una vez las células se desenganchan del fondo de la placa, se centrifugan y se cuentan en una cámara de conteo de células. El pellet se resuspende con DMEM sin calcio a una concentración de 5×10^5 células/mL. Se añaden 2 mL de la suspensión de células rho⁰ (en total 1 millón de células) al pellet de plaquetas con mucho cuidado de no desenganchar el pellet. Se centrifuga el tubo a 180 xg durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Con una pipeta Pasteur se añaden 0.1 mL de la solución de PEG al 42% y se resuspende el pellet. Cuando el pellet está casi resuspendido, se incuba un minuto a temperatura ambiente, se añaden 10 mL de medio rho⁰ y se resuspenden durante 30 segundos.

Una vez bien agitado, se prepara una dilución 1:10 con el mismo medio y se siembran las células en placas de 96 pocillos, haciendo por lo menos tres nuevas diluciones de la siguiente manera:

- a 10 mL de la dilución 1:10 se añaden 10 mL de medio rho⁰ y se siembran 0,2 mL en cada pocillo de la placa de 96,
- a 2.5 mL de la dilución 1:10 se añaden 7.5 mL de medio rho⁰ y se siembran 0,1 mL en cada pocillo de la placa de 96,

- a 1 mL de la dilución 1:10 se añaden 9 mL de medio rho⁰ y se siembran 0,1 mL en cada pocillo de la placa de 96.

La placa de 96 pocillos con las células sembradas se deja en un incubador de cultivos celulares a una temperatura constante de 37°C y una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células que no se han sembrado, se recogen por centrifugación (180 xg durante 5 minutos) y se resuspenden en medio de congelación. Se hacen alícuotas de 1mL/vial y se congelan de manera progresiva y finalmente se dejan almacenadas en nitrógeno líquido.

Dos o tres días después de haber sembrado las células en las placas de 96 pocillos, se cambia el medio rho⁰ por medio selectivo (sin uridina y con BrdU), que se cambia cada 3 días. Una vez pasados de 10 a 12 días después de haber empezado la selección, las colonias ya son visibles y están a punto para ser transferidas a placas de cultivo mayores.

Las placas de 96 pocillos que presentan un mayor número de pocillos negativos (preferentemente más del 70-80%) son los mas recomendables para aislar los clones, ya que así se reduce la probabilidad de tener más de una colonia por pocillo.

Para transferir cada colonia, primero se lava el pocillo con 0,2 mL de tampón TD. Se decanta el tampón y se añaden 0.1mL de solución de tripsina. Cuando las células se desenganchan, se transfieren directamente con una pipeta Pasteur a una placa de cultivo mayor que contiene 2 mL de medio selectivo.

3.2.2 Mantenimiento de los cultivos de híbridos transmitocondriales

3.2.2.1 Medios de cultivo

Las líneas celulares MERRF_0%, MERRF_100%, MELAS_100% y ND6_100% se cultivan utilizando el siguiente medio de cultivo:

- DMEM
- 10% suero fetal bovino
- 1% penicilina-estreptomicina-fungizona
- 1% piruvato sódico
- 1% L-glutamina
- 1% aminoácidos no esenciales

Las líneas celulares COX_0% y COX_100% se cultivan en el mismo medio, pero adicionado con uridina (0,025 gramos de uridina/500 mL de medio). Se suplementa con uridina para superar el bloqueo en la síntesis de uracilo, que requiere la actividad del enzima dihidroorotato deshidrogenasa, unido al complejo IV de la CTE (King MP, 1989).

3.2.2.1 Tripsinización de las placas de cultivo

Para tripsinizar las placas de cultivo se utilizan los métodos habituales. Antes de que el cultivo llegue a la confluencia, se elimina el medio de cultivo por aspiración, y se lava con 5 mL de PBS. Se aspira el PBS y se añaden 5 mL de tripsina. Se introduce la placa en el incubador y se deja durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo las células están desenganchadas y se recogen por aspiración y se colocan en un tubo falcon, con 1 mL de medio completo. Se centrifuga el tubo durante 5 minutos a 1000 xg. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet con 5 mL de medio completo si se resiembrará, o con PBS si se cuentan.

3.3 Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno

3.3.1 Fundamentos del método

Se utiliza la determinación de la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno en las células. Este método fue originariamente descrito por Kenston y Brandt en el año 1965, para medir el peróxido de hidrógeno en una solución acuosa (Kenston AS, 1965) (Brandt R, 1965).

Se basa en la utilización del diacetato de diclorofluorescina (en adelante DCFH-DA), que es un compuesto no fluorescente estable de naturaleza hidrofóbica. Esta característica le permite atravesar libremente las membranas biológicas e introducirse en el interior de las células. Una vez en el interior de las células la molécula es desacetilada para formar el compuesto no fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (en adelante DCFH). Este proceso se cree lo realizan esterasas intracelulares. La DCFH reacciona rápidamente con el peróxido de hidrógeno intracelular para formar 2',7'-diclorofluoresceína (en adelante DCF), un compuesto que se puede medir por fluorescencia.

3.3.2 Preparación de las células para el ensayo

Para el ensayo se necesitan como mínimo 2×10^6 células. La determinación se realiza por duplicado. Las células tripsinizadas se lavan con PBS y se recogen por centrifugación. El pellet se resuspende en 10 mL de PBS y se mantiene en hielo.

Las células se dividen en 4 tubos de polipropileno donde cada tubo contiene $2,5 \times 10^5$ células. Se completa el volumen hasta 3 mL con PBS. Se mantienen en hielo.

3.3.3 Procesamiento de las muestras

A cada tubo anterior se añaden 24 μL de una solución de DCFH-DA (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) 1,25 mM (concentración final es 10 μM). Se agitan rápidamente en un vórtex y se ponen a incubar en un baño de agua a 37°C con agitación suave, a excepción del tubo “0 minutos”, que se procesará inmediatamente.

A cada tiempo de incubación: 15, 30 y 45 minutos, se sacan los tubos correspondientes del baño de 37°C y se colocan en hielo. Para romper las células y liberar la DCF, se sonica (XL-Microson Ultrasonic cell disruptor, Heat Systems INC) cada muestra durante 1 minuto y 15 segundos, en ciclos de 15 segundos. Una vez sonicadas las muestras se centrifugan durante 2 minutos a 1000 xg a 4°C y se conserva el sobrenadante.

Se lee inmediatamente la fluorescencia del sobrenadante de las muestras en un fluorímetro (SFM 25, Kontron Instruments), con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm.

3.3.4 Preparación de la recta patrón

Se prepara una recta patrón con DCF (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Germany) de la siguiente manera:

Solución 1: se prepara una solución 1,0 mM de DCF en metanol

Solución 2: se cogen 100 μL de la solución 1 y se diluyen en 99,9 mL de PBS.

Concentración final (μM)	Volumen de la solución 2 (μL)	Volumen de PBS (μL)
0,06	180	2820
0,05	150	2850
0,04	120	2880
0,03	90	2910
0,02	60	2940

0,01	30	2970
0,005	15	2985

Cada estándar se lee directamente en el fluorímetro y se anota la fluorescencia. Se calcula la recta de regresión entre la concentración de DCF y la fluorescencia obtenida.

3.3.5 Procesamiento de datos

A partir de la ecuación obtenida de la recta patrón se calculan los micromoles de DCF (equivalente a peróxido de hidrógeno) producidos en cada tiempo de incubación, utilizando la fluorescencia obtenida en cada muestra. El DCF en la célula se forma de manera equimolar al peróxido de hidrógeno, los micromoles de DCF producidos son equivalentes a los micromoles de peróxido de hidrógeno (Keston AS, 1965) (Cathcar R, 1983).

A continuación se calculan los micromoles de peróxido de hidrógeno producidos por unidad de tiempo. Este valor se obtiene de la pendiente de la recta de regresión entre el tiempo de incubación y los micromoles de peróxido de hidrógeno producidos en cada tiempo de incubación. Se representa gráficamente la producción de H_2O_2 en el tiempo. Sólo se consideran aquellos tiempos en que la gráfica sea lineal.

3.4 Determinación de la oxidación lipídica

3.4.1 Fundamentos del método

Para valorar la oxidación de los lípidos se determinan los niveles de malondialdehído, un marcador de oxidación lipídica ampliamente utilizado. Se utiliza la capacidad del MDA de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico para dar un compuesto coloreado, que se puede valorar tanto por espectrofotometría como por fluorescencia. Para hacer más específico el método se separa el producto MDA-TBA por HPLC.

Un problema importante de esta técnica es la formación de MDA durante el procesamiento de las muestras. Este MDA también reaccionará con el TBA, con lo que puede sobre valorar los resultados obtenidos. Previamente a la determinación se realizó una búsqueda bibliográfica de los antioxidantes empleados y las concentraciones utilizadas. El EDTA y el hidroxitolueno butilado (BHT) eran los más utilizados, pero no había un consenso claro de que concentración era la más adecuada. Tampoco había ningún estudio anterior donde utilizaran un espécimen similar al nuestro.

Por estas razones antes de empezar a valorar el MDA en nuestras muestras se creyó importante determinar qué antioxidante era el más adecuado, y a qué concentración.

3.4.2 Preparación de las muestras

En este apartado se explica la preparación de las muestras en el estudio de la concentración de BHT o EDTA, tanto para las muestras de los híbridos como para los estándares.

3.4.2.1 Optimización del método de determinación de MDA: estudio de la concentración de BHT o EDTA

En este estudio se valoran los efectos del uso de diferentes concentraciones de BHT y de EDTA sobre la cantidad final de MDA obtenida en los híbridos.

Para ello se recogen por tripsinización 48 millones de células que se dividen en diferentes tubos a razón de 6,5 millones de células por tubo. A partir de este momento todo el proceso se realiza en frío. Las células se resuspenden en 700 μL de ácido ortofosfórico 0,44 M (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) y a cada tubo se le añade una concentración diferente de BHT (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (0,9; 1,81; 3; 3,6 y 4,5 mM) o de EDTA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (0,1; 0,5; 1; 5 y 10 mM). Las células se homogenizan (veinte golpes a 1100 rpm) en un Potter (Potter S, B. Braun, Melsungen, Germany). Cincuenta microlitros de este homogenado se utilizan para la determinación de proteínas (procedimiento explicado en el apartado 3,7). A 250 μL del homogenado se añaden 85 μL de TBA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Germany) 42mM, y se completan hasta un volumen final de 750 μL con agua MilliQ (MilliQ Plus System, Millipore[®], Bedford, USA).

Las muestras se tapan y se incuban durante una hora a 95°C en un baño seco (Block heater, Stuart Scientific, Watford, Herts, UK). Después de la incubación las muestras se enfrían en un baño de hielo. Se transfieren 500 μL de cada reacción a un tubo, donde se añaden 50 μL de ácido perclórico al 70% (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). Se centrifugan a 2500 $\times g$ durante 10 minutos para precipitar las proteínas. 20 μL del sobrenadante se inyectan en el sistema HPLC.

3.4.2.2 Preparación de las muestras a partir de las células

Una vez estandarizado el método de tratamiento de las células se analiza el contenido de MDA de las muestras del estudio, utilizando solamente un antioxidante y a una concentración. El método es el explicado en el apartado anterior.

3.4.2.3 Preparación de la recta patrón

La recta patrón se realiza a partir de 1,1,3,3-tetraethoxypropane (en adelante TEP) (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Germany), que al hidrolizarse, libera MDA de forma estequiométrica (Nielsen F, 1997).

Se prepara una primera dilución (Dilución 1) utilizando 50 μL de la solución comercial de TEP y se lleva a un volumen final de 25 mL con etanol al 40%. Esta dilución 1 tiene una concentración de 8,02 mM, y es estable durante un mes conservada a 4°C. Se prepara una segunda dilución (dilución 2), cogiendo 500 μL de la dilución 1 llevándolos hasta 100 mL con etanol al 40%. Esta dilución 2 tiene una concentración final de 40,01 μM , y es estable durante quince días conservada a 4°C. A partir de esta dilución 2, se preparan cada día los diferentes puntos de la recta patrón de la siguiente manera:

Volumen de la dilución 2 (μL)	Volumen de H_3PO_4 (mL)	Concentración final (μM)
31,2	csp. 25 mL	0,05
62,3	csp. 25 mL	0,1
93,5	csp. 25 mL	0,15
188	csp. 25 mL	0,3
375	csp. 25 mL	0,61
561	csp. 25 mL	0,9

El procesamiento de la recta patrón se realiza de forma similar a las muestras, a 250 μL de cada punto de la recta, se añaden 25 μL de una solución de BHT al 2% y se agitan. Posteriormente se añaden 85 μL de TBA 42mM y agua destilada hasta un volumen final de 750 μL . A partir de este momento se procesan de igual manera que las muestras.

3.4.2.4 Procesamiento de los controles

Como control se utiliza un pool de plasma alicuotado a -80°C . En cada ensayo se utilizan 100 μL de plasma y se añaden 150 μL de ácido ortofosfórico y 25 μL de BHT 2%. Posteriormente los controles se procesan igual que muestras y estándares.

3.4.3 Separación cromatográfica por HPLC

Se utiliza un sistema cromatográfico compuesto por un sistema separador Alliance 2695 (Waters Corporation, MA, USA) y un detector de fluorescencia (Waters 474 fluorescent detector, Waters Corporation, MA, USA). La columna que se utiliza es una Symetry C_{18} de 150 mm de longitud y 4,6 de diámetro interno con un tamaño de partícula de 5 μm (Waters Corporation, MA, USA). Se utiliza una precolumna Symetry C_{18} de 20 mm de longitud y 3,9 de diámetro interno con un tamaño de partícula de 5 μm (Waters Corporation, MA, USA). La fase móvil que se utiliza durante el proceso de separación está compuesta de: fosfato potásico 50 mM pH 6,8 (60 %) y metanol (40%), a un flujo constante de 0,8 mL/min. La determinación del aducto TBA-MDA se realiza a una longitud de onda de excitación de 515 nm y de emisión de 553nm. Los cromatogramas que se obtienen se integran mediante el software Millenium (Waters Corporation, MA, USA).

3.5 Determinación de la oxidación de proteínas

3.5.1 Fundamentos del método

El método que se utiliza para la detección de las proteínas oxidadas, consiste en la derivatización de las proteínas celulares con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (en adelante 2,4-DNPH), la posterior separación de las proteínas mediante un gel de poliacrilamida, transferencia a una membrana de PVDF y finalmente la detección de todas las proteínas oxidadas mediante la utilización de un anticuerpo, que reconoce específicamente el compuesto 2,4-dinitrofenilhidrazona, que ha reaccionado con los grupos carbonilo oxidados de las proteínas.

3.5.2 Procedimiento

3.5.2.1 Obtención y derivatización de las proteínas

Se necesitan aproximadamente 30 millones de células de cada línea celular para realizar el ensayo. Se lavan las placas con PBS (10mL cada vez), para eliminar el medio de cultivo. Después de los lavados se añaden 3 mL de PBS y se separan las células de la

placa utilizando un rascador de células. Se colocan en un tubo falcon de 15 mL y se centrifugan a 1000 xg durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 400 µL de tampón de lisis, que está compuesto de:

- PBS 1X
- 1mM EDTA
- 0,7 µg/ µL de pepstatina
- 0,5 µg/ µL de leupeptina
- 0,5 µg/ µL de aprotinina

Se transfieren los 400 µL a un tubo Eppendorf y se coloca en un baño de hielo. Se sonicán las células durante un 1 minuto y 15 segundos, en ciclos de 15 segundos. Posteriormente se añaden 40 µL de sulfato de estreptomicina al 10% en Hepes 50 mM pH 7,2, se agita y se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Al finalizar la incubación se centrifuga durante 10 minutos a 10000 xg a temperatura ambiente, y se recoge el sobrenadante. Se utilizan 50 µL del sobrenadante para realizar la determinación de proteínas.

A 215 µL del sobrenadante se añaden 215 µL de una solución de SDS (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Germany) al 12% y se agita bien. Posteriormente al mismo tubo se añaden 139,8 µL de una solución de 2,4-DNPH 20 mM en 20% de ácido trifluoroacético (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany), se agita por inversión dos veces, y se guarda en la oscuridad durante 25 minutos a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la incubación se neutraliza añadiendo Tris 2M/30% glicerol/19% β-mercaptoetanol, cambiando de color amarillo a naranja. Se debe registrar el volumen utilizado para la neutralización. Se pipetea 100 µL de las proteínas neutralizadas a un tubo Eppendorf y se añaden 25 µL de azul de bromofenol al 5%. Las muestras ya están listas para ser cargadas.

3.5.2.2 Separación de las muestras mediante un gel SDS-PAGE

En cada ensayo se utilizan en paralelo dos geles, uno se transfiere y el otro se tiñe con Coomassie. Para preparar los geles se precisan de los siguientes reactivos:

- solución 1: Acrilamida-bisacrilamida 30%
- solución 2: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
- solución 3: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

- solución 4: SDS 10%

Todas las soluciones, a excepción de la 4 se filtran y desgasifican. La solución 4 se prepara diariamente. En la preparación de los geles de la electroforesis se mezclan los reactivos anteriores de la siguiente manera:

Reactivo	Gel inferior (10%) (mL)	Gel superior (4%) (mL)
Solución 1	6,7	1,3
Solución 2	5	-----
Solución 3	-----	2,5
Agua milliQ	8	6
Solución 4	0,2	0,1
TEMED	0,01	0,007
Persulfato amónico	0,1	0,07

Una vez polimerizados los dos geles se monta el sistema en la cubeta de la electroforesis y se llena la cubeta con el tampón Tris-HCl 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1% pH=8,3. Una vez limpiados los pocillos, se cargan de 10 a 15 µg de las muestras.

La electroforesis dura 120 minutos y se utiliza un voltaje de 130 V.

Al finalizar la electroforesis uno de los dos geles se guarda para realizar la transferencia mientras que el otro se tiñe para cuantificar las proteínas cargadas en cada carril.

3.5.2.3 Tinción y secado del gel con Coomassie

El gel que se va a teñir se lava durante 5 minutos con agua destilada en constante agitación en una bandeja. Al cabo de los 5 minutos se añade un determinado volumen (hasta que el gel quede cubierto) de la solución de azul de Coomassie al 0,25%, y se deja agitando durante 20 minutos. Posteriormente se elimina la solución de teñido y el gel se coloca en otra bandeja donde previamente se ha añadido unos 50 mL de una solución de desteñido compuesta de metanol al 50% y ácido acético al 10% y se deja agitando durante 2 horas. La solución de desteñido se cambia cada 30 minutos. Al cabo de las 2 horas y cuando el fondo del gel es transparente se elimina la solución de desteñido y se coloca en otra bandeja con 50 mL de una solución compuesta de metanol al 5% y ácido acético al 7%, que rehidrata el gel.

Se deja en esta solución durante 30 minutos y posteriormente se coloca el gel sobre un papel absorbente y se seca en un secador de geles durante 3 horas. Posteriormente se digitaliza sobre un escáner y se guarda la imagen obtenida.

3.5.2.4 Transferencia y revelado de la membrana

Se coloca el gel en tampón de transferencia formado por Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol al 20% y SDS 0,1%. Se cortan 4 papeles de filtro de una medida de 8x6 cm y una membrana de PVDF (Millipore[®], Bedford, USA) de las mismas dimensiones. Se moja la membrana en metanol hasta que queda traslúcida y posteriormente se deja en el tampón de transferencia. Se humedecen los 4 papeles de filtro en el mismo tampón y se monta el sistema de transferencia, teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire entre el gel y la membrana. Se monta la transferencia utilizando el mismo tampón anterior, y se deja durante 90 minutos a 100 V.

Una vez ha acabado la transferencia se incuba en solución de bloqueo (5% leche descremada en polvo, 0,01% Tween-20 en PBS 1X) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se añade a la membrana el anticuerpo anti dinitrofenilhidrazona (DAKO A/S, Denmark) a una dilución 1:100000 preparado en solución de bloqueo. Se incuba durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se deja atemperar la membrana y se realizan 3 lavados de 15 minutos con PBS 1X.

Se incuba la membrana con el anticuerpo secundario en una dilución 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan 5 lavados de la membrana de 10 minutos con un solución de 0,01% Tween-20 en PBS 1X.

El revelado de la membrana se realiza utilizando el kit quimiluminiscente ECL+Plus[®] (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), tal como indica el protocolo del kit. La quimiluminiscencia se registra utilizando el detector Fujifilm Las-6000 (Fuji Photo Film Co. Ltd., USA)

3.5.2.5 Análisis de resultados

Se densitometra tanto la imagen obtenida del escaneado del gel teñido con coomassie como la obtenida de la membrana de PVDF, utilizando el software Quantity One[®] (BioRad, Hercules, CA). Se calcula el cociente entre el valor obtenido en la densitometría de la membrana (grupos carbonilo) y el valor obtenido del mismo carril en la densitometría del gel teñido con Coomassie (carga de proteínas).

3.6 Determinación de la oxidación del ADN

3.6.1 Fundamentos del método

Para determinar la oxidación del ADN se utiliza un método de PCR semicuantitativa donde se realizan dos PCR, una de un fragmento largo donde la Taq polimerasa amplificará en menor eficiencia si el ADN está oxidado, y una PCR de un fragmento muy corto, donde la Taq polimerasa no va a encontrar diferencias de oxidación del ADN, y que se utilizará para normalizar por la cantidad de ADNmt presente en la muestra. Al tratarse de un método de PCR semicuantitativa se ha de controlar la calidad del ADN amplificado, y la cantidad exacta utilizada como molde en la PCR. A continuación se describen los métodos utilizados para extraer el ADN así como para su amplificación y cuantificación de los productos de la PCR.

3.6.2 Procedimientos

3.6.2.1 Extracción y cálculo de la concentración del ADN

Para realizar esta técnica se requiere que el ADN extraído sea de buena calidad y que no esté excesivamente fragmentado. Es importante no utilizar un protocolo de extracción que incluya agentes que pudieran oxidar al ADN, como por ejemplo el fenol, ampliamente utilizado en este proceso. Por estas consideraciones se utiliza el kit comercial de extracción de ADN “QIamp DNA Mini Kit” (QiAgen, GmbH, Germany). El protocolo para la extracción es el recomendado por el fabricante:

- Se utilizan aproximadamente dos millones de células obtenidas por tripsinización en un tubo falcon.
- Se lavan dos veces con PBS y después del segundo lavado se deja el pellet seco.
- Se resuspende con 200 µL de PBS y se traspasan a un tubo Eppendorf.
- Se añaden 20 µL de QIAGEN protease y se agita.
- Se añaden 200 µL de tampón AL (previamente agitado).
- Se incuban 10 minutos a 56°C. Se hace un spin.
- Se añaden 200 µL de etanol 96% y se mezcla durante 15 segundos. Se vuelve a hacer una spin.
- El contenido del tubo se pasa a una columna proporcionada en el kit. Se centrifuga a 6000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se pone la columna en un tubo nuevo y se descarta el tubo con el eluido.

- Se añaden 500 µL del tampón AW1 en el centro de la columna. Se vuelve a centrifugar a 6000 xg durante 1 minuto. Se descarta el eluido y se coloca la columna en un tubo nuevo.
- Se añaden 500 µL del tampón AW2 en el centro de la columna. Se centrifuga a 20000 xg durante 3 minutos. Si quedan restos de tampón AW2 se puede volver a centrifugar a 20000 xg durante un minuto.
- Se colocan las columnas en un tubo nuevo. Se añaden a la columna 200 µL de agua destilada. Se incuba a temperatura ambiente de 1 a 5 minutos y se centrifuga a 6000 xg un minuto.
- Se conserva el eluido a 4°C y se lee la concentración antes de congelar.

En este método al ser una PCR semicuantitativa es muy importante cuantificar correctamente el ADN extraído. Para ello se realiza una primera determinación del ADN tal como se describe en el apartado 3.1.4.2; y se preparan diferentes alícuotas a una concentración final de 50 ng/µL. Posteriormente se vuelve a leer la concentración de ADN de estas alícuotas y este resultado es el que se utiliza para calcular la cantidad de ADN que se pone en la PCR semicuantitativa.

3.6.2.2 PCR cuantitativa y gel de visualización de los productos

En esta técnica se requiere de la amplificación de dos fragmentos: uno largo de 8,9 kilobases (en adelante kb) y otro corto de 207 pares de bases (en adelante pb). Para ello se utilizan las siguientes condiciones:

Fragmento largo:

DNA	50/100 ng
Tampón 3.3X	1X
dNTPS	200 µM
Cebador	20 pmoles
Magnesio	1,3 mM
Taq pol [*]	1 unidad
Agua	csp 50 µL

^{*}Gene Amp[®] XL PCR kit (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Los cebadores utilizados son los siguientes:

Cebador A: 5'-TTT CAT CAT GCG GAG ATG TTG GAT GG-3'

Cebador B: 5'-TCT AAG CCT CCT TAT TCG AGC CGA-3'

Las condiciones de la PCR son las siguientes:

Pre-PCR	75°C	2 minutos	
	94°C	1 minuto	
PCR	94°C	15 segundos	} x 19 ciclos
	64°C	12 minutos	
	72°C	10 minutos	
	4°C	∞	

<u>Fragmento corto:</u>	DNA	50/100 ng
	Tampón 3.3X	1X
	dNTPS	200 µM
	Cebador	20 pmoles
	Magnesio	1,3 mM
	Taq pol*	1 unidad
	Agua	csp 50 µL

*Gene Amp® XL PCR kit (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Los cebadores utilizados son los siguientes:

Cebador C: 5'-ACT TCC TAC CAC TCA CCC TA-3'

Cebador D: 5'-TGA TAG GTG GCA CGG ACA AT -3'

Las condiciones de la PCR son las siguientes:

94°C	1 minuto	
94°C	15 segundos	} x 25 ciclos
50°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	

Los productos de las dos PCRs se visualizan en un gel de agarosa al 0.8%, según el apartado 3.1.4.4. La electroforesis se realiza durante 35 minutos a 100 V. A

continuación el gel se visualiza en un transluminador y se realiza una fotografía del mismo. La densitometría de las bandas se registra con el programa Quantity One®.

3.6.2.3 Cálculo de la eficiencia de amplificación

Para calcular la eficiencia de amplificación en cada línea celular se procede a normalizar el resultado por la cantidad de ADNmt presente en la muestra. Para ello se divide el valor obtenido en la densitometría del fragmento amplificado de 8,9 kb, por el valor correspondiente obtenido en la densitometría del fragmento amplificado de 209 pb. Después se compara el resultado obtenido de la muestra procedente de las células control con la muestra procedente de las células mutadas.

3.7 Determinación de proteínas

En algunas de las técnicas utilizadas los resultados se expresan por cantidad de proteína. Para la determinación de proteínas en la muestra se utiliza siempre el mismo método, que es un método modificado del clásico de Bradford, utilizando el reactivo Coomassie Plus™ Protein Assay Reagen (Pierce, Rockford, USA). A 50 µL de la muestra, previamente diluída para que su lectura estuviese comprendida entre el estándar inferior y el superior, se añaden 1,5 mL del reactivo de proteínas. Se agita el tubo y se lee a 595 nm. La recta patrón se realiza a partir de una solución de albúmina 2 mg/mL (Pierce, Rockford, USA), a partir de las diluciones siguientes:

	Concentración final (mg/mL)
Dilución A: 250 µL de solución albúmina + 250 µL de tampón	0,5
Dilución B: 250 µL de solución A + 250 µL de tampón	0,25
Dilución C: 250 µL de solución B + 250 µL de tampón	0,125
Dilución D: 50 µL de solución C + 200 µL de tampón	0,025

El tampón utilizado para la preparación de los estándares es el mismo que el de las muestras. A 50 µL de muestra se añade 1,5 mL del reactivo de proteínas, se agita y se lee la absorbancia a 595 nm.

3.8 Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se realizan con el programa informático SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). En el caso de la producción de peróxido de hidrógeno y del análisis de la peroxidación lipídica de las muestras, se utiliza el test no paramétrico U de Mann-Whitney. En el estudio de los inhibidores de la peroxidación lipídica *in vitro* se utiliza el test de Kruskal y Wallis. En la comparación de los resultados de los diferentes geles tanto en la oxidación de proteínas como en la oxidación del ADNmt, se utiliza el test no paramétrico de Willcoxon.

RESULTADOS

4-.RESULTADOS

4.1 Diagnóstico de pacientes

4.1.1 Paciente 1

La paciente 1 presentaba una severa miopatía asociada a diabetes mellitus y sordera de herencia materna. La combinación de diabetes mellitus y sordera de herencia materna se ha asociado a mutaciones restringidas básicamente a tres genes mitocondriales: el $\text{ARNt}^{\text{Leu(UUR)}}$, $\text{ARNt}^{\text{Ser(UCN)}}$, $\text{ARNt}^{\text{Ser(AGU/C)}}$ (DiMauro S, 1998). Se aisló el ADN del músculo de la paciente y se secuenciaron estos tres genes. Se encontró el cambio adenina por guanina en la posición 3243 del $\text{ARNt}^{\text{Leu(UUR)}}$.

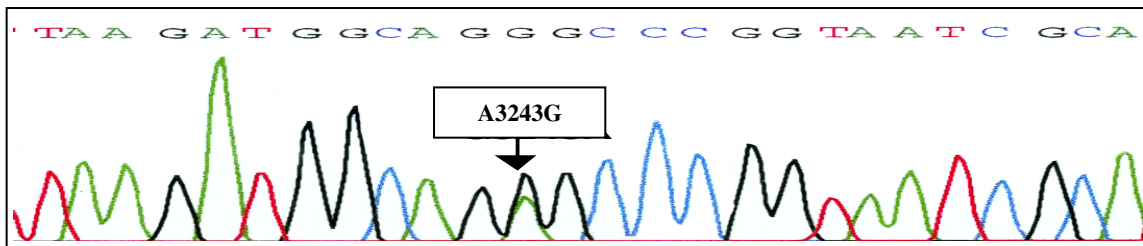


Figura 20: Electroferograma del gen $\text{ARNt}^{\text{Leu(UUR)}}$ de la paciente 1 de ADN extraído de músculo. Se aprecia la mutación A3243G en forma heteroplásmia.

Una vez se conoció la mutación de la paciente, se procedió a analizar el porcentaje de genomas mitocondriales que contenían la mutación en los tejidos disponibles, tanto de la paciente índice como de los familiares más cercanos. El análisis de RFLP con el ADN de la paciente y del resto de familiares disponibles, mostró que la paciente tenía un 80% del ADNmt mutado en el músculo y un 53% mutado en la sangre. Los miembros de la familia que actualmente son asintomáticos también presentaban la mutación en sangre, y en algunos casos los porcentajes de mutación eran muy elevados, como en el caso del hijo de la paciente (84% del ADNmt mutado).

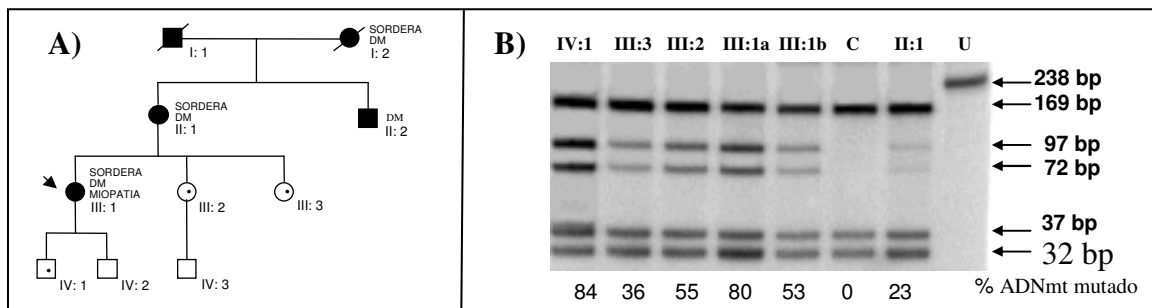


Figura 21: A) Pedigrí miembros de la familia de la paciente 1 (III:1). Los individuos coloreados en negro presentan afectación (diabetes, sordera o ambas (DM = diabetes mellitus)). · indica que individuo es asintomático para la mutación. B) Análisis de RFLP de miembros de la familia descritos en el panel A). Si no existe mutación el enzima de restricción Hae III corta el fragmento de 238 pb en tres fragmentos de 169, 34 y 32 pb. La mutación crea una nueva diana y se corta el fragmento de 169 pb en dos de 97 y 72 pb. III:1a = músculo de la paciente; III:1b = sangre de la paciente 1; U = fragmento sin cortar; C = músculo control.

4.1.2 Paciente 2

La paciente 2 estaba afectada de lipomas múltiples y el pedigrí familiar sugería que podían ser de herencia materna.

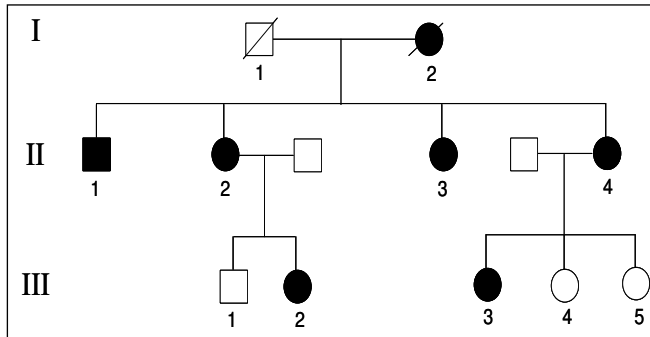


Figura 22. Pedigrí de la paciente 2 (III:2). Los individuos afectados están coloreados en negro, y los no afectados en blanco.

El síndrome de lipomatosis múltiple simétrica de herencia materna (MSL), se ha asociado a tres tipos diferentes de mutaciones en el ADNmt:

- deleciones grandes y únicas
- deleciones múltiples
- mutaciones puntuales en el gen del ARNt^{Lys}.

La mutación puntual más habitual en este gen es el cambio de adenina por guanina en la posición 8344 (Berkovic SF, 1991), o excepcionalmente el cambio guanina por adenina en la posición 8363 (Casali C, 1999). Se procedió en primer lugar a secuenciar el gen del ARNt^{Lys} y se encontró el cambio A8344G en el ADNmt procedente de la biopsia de lipoma.

De igual manera que en el paciente anterior, se procedió a analizar la cantidad de genomas mitocondriales que contenían la mutación mediante el análisis por RFLP.

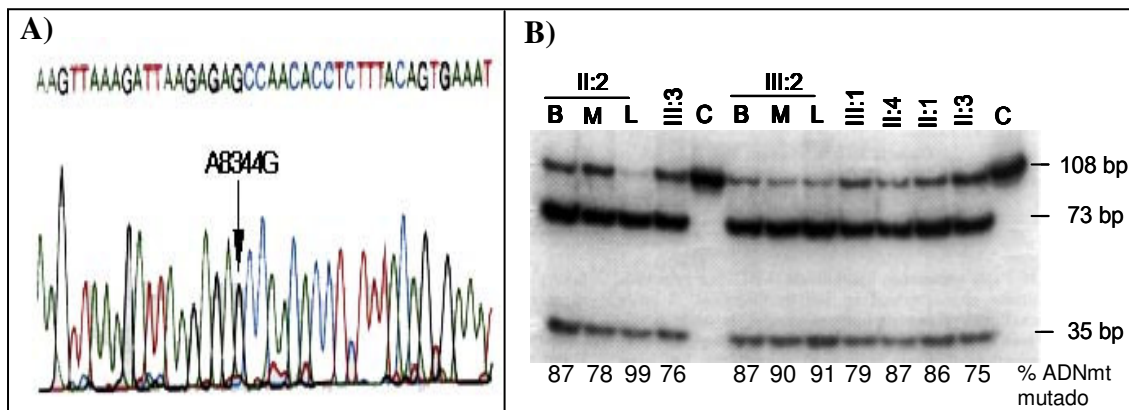


Figura 23. En el panel A se muestra el electroferograma de la secuencia del ARNt^{Lys} de la paciente 2, donde se observa la mutación A8344G. En el panel B se observa el análisis por RFLP de la familia de la paciente 2. La mutación genera una diana de corte para el enzima de restricción Bgl I, que digiere el fragmento original de 108 pb en dos fragmentos de 73 y 35 pb. Tanto de la paciente 2 (III:2) como de su madre (II:2) se estudiaron los siguientes tejidos: B = sangre, M = músculo, L = lipoma. C = ADNmt extraído de sangre de controles. En el resto de pacientes estudiados en el pedigrí, el ADNmt extraído provenía de la sangre.

El análisis de RFLP, con los miembros de la familia de la paciente 2 (III:2) descritos en el pedigrí mostró que la mutación también estaba presente en la sangre de todos los individuos afectados. La paciente 2 presentaba un 91% de genomas mutados en el lipoma, un 90% en el músculo y un 87% en la sangre. Estos mismos tejidos se estudiaron en el ADNmt de la madre (II:2 en el pedigrí), y se encontró que en lipoma tenía el 99% de los genomas mutados, el 78% en el músculo y en la sangre el 87%.

4.1.3 Paciente 3

La paciente 3 presentaba un cuadro multisistémico que se había ido complicando con la edad, con afectación a múltiples órganos y tejidos, incluyendo el sistema nervioso central. En esta ocasión se pudo realizar un estudio de la biopsia muscular, que mostró una actividad SDH normal, sin presencia de fibras rojo-rasgadas, pero con un marcado déficit de actividad COX, ya que solo el 10% de las fibras presentaban actividad COX.

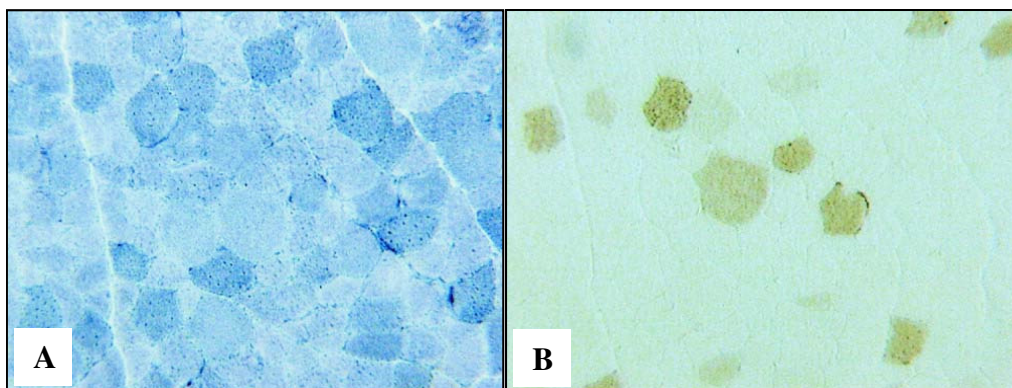


Figura 24. Histoquímica del músculo de la paciente 3. En el panel A se observa la tinción para la actividad SDH que es normal. En el panel B se observa la tinción para la actividad COX, donde se observan muy pocas fibras COX positivas.

Posteriormente se analizó la actividad de los enzimas de la cadena respiratoria, revelando un claro déficit de la actividad del complejo IV al compararlo con valores controles:

Valor observado en la paciente: 0.22 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido

Valor observado en controles: 2.8 ± 0.52 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido

Este déficit era aislado para el complejo IV, ya que el resto de complejos de la cadena respiratoria presentaban actividades normales.

Se decidió secuenciar las tres subunidades codificadas por el ADNmt del complejo IV (*COI*, *COII* y *COIII*), y se encontró el cambio de guanina por adenina en la posición 6930, en el gen de la subunidad I. La mutación cambia un triplete que codificaba el

aminoácido glicina (GGA), por un codón de terminación de la traducción. Este hecho provoca la pérdida de los últimos 170 aminoácidos de la región C-terminal de esta subunidad.

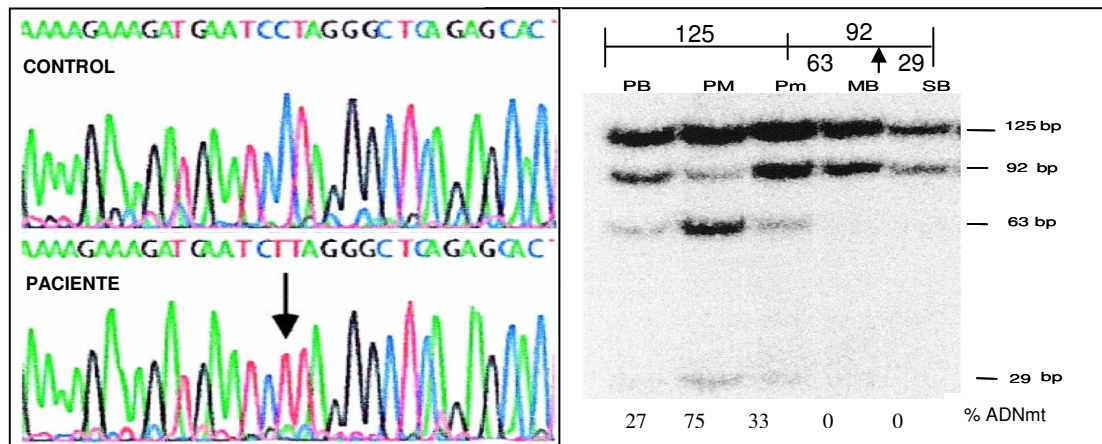


Figura 25. En el panel izquierdo se puede observar el electroferograma del gen *COI*, mostrando la secuencia de ADNmt de un músculo control y del músculo de la paciente 3. La reacción de secuenciación se realizó con el cebador reverso, por lo que el cambio de G a A, aquí se observa como de C a T (indicado con una flecha). En el panel derecho se observa el análisis de RFLP para la mutación encontrada. La mutación genera una diana de restricción para el enzima *Alu I*, que corta el fragmento de 92 pb en dos fragmentos (63 pb y 29 pb). PB = sangre de la paciente; PM = músculo de la paciente; Pm = mioblastos de la paciente; MB = sangre de la madre; SB = sangre de la hermana.

Se procedió a realizar un análisis de RFLP de diferentes tejidos de la paciente y de sangre de la hermana para observar si la mutación se presentaba en estado homoplásmico o heteroplásmico. El análisis por RFLP demostró que la mutación era heteroplásmica en la sangre de la paciente, ya que presentaba un 27% de los genomas mutados, también lo era en el músculo ya que presentaba un 75% de heteroplasmia, y en los mioblastos cultivados (33%).

4.1.4 Paciente 4

El paciente estaba afectado de BSN (necrosis bilateral del estriado), pero no presentaba historia familiar de enfermedades neurodegenerativas. Se han descrito casos de BSN asociados a mutaciones en genes del ADNmt, básicamente en polipéptidos del complejo I (*ND6* y *ND4*) y de la ATPasa (*ATPase 6* y *ATPase 4*). Con la finalidad de estudiar si la BSN era de origen mitocondrial, se decidió estudiar la biopsia muscular. En este caso también se pudo realizar un análisis de las fibras musculares por inmunohistoquímica. Este análisis reveló que unas pocas fibras presentaban actividad SDH y actividad COX aumentadas en la periferia, y ausente en el citoplasma, indicativo de que solo quedaban mitocondrias sanas en la periferia de estas fibras.

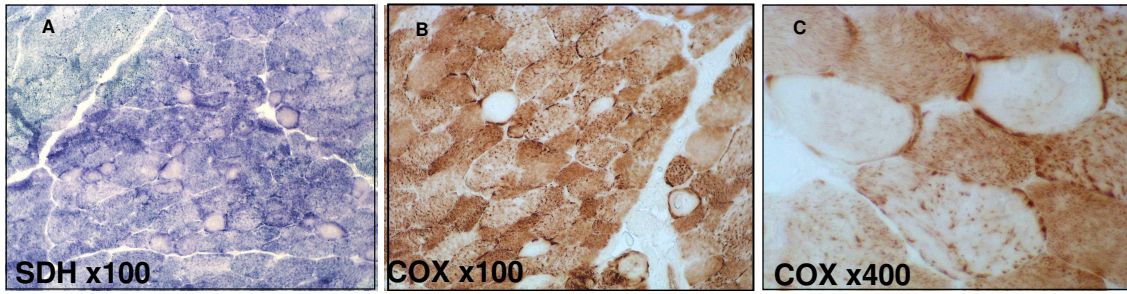


Figura 26. Histoquímica del paciente 4. En el panel A) se observa la tinción histoquímica para la actividad SDH, que desveló unas pocas fibras rojo-rasgadas. En el panel B) la tinción para la actividad COX dio positiva, pero se encontraron fibras que solo presentaban dicha actividad en la periferia. En el panel C) se pueden observar estas fibras con más detalle.

Posteriormente se procedió a realizar un análisis bioquímico de los enzimas de la cadena respiratoria permitió observar un déficit aislado del complejo I, sugiriendo que el defecto molecular podía estar en algún gen del ADNmt que codificara para alguna subunidad de la NADH-deshidrogenasa.

	Controles	Paciente 4
NADH-Cit c Reductasa (I +III)	12-56	4.93
Succinato Deshidrogenasa (II)	10-25	9.33
Decilubiquinol Cit c oxidoreductasa (III)	55-259	73.8
Citocromo c oxidasa (IV)	59-170	99.9
Citrato sintasa (CS)	7-20	19.8

Tabla 5. Actividades de los enzimas de la cadena respiratoria en el músculo de la paciente 4. Los valores están expresados como nmol x min / mg prot. La diferencia significativa está marcada en gris.

Después de secuenciar los genes del ADNmt codificados por los polipéptidos del complejo I de la cadena respiratoria, se encontró la mutación que provocaba el cambio de timina a citosina en la posición 14487 en el gen que codifica para la subunidad ND6.

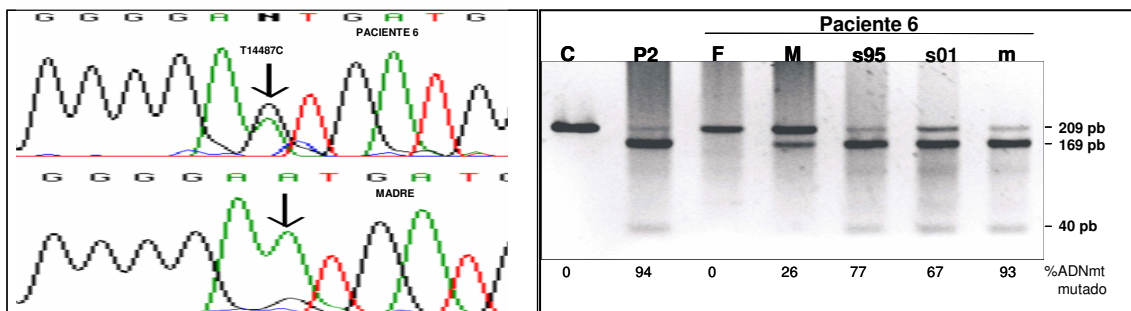


Figura 27. En el panel izquierdo se muestra el electroferograma del gen ND6. Se utilizó un cebador reverse, así la mutación aparece en la secuencia como un cambio de A a G. La secuencia superior corresponde al ADNmt del músculo de la paciente 4, y la inferior a la sangre de la madre, donde se aprecia la posible presencia de más genomas mutados. En el panel de la derecha se observa el análisis por RFLP de la mutación T14487C en la paciente 4. En la presencia de la mutación el fragmento de 209 pb es cortado en dos fragmentos (169 pb y 40 pb) por el enzima Gsu I. C= ADNmt de músculo control; F= padre del paciente 4; M= madre de la paciente 4 ; S95 y S01= sangre del paciente 6 extraída el 1995 y el 2001 respectivamente; m= músculo de la paciente; P2= sangre de un segundo paciente afectado de BSN, portador de la mutación T14487C (Dr Montoya)

La mutación aparecía en estado de heteroplasmia en la secuencia del músculo de la paciente como en la sangre de la madre, y era un cambio hasta entonces no descrito en la literatura. Por ello se secuenciaron 150 ADNmt de individuos controles sanos y no se detectó la base mutada en ninguno de ellos.

Para estudiar la patogenicidad de la mutación se realizó un análisis de RFLP en los tejidos disponibles de la paciente y familiares. Como la mutación no creaba ni destruía ninguna diana de restricción, se diseñó un cebador reverso que al utilizarlo para amplificar el fragmento crearía una diana (cebador “missmatch”) (5'-GTTTTTAAATTTATTTAGCTGGA - 3'), que en presencia de la mutación, genera un punto de corte para el enzima Gsu I. La mutación era heteroplásmica, presentándose con una elevada proporción de genomas mutados en el músculo (93%).

Se midió el porcentaje de la mutación en dos muestras de sangre del paciente, una extraída el año 1995 (77% de ADNmt mutado) y otra el año 2001 (67% de ADNmt mutado). La mutación también estaba presente en la sangre de la madre (26% de ADNmt mutado). El estudio de esta paciente se realizó en estrecha colaboración con el grupo del Dr. Montoya, de la Universidad de Zaragoza. A la vez que se estudiaba al paciente 4, se identificó la misma mutación T14487C en otro paciente afecto de BSN.

4.2 Estudio de la producción de ROS y daño oxidativo

4.2.1 Generación de híbridos mitocondriales

Se consiguieron aislar plaquetas de todos los pacientes descritos en la sección de material y métodos, y se fusionaron con células ρ^0 para formar híbridos mitocondriales, tal y como se ha explicado en el apartado 3.2.1. Después de la fusión se seleccionaron diferentes clones y se analizó el tanto por ciento de mutación de cada uno de los clones mediante la técnica de RFLP.

No se pudieron obtener todos los clones esperados ya que por ejemplo tanto del paciente 1 como del paciente 4, no se consiguió un clon que no presentara la mutación. Así los clones que se obtuvieron fueron los siguientes (se indica también el nombre utilizado para identificar las líneas):

- Paciente 1: MELAS_100%
- Paciente 2: MERRF_0% y MERRF_100%
- Paciente 3: COX_0% y COX_100%
- Paciente 4: ND6_100%

Tanto la línea celular MELAS_100% como la línea celular ND6_100% se compararon durante todo el estudio con la línea celular MERRF_0%. Se escogió esta línea celular y no la línea COX_0%, porque a esta última se le añadía uridina en el medio de cultivo ya que COX_100% así lo requería para su viabilidad.

4.2.2 Análisis del haplotipo mitocondrial de las diferentes líneas celulares

Con el objetivo de conocer si nuestras líneas celulares pertenecían a algún haplotipo mitocondrial en particular, se procedió a su determinación siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.1.4.8 de la sección de materiales y métodos. A continuación se muestra una figura del análisis de restricción realizado para el polimorfismo C7028T:

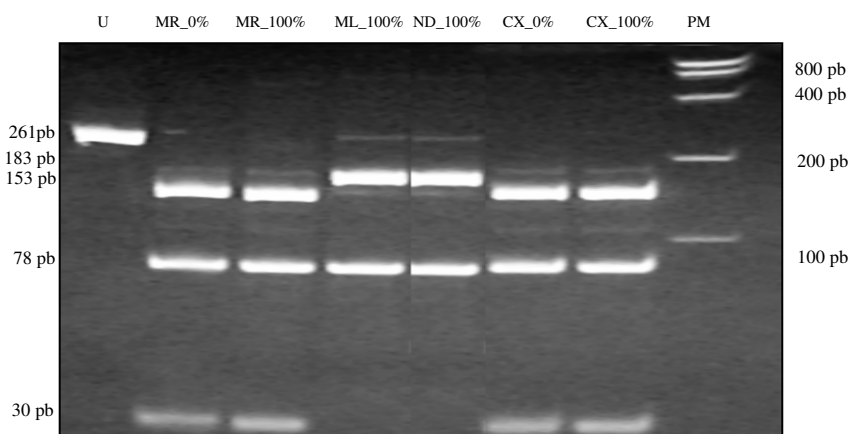


Figura 28. Gel de acrilamida 12%. RFLP realizada con el enzima Alu I. El fragmento amplificado posee una diana interna para el enzima, y si además presenta el polimorfismo C7028T, cortará otra vez más. U = fragmento sin digerir; MR_0% = MERRF_0%; MR_100% = MERRF_100%; ML_100% = MELAS_100%; ND_100% = ND6_100%; CX_0% = COX_0%; CX_100% = COX_100% y PM = marcador de peso molecular.

Todas las líneas celulares exceptuando MELAS_100% y ND6_100% presentaron el polimorfismo buscado, por lo que de momento se pudo concluir (siguiendo el esquema presentado en la tabla descrita en el apartado 3.1.4.8 de la sección de material y métodos), que estas dos líneas celulares eran del haplotipo mitocondrial H, mientras que de momento no se conocía el de las demás.

Se procedió de la misma manera a realizar la técnica de RFLP para el polimorfismo T4216C y se observó que lo presentaban todas las líneas celulares, por lo que ya solo podían ser haplotipo mitocondrial J o T. Para averiguar definitivamente a cuál de los dos pertenecían, se realizó otro análisis por RFLP para el polimorfismo G13708A,

observándose que todas las líneas lo presentaban. Así finalmente los haplotipos mitocondriales de las líneas celulares fueron los siguientes:

- MERRF_0% y MERRF_100%: Haplotipo T
- COX_0% y COX_100%: Haplotipo T
- MELAS_100% y ND6_100%: Haplotipo H

4.2.3 Producción de peróxido de hidrógeno de las diferentes líneas celulares

Se analizó la producción de peróxido de hidrógeno en todas las líneas celulares como medida indirecta de la producción de ROS.

4.2.3.1 Línea MERRF

Los resultados presentados a continuación son el resultado de experimentos independientes realizados por duplicado:

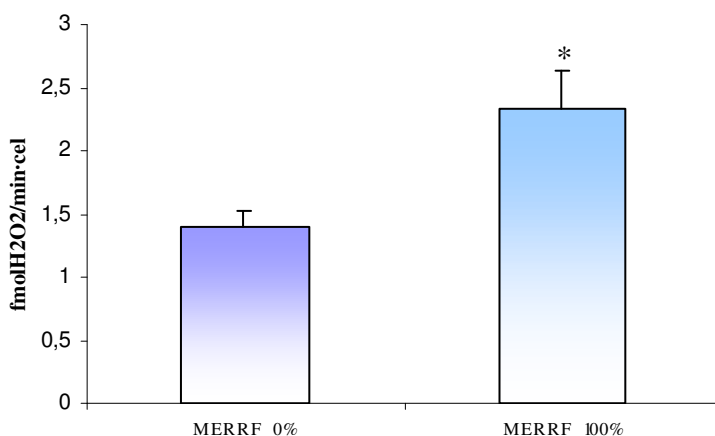


Figura 29. Producción de H₂O₂ de la línea celular portadora de la mutación de MERRF y de su control isogénico. (*: p<0.01)

	MERRF_0%	MERRF_100%
Media	1,391	2,341
Mínimo	1,216	1,868
Máximo	1,576	2,664
Desviación estándar	0,132	0,293
N	6	7
p	<0,01	

Tabla 6. Resumen de resultados de la línea celular portadora de la mutación MERRF y de su control isogénico.

La producción de peróxido de hidrógeno fue mayor en la línea portadora de la mutación (MERRF_100%) que en la línea control (MERRF_0%). En la línea control el valor medio obtenido de producción de peróxido de hidrógeno fue de 1.391 fmol H₂O₂/min·célula, mientras que en la línea portadora de la mutación el valor medio obtenido fue claramente superior (2.341 fmol H₂O₂/min·célula). El análisis estadístico reflejó que las dos poblaciones eran diferentes (p<0.01).

4.2.3.2 Línea MELAS

La producción de peróxido de hidrógeno de la línea portadora de la mutación de MELAS, se comparó con la línea control MERRF_0%, al no poder disponer de un control isogénico.

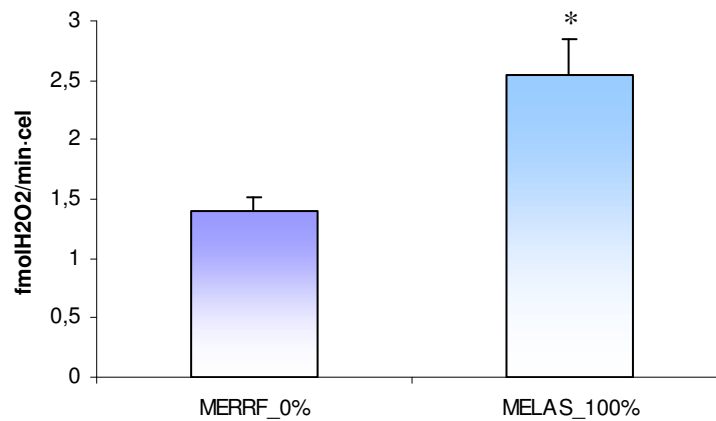


Figura 30. Producción de H₂O₂ de la línea celular portadora de la mutación de MELAS y del control MERRF_0%. (*; p<0.01)

	MERRF_0%	MELAS_100%
Media	1,391	2,548
Mínimo	1,216	1,964
Máximo	1,576	2,832
Desviación estándar	0,132	0,298
N	6	7
p		<0,01

Tabla 7. Resumen de resultados de la línea celular portadora de la mutación MELAS y del control MERRF_0%.

En este caso, como en el anterior la producción de peróxido de hidrógeno fue mayor en la línea con la mutación (MELAS_100%), que la línea control (MERRF_0%). La producción de peróxido de hidrógeno fue en la línea celular mutada de 2.548 fmol H₂O₂/min·célula, en comparación con la de la línea control que fue de 1.391 fmol H₂O₂/min·célula. El análisis estadístico reflejó que las dos poblaciones eran diferentes (p<0.01).

4.2.3.3 Línea COX

Se comparó la producción de peróxido de hidrógeno en la línea celular mutada respecto a la línea control, que en este caso era su control isogénico.

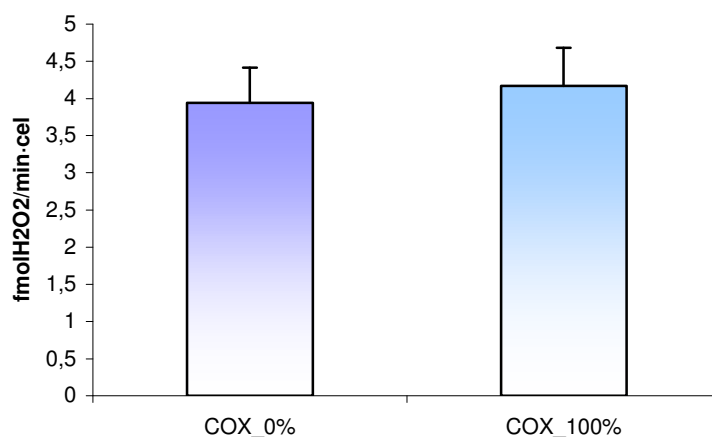


Figura 31. Producción de H₂O₂ de la línea celular portadora de la mutación G6930A y de su control isogénico.

	COX_0%	COX_100%
Media	3,943	4,170
Mínimo	3,288	3,212
Máximo	5,132	4,822
Desviación estándar	0,472	0,514
N	15	11
p	0,180	

Tabla 8. Resumen de resultados de la línea celular portadora de la mutación G6930A y de su control control isogénico.

En este caso, no existieron diferencias apreciables en cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno entre la línea celular mutada (COX_100%) y la línea control (COX_0%). Analizando los datos numéricos presentados en la tabla, se observa que la producción de peróxido de hidrógeno en la línea control fue de 3.943 fmol H₂O₂/min·célula y en la línea mutada de 4.170 fmol H₂O₂/min·célula, prácticamente iguales. El análisis estadístico confirmó que que no había diferencias significativas en cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno entre las dos líneas.

4.2.3.4 Línea ND6

La línea mutada ND6_100% tampoco se pudo comparar respecto a un control isogénico ya que no se pudo obtener, por lo que los resultados se compararon respecto al control MERRF_0%.

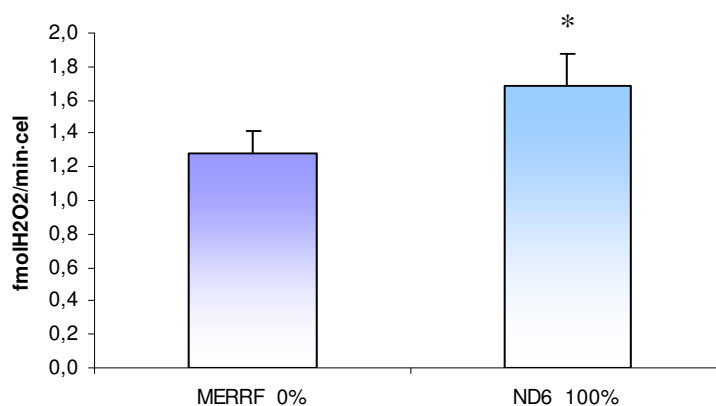


Figura 32. Producción de H₂O₂ de la línea celular portadora de la mutación T14487C en la subunidad ND6 y de la línea control MERRF_0%. (*: p<0.05)

	MERRF_0%	ND6_100%
Media	1,282	1,693
Mínimo	1,080	1,480
Máximo	1,400	1,920
Desviación estándar	0,139	0,183
N	4	4
p	<0,05	

Tabla 9. Resumen de resultados de la línea celular portadora de la mutación T14487C y de la línea control MERRF_0%.

La producción de peróxido de hidrógeno de la línea mutada (ND6_100%) fue claramente superior a la producción de la línea control (MERRF_0%). Analizando los datos numéricos presentados en la tabla se observa que la producción de peróxido de hidrógeno de la línea mutada fue de 1.693 fmol H₂O₂/min·célula mientras que la de la línea control fue de 1.282 fmol H₂O₂/min·célula. EL análisis estadístico de los resultados refleja que los dos grupos son claramente diferentes (p<0.05).

4.2.4 Estudio de la peroxidación lipídica en las diferentes líneas

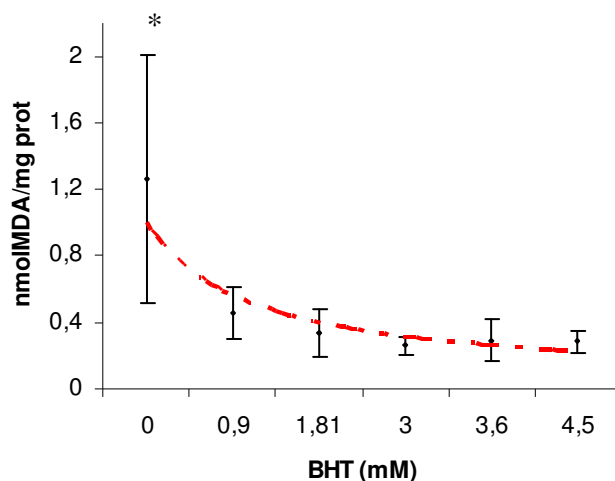
Antes de proceder a analizar la oxidación lipídica en las diferentes líneas celulares se estudiaron los distintos antioxidantes utilizados en la literatura y la concentración para evitar la oxidación *in vitro*.

4.2.4.1 Optimización del método de determinación de MDA: estudio de la concentración de BHT o EDTA

Los estudios para analizar la concentración de BHT y EDTA se realizaron en días diferentes dado que en estos estudios se precisaban un número importante de células. Se obtuvieron los siguientes resultados.

4.2.4.1.1 Estudio de la concentración de BHT

El experimento se realizó tres veces en tres días diferentes, y se obtuvo la siguiente curva de inhibición de la peroxidación lipídica *in vitro*:



Al no añadir BHT existía una gran dispersión de resultados, con valores muy elevados de MDA. A concentraciones muy bajas de BHT se observó una gran disminución de la dispersión y una disminución muy importante de los valores de MDA obtenidos.

Figura 33. Inhibición de la producción de MDA *in vitro* por adición de BHT. A muy bajas concentraciones de BHT ya se observa inhibición. (*; p<0.05)

Concentración	Media	Desviación estándar
0 mM	1,263	0,747
0,9 mM	0,455	0,158
1,81 mM	0,338	0,141
3 mM	0,262	0,056
3,6 mM	0,292	0,126
4,5 mM	0,287	0,067

Tabla 10. Media de los valores de MDA (nmolMDA/mg prot) obtenidos por cada concentración de BHT utilizada.

Observando la tabla que muestra la media de los diferentes valores obtenidos, el valor máximo de inhibición se obtuvo a una concentración de BHT de 3 mM, que es el valor al cual la concentración de MDA obtenida fue menor (0.262 nmolMDA/mg prot). Además es con este valor con el que se obtuvo una menor desviación estándar.

Para la comparación estadística de los resultados se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis que solamente reveló diferencias entre el valor de MDA obtenido, cuando no se utilizaba BHT con todos los demás valores ($p < 0.05$). Los valores de MDA obtenidos con el resto de concentraciones de BHT no se diferenciaron estadísticamente entre sí.

4.2.4.1.2 Estudio de la concentración de EDTA

Igual que en el estudio de la concentración de BHT, también se realizó este estudio en tres días diferentes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

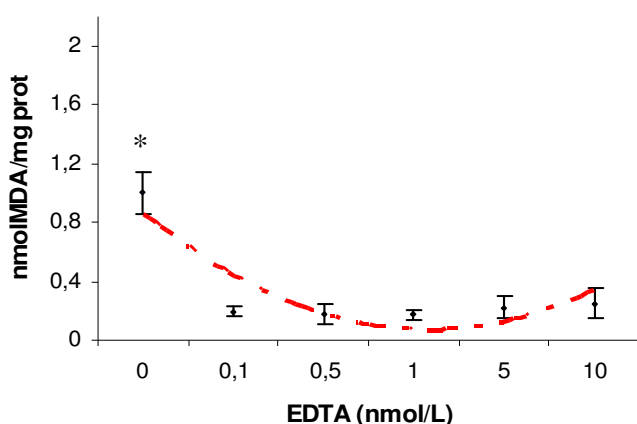


Figura 34. Inhibición de la producción de MDA *in vitro* por adición de EDTA. A muy bajas concentraciones de EDTA ya se observa inhibición. (*; $p < 0.05$)

Los resultados fueron muy similares a los obtenidos en el experimento anterior con BHT. Se observó que al no añadir EDTA, los valores de MDA fueron muy elevados, mientras que al añadir pequeñas concentraciones de EDTA disminuyeron drásticamente los valores de MDA.

Concentración	Media	Desviación estándar
0 mM	0,999	0,143
0,1 mM	0,196	0,033
0,5 mM	0,179	0,067
1 mM	0,174	0,035
5 mM	0,222	0,071
10 mM	0,251	0,104

Tabla 11. Media de los valores de MDA (nmolMDA/mg prot) obtenidos por cada concentración de EDTA utilizada.

Al seguir aumentando la concentración de EDTA, los valores disminuyeron todavía un poco más, llegando a un valor mínimo de MDA de 0.174 nmol/mg prot a una concentración de EDTA de 1 mM. A concentraciones mayores de EDTA (5 y 10 mM) los niveles de MDA obtenidos eran mayores, pero de igual manera aumenta la desviación estándar.

Al analizar estadísticamente los niveles de MDA obtenidos a cada concentración de EDTA, solamente se encontraron diferencias cuando no se había añadido EDTA con el resto de valores ($p < 0.05$). Los valores de MDA obtenidos con el resto de concentraciones de EDTA no eran estadísticamente diferentes entre sí (Prueba de Kruskal-Wallis).

4.2.4.1.3 Estudio del mejor inhibidor. ¿Sólos o combinados?

Una vez observado que los dos compuestos inhibían de una manera importante la peroxidación lipídica *in vitro*, se planteo la cuestión de cuál era más conveniente utilizar. Los dos inhibidores actúan de diferente manera, el EDTA es un quelante de metales y el BHT es un antioxidante, por lo que se decidió estudiar si era posible mejorar su efecto combinando los dos en la misma reacción. Para ello se analizaron en un mismo experimento la concentración de BHT y EDTA a la que parecía se habían obtenido mejores resultados (3 mM y 0.5 mM respectivamente) y tres combinaciones a diferentes concentraciones de BHT más EDTA (ver tabla). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	BHT 3mM	EDTA 0.5 mM	Concentraciones de BHT + EDTA		
			1.81 + 0.1 mM	3 + 0.5 mM	4.5 + 1 mM
Media	0,100	0,166	0,123	0,113	0,113
Desviación estándar	0,014	0,001	0,011	0,031	0,018

Tabla 12. Valores de MDA (nmolMDA/mg prot) obtenidos en el estudio de la búsqueda mejor inhibidor. Se probó la adición de BHT y EDTA tanto por separado como combinados.

En la tabla se observa que el valor mínimo de MDA se obtuvo utilizando BHT sólo en la reacción, a una concentración de 3 mM. El hecho de añadir BHT y EDTA en la misma muestra, no mejoró los valores de MDA obtenidos, siendo incluso un poco superiores. Después de comparar estadísticamente los valores obtenidos de MDA en cada situación solamente se encontraron diferencias en el valor de EDTA 0.5 mM con el resto de valores ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis).

4.2.4.1.4 Efecto del BHT y el EDTA en la reacción MDA-TBA

Para excluir la posibilidad de que la disminución observada en los valores obtenidos de MDA al añadir BHT o EDTA, fuese debida a una interacción de estos en la reacción del MDA con el TBA, se procesaron diferentes rectas patrón añadiendo en cada caso BHT, EDTA, BHT más EDTA, etanol (ya que el BHT se disolvió en este líquido) y agua (ya que el EDTA se disolvió en este líquido). Estos fueron los parámetros obtenidos de las rectas analizadas:

	Pendiente (Error estándar)	Ordenada en el origen (Error estándar)	Error estándar de la estimación	r
BHT	1,70E6 (58440)	39427 (25271)	40699	0,998
EDTA	1,53E6 (19364)	49452 (8374)	13485	0,999
EtOH	1,49E6 (53633)	46323 (25033)	40317	0,997
BHT+EDTA	1,50E6 (38798)	46474 (16777)	27019	0,999
H ₂ O	1,59E6 (8395)	36785 (3918)	6310	0,999

Tabla 13. Parámetros de las rectas obtenidas utilizando tanto los dos inhibidores de la peroxidación lipídica así como los tampones en que están disueltos.

Las pendientes encontradas en todos los experimentos fueron muy similares, así como los coeficientes de correlación de cada recta (r). Analizando de forma estadística si las diferentes rectas patrón eran iguales o diferentes, se obtuvo que todas ellas eran iguales

($p > 0.05$; Prueba de comparación de líneas de regresión), por lo que ni el BHT ni el EDTA, ni la combinación de los dos, interfieren en la reacción MDA-TBA.

4.2.4.2 Estudio de la peroxidación lipídica en MERRF

Una vez determinado que antioxidante utilizar y a qué concentración (BHT, 3mM), se procedió a analizar la peroxidación lipídica en las diferentes líneas celulares. La primera línea celular analizada era la portadora de la mutación de MERRF.

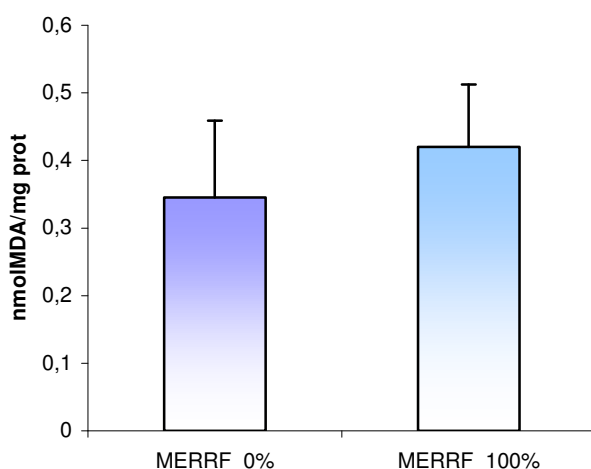


Figura 35. Valores de MDA obtenidos en la línea celular portadora de la mutación A8344G y de su control isogénico.

	MERRF_0%	MERRF_100%
Media	0,345	0,420
Desviación estándar	0,114	0,092
N	18	18
p	0,4	

Tabla 14. Media de los valores de MDA (nmol MDA/mg prot) obtenidos en las diferentes determinaciones. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Mann Whiney.

Los valores obtenidos de MDA para la línea control fueron muy similares a los obtenidos para la línea portadora de la mutación. El valor medio de MDA para línea control fue de 0.345 nmol MDA/ mg proteína y para la línea con mutación 0.420 nmol

MDA/ mg proteína. El análisis estadístico confirmó que no existían diferencias entre los dos valores de MDA.

4.2.4.3 Estudio de la peroxidación lipídica en MELAS

La siguiente línea celular en la que se estudió si existía daño oxidativo en los lípidos fue la línea que era portadora de la mutación A3243G (MELAS_100%), que se comparó con la línea MERRF_0%. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

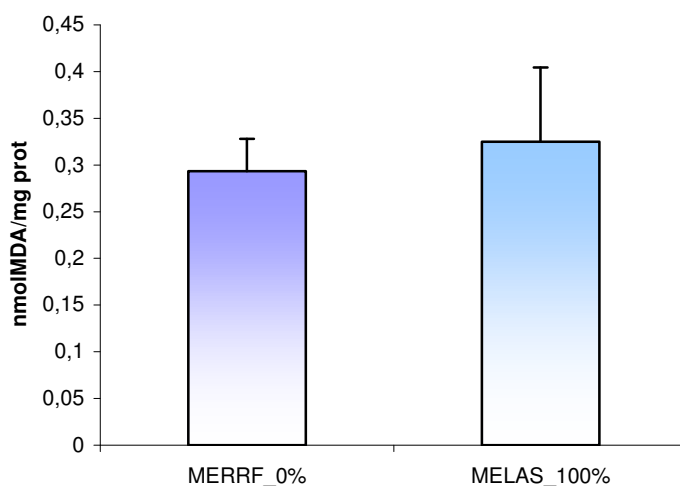


Figura 36. Valores de MDA obtenidos en la línea celular portadora de la mutación A3243G y del control MERRF_0%.

	MERRF_0%	MELAS_100%
Media	0,293	0,325
Desviación estándar	0,035	0,079
N	18	18
p	0,513	

Tabla 15. Media de los valores de MDA (nmol MDA/mg prot) obtenidos en las diferentes determinaciones. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Mann Whitney.

Igual que en el caso anterior los valores obtenidos en la línea control y mutada fueron muy similares. El valor medio obtenido con la línea mutada fue de 0.325 nmol MDA/ mg proteína, mientras que el valor medio de la línea control fue de 0.293 nmol

MDA/mg proteína. El análisis estadístico confirmó que los valores de MDA obtenidos no eran diferentes estadísticamente.

4.2.4.4 Estudio de la peroxidación lipídica en COX

En este caso se comparó la peroxidación lipídica en la línea portadora de la mutación G6930A versus su control isogénico, no portador de dicha mutación. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

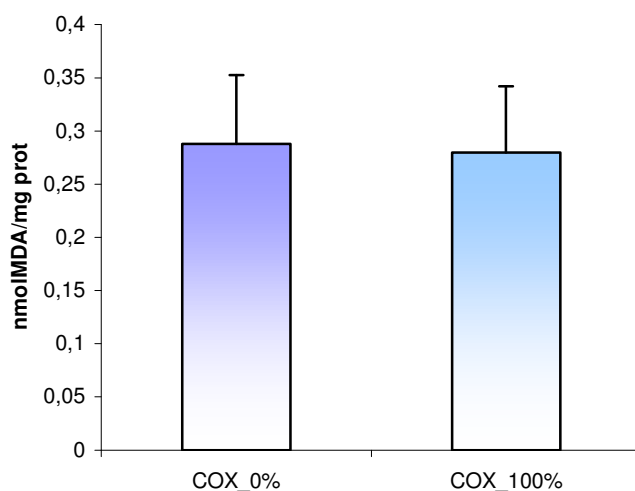


Figura 37. Valores de MDA obtenidos en la línea celular portadora de la mutación G6930A y de su control isogénico.

	COX_0%	COX_100%
Media	0,288	0,280
Desviación estándar	0,065	0,063
N	14	14
p	0,804	

Tabla 16. Media de los valores de MDA (nmol MDA/mg prot) obtenidos en las diferentes determinaciones. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Mann Whiney.

Los valores obtenidos de MDA en la línea control y mutada fueron prácticamente los mismos. En la línea control el valor medio de MDA fue de 0.288 nmol MDA/mg prot, y

en la línea mutada fue de 0.280 nmol MDA/ mg proteína. El análisis estadístico confirmó que los valores obtenidos de MDA en las dos líneas celulares eran iguales.

4.2.4.5 Estudio de la peroxidación lipídica en ND6

Se analizó la peroxidación lipídica en la línea portadora de la mutación T14487C comparándola con la línea control MERRF_0%.

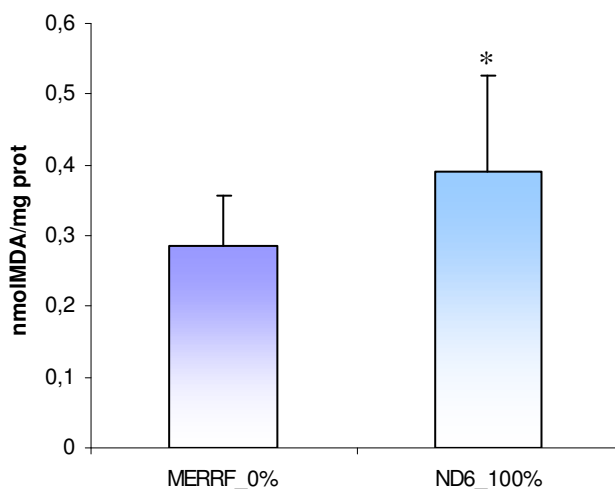


Figura 38. Valores de MDA obtenidos en la línea celular portadora de la mutación T14487C y del control MERRF_0%. (*; p<0.05)

	MERRF_0%	ND6_100%
Media	0,286	0,391
Desviación estándar	0,071	0,134
N	14	16
p	0,028	

Tabla 17. Media de los valores de MDA (nmol MDA/mg prot) obtenidos en las diferentes determinaciones. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Mann Whiney.

En la línea mutada ND6_100% los valores obtenidos de MDA fueron mayores a los obtenidos en la línea control. La línea mutada presentaba unos niveles de MDA de 0.391 nmol MDA/ mg proteína, mientras que la línea control de 0.286 nmol MDA/ mg

proteína. El análisis estadístico de los valores de MDA obtenidos en la línea mutada y la línea control concluyó que estos eran diferentes, por lo que en la línea mutada portadora de la mutación T14487C presentaba un incremento de la peroxidación lipídica.

4.2.5 Estudio de la oxidación de proteínas

Para estudiar la oxidación de las proteínas se realizaron como mínimo tres experimentos de western-blot en cada línea celular en tres pases diferentes de las células. En cada línea celular se muestra la imagen de un experimento representativo. En la representación gráfica de los resultados se ha calculado el incremento de oxidación de las líneas celulares mutadas respecto a las líneas control en tanto por ciento, una vez normalizados los valores por la carga de proteínas.

4.2.5.1 Estudio de la oxidación de proteínas en MERRF

A continuación se muestra el resultado del gel teñido con Coomassie y la membrana del western-blot:

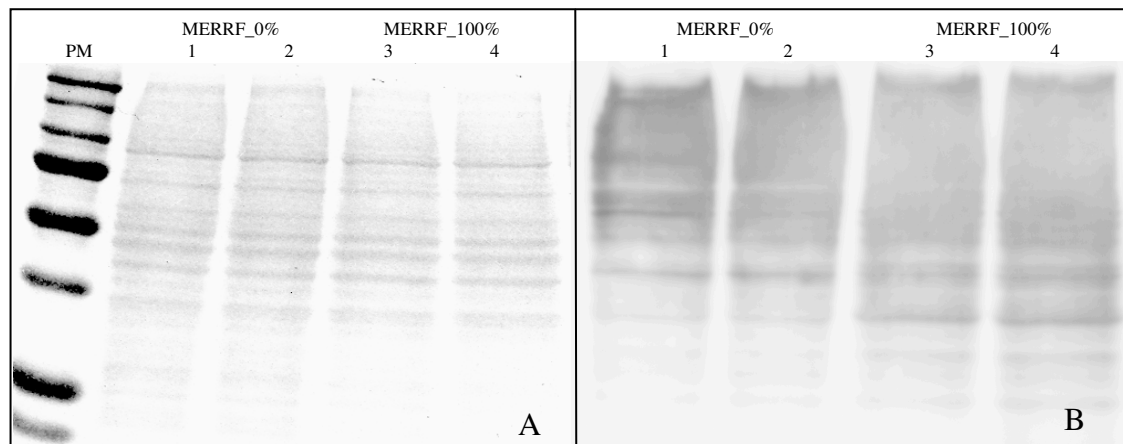


Figura 39. En el panel A se muestra la membrana teñida con Coomassie y en el panel B se muestra la membrana de western-blot. Los carriles 1 y 2 tanto del panel A como del panel B corresponden a las proteínas de la línea control (MERRF_0%) y los carriles 3 y 4 a las proteínas de la línea mutada (MERRF_100%).

Después de normalizar los resultados por la carga de proteínas se comparó la oxidación de las proteínas en la línea celular control y mutada como incremento de oxidación de la línea celular mutada respecto a la línea control.

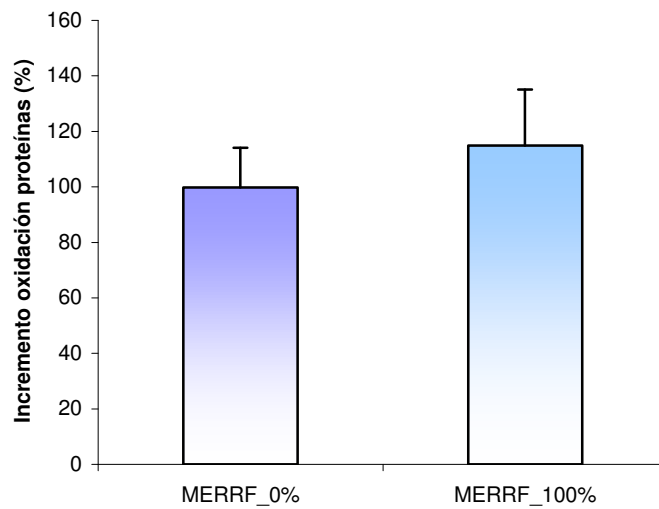


Figura 40. Oxidación de proteínas de la línea celular mutada respecto a la línea control (considerada como el 100%).

	MERRF_0%	MERRF_100%
Media	99,8	114,9
Desviación estándar	14,3	20,2
N	3	3
p	0,285	

Tabla 18. Oxidación de proteínas (%) de la línea celular mutada respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

El análisis estadístico de los resultados reveló que no existían diferencias significativas entre los la línea celular mutada MERRF_100% y la línea control MERRF_0% (p=0.285).

4.2.5.2 Estudio de la oxidación de proteínas en MELAS

De igual manera que en la línea anterior se procedió a estudiar la oxidación de proteínas en la línea portadora de la mutación A3243G, comparándola con el control MERRF_0%.

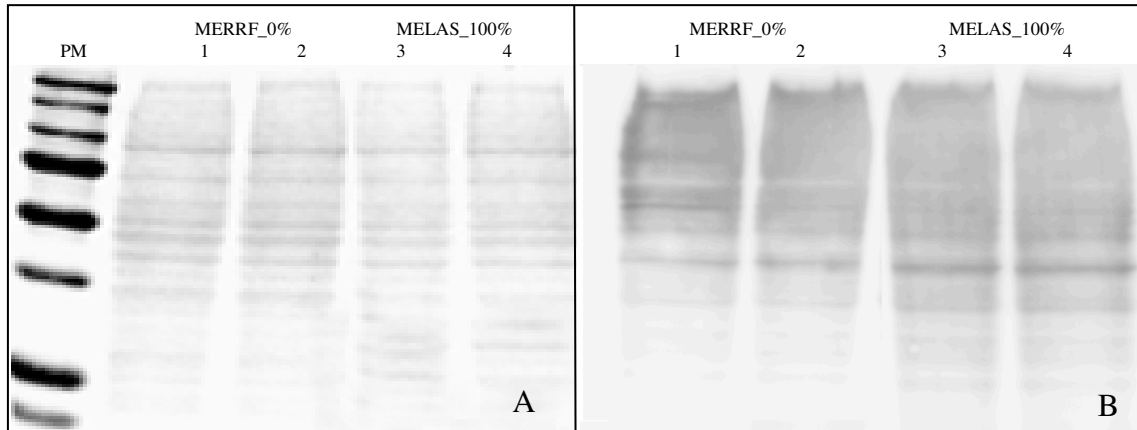


Figura 41. En el panel A se muestra la membrana teñida con Coomassie y en el panel B se muestra la membrana de western-blot. Los carriles 1 y 2 tanto del panel A como del panel B corresponden a las proteínas de la línea control (MERRF_0%) y los carriles 3 y 4 a las proteínas de la línea mutada (MELAS_100%).

Después de normalizar los resultados por la carga de proteínas se comparó la oxidación de las proteínas en la línea celular control y mutada como incremento de oxidación de la línea celular mutada respecto a la línea control.

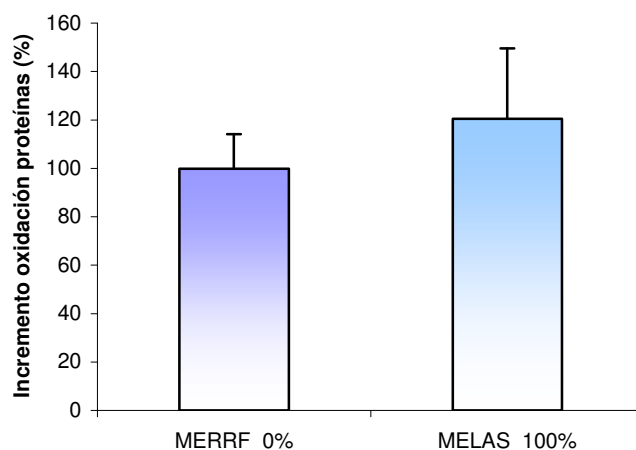


Figura 42. Oxidación de proteínas de la línea celular mutada (MELAS_100%) respecto a la línea control (considerada como el 100%).

El análisis estadístico reflejó que no existían diferencias en cuanto a la oxidación de proteínas entre la línea celular MELAS_100% y la control MERRF_0% ($p = 0.285$).

	MERRF_0%	MELAS_100%
Media	99,8	120,5
Desviación estándar	14,3	29,1
N	3	3
p	0,285	

Tabla 19. Oxidación de proteínas (%) de la línea celular mutada (MELAS_100%) respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

4.2.5.3 Estudio de la oxidación de proteínas en COX

La siguiente línea estudiada fue la portadora de la mutación G6930A respecto a su control isogénico.

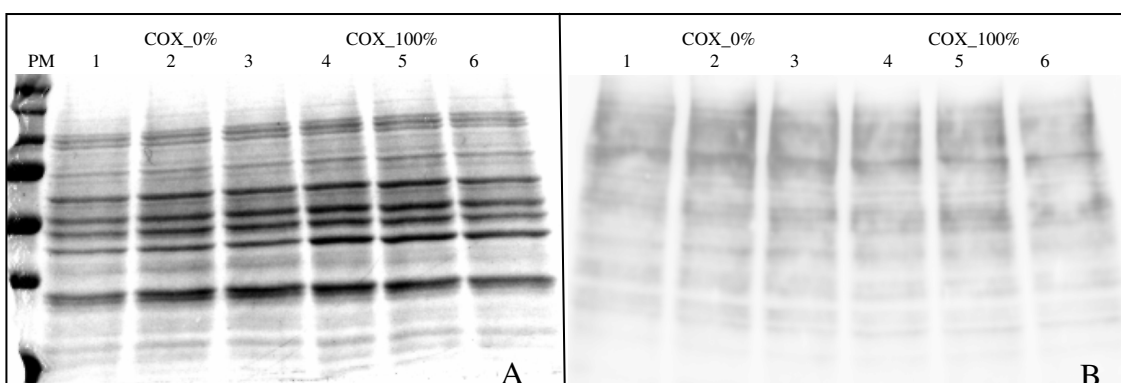


Figura 43. En el panel A se muestra la membrana teñida con Coomassie y en el panel B se muestra la membrana de western-blot. Los carriles 1, 2 y 3 tanto del panel A como del panel B corresponden a las proteínas de la línea control (COX_0%) y los carriles 4, 5 y 6 a las proteínas de la línea mutada (COX_100%).

El resultado del experimento de western-blot refleja que no existen diferencias muy apreciables, en cuanto a la oxidación de proteínas en línea mutada COX_100% respecto a la línea control COX_0%.

Se observa en la gráfica resumen de los tres experimentos realizados, que la oxidación de proteínas es prácticamente igual en la línea celular control y en la línea mutada.

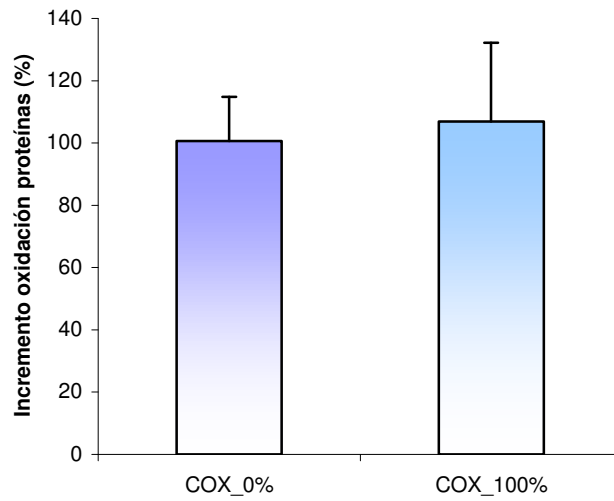


Figura 44. Oxidación de proteínas de la línea celular mutada (COX_100%) respecto a la línea control (considerada como el 100%).

Al analizar los datos estadísticamente (test de Willcoxon) se confirmó que no existen diferencias entre los dos grupos ($p = 0.285$).

	COX_0%	COX_100%
Media	100,6	106,9
Desviación estándar	14,2	25,3
N	4	4
p	0,285	

Tabla 20. Oxidación de proteínas (%) de la línea celular mutada (COX_100%) respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

4.2.5.4 Estudio de la oxidación de proteínas en ND6

La última línea celular en la que se le estudio la oxidación de proteínas fue la ND6_100%, que se comparó con el control MERRF_0%.

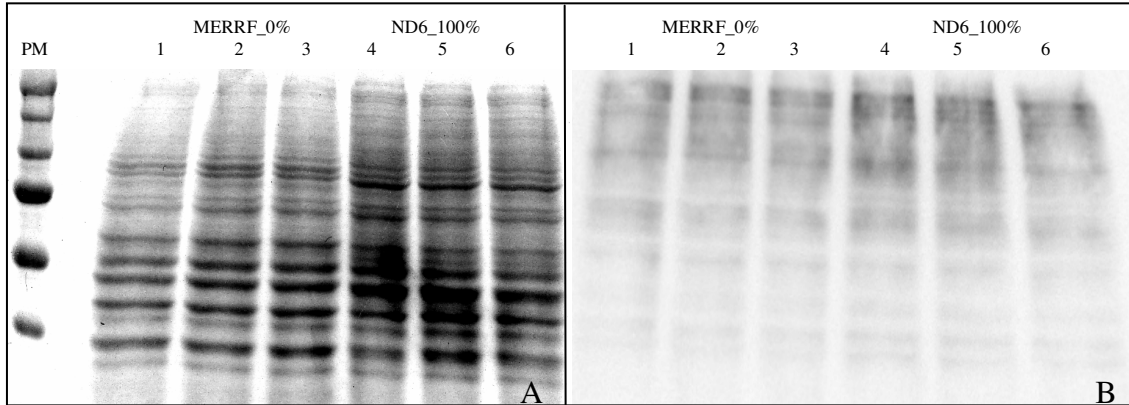


Figura 45. En el panel A se muestra la membrana teñida con Coomassie y en el panel B se muestra la membrana de western-blot. Los carriles 1, 2 y 3 tanto del panel A como del panel B corresponden a las proteínas de la línea control (MERRF_0%) y los carriles 4, 5 y 6 a las proteínas de la línea mutada (ND6_100%).

Después de normalizar los resultados por la carga de proteínas se comparó la oxidación de las proteínas en la línea celular control y mutada como incremento de la oxidación de proteínas de la línea celular mutada respecto a la línea control.

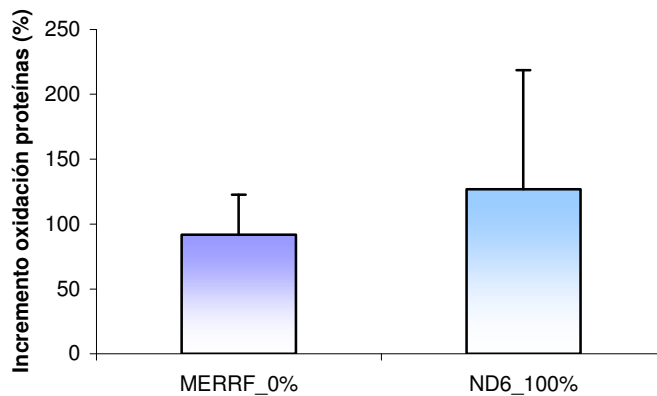


Figura 46. Oxidación de proteínas de la línea celular mutada (ND6_100%) respecto a la línea control (considerada como el 100%).

	MERRF_0%	ND6_100%
Media	100	126,8
Desviación estándar	22,3	91,9
N	4	4
p	0,893	

Tabla 21. Incremento medio de la oxidación de proteínas (%) de la línea celular mutada (ND6_100%) respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

El análisis estadístico de los resultados (test de Willcoxon) reveló que no existían diferencias entre la línea control y la mutada ($p = 0.893$).

4.2.6 Estudio de la oxidación del ADNmt

En el estudio de la oxidación del ADNmt se realizaron como mínimo tres extracciones de ADN de tres pases diferentes de cada línea celular. De cada extracción se realizó una PCR del fragmento largo y una PCR del fragmento corto utilizando dos concentraciones de ADN diferentes. Se muestra en cada línea analizada el resultado de uno de los experimentos de cada PCR. Para calcular el daño al ADNmt de cada línea celular se corrigió la amplificaciones del fragmento largo por la cantidad de ADNmt de cada línea celular (PCR del fragmento corto).

4.2.6.1 Estudio de la oxidación del ADNmt en MERRF

La primera línea celular a la que se le analizó la posible oxidación del ADNmt fue a la línea portadora de la mutación A8344G y a su control isogénico.

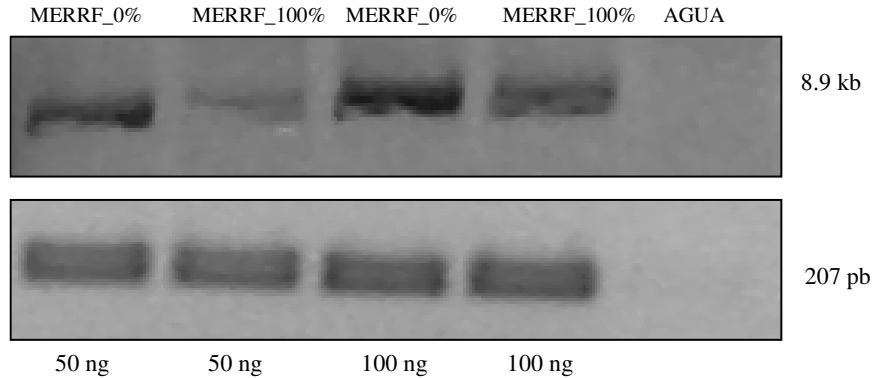


Figura 47. Experimento representativo de la oxidación del ADNmt en la línea celular portadora de la mutación A8344G. En el panel superior se observa la amplificación del fragmento largo, y en el panel inferior la amplificación del fragmento corto.

Los resultados de la PCR del fragmento largo mostraron que ya sea utilizando una concentración de 50 ng de ADN ya sea utilizando 100 ng, se obtuvo una menor amplificación del fragmento en la línea celular mutada MERRF_100% en comparación con la línea control MERRF_0%. En la PCR del fragmento corto no se observaron diferencias entre la amplificación del ADN procedente de la línea control y el ADN procedente de la línea mutada.

En la representación gráfica se agruparon los valores obtenidos con 50 ng y con 100 ng, ya que se observó que se comportaban de la misma manera. Se representa la disminución de la amplificación de la línea celular mutada respecto a la línea control.

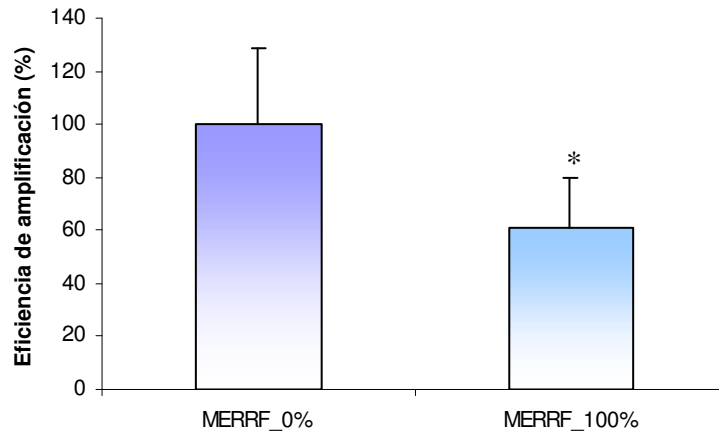


Figura 48. Disminución de la eficiencia de amplificación de la línea celular mutada (MERRF_100%) respecto a la línea control (MERRF_0%), considerada como el 100%. Las diferencias observadas eran estadísticamente significativas (test de Wilcoxon; * = $p < 0.05$)

Se obtiene una mayor eficiencia de amplificación en la línea celular control MERRF_0% que en la línea portadora de la mutación MERRF_100%, indicando que la línea mutada presenta más daño al ADNmt que la control.

	MERRF_0%	MERRF_100%
Media	100,4	61,0
Desviación estándar	28,7	18,8
N	6	6
p	0,046	

Tabla 22. Disminución de la eficiencia de amplificación (%) de la línea celular mutada (MERRF_100%) respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

4.2.6.2 Estudio de la oxidación del ADNmt en MELAS

La segunda línea a la que se le analizó la posible oxidación del ADNmt fue a la línea portadora de la mutación A3243G y a la línea control MERRF_0%.

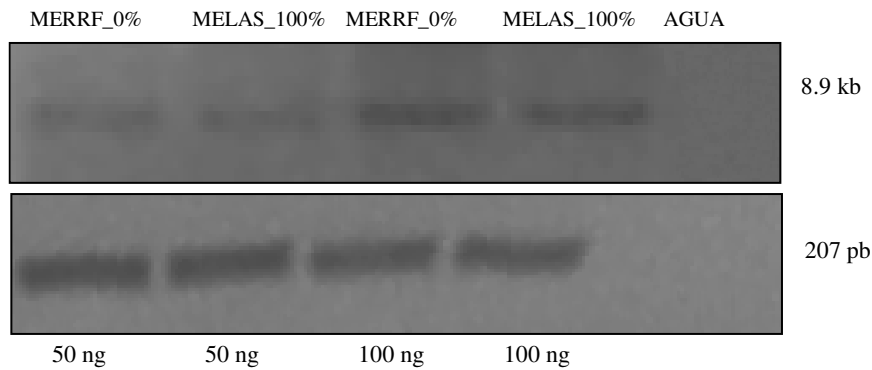


Figura 49. Experimento representativo de la oxidación del ADNmt en la línea celular portadora de la mutación A3243G. En el panel superior se observa la amplificación del fragmento largo, y en el panel inferior la amplificación del fragmento corto.

La amplificación del fragmento largo a partir del ADN procedente de la línea mutada fue algo inferior a la de la línea control, aunque los resultados no fueron tan claros como en el caso anterior. En la amplificación del fragmento corto no se observaron diferencias entre el ADN proveniente de las células control y el ADN procedente de las células mutadas.

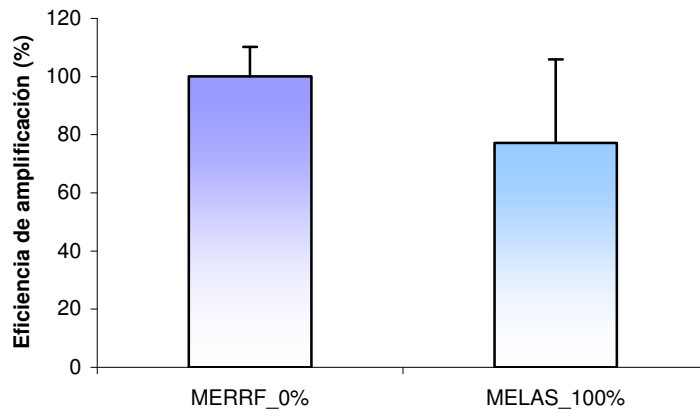


Figura 50. Eficiencia de amplificación de la línea celular mutada (MELAS_100%) respecto la línea control (MERRF_0%), considerada como el 100%. Las diferencias observadas no eran estadísticamente significativas (test de Willcoxon)

En la gráfica anterior se representa la eficiencia de amplificación de la línea celular mutada (MELAS_100%) respecto la línea control. No se encontraron diferencias significativas ($p=0.116$), por lo que no existe daño al ADNmt en la línea mutada respecto a la control.

	MERRF_0%	MELAS_100%
Media	100,1	77,2
Desviación estándar	10,1	28,7
N	6	6
p	0,116	

Tabla 23. Eficiencia de amplificación (%) de la línea celular mutada (MELAS_100%) respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

4.2.6.3 Estudio de la oxidación del ADNmt en COX

En este caso se amplificó el ADN procedente de la línea portadora de la mutación G6930A comparándola con la amplificación del ADN procedente de su control isogénico COX_0%.

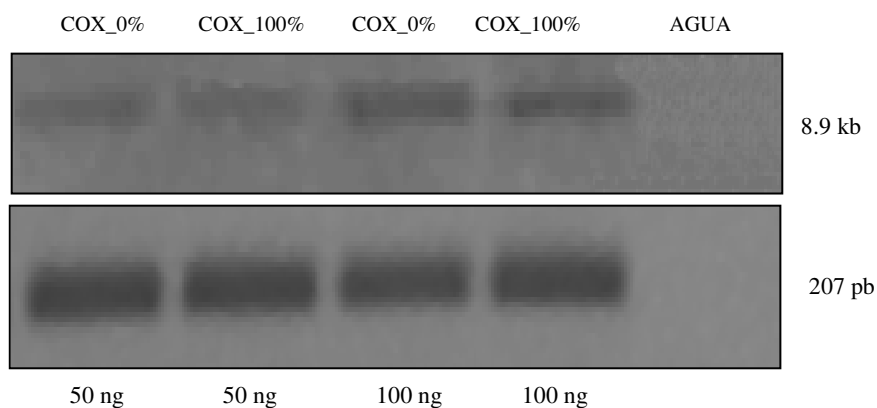


Figura 51. Experimento representativo de la oxidación del ADNmt en la línea celular portadora de la mutación A6930G. En el panel superior se observa la amplificación del fragmento largo, y en el panel inferior la amplificación del fragmento corto.

La amplificación del fragmento largo en la línea mutada (COX_100%) fue muy similar a la amplificación del mismo fragmento en la línea control (COX_0%). En la amplificación del fragmento corto tampoco se observaron diferencias entre la línea celular mutada y la línea control.

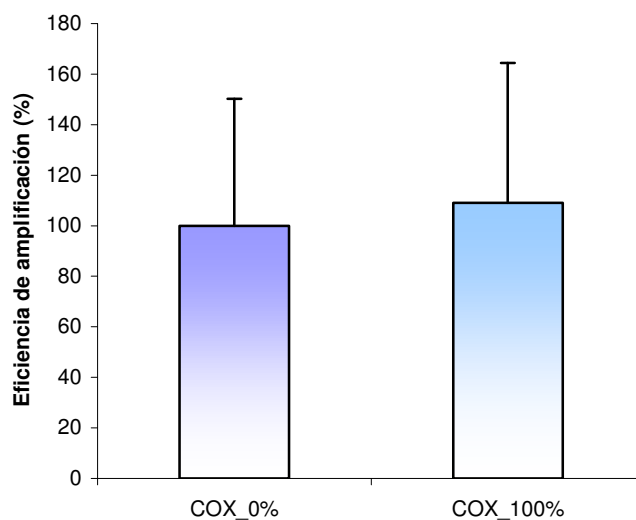


Figura 52. No se observaron diferencias entre la eficiencia de amplificación de la línea celular mutada (COX_100%) respecto la línea control (COX_0%), considerada como el 100%.

En la representación gráfica de los resultados agrupados de las PCR a 50 ng y a 100 ng, se observó esta misma tendencia, indicando que no existía daño al ADNmt en la línea mutada respecto a la línea control.

	COX_0%	COX_100%
Media	99,9	109,1
Desviación estándar	50,2	55,4
N	6	6
p	0,345	

Tabla 24. No se observaron diferencias entre la eficiencia de amplificación (%) de la línea celular mutada (COX_100%) respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

4.2.6.4 Estudio de la oxidación del ADNmt en ND6

Se estudió la oxidación del ADNmt en la línea celular ND6_100% que se comparó con el ADNmt procedente de la línea celular control MERRF_0%.

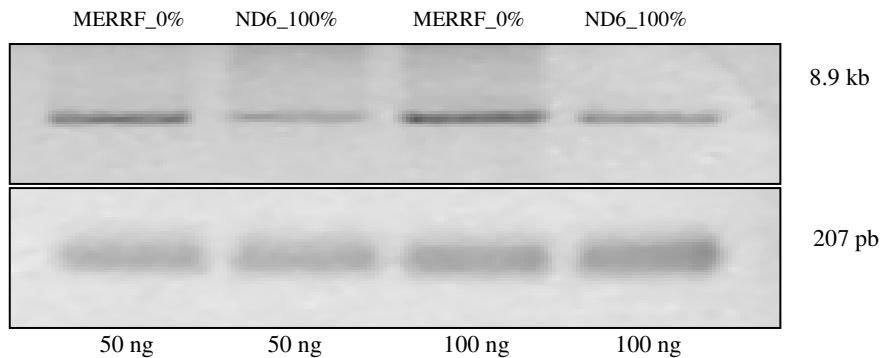


Figura 53. Experimento representativo de la oxidación del ADNmt en la línea celular portadora de la mutación T14487C. En el panel superior se observa la amplificación del fragmento largo, y en el panel inferior la amplificación del fragmento corto.

En la imagen superior se muestra como la amplificación del fragmento largo en el caso del ADN procedente de la línea celular mutada ND6_100% fue mucho menor respecto al ADN procedente de la línea control MERRF_0%. Este hecho se observó tanto en la amplificación utilizando 50 ng de ADN como utilizando 100 ng. En el caso de la amplificación del fragmento corto no se apreciaron diferencias entre el ADN procedente de la línea celular control y el de la línea mutada.

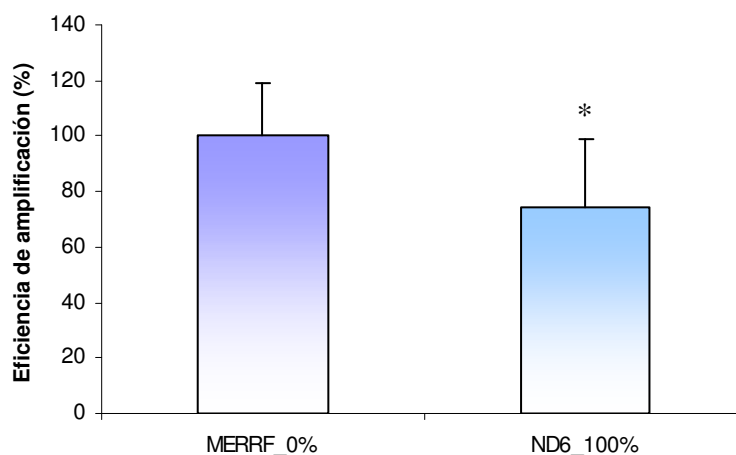


Figura 54. Disminución de la la eficiencia de amplificación de la línea celular mutada (ND6_100%) respecto la línea control (MERRF_0%), considerada como el 100%. (*; $p < 0.05$, Test de Willcoxon)

En la gráfica resumen de los tres experimentos realizados donde se han agrupado los resultados obtenidos en la PCR de 50 ng y de 100 ng, se observó que la amplificación fue mucho más eficiente en la línea control MERRF_0%, que en la línea mutada ND6_100%.

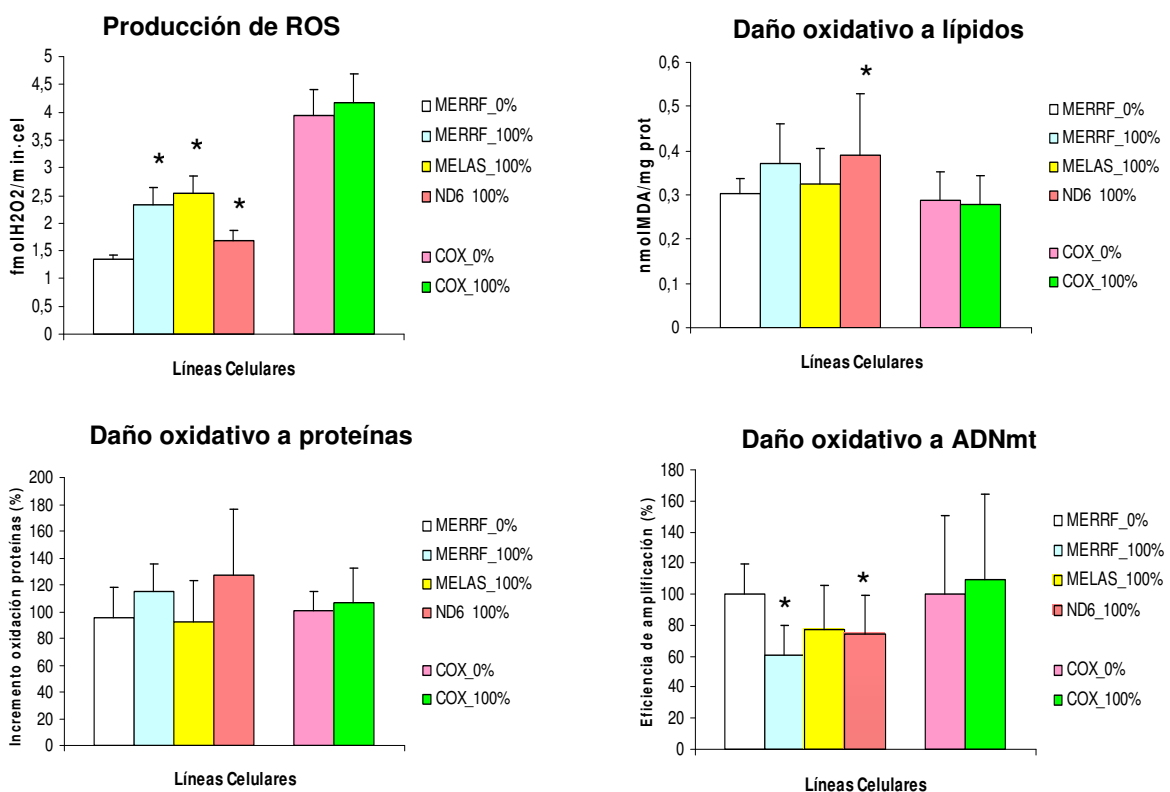
	MERRF_0%	ND6_100%
Media	100,1	74,4
Desviación estándar	19,1	24,6
N	6	6
p	0,046	

Tabla 25. Disminución de la eficiencia de amplificación (%) de la línea celular mutada (ND6_100%) respecto a la línea control. Se muestra también el valor de la p obtenida por el test de Wilcoxon.

En la línea celular mutada (ND6_100%) la disminución en la eficiencia de amplificación fue estadísticamente significativa, respecto a la línea celular control (MERRF_0%), indicando daño al ADNmt en la línea celular portadora de la mutación.

4.2.7 Resumen de resultados sobre la producción de ROS y el daño oxidativo

Aquí se resumen los resultados obtenidos en cuanto a la producción de ROS y el daño oxidativo:



DISCUSIÓN

5-. DISCUSIÓN

5.1 Estudio molecular de los pacientes

El diagnóstico de pacientes con enfermedades mitocondriales presenta algunas complicaciones. La principal dificultad radica en la gran heterogeneidad tanto clínica como genética de este tipo de enfermedades. Diferentes mutaciones en el genoma mitocondrial pueden dar lugar a un fenotipo clínico muy similar: miopatía (por ejemplo los cambios A3243G, T3271C y A8344G), mientras que a su vez una misma mutación puede dar lugar a diferentes fenotipos clínicos: miopatía, diabetes o sordera (por ejemplo el cambio A3243G).

La síntesis de ATP por parte de la cadena de transporte electrónico supe a muchos órganos y tejidos de la energía que necesitan. Un defecto de la cadena de transporte electrónico se caracteriza por un aumento de los niveles plasmáticos de lactato, piruvato y de los cuerpos cetónicos, así como de la relación lactato/piruvato y lactato/cuerpos cetónicos.

La cadena de transporte electrónico está compuesta aproximadamente por 100 polipéptidos, codificados en otros tantos genes diferentes, y que estos pueden estar localizados tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear. Además para la biogénesis y ensamblaje de cada componente de la cadena de transporte electrónico se requieren multitud de genes codificados en el genoma nuclear. En defectos de la cadena de transporte electrónico pueden presentarse con cualquier tipo de herencia, incluyendo mutaciones en el ADNmt o nuclear en casos esporádicos, herencia materna de mutaciones en el ADNmt, herencia autosómica recesiva o dominante o herencia ligada al cromosoma X. En este tipo de enfermedades es muy necesario disponer del pedigrí de la familia del paciente a diagnosticar. Si la herencia es materna nos indicará mutaciones en el ADNmt, por otro lado en casos esporádicos y casos donde se observe herencia autosómica nos indicará mutaciones en el ADN nuclear, aunque también se pueden dar casos esporádicos con herencia mitocondrial.

Por otro lado, las mutaciones en el ADNmt que afecten a la actividad de la cadena de transporte electrónico, se pueden localizar tanto en genes estructurales como en genes que codifiquen ARNs de transferencia. Las mutaciones en los genes estructurales solamente afecta a la actividad de un determinado complejo, mientras que las mutaciones que afectan a los ARNs de transferencia pueden afectar a más de un complejo, ya que estas moléculas son parte fundamental de la síntesis de proteínas. En

nuestros pacientes diagnosticados encontramos tanto mutaciones en genes estructurales como en ARNs de transferencia.

5.1.1 Paciente 1

Esta paciente presentaba una severa miopatía asociada a diabetes mellitus y sordera de herencia materna. Después de secuenciar el gen ARNt^{Leu(UUR)} se identificó el cambio adenina por guanina en la posición 3243. Esta mutación fue descrita por primera vez en pacientes con MELAS en el año 1990 por Goto y colaboradores (Goto Y, 1990). En cultivos celulares se detectó que esta mutación provoca una alteración de la síntesis de proteínas mitocondrial (Chomyn A, 1992; King MP, 1992), debido principalmente a una alteración en la incorporación de aminoácidos en los polipéptidos de síntesis mitocondrial. Además también se observó que la alteración de la estructura y la estabilidad del ARNt^{Leu(UUR)} puede causar defectos en el procesamiento de los transcritos primarios del genoma mitocondrial y en la maquinaria de traducción de la mitocondria (Flierl A, 1997).

El genoma mitocondrial se ha implicado en la patogénesis de la diabetes mellitus por varias razones: la primera de ellas es la presencia de la mutación A2343G en la región codificante (Kadowaki T, 1994), también se han descrito la presencia de polimorfismos comunes en la región reguladora (Poulton J, 2002), y la reducción de la cantidad de ADNmt (Lee HK, 1998). El origen mitocondrial de la diabetes normalmente se da en un 1% del total de casos de diabetes (Maassen JA, 2001). La estimulación de los islotes β pancreáticos normalmente induce una serie de respuestas incluyendo la generación de NADH por la glicólisis, el aumento del consumo de oxígeno, un aumento del ratio ATP/ADP, despolarización de la membrana, elevación del calcio libre citoplasmático y finalmente la secreción de insulina (Newgard CB, 1995). Así un descenso dramático en la tasa de consumo de oxígeno y en el ratio ATP/ADP provocado por la mutación A3243G en el ADNmt de las células β pancreáticas, debe provocar una alteración de la secreción de insulina en respuesta a la estimulación por glucosa (Pang CY, 2001).

Se han realizado estudios donde se ha deplecionado el ADNmt de células β pancreáticas, utilizando bromuro de etidio o algún otro agente químico y se ha visto que estas células son capaces de seguir sintetizando insulina y de seguir viviendo, aunque a un ritmo más lento. Estas células han perdido la capacidad de excretar insulina en respuesta a glucosa (Soejima A, 1996).

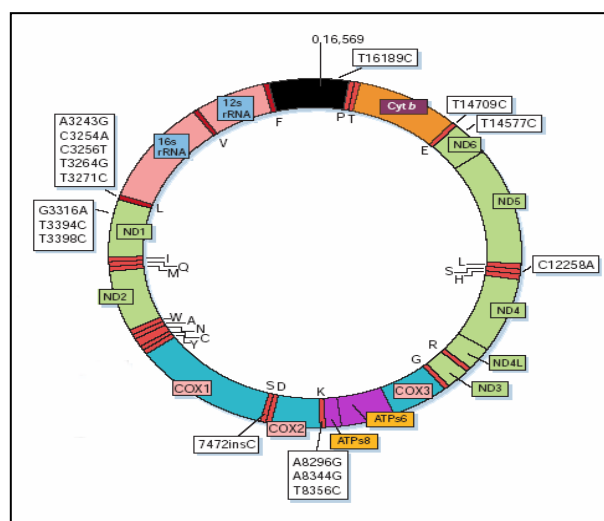


Figura 55. Esquema de todas las mutaciones mitocondriales relacionadas con la diabetes mellitus (modificado de Maechler P, 2001)

Como se ha comentado la mutación A3243G es la típica “mutación de MELAS”, pero resulta muy extraño que ninguno de los pacientes del pedigrí presentase esta enfermedad (Figura 19-A en página 80). Esto se puede explicar debido a dos características del ADNmt: la primera de ellas es la segregación tejido-específica que pueden sufrir las moléculas de ADNmt mutadas, es decir, que moléculas de ADNmt mutadas van a parar directamente durante el desarrollo embrionario a un tejido en concreto. La otra razón es que el deterioro de la función mitocondrial afecta de diferente manera a la viabilidad de diferentes células, y un tipo celular puede entrar en fase de apoptosis antes que otro. Se ha visto en estudios post-mortem de pacientes diabéticos que el grado de heteroplasmia en sus células pancreáticas no es demasiado elevado, siendo de un 32% al 63% (Kobayashi T, 1997).

Un aspecto importante que se observa en los resultados de la RFLP (Figura 19-B en página 80) y común a las enfermedades mitocondriales provocadas por mutaciones puntuales, es que el grado de heteroplasmia siempre es menor cuando se ha determinado en sangre que cuando se ha determinado en músculo del mismo paciente (caso índice: 80% en músculo y 53% en células sanguíneas). Esto es debido a que el tejido sanguíneo está sometido a continua renovación donde se da una selección positiva, por la que la proporción de moléculas de ADNmt mutado va en disminución, mientras que el músculo es un tejido postmitótico en el que las mutaciones tenderían a concentrarse debido a la escasa división celular que tiene.

5.1.2 Paciente 2

Esta paciente estaba afectada de lipomas múltiples con afectación a varios de los familiares. El pedigrí familiar sugería una clara herencia materna de la enfermedad (Figura 20 en página 81). Posteriormente la paciente desarrolló una severa intolerancia al ejercicio.

Como se ha comentado en el apartado de resultados de esta paciente, la lipomatosis simétrica múltiple (MSL) se ha relacionado a deleciones grandes y únicas (Campos Y, 1996), deleciones múltiples (Klopstock, 1994) y a mutaciones puntuales en el gen del ARNt^{Lys} (Berkovic SF, 1991). En el caso de nuestra paciente se debía a la mutación A8344G en el gen ARNt^{Lys}. Este cambio provoca el síndrome de MERRF y fue descrita por primera vez en el año 1990 por Shoffner JM y colaboradores (Shoffner JM, 1990). Esta mutación puede dar lugar a fenotipos muy diversos, este hecho se ha asociado a distintos porcentajes de la mutación en los tejidos afectados de los pacientes estudiados, pero muy probablemente no se debe únicamente a esto, sino a la combinación de la presencia de la mutación con otros factores genéticos, morfológicos o ambientales (Hanna MG, 1995). En estudios sobre cíbridos transmitocondriales se observó que la mutación en el ARNt^{Lys} afectaba a la síntesis de proteínas mitocondriales, afectando principalmente a los péptidos con mayor número de residuos de lisina (Enriquez JA, 1995).

La MSL se caracteriza por la presencia de cúmulos de grasa en el cuello, los hombros y otras partes del tronco, y se asocia en muchos pacientes a alteraciones del sistema nervioso central y periférico. En algunos estudios se ha visto que afecta principalmente a hombres y que pudiera tener una mayor incidencia en los países mediterráneos. (Enzi G, 1985). Aunque la base bioquímica de la enfermedad todavía no se conoce, la presencia de fibras rojo rasgadas observadas en muchos pacientes (Klopstock T, 1994), parecen indicar una clara asociación con una patología mitocondrial. Fueron Berkovic y colaboradores los primeros que demostraron una asociación clara entre la MSL y una patología mitocondrial (Berkovic SF, 1991). De todas maneras la MSL no está siempre ligada a mutaciones mitocondriales o alteración de la función mitocondrial, ya que se han descrito casos que así lo demuestran (Klopstock T, 1997). Además también se han descrito casos esporádicos (Naumann M, 1997). Así el origen genético de la MSL parece ser bastante heterogéneo. En algunos casos se ha descrito una expresión fenotípica dependiente de la edad, indicando que si la función mitocondrial está

alterada, una disminución progresiva de la actividad oxidativa podría ayudar al desarrollo de la enfermedad (Muñoz-Málaga A, 2000).

No se conoce muy bien el porqué se da una proliferación tan importante del tejido adiposo. Existen algunos autores que postulan que una mutación del ADNmt puede inducir la expresión anormal de un gen nuclear que produzca la proliferación de las células adiposas (Larsson NG, 1995). Otros postulan que el crecimiento del tejido adiposo seguramente se deba a cambios en el metabolismo intermedio, ya que se ha visto que los lipomas observados en MSL se asemejan a la grasa llamada “parda”. Este tipo de grasa normalmente solo se presenta en la infancia y posee un elevado metabolismo oxidativo mitocondrial acoplado a la lipólisis. En este sentido Vila y colaboradores describieron en el año 2000 la presencia de ARNm de UCP-1 (del inglés *Uncoupling Protein-1*) en lipomas de pacientes de MSL. La UCP-1 es el único marcador cualitativo que distingue entre adipocitos marrones y blancos (Vila MR, 2000).

5.1.3 Paciente 3

La paciente presentaba una clara afectación multisistémica incluyendo debilidad muscular, un severo defecto visual y sordera total. Al evidenciar el análisis tanto histoquímico como bioquímico un claro defecto en la actividad del complejo IV de la cadena de transporte electrónico, se procedió a secuenciar las tres subunidades de este mismo complejo codificadas en el ADNmt. Se identificó la mutación no descrita hasta entonces G6930A en el gen *COI*. Esta mutación provoca la aparición prematura de un codón de fin de traducción (en lugar de una glicina), con lo que se pierden los últimos 170 aminoácidos de la proteína, lo que equivale a una tercera parte de ella.

Bruno y colaboradores estudiaron la mutación utilizando el modelo de los cíbridos transmitocondriales (Bruno C, 1999). En este tipo de células observaron que la línea celular portadora del menor tanto por ciento de genomas mitocondriales mutados crecía tan lentamente en el medio como la que tenía el mayor tanto por ciento de genomas mutados, evidenciando la alta patogenicidad de la mutación incluso a bajos niveles. Esto explicaría que en el músculo del paciente, que tenía un 75% de los genomas mutados, no existía prácticamente actividad citocromo *c* oxidasa (Figura 23 en página 83). En este mismo sentido Bruno y colaboradores también observaron una disminución en la actividad de la citocromo oxidasa que era directamente proporcional a la cantidad de genomas mutados.

En posteriores trabajos D'Aurelio y colaboradores observaron cómo la síntesis del complejo IV resultaba afectada por esta mutación y también la regulación de la cadena de transporte en global (D'Aurelio, 2001). No observaron síntesis del polipéptido truncado de COX I en las células que eran portadoras del 100% de los genomas mutados, indicando que la pérdida de la porción C-terminal del polipéptido impedía una correcta inserción del polipéptido en la membrana mitocondrial interna y ensamblaje de las demás subunidades, provocando una rápida degradación de la proteína truncada. Así estos resultados sugieren que la subunidad COX I tiene un papel principal en el ensamblaje del complejo IV. D'Aurelio y colaboradores en líneas celulares portadoras de altos niveles de mutación en el gen *COI* detectaron una profunda disminución de complejo IV completo,

La citocromo *c* oxidasa está formada por trece polipéptidos de los cuales 3 de ellos están codificados en el genoma mitocondrial. En su síntesis y correcto ensamblaje en la membrana mitocondrial interna intervienen un alto número de proteínas que están bajo el control de los dos genomas, por lo que es un proceso muy complejo. Hasta el momento se han encontrado pocos defectos de este enzima debidos a mutaciones en los genes mitocondriales, siendo más frecuentes los defectos en los genes nucleares. De estos últimos las mutaciones encontradas hasta el momento están localizadas en genes que codifican proteínas que intervienen en el ensamblaje del complejo: SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15 (Pecina P, 2004).

Existen múltiples fenotipos en las patologías asociadas a deficiencias de la citocromo *c* oxidasa (anemia sideroblástica idiopática, mioglobulinuria asociada a intolerancia al ejercicio, desorden de motoneuronas, síndrome de Leigh, miopatía, etc.) (Pecina P, 2004). Probablemente se debe la multitud de genes que están involucrados en la biogénesis de este complejo y que realmente en la actualidad, se conoce muy poco sobre cómo se regula la síntesis y actividad de estos genes, ya que se ha observado que se expresan en diferente cantidad en diferentes tejidos (Shoubridge EA, 2001b).

En un trabajo muy reciente se ha observado una relación entre la presencia de mutaciones en el gen mitocondrial *COI* y la presencia de cáncer de próstata (Petros JA, 2005). Además han demostrado que la presencia de mutaciones en este gen en líneas germinales puede ser un factor importante a tener en cuenta para desarrollar este tipo de cáncer.

5.1.4 Paciente 4

Este paciente se estudió en colaboración con el grupo del doctor Julio Montoya de la Universidad de Zaragoza. El paciente presentaba necrosis bilateral del estriado (BSN) y distonia generalizada. El análisis bioquímico de la cadena respiratoria indicaba un defecto aislado del complejo I, por lo que se decidió secuenciar todos los genes que codificaban subunidades de este complejo localizados en el ADNmt. Se encontró el cambio T14487C, no descrito hasta entonces, en el gen *ND6*.

Esta mutación afecta al codón 63 de la proteína y provoca el cambio del aminoácido metionina al aminoácido valina. Esta región de la proteína ND6 es además una de las más conservadas a lo largo de la evolución (Carelli V, 1999). Esta zona de la proteína está muy estudiada en la literatura ya que se han visto en ella mutaciones asociadas a síndrome de Leigh (Kirby DM, 2000), MELAS (Ravn K, 2001), y además se cree que es un “punto caliente” para mutaciones que provoquen el síndrome de LHON (Chinnery PF, 2001). Concretamente la mutación principal de Leber T14484C causa el mismo cambio de aminoácido que la mutación encontrada en nuestro paciente, y en el aminoácido adyacente, pero sin embargo no se conoce el porqué una presenta un fenotipo mucho más severo que la otra.

Esta mutación fue estudiada a nivel bioquímico utilizando el modelo de los cíbridos mitocondriales por el grupo del doctor Montoya (Solano A, 2003). El consumo de oxígeno dependiente de rotenona de la línea mutada era prácticamente nulo, en comparación con el consumo de la línea control (1,758 fmol O₂/célula/min), indicando que era la mutación en el ADNmt el que provocaba la baja actividad del complejo I observada en la biopsia del paciente. Además de este hecho existen otros que apoyan la hipótesis de que este cambio es patogénico: no se encontró en una serie de 150 ADN de controles analizados, el grupo del Dr. Montoya encontró este mismo cambio en otro paciente con un fenotipo muy similar y en los dos pacientes el cambio estaba en estado heteroplásmico.

Coincidiendo en el tiempo otro grupo de investigación publicó otro paciente con la misma mutación, sin embargo con un fenotipo algo diferente, ya que era más parecido a un síndrome de Leigh. Además en este caso el paciente murió a los tres meses de presentar los primeros síntomas (Ugalde C, 2003). En este trabajo el grupo analizó todas las subunidades del complejo I de la cadena de transporte electrónico codificadas por el genoma mitocondrial, encontrando 17 polimorfismos ya descritos en la literatura y 6 variantes no descritas. Además este grupo también estudió mediante la técnica de

electroforesis 2D-BN (del inglés *2-dimensions blue native*) como se estructuraban las diferentes subunidades del complejo I entre ellas, tanto en fibroblastos derivados de la paciente, como en cíbridos transmitocondriales con dicha mutación. Tanto en unas células como en las otras observaron que el ensamblaje del complejo I no era el correcto, ya fuera porque se observaba menos cantidad de complejo I ensamblado (en el caso de los fibroblastos) o porque se acumulaban subcomplejos de menor tamaño (tanto en cíbridos como en fibroblastos).

Estos últimos resultados dejan entrever que la mutación T14487C afecta muy seriamente al ensamblaje del complejo I, afectando así a su correcto funcionamiento. Además en un trabajo posterior publicado por el mismo grupo, demostraron que mutaciones en el complejo I de la cadena de transporte electrónico afectaban a su ensamblaje (en este segundo trabajo, las mutaciones analizadas estaban localizadas en genes codificados en el genoma nuclear), a su vez podían afectar al correcto ensamblaje del complejo III, indicando así que la funcionalidad de la cadena de transporte electrónico esta severamente alterada (Ugalde C, 2004).

Nuestro grupo analizó por secuenciación todas las subunidades del complejo I codificadas por el genoma mitocondrial en nuestro paciente y en el otro paciente del Dr. Montoya (datos no mostrados), con el de fin de concretar si la mutación en el gen *ND6* venía acompañada por todos los polimorfismos descritos en el primer trabajo de Ugalde y colaboradores. No se identificó ningún polimorfismo en ninguno de los dos pacientes, por lo que estos polimorfismos podrían tener una implicación en el distinto fenotipo observado entre nuestro paciente y el del Dr. Montoya con el de Ugalde y colaboradores.

5.2 Células transmitocondriales

En este apartado se discuten los resultados obtenidos del análisis del haplotipo mitocondrial y después la puesta a punto de la técnica de determinación de la peroxidación lipídica. Posteriormente se analizarán conjuntamente en un mismo apartado todos los resultados obtenidos en los estudios de producción de peróxido de hidrógeno, oxidación de los lípidos, las proteínas y ADNmt en las líneas de cíbridos mitocondriales.

5.2.1 Haplotipos mitocondriales

Después de analizar el haplotipo mitocondrial de nuestras células mediante la técnica de RFLP, se concluyó que tanto los cíbridos obtenidos a partir de las plaquetas procedentes del paciente 2 como los procedentes del paciente 4 pertenecían al haplotipo H, mientras que en el caso del paciente 1 y 3 pertenecían al haplogrupo T. Según un estudio publicado en el año 2000 por Helgason y colaboradores el haplogrupo H es el mayoritario en la población caucásica con un proporción del 50% y el haplogrupo T es el tercero en proporción (10% de la población) (Helgason A, 2000).

Algunos autores han estudiado la pertenencia a un haplogrupo determinado, como un factor importante para una mayor incidencia o probabilidad de padecer una determinada patología de origen mitocondrial. En este sentido Ruiz-Pesini y colaboradores, en el año 2000 asociaron una disminución en la movilidad de los espermatozoides con la pertenencia al haplogrupo T. Relacionaban esta baja movilidad con una disminución en la producción de ATP por las mitocondrias, que en condiciones de alta demanda energética como puede ser el movimiento de los espermatozoides puede provocar diferencias (Ruiz-Pesini E, 2000). Otra enfermedad de origen mitocondrial en que se ha estudiado la pertenencia a un haplogrupo con la penetrancia de la enfermedad es el síndrome de Leber. En diversos estudios se ha relacionado la pertenencia al haplogrupo J con una mayor penetrancia de las mutaciones patogénicas de Leber 11778/ND4 y 14484/ND6 (Brown MD, 1997). De la misma manera existen estudios en sentido contrario (Oostra RJ, 1994).

Hasta el momento no está claro si los polimorfismos que definen los haplogrupos podrían tener alguna influencia en la aparición o desarrollo de las enfermedades mitocondriales, y es posible que simplemente hagan a la mitocondria más susceptible a determinados factores ambientales o genéticos, que alteren su funcionalidad.

5.2.2 Optimización del método de determinación de MDA: estudio de la concentración de BHT o EDTA

Antes de proceder a estudiar la oxidación de los lípidos en las líneas de cíbridos transmitocondriales estudiamos qué inhibidor era el más adecuado y qué concentración era la óptima para evitar la peroxidación lipídica “in vitro”, ya que en la literatura no había un consenso claro al respecto. La técnica de medición de la oxidación lipídica mediante la determinación de los niveles de MDA, ha sido ampliamente utilizada desde que fue descrita en el año 1950. Desde su inicio esta técnica ha tenido dos grandes

problemas: el primero de ellos es la inespecificidad en la detección del compuesto y el segundo es la producción durante el procesamiento del mismo compuesto que se detecta, el MDA. Los primeros ensayos realizaban la determinación espectrofotométrica a 535 nm del aducto de color rosado formado por una molécula de MDA con dos de TBA (Yagui K, 1976). Al existir otras moléculas capaces de reaccionar con el TBA y dar también un compuesto coloreado, se desarrollaron por el año 1980 técnicas de separación del aducto MDA-TBA por HPLC (Bird RP, 1983), con lo que se lograba solventar el primer problema.

Para evitar el segundo problema se introdujeron antioxidantes en la mezcla de la reacción. Los dos antioxidantes más ampliamente utilizados han sido el BHT y el EDTA (Knight JA, 1992), pero no hay un consenso en la comunidad científica sobre cuál de ellos es mejor y a qué concentración debe utilizarse. En la literatura existen trabajos que no utilizan antioxidantes, unos que utilizan BHT a diferentes concentraciones y otros donde utilizan EDTA también a diferentes concentraciones. Esta variedad de métodos provoca una gran disparidad de resultados, por lo que consideramos necesario realizar un estudio previo para saber cuál era el antioxidante más adecuado y a qué concentración deberíamos utilizarlo en nuestros ensayos.

De los resultados obtenidos en las curvas de inhibición (figuras 31 y 32 en páginas 91 y 92) concluimos que tanto el BHT como el EDTA son buenos inhibidores de la peroxidación lipídica *in vitro* incluso a muy bajas concentraciones. Es de destacar que es muy importante la adición de BHT o de EDTA en la mezcla, ya que como se observa en las mismas gráficas, los valores de MDA en los tubos donde no se añade ninguno son muy superiores. Los valores de MDA obtenidos en estudios donde no se utiliza ningún inhibidor seguramente están muy sobrevalorados. Posteriormente se comparó cuál de los dos inhibidores era mejor, o incluso si combinándolos se mejoraban los resultados. De los resultados obtenidos podemos concluir que el BHT es mejor inhibidor de la peroxidación lipídica que el EDTA, y que la combinación de los dos no mejora los resultados.

Existe un estudio en el que analizan la mejor concentración de BHT para inhibir la peroxidación lipídica (Jentsch AM, 1996). Este estudio se realizó en plasma y obtuvieron resultados similares a los nuestros. Deberían realizarse estudios de forma sistemática analizando la concentración de inhibidor de la peroxidación lipídica al utilizar un espécimen diferente a los publicados en la literatura, ya que cada espécimen

puede requerir un tiempo y modo de procesamiento diferente, por lo que la concentración de inhibidor debería estar ajustada en cada caso.

5.2.3 Estudio bioquímico del estrés oxidativo en las células transmitocondriales

La patofisiología de las enfermedades mitocondriales se ha atribuido en general, a deficiencias en la producción energética de la mitocondria. Se basaba en que la producción de ATP de la mitocondria no era suficiente para el funcionamiento normal de la célula. Sin embargo en los últimos años existen una serie de observaciones y estudios, que indican que aparte de la disminución en la producción de ATP debido al mal funcionamiento de la cadena de transporte electrónico, puede existir un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, que también estaría provocado por el mal funcionamiento de la cadena. Este aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno provocaría un aumento del estrés oxidativo dentro de la mitocondria que dificultaría mucho su viabilidad (Pitkanen S, 1996).

La amplia variabilidad de fenotipos observada por ejemplo en las mutaciones A3243G y A8344G, puede estar relacionada no simplemente con diferencias en la cantidad y distribución de genomas mutados por los tejidos del organismo, sino que la producción de ROS puede jugar un papel importante en la modulación del fenotipo.

Como ya se ha comentado en la introducción, la cadena de transporte electrónico puede producir especies reactivas de oxígeno cediendo un electrón al oxígeno para formar el anión superóxido. En diversos estudios se ha visto que utilizando inhibidores de los complejos de la cadena de transporte, se provoca un aumento de la generación de ROS tanto por el complejo I como por el III (Barrientos A, 1999) (Pitkanen S, 1996), por ello es factible pensar que mutaciones en los genes que codifican estos complejos podrían provocar también un incremento de la generación de ROS.

El modelo de cíbridos transmitocondriales es muy útil para el estudio de los efectos bioquímicos y moleculares de una mutación puntual en el genoma mitocondrial. Al tener la línea control idéntico ADN nuclear que la línea mutada, todos los efectos que se observen en esta línea, serán debidos a la mutación en el genoma mitocondrial.

5.2.3.1 Estudio de la producción de ROS

Lo primero que hicimos fue medir la producción de especies reactivas de oxígeno en cada línea celular. Existen diferentes métodos para realizar esta medición, y nosotros escogimos uno indirecto que consistía en medir la cantidad de peróxido de hidrógeno

que se generaba. El anión superóxido generado por el traspaso directo de electrones del complejo I o el III al oxígeno, es rápidamente detoxificado por la superóxido dismutasa. Esta reacción de detoxificación genera peróxido de hidrógeno que es lo que nosotros determinamos.

Las dos líneas portadoras de la mutación en un ARNt (MERRF_100% y MELAS_100%) (Figuras 29 y 30 en páginas 90 y 91 respectivamente) así como la línea portadora de la mutación en el complejo I (ND6_100%) (Figura 32 en página 93) presentan un claro incremento de la producción de peróxido de hidrógeno en comparación al control MERRF_0%. Como se ha comentado al describir estos dos síndromes (MERRF y MELAS), en su caracterización ya se observó que la síntesis de proteínas mitocondriales estaba alterada, como era de esperar en una mutación en un ARNt (Enriquez JA, 1995) (Chomyn A, 1992). La actividad de varios complejos del sistema OXPHOS está alterada, entre ellos el complejo I y III que son los principales productores de ROS en la mitocondria.

Un resultado similar fue descrito por Rana y colaboradores en cíbridos generados con una delección en el complejo III (Rana M, 2000), donde además observaron que el complejo III no se ensamblaba correctamente. En otro estudio utilizando cíbridos portadores de la mutación A3243G observaron una disminución de la proporción de glutatión reducido frente a un aumento del glutatión oxidado, indicando que la célula estaba en un ambiente oxidante (Pang CY, 2001). Además también se han descrito resultados similares en cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome de MERRF o MELAS (Wei YH, 2001). En varios estudios utilizando cíbridos portadores de mutaciones características de síndrome de Leber (complejo I), también se ha descrito incremento de la producción de ROS (Beretta S, 2004) (Wong A, 2002)

A diferencia de las líneas celulares anteriores, en los cíbridos portadores de la mutación G6930A en el complejo IV (COX_100%), no se observó un incremento de la producción de ROS respecto la línea control (COX_0%) (Figura 31 en página 92). La mutación crea un codón de fin de traducción, que acorta el polipéptido un 33% respecto su longitud original, provocando además que el complejo IV de la CTE no se ensamble correctamente (D'Aurelio, 2001). El hecho de que el este complejo no se ensamble correctamente no afecta a la producción de ROS, ya que el complejo IV no es productor. Existen trabajos que asocian a este complejo un papel regulador sobre la CTE y que al estar mutado pudiera afectar al flujo de electrones (Villani G, 1997) (Lee I, 2005).

Hay que destacar un trabajo donde utilizando cíbridos portadores de la mutación que provoca los síndromes de NARP y MILS (T8993G), también observaron un incremento en la producción de ROS (Mattiuzzi M, 2004). Así que según nuestros resultados y los publicados en la literatura una mutación mitocondrial que afecte ya sea al complejo I, III o V del sistema OXPHOS provoca un incremento de ROS, mientras que mutaciones en el complejo IV parecen no provocar este incremento. Queda por resolver que pasaría con mutaciones en el complejo II en cuanto a la producción de ROS, ya que existen publicaciones que describen que este complejo también puede producir ROS (Zhang Z, 1998).

La sobreproducción de ROS por parte de la CTE puede llegar a tener consecuencias negativas, si no son detoxificadas por las defensas antioxidantes, ya que pueden provocar daño en lípidos, proteínas y ADN. El daño oxidativo se produce cuando la producción de especies reactivas de oxígeno supera la capacidad detoxificadora de las defensas antioxidantes. Por regla general, los radicales libres tienen una vida media muy corta y solamente pueden dañar a moléculas que estén relativamente cerca del lugar de producción pero, en algunos estudios, se ha visto que el daño oxidativo a los lípidos, es capaz de crear moléculas estables que son capaces de propagar este daño a lugares lejanos respecto al sitio de producción de las ROS (Esterbauer H, 1991).

5.2.3.2 Estudio del daño oxidativo a lípidos

En varias líneas de cíbridos transmitocondriales observamos un incremento de la producción de ROS, por lo que nos pareció interesante estudiar si esta sobreproducción se traduciría en daño a los componentes celulares. Analizando la peroxidación lipídica observamos que tanto la línea MERRF_100%, como la MELAS_100% (Figuras 35 y 36 en páginas 98 y 99), como la COX_100% (Figura 37 en página 100), no presentaban un incremento de la peroxidación lipídica. En esta última línea (COX_100%) no se esperaba encontrar daño a los lípidos, ya que tampoco se observó un incremento de la producción de ROS. Sin embargo en las líneas MERRF_100% y MELAS_100%, el incremento en la producción de ROS no debe ser suficiente para superar a las defensas antioxidantes, ya que no se observa daño oxidativo en los lípidos. Existe un trabajo publicado donde utilizando cíbridos portadores de la mutación A3243G, detectan incremento de la peroxidación lipídica (Pang CY, 2001). Hay que destacar que en este

trabajo utilizan una concentración de BHT en la determinación de MDA diez veces menor de la que utilizamos nosotros, por lo que los valores obtenidos son cuestionables. En la línea de híbridos ND6_100%, portadora de una mutación en el complejo I de la CTE, a diferencia de todas las demás líneas, sí se observó incremento de la peroxidación lipídica (Figura 38 en página 101). Este resultado es acorde con otros trabajos publicados en la literatura, donde utilizando inhibidores del complejo I también observaban incremento de la peroxidación lipídica (Barrientos A, 1999) (Luo X, 1997). Hay que tener en cuenta que los lugares de producción de ROS en el complejo I y III son diferentes, por lo que existirán diferencias en este sentido que podrán afectar a la producción de daño oxidativo, entre las líneas portadoras de la mutación en un ARNt o en un complejo en particular.

5.2.3.3 Estudio del daño oxidativo a proteínas

No se observó incremento de la oxidación proteica en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Este resultado en las líneas MERRF_100% y MELAS_100% (Figuras 40 y 42 en páginas 103 y 104) estaba en consonancia con los obtenidos de peroxidación lipídica, en que si bien existe incremento de la producción de ROS, las defensas antioxidantes parecen ser suficientes para compensar y que no se produzca daño oxidativo. Respecto a la línea COX_100% donde no existe aumento de producción de ROS, tampoco existe incremento de daño oxidativo ni a lípidos ni a proteínas (Figura 44 en página 106). En el caso de la línea ND6_100% en que sí existía aumento de la producción de ROS y de MDA, existe una ligera tendencia a presentar proteínas más oxidadas respecto a la línea MERRF_0%, pero esta tendencia no ha sido suficientemente importante para ser estadísticamente significativa (Figura 46 en página 107).

Existe muy poca bibliografía sobre la oxidación de proteínas asociada a mutaciones del ADNmt, por lo que resulta muy difícil comparar nuestros resultados con los de otros trabajos publicados. Existen estudios sobre oxidación de proteínas asociada al envejecimiento (Judge S, 2005). Sería interesante desarrollar nuevos trabajos sobre la implicación de mutaciones mitocondriales concretas en la oxidación de las proteínas, ya que la oxidación de los componentes de la CTE puede llegar a alterar su funcionalidad siendo otro marcador más del estado oxidativo de la célula.

5.2.3.4 Estudio del daño oxidativo al ADNmt

Finalmente estudiamos si presentaba daño oxidativo el ADNmt. El ADNmt está localizado en la matriz mitocondrial adyacente a la CTE, principal lugar de producción de ROS en la mitocondria, por lo que es de esperar que en situaciones en que se produzcan muchas ROS puede resultar dañado. Al analizar el daño oxidativo a nuestras líneas de cíbridos transmitocondriales nos encontramos con resultados diversos. En la línea mutada COX_100% no observamos incremento de la oxidación del ADNmt (presentado en los resultados como disminución de la eficiencia de amplificación) respecto a la línea control COX_0%, resultado en concordancia con la producción de peróxido de hidrógeno, oxidación lipídica y proteica (Figura 52 en página 112).

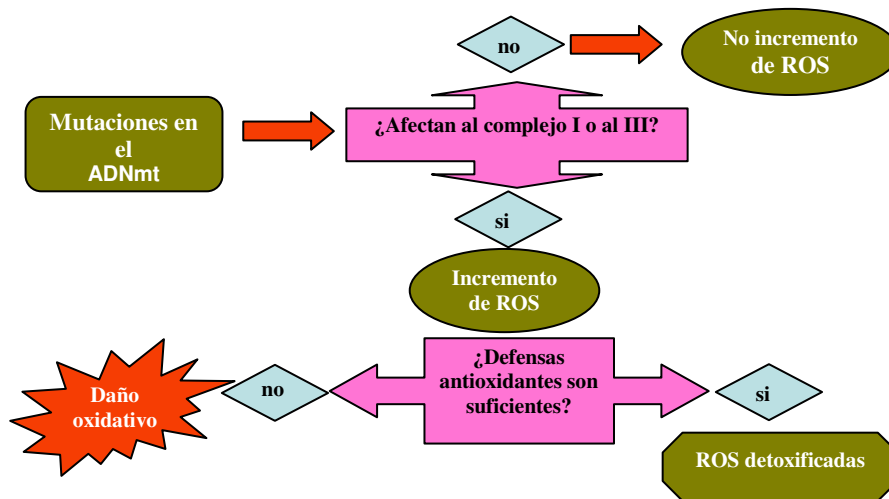
En cambio en las líneas celulares mutadas MERRF_100% y ND6_100% sí que se observó un incremento de la oxidación del ADNmt. En ND6_100% (Figura 54 en página 113), que ya presentaba daño oxidativo en los lípidos, parece haber un ambiente extremadamente oxidante, y las defensas antioxidantes celulares no deben ser suficientes para compensar las ROS producidas. En MERRF_100% también se observó daño en el ADNmt (Figura 48 en página 109), en cambio no se encontró daño ni a lípidos ni a proteínas. Este hecho puede explicarse porque el ADNmt está muy cercano al lugar de producción de las ROS y además es un daño mucho más localizado que el medido en la oxidación lipídica y proteica celular. De esta manera el aumento de la oxidación de proteínas y lípidos mitocondriales, podría no apreciarse al determinar la oxidación proteica y lipídica celular total.

En la línea mutada MELAS_100% no se observaron diferencias en cuanto a la oxidación del ADNmt respecto a la línea control MERRF_0% (Figura 50 en página 110). Sí que se observó una tendencia a presentar una mayor oxidación en la línea mutada respecto la línea control, pero no fue estadísticamente significativa.

Tampoco existen demasiados trabajos que asocien una mutación determinada con un efecto sobre la oxidación del ADNmt. La mayoría de trabajos la estudian asociada al envejecimiento (Short KR, 2005), a determinadas enfermedades relacionadas con las mitocondrias (Wang J, 2005), o para reflejar la mayor susceptibilidad del ADNmt frente al nuclear (Yakes FM, 1997). En estos trabajos observan siempre una mayor oxidación del ADNmt respecto al nuclear, que se asocia a la proximidad del ADNmt al lugar de generación de las ROS, a una menor eficiencia en sus mecanismos de reparación y a una mayor desprotección al no formar estructuras secundarias o terciarias tan complejas como el ADN nuclear.

En resumen, en este trabajo se han analizado diferentes líneas celulares con diferentes mutaciones en su ADNmt, procedentes de pacientes previamente diagnosticados. Se ha analizado el efecto de las diferentes mutaciones del ADNmt sobre la producción de ROS y el posible daño oxidativo producido. Se ha observado un comportamiento diferente según la mutación analizada, así en la línea portadora de la mutación en el complejo IV no se ha observado producción de ROS y por lo tanto tampoco daño ni a lípidos, ni a proteínas, ni al ADNmt, sugiriendo que esta mutación no afectara a la producción de ROS por parte de la CTE. Las líneas celulares portadoras de la mutación en un ARNt se comportan de una forma parecida, observándose un incremento en la producción de ROS en las líneas portadoras de la mutación. El incremento de ROS no se traduce en daño a los lípidos ni a las proteínas. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio de la actividad de los enzimas antioxidantes en las líneas MERRF_100% y MELAS_100%, se observó un claro incremento de todos ellos, por lo que probablemente este incremento de actividad de las defensas antioxidantes, es capaz de detoxificar todas las ROS producidas. En cuanto al ADNmt el comportamiento es similar, ya que en ambos casos se observa un aumento del daño, pero en el caso de la línea portadora de la mutación A8344G los resultados son estadísticamente significativos. En el caso de la mutación en el complejo I, se observa un incremento de la producción de ROS que se traduce en un daño claro en los lípidos y el ADNmt. En esta línea celular las defensas antioxidantes no deben ser capaces de eliminar las ROS producidas y por eso se observa más daño oxidativo.

Como se ha visto no todas las mutaciones en el ADNmt se traducen en un mismo sentido en cuanto a la producción de estrés oxidativo en las células. Parece ser que las mutaciones que afecten al funcionamiento de los complejos I y III provocarán un aumento de la producción de ROS con la posibilidad de producirse daño oxidativo, mientras que parece que mutaciones en el complejo IV no. Un esquema de esta hipótesis podría ser el siguiente:



En algunas mutaciones el estrés oxidativo puede llegar a jugar un papel más importante que en otras e incluso según el tipo celular en que se encuentre la mutación también puede influir. En este sentido en un trabajo reciente se ha observado como mutaciones típicas de LHON solo producían efectos fenotípicos significativos cuando se diferenciaban en células neuronales NT2, indicando que el las mutaciones de LHON requieren encontrarse en un ambiente típico de células neuronales diferenciadas para desarrollar la patología (Wong A, 2002). En otro trabajo utilizando un ratón transgénico para el translocador de nucleótidos de adenina (*Ant1*), han encontrado que el corazón presenta más daño oxidativo que el músculo esquelético, indicando una mayor susceptibilidad del tejido o una menor activación de las defensas antioxidantes (Esposito LA, 1999). Además se sabe que una misma mutación puede estar en diferente grado de heteroplasmia en diferentes tejidos, y se acepta que según este grado de heteroplasmia y la demanda energética del tejido se desarrollará la enfermedad o no. En un trabajo muy reciente se ha observado en la mutación A8344G, una relación directa entre el grado de heteroplasmia y los niveles de F₂-isoprostanos (otro marcador de daño oxidativo a lípidos) en plasma de un largo pedigrí familiar (Canter JA, 2005).

Así el panorama que se plantea en cuanto a las mutaciones mitocondriales es bastante complejo, ya que unas mutaciones provocarán incremento del estrés oxidativo mientras que otras no, y además dependiendo del grado de heteroplasmia, tipo celular o tejido donde se encuentre la mutación, el estrés oxidativo generado será más o menos importante y perjudicial para la célula. Además la edad del paciente también puede influir para la expresión fenotípica de la mutación ya que se ha observado que con la

edad existe una disminución de la función mitocondrial y de la cantidad de ADNmt, asociándose al daño oxidativo que haya podido sufrir (Short KR, 2005).

CONCLUSIONES

6-.CONCLUSIONES

1. Se ha diagnosticado una paciente afectada de diabetes mellitus, sordera y miopatía de herencia materna. En esta paciente se ha identificado la mutación A3243G en el ARNt^{Leu(UUR)} en su ADNmt.
2. Se ha identificado la mutación A8344G en el ARNt^{Lys} del genoma mitocondrial de una paciente afectada de lipomatosis múltiple, severa intolerancia al ejercicio y accidentes cerebrovasculares.
3. Se ha estudiado la mutación G6930A en el gen *COI*, que codifica la subunidad I del complejo IV de la cadena de transporte electrónico, en el genoma mitocondrial de una paciente con una afectación multisistémica incluyendo debilidad muscular, un severo defecto visual y sordera total.
4. Se ha encontrado una nueva mutación patogénica (T14487C) en el ADNmt en el gen *ND6* que codifica para la subunidad 6 del complejo I de la cadena de transporte electrónico, en un paciente que presentaba necrosis bilateral del estriado y distonia generalizada.
5. Se han generado 6 líneas de híbridos transmitocondriales con las mutaciones A3243G, A8344G, G6930A y T14487C para caracterizar el estrés oxidativo que pudieran provocar estas mutaciones.
6. Para inhibir la peroxidación lipídica “in vitro” es más efectivo utilizar hidroxitolueno butilado a una concentración de 3 mM que EDTA, en muestras procedentes de cultivos de híbridos transmitocondriales.
7. En la línea portadora de la mutación A8344G (ARNt^{Lys}) se ha observado un incremento de la producción de peróxido de hidrógeno, que no ha provocado un aumento en la peroxidación lipídica ni proteica. Sin embargo se ha observado un incremento de oxidación del ADNmt.

8. En la línea portadora de la mutación A3243G ($\text{ARNt}^{\text{Leu(UR)}}$) se ha observado un incremento de la producción de peróxido de hidrógeno, que no se traduce en un aumento de la oxidación de los lípidos, de las proteínas o del ADNmt.
9. En la línea portadora de la mutación G6930A (*COI*) no se ha observado incremento de la producción de peróxido de hidrógeno, ni incremento de oxidación de lípidos, proteínas o ADNmt.
10. En la línea portadora de la mutación T14487C (*ND6*) se ha observado un incremento de la producción de peróxido de hidrógeno, un incremento de la oxidación de los lípidos y del ADNmt, sin incremento en la oxidación de las proteínas.
11. Nuestros resultados sugieren que mutaciones que afecten al funcionamiento del complejo I y III provocarán un aumento de la producción de ROS, mientras que parece que mutaciones en el complejo IV no.

BIBLIOGRAFÍA

7-. BIBLIOGRAFÍA

Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*. 370(1994):621-628

Adachi T, Wang XL. Association of EC-SOD phenotype with the endothelial constitutive NO synthase polymorphism. *FEBS Lett*. 433(1998):166-168

Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res*. 31(2003):1640-1645

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Conversión energética: Mitocondrias y cloroplastos. En: *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, Segunda edición (1989): 364-6

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(1993):7915-7922

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290(1981):457-465

Andreu AL, Bruno C, Shanske S, Shtilbans A, Hirano M, Krishna S, Hayward L, Systrom DS, Brown RH Jr, DiMauro S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology*. 51(1998):1444-1447

Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Palloti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, DiMauro S. Exercise intolerante due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 341(1999):1037-1044.

Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, Shoubridge EA. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 72(2003):101-114

Arnold S, Kadenbach B. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome c oxidase. *Eur J Biochem.* 249(1997):350-354

Arnold S, Kadenbach B. Intramitochondrial ATP/ADP-ratios control cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Lett.* 443(1999):105-108.

Babior BM. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life.* 50(2000):267-269

Banci L, Benedetto M, Bertini I, Del Conte R, Piccioli M, Viezzoli MS. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry.* 37(1998):11780-11791.

Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med.* 8(1990):523-539

Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 31(1999):347-366

Barrientos A, Moraes CT. Titrating the effects of mitochondrial complex impairment in the cell physiology. *J Biol Chem.* 274(1999):16188-16197

Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene.* 286(2002):53-63

Barrientos A. In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. *Methods.* 26(2002a):307-316

Battistoni A, Folcarelli S, Rotilio G, Capasso C, Pesce A, Bolognesi M, Desideri A. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the monomeric Cu,Zn superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* (1996):2125-2127

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide superoxide and peroxynitrite: the good the bad and the ugly. *Am J Physiol.* 271(1996):1424-1437

Benov L, Fridovich I. Growth in iron-enriched medium partially compensates *E. coli* for the lack of Mn and Fe SOD. *J Biol Chem.* 273(1998):10313-10316

Beretta S, Mattavelli L, Sala G, Tremolizzo L, Schapira A, Martinuzzi A, Carelli V, Ferrarese C. Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain.* 127(2004):2183-2192

Berkovic SF, Andermann F, Shoubridge EA, Carpenter S, Robitaille Y, Andermann E, Melmed C, Karpati G. Mitochondrial dysfunction in multiple symmetric lipomatosis. *Ann Neurol* 29(1991):566-569

Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem.* 69(2000):1005-1075

Bird RP, Hung SS, Hadley M, Draper HH. Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem.* 128 (1983):240-244

Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 156(1976):435-444

Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet.* 11(1995):144-149

Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem.* 278(2003):50961-50969

Brand R, Keston AS. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: a stable reagent for fluorometric analysis. *Annal Biochem.* 11(1965):6-9

Brown MD, Sun F, Wallace DC. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet.* 60(1997):381-387

Bruno C, Martinuzzi A, Tang Y, Andreu AL, Pallotti F, Bonilla E, Shanske S, Fu J, Sue CM, Angelini C, DiMauro S, Manfredi G. A stop-codon mutation in the human mtDNA Cytochrome *c* oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV. *Am J Hum Genet.* 65(1999):611-620

Cabezón E, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F₁-ATPase. *Embo J.* 20(2001):6990-6996

Campos Y, Martin MA, Navarro C, Gordo P, Arenas J. Single large-scale mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis. *Neurology.* 47(1996):1012-1014

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 325(1987):31-36

Canter JA, Eshaghian A, Fessel J, Summar ML, Roberts LJ, Morrow JD, Sligh JE, Haines JL. Degree of heteroplasmy reflects oxidant damage in a large family with the mitochondrial DNA A8344G mutation. *Free Radic Biol Med.* 38(2005):678-682

Carelli V, Ghelli A, Bucchi L, Montagna P, De Negri A, Leuzzi V, Carducci C, Lenaz G, Liguori E, Degli Esposti M. Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol.* 45(1999):320-328

Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy. In: Schapira AHV, DiMauro S, editors. Mitochondrial disorders in neurology. 2nd edition. Boston: Butterworth-Heinemann, (2002):115-142

Carrodegua JA, Pinz KG, Bogenhagen DF. DNA binding properties of human pol gammaB. *J Biol Chem.* 277(2002):50008–50014

Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics.* 2(2003):117-126.

Casali C, Fabrizi GM, Santorelli FM, Colazza G, Villanova M, Dotti MT, Cavallaro T, Cardaioli E, Battisti C, Manneschi L, DiGennaro GC, Fortín D, Spadaro M, Morocutti C, Federico A. Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology.* 52(1999):1003-1004

Cathcar R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem.* 134(1983):111-116

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. Central role of Complex III. *J Biol Chem.* 278(2003):36027-36031

Chernyak BV. Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Biosci Rep.* 17(1997):293-302

Chevion M, Berenshtein E, Stadman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 33(2000):99-108

Chinnery PF. Epidemiology of mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol.* 48 (2000):188-193

Chinnery PF, Brown DT, Andrews RM, Singh-Kler R, Riordan-Eva P, Lindley J, Applegarth DA, Turnbull DM, Howell N. The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain.* 124(2001):209-218

Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 (1992):4221-4225

Chomyn A, Enriquez JA, Micol V, Fernandez-Silva P, Attardi G. The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J Biol Chem.* 275(2000):19198-19209

Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71(1974):2777-2781

Clayton DA. Replication of mitochondrial DNA. *Cell.* 28(1982): 693-705

Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum Reprod.* 15 (2000):11-17

Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz AD. Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J.* 6(1992):669-673

Crofts AR. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol.* 66(2004):689-733

Curran SP, Leuenberger D, Oppliger W, Koehler CM. The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* 21(2002):942-953

D'Aurelio M, Pallotti F, Barrientos A, Gajewski CD, Kwong JQ, Bruno C, Beal F, Manfredi G. In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harbouring a stop-codon mutation in the mitochondrial DNA-encoded cytochrome *c* oxidase subunit I. *J Biol Chem.* 276(2001):46925-46932

Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 27(1999):1151-1163

Davis AJ, Sepuri NB, Holder J, Johnson AE, Jensen RE. Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J Cell Biol.* 150(2000):1271-1282

De Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman JW, Benayoun E, Chretien D, Kadhom N, Lombes A, de Baulny HO, Niaudet P, Munnich A, Rustin P, Rotig A. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet.* 29(2001):57-60

De Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RP, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Herzog PJ, Kola I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, GPX1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 273(1998):22528-22536

DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Servidei S, De Vivo DC, Schon EA. Mitochondrial myopathies. *J Inherit Metab Dis.* 10(1987):113-128

DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, editors. The molecular and genetic basis of neurological disease. (1997) Boston: Butterworth-Heinemann; 389-446

DiMauro S, Bonilla E, Davidson M, Hirano M, Schon EA. Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta* 1366(1998):199-210

Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D, Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J.* 332(1998):251-255

Drahota Z, Chowdhury SK, Floryk D, Mracek T, Wilhelm J, Rauchova H, Lenaz G, Houstek J. Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *J Bioenerg Biomembr.* 34(2002):105-113

Dubin DT, Montoya J, Timko KD, Attardi G. Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J Mol Biol.* 157(1982):1-19

Engel WK, Cunningham CG. Rapid examination of muscle tissue: an improved trichrome stain method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology.* 13(1963): 919-923

Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G. mtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet.* 10(1995):47-55

Enzi G, Angelini c, Negrin P, Armani M, Pierobon S, Fedele D. Sensory, motor and autonomic neuropathy in patients with multiple symmetric lipomatosis. *Medicine.* 64(1985):388-393

Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(1999):4820-4825

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med.* 11(1991):81-128

Esworthy RS, Mann JR, Sam M, Chu FF. Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(2000):G426-436

Fan L, Sanschagrin PC, Kaguni LS, Kuhn LA. The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(1999): 9527–9532

Fawcett DW. Bloom and Fawcett a Textbook of Histology. Publisher: Chapman & Hall; 12th edition (1994)

Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol.* 88(2003):41-56

Flierl A, Reichmann H, Seibel P. Pathophysiology of the MELAS 3243 transition mutation. *J Biol Chem.* 272(1997):189-196

Forman HJ, Kennedy J. Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. A function of the primary dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 173(1976):219-224

Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med.* 4(1988):155-161

Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418(1997):291-296

Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*. 348(1990):651-653

Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce JA, MacGregor GR, Wallace DC. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet*. 16(1997):226-234

Grossman LI, Watson R, Vinograd J. The presence of ribonucleotides in mature closed-circular mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 70(1973):3339-3343

Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem*. 271(1996):15504-15509

Hagerhall C. Succinate:quinoneoxio-reductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*. 1320(1997):107-141

Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharm*. 49(1995):1341-1348

Han D, Williams E, CAdenas E. Mitochondrial respiratory Chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J*. 353(2001):411-416

Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*. 278(2003):5557-5563

Hanna MG, Nelson IP, Morganhughes JA, Harding AE. Impaired mitochondrial translation in human myoblasts harbouring the mitochondrial DNA tRNA lysine 8344 A→G (MERRF) mutation: Relationship to proportion of mutant mitochondrial DNA. *J Neurol Sci*. 130(1995):154-160

Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys.* 335(1996):295-304

Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PW, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(1998):288-293

Helgason A, Siguroardottir S, Gulcher JR, Ward R, Stefansson K. mtDNA and the origin of the Icelanders: deciphering signals of recent population history. *Am J Hum Genet.* 66(2000):999-1016

Hendrick JP, Hodges PE, Rosenberg LE. Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three amino-acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(1989):4056-4060

Hirano M, Marti R, Ferreira-Barros C, Vila MR, Tadesse S, Nishigaki Y, Nishino I, Vu TH. Defects of intergenomic communication:autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. *Semin Cell Dev Biol.* 12(2001):417-427

Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem.* 279(2004):32804-32812

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 331(1988):717-719

Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 46(1990):428-433

Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading-and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell.* 100(2000):515-524

Hunt C, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Goleen W, Kapp-Herr CV, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ, Spitz DR. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.* 58 (1998):3986-3992

Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 273(1998):1990-1997

Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet.* 26(2000):176-181

Inoue K, Ogura A, Hayashi JI. Production of mitochondrial DNA transgenic mice using zygotes. *Methods.* 26(2002):358-363

Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science.* 281(1998):64-71

Iyengar B, Luo N, Farr CL, Kaguni LS, Campos AR. The accessory subunit of DNA polymerase gamma is essential for mitochondrial DNA maintenance and development in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(2002):4483-4488

Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 24(1996):1389-1394

Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 20(1996):251-256

Johns DR, Neufeld MJ. Cytochrome b mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 181(1991):1358-1364

Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburg C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J.* 19(2005):419-421

Kadowaki T, Kadowaki Y, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, Tanabe Y, Sakura H, Awata T, Goto Y, Hayakawa T, Matsuoka K, Kawamori R, Kamada T, Horai S, Nonaka I, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 330(1994):962-968

Kanki T, Nakayama H, Sasaki N, Takio K, Alam TI, Hamasaki N, Kang D. Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci.* 1011(2004):61-68

Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 43(1974):695-719

Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen A. Role of adenina nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science.* 289(2000):782-785

Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicroquantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem.* 11(1965):1-5

King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 246(1989):500-503

King MP, Koga Y, Davidson M, Shon EA. Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Mol Cell Biol.* 12(1992):480-490

Kirby DM, Kahler SG, Freckmann ML, Reddiough D, Thorburn DR. Leigh disease caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in unrelated families. *Ann Neurol.* 48(2000):102-104

Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanism of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* 274(1999):13908-13914

Klopstock T, Naumman M, Schalke B, Bischof F, Seibel P, Kottlors M, Eckert P, Reiners K, Toyka KV, Reichmann H. Multiple symmetric lipomatosis: abnormalities in complex IV and multiple deletions in mitochondrial DNA. *Neurology.* 44(1994):862-866

Klopstock T, Naumann M, Seibel P, Schalke B, Reiners K, Reichmann H. Mitochondrial DNA mutations in multiple symmetric lipomatosis. *Mol Cell Biochem.* 174(1997):271-275

Knight JA, Voorhess RP, Martin L. The effect of metal chelators on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann Clin Lab Sci.* 22(1992):207-213

Ko TP, Safo MK, Musayev FN, Di Salvo ML, Wang C, Wu SH, Abraham DJ. Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 56(2000):241-245

Kobayashi T, Nakanishi K, Nakase H, Kajio H, Okubo M, Murase T, Kosaka K. In situ characterization of islets in diabetes with a mitochondrial DNA mutation at nucleotide position 2343. *Diabetes.* 46(1997):1567-1571

Koehler CM, Merchant S, Schatz G. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci.* 24(1999):428-432

Kogelnik AM, Lott MT, Brown MD, Navathe SB, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database –1988 update. *Nucleic Acids Res.* 26(1988):112-115

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 60(1998):619-642

Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*. 58(1989):391-397

Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*. 279(2004):4127-4135

Lagerkvist U. "Two out of three": An alternative method for codon reading. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75(1978):1759-1762.

Lardy HA, Wellman H. Oxidative phosphorylation: role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J Biol Chem*. 195(1952):215-224.

Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfords A. Pathogenic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve*. Suppl 3(1995):S102-106

Lee HK, Song JH, Shin CS, Park DJ, Park KS, Lee KU, Koh CS. Decreased mitochondrial DNA content in peripheral blood precedes the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 42(1998):161-167

Lee I, Salomon A, Ficarro S, Mathes I, Lottspeich F, Grossman L, Hüttemann M. cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome *c* oxidase activity. *J Biol Chem*. 280(2005):6094-6100

Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet*. 355(2000):299-304

Letellier T, Heinrich R, Malgat M, Mazat JP. The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochem J*. 302(1994):171-174

Leveque VJ, Stroupe ME, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA, Nick HS, Silverman DN. Multiple replacements of glutamine 143 in human manganese superoxide dismutase: effects on structure, stability, and catalysis. *Biochemistry*. 39(2000):7131-7137

Levin ED, Brady TC, Hocherein EC, Oury TD, Jonsson LM, Marklund SL, Crapo JD. Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: functional importance for learning. *Behav Genet*. 28(1998):381-390

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadman ER. Determination of carbonyl content in oxidative modified proteins. *Methods Enzymol*. 186(1990):464-478.

Levine RL, Williams J, Stadman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 233(1994):346-357

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91(1997):479-489

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 11(1995):376-381

Liochev SI, Chen LL, Hallewell RA, Fridovich I. The familial ALS-associated amino acid substitutions E100G, G93A, and G93R do not influence the rate of inactivation of Cu,Zn-SOD by H₂O₂. *Arch Biochem Biophys*. 352(1998):237-239

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(1962):1776-1804

Luo X, Pitkänen, Kassovska-Bratinova S, Robinson B, Lehotay D. Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblast from patients with complex I deficiency. *J Clin Invest.* 99(1997):2877-2882

Maassen JA, van Essen E, van den Ouweland JM, Lemkes HH. Molecular and clinical aspects of mitochondrial diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 109(2001):127-134

Maechler P, Wolheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic β -cells. *Nature.* 414(2001):807-812

Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, Anbinder Y, Berkowitz D, Hartman C, Barak M, Eriksson S, Cohen N. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 29(2001):337-341 [Erratum *Nat Genet* 29(2001):491]

Magalhaes PJ, Andreu AL, Schon EA. Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol Biol Cell* 9(1998):2375-2382

Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski C, DeVivo D, Lenaz G, Wiedmann M, Manfredi G. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet.* 13(2004):869-879

Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr.* 12(1991):99-117

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* 191(1961):144-148.

Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. Identification of initiation sites for heavy strand and light strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79(1982):7195-7199

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 279(2004):49064-49073

Muñoz-Málaga A, Bautista J, Salazar JA, Aguilera I, García R, Chinchón I, Segura MD, Campos Y, Arenas J. Lipomatosis, proximal myopathy, and the mitochondrial 8344 mutation. A lipid storage myopathy? *Muscle Nerve.* 23(2000):538-542

Murakami E, Feng JY, Lee H, Hanes J, Johnson KA. Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase γ . Importance in mitochondrial DNA replication. *J Biol Chem.* 19(2003):36403-36409

Napiwotzki J, Shinzawa-Itoh K, Yoshikawa S, Kadenbach B. ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity. *J Biol Chem.* 378(1997):1013-1021.

Naumann M, Kiefer R, Toyka KV, Sommer C, Seibel P, Reichmann H. Mitochondrial dysfunction with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers point mutation in nerve, muscle, and adipose tissue of a patient with multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve.* 20(1997):833-839

Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 64(1995):689-719

Nielsen F, Borg Mikkelsen B, Bo Nielsen J, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem.* 43(1997):1209-1217

Nijtmans L, Ugalde C, van den Heuvel LP, Smeitink J. Function and dysfunction of the oxidative phosphorylation system. En: Topics in Current Genetics. Mitochondrial function and Biogenetics. Editores: Köler C, Bauer MF. Springer-Verlag, Berlin (2004)

Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science.* 283(1999):689-692

Nohl H. Is redox-cycling ubiquinone involved in mitochondrial oxygen activation? *Free Radic Res Commun.* 8(1990):307-315

Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature.* 290(1981):470-474

Oostra RJ, Bolhuis FA, Wijburg FA, Zorn-Ende G, Bleeker-Wagemakers EM. Leber's hereditary optic neuropathy: correlations between mitochondria genotype and visual outcome. *J Med Genet.* 31(1994):280-286

Pang CY, Lee HC, Wei YH. Enhanced oxidative damage in human cells harbouring A3243G mutation of mitochondrial DNA: implication of oxidative stress in the pathogenesis of mitochondrial diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 54(2001):45-56

Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J, Houstek J. Genetic defects of cytochrome *c* oxidase assembly. *Physiol Res.* 53(2004):231-223

Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *PNAS.* 102(2005):719-724

Pinz KG, Bogenhagen DF. Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol Cell Biol.* 18(1998):1257-1265

Pitkanen S, Robinson BH. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest.* 98(1996):345-351

Poulton J, Luan J, Macaulay V, et al. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet.* 11(2002):1581-1583

Pryor WA, Stanley JP, Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*. 11(1976):370-379

Ran Q, Liang H, Gu M, Qi W, Walter CA, Roberts LJ 2nd, Herman B, Richardson A, Van Remmen H. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 279(2004):55137-55146

Rana M, de Coo I, Diaz F, Smeets H, Moraes C. An out-of-frame cytochrome *b* gene deletion from a patient with parkinsonism is associated with impaired complex III assembly and an increase in free radical production. *Ann Neurol* 48(2000):774-781

Ravn K, Wibrand F, Hansen FJ, Horn N, Rosenberg T, Schwartz M. An mtDNA mutation, 14453G→A, in the NADH dehydrogenase subunit 6 associated with severe MELAS syndrome. *Eur J Hum Genet*. 9(2001):805-809

Reaume A, Elliot JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood G, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD. Motor neurons in Cu/ZnSOD-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*. 13(1996):43-47

Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(1988):6465-6467

Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Diez-Sanchez C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Diaz M, Urries A, Montoso L, Lopez-Perez M, Enriquez JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*. 67(2000):682-696

Rustin P, Rötig A. Inborn errors of complex II – Unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1553(2002):117-122

Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet.* 29(2001):342-344

Santos JH, Mandavilli BS, Van Houten B. Measuring oxidative mitochondrial DNA damage and repair using quantitative PCR. *Methods Mol Biol.* 197(2002):159-176

Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cell. *J Bioenerg Biomembr.* 29(1997):109-119

Schon E. The mitochondrial genome. In Rosenberg, R.N., Prusiner S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L., Nestler, E.J. *The Molecular and Genetic Bases of Neurologic and Psychiatric Diseases (Mitochondrial Disorders, Chapter 14, pp.179-189).* Butterworth-Heinemann (1997), 3rd Edition

Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl Med.* 347(2002):576-580

Sciacco M, Bonilla E. Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections. *Methods Enzymol.* 264(1996):509-521

Shägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J.* 19(2000):1777-1783

Shapira Y, Harel S, Russel A. Mitochondrial encephalomyopathies: a group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. *Isr J Med.* 13(1977):161-164

Shatz G. Protein transport. The doors to organelles. *Nature.* 395(1998):439-440

Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell.* 61(1990):931-937

Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Sreekumaran Nair K. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *PNAS*. 102(2005):5618-5623

Shoubridge EA. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet*. 10(2001):2277-2287

Shoubridge EA. Cytochrome *c* oxidase deficiency. *Am J Med Genet*. 106(2001b):46-52

Shy GM, Gonatas NK. Human myopathy with giant abnormal mitochondria. *Science*. 145(1964):493-496

Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J Lipid Res*. 38(1997):612-622

Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*. 222(1984):1-15

Soejima A, Inoue K, Takai D, Kaneko M, Ishihara H, Oka Y, Hayashi JI. Mitochondrial DNA is required for regulation of glucose stimulated insulin secretion in a mouse pancreatic beta cell line, MIN6. *J Biol Chem*. 271(1996):26194-26199

Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Hernandez-Peña J, Garcia-Arumi E, Playan A, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol*. 54(2003):527-530

Stock D, Leslie AG, Walker JE. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*. 286(1999):1700-1705

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402(1999):371-372

Takahashi MA, Asada K. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys*. 226(1983):558-566

Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 277(2002):50966-50972

Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JT, Wherret J, Smith C, Rudd N, Petrova-Benedict R, Robinson BH. Heteroplasmic mtDNA mutation (T to G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet.* 50(1992):852-858

Taylor RW, Birch-Machin MA, Bartlett K, Lowerson SA, Turnbull DM. The control of mitochondrial oxidations by complex III in rat muscle and liver mitochondria. Implications for our understanding of mitochondrial cytopathies in man. *J Biol Chem.* 269(1994):3523-3528

Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 3(2000):373-384

Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. Respiration chain complex I deficiency. *Am J Med Genet.* 106(2001):37-45

Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature.* 429(2004):417-423

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 269(1995):1069-1074

Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 191(1980):401-410

Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* 217(1982):401-410

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552(2003):335-344

Ugalde C, Triepels RH, Coenen MJ, van den Heuvel LP, Smeets R, Uusimaa J, Briones P, Campistol J, Majamaa K, Smeitink J, Nijtmans L. Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Ann Neurol.* 54(2003):665-669

Ugalde C, Jansen R, Van den Heuvel L, Smeitink J, Nijtmans L. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet.* 13(2004):659-667

Van Etten RA, Bird JW, Clayton DA. Identification of the 3'-ends of the two mouse mitochondrial ribosomal RNAs. The 3'-end of 16 S ribosomal RNA contains nucleotides encoded by the gene for transfer RNA^{Leu}UUR. *J Biol Chem.* 258(1983):10104-10110

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Moll Life Sci.* 59(2002):1428-1459

Vila MR, Gamez J, Solano A, Playan A, Schwartz S, Santorelli FM, Cervera C, Casali C, Montoya J, Villarroya F. Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* 278(2000):800-802

Villani G, Attardi G. *In vivo* control of respiration by cytochrome *c* oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(1997):1166-1171

Von Heijne G, Steppuhn J, Hermann RG. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem.* 180(1989):535-545

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 242(1988):1427-1430

Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene.* 238(1999):211-230

Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 93(2005):953-962

Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol.* 44(2001):1-11

Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 248(1973):4793-4796

Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 313(1996):17-29

Wood PM. The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. *Trends Biochem Sci.* 12(1987):250-251

Wong A, Cavalier L, Collins-Schramm HE, Seldin MF, McGrogan M, Savontaus ML, Cortopassi G. Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Hum Mol Genet.* 11(2002):431-438

Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J. Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science.* 277(1997):60-66

Yagui K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Res.* 15(1976):212

Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(1997):514-519

Yan LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med.* 34(2003):496-502

Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J.* 328(1997):599-605

Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, Vergani L, Angeli P, Gringeri E, Jacobs HT, Holt IJ. Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-Strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell.* 111(2002):495-505

Zeviani M. The expanding spectrum of nuclear gene mutations in mitochondrial disorders. *Semin Cell Dev Biol.* 12(2001):407-416

Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, Kim SH. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature.* 16(1998):677-684

APÉNDICES

Estas son las abreviaturas que se han utilizado en esta tesis:

ATP: adenosina trifosfato

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADP: adenosina difosfato

ARN: ácido ribonucleico

BER: *base excision repair*

BHT: hidroxitolueno butilado

BSN: necrosis bilateral del estriado

CK: creatina quinasa

CoQ: coenzima Q

COX: citocromo oxidasa

CPEO: *chronic progressive external ophtalmoplegia*

CSB: *conserved sequence blocks*

CuZn-SOD / SOD1: Cobre, zinc superóxido dismutasa

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH-DA: diacetato de diclorofluorescina

DCPIP: diclorofenol indofenol oxidoreductasa

DNP: 2,4-dinitrofenilhidrazona

EC-SOD: superóxido dismutasa extracelular

EMG: electromiograma

FAD: Flavina adenina dinucleótido

FMN: Flavina mononucleótido

GPx: glutation peroxidasa

H₂O₂: peróxido de hidrógeno / agua oxigenada

HO₂[·]: anión superóxido

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

IR: intermediarios de replicación

LHON: *Leber hereditary optic neuropathy*

MDA: malondialdehído

MELAS: *mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis and stroke like episodes*

MERRF: *Myoclonus epilepsy with ragged-red fibers*

MILS: *Maternally inherited Leigh's syndrome*

MNGIE: *mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy*

MnSOD / SOD-2: manganeso superóxido dismutasa

MRP: *mitochondrial RNA-processing ribonuclease*

MRI: imágenes de resonancia magnética

MSL: lipomatosis múltiple simétrica

mtTFA: *mitochondrial transcription factor A*

mtTERF: *mitochondrial transcription termination factor*

NADH: dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido

NARP: *Neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa*

NO: óxido nítrico

O₂^{·-}: anión superóxido

OH: radical hidroxilo

OXPHOS: fosforilación oxidativa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilén glicol

PMS: metasulfato de fenacina

PUFA: ácido graso poliinsaturado

RFLP: *restriction fragment length polymorphism*

ROS: *reactive oxygen species*

RRF: *ragged-red fibers*

SDH: succinato deshidrogenasa

TAC: tomografía axial computerizada

TBA: ácido tiobarbitúrico

UTR: *untranslated region*

Lista de cebadores utilizados para amplificar los ARNt y resto de genes del ADNmt:

NOMBRE	SECUENCIA
531F	TAACCCCATACCCCGAACCA
718R	TCACTGGAACGGGGATGCTT
1492F	ACCCTCCTCAAGTATACTTC
1803R	TTTCATCTTTCCCTTGCGGT
3087F	CCAGGTCGGTTTCTATCTAC
3472R	AFAGTTTTATGGCGTCAGCG
4181F	ACTTCCTACCACTCACCTA
4370F	TTCTCCGTGCCACCTATCAC
4388R	TGATACGTGGCACGGACAAT
4553R	GGTAAAAAATCAGTGCGAGC
5454F	CTCATCGCCCTTACCACGCT
5651F	CCCTTACTAGACCAATGGGA
5739R	GCGGGAGAAGTAGATTGAAG
6022R	TCGGCTCGAATAAGGAGGCT
7361F	AGAACCCTCCATAAACCTGG
7667R	GGGCGTGATCATGAAAGGTG
8123F	AACCAAACCACTTTCACCGC
8490F	ATGGGCTTTGGTGAGGGAGG
9917	CGCCGCCTGATACTGGCATT
10149R	TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT
10347F	ATCCTAGCCCTAAGTCTGGC
10568R	TAGGCATAGTAGGGAGGATA
12057F	AAAACCCTCATTACACGAG
12408R	AACGAGGGTGGTAAGGATGG
14587F	ACCCCATAAATAGGAGAAG
14840R	TTCATCATGCGGAGATGTTG
15756F	GAATCGGAGGACAACCAGTA
16119R	TCATGGTGGCTGGCAGTAAT
1F	CTCCTCAAAGCAATACACTG
1R	TGCTAAATCCACCTTCGACC

2F	CGATCAACCTCACCACCTCT
2R	TGGACAACCAGCTATCACCA
3F	GGACTAACCCCTATACCTTCTGC
3R	GGCAGGTCAATTTCACTGGT
4F	AAATCTTACCCCGCCTGTTT
4R	AGGAATGCCATTGCGATTAG
5F	TACTTCACAAAGCGCCTTCC
5R	ATGAAGAATAGGGCGAAGGG
6F	TGGCTCCTTTAACCTCTCCA
6R	AAGGATTAATGGATGCGGTTG
7F	ACTAATTAATCCCCTGGCCC
7R	CCTGGGGTGGGTTTTGTATG
8F	CTAACCGGCTTTTTGCCC
8R	ACCTAGAAGGTTGCCTGGCT
9F	GAGGCCTAACCCCTGTCTTT
9R	ATTCCGAAGCCTGGTAGGAT
10F	CTCTTCGTCTGATCCGTCCT
10R	AGCGAAGGCTTCTCAAATCA
11F	ACGCCAAAATCCATTTCACT
11R	CGGGAATTGCATCTGTTTTT
12F	ACGAGTACACCGACTACGGC
12R	TGGGTGGTTGGTGTAATGA
13F	TTCCCCCTCTATTGATCCC
13R	GTGGCCTTGGTATGTGCTTT
14F	CCCACCAATCACATGCCTAT
14R	TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT
15F	TCTCCATCTATTGATGAGGGTCT
15R	AATTAGGCTGTGGGTGGTTG
16F	GCCATACTAGTCTTTGCCGC
16R	TTGAGAATGAGTGTGAGGGC
17F	TCACTCTCACTGCCCAAGAA
17R	GGAGAATGGGGGATAGGTGT
18F	TATCACTCTCCTACTTACAG

18R	AGAAGGTTATAATTCCTACG
19F	AAACAACCCAGCTCTCCCTAA
19R	TCGATGATGTGGTCTTTGGA
20F	ACATCTGTACCCACGCCTTC
20R	AGAGGGGCAGGGTTCATTC
21F	GCATAATTAACTTTACTTC
21R	AGAATATTGAGGCGCCATTG
22F	TGAAACTTCGGCTCACTCCT
22R	AGCTTTGGGTGCTAATGGTG
23F	TCATTGGACAAGTAGCATCC
23R	GAGTGGTTAATAGGGTGATAG
24F	CACCTTCTCCGTGAAATCA
24R	AGGCTAAGCGTTTTGAGCTG