



Universidad
Zaragoza



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en biotecnología - 2022

**CREACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
UN CÍBRIDO TRANSMITOCONDRIAL
PORTADOR DE UNA NUEVA MUTACIÓN
CON FENOTIPO MITOCONDRIAL**

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

Autora

Ana Escolano Sebastián

Directora

Ester López Gallardo

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

Índice

Abreviaturas	1
Resumen.....	2
Abstract	2
1. Antecedentes	3
2. Hipótesis y objetivos.....	4
3. Material y métodos.....	4
3.1 Material biológico	4
3.2 Aparatos	5
3.3 Reactivos.....	6
3.4 Métodos.....	6
3.4.1. Creación cíbridos transmitocondriales.....	6
3.4.1.1. Aislamiento de plaquetas.....	6
3.4.1.2. Preparación células Rho 0 (ρ^0).....	7
3.4.1.3. Fusión celular.....	7
3.4.1.4. Tratamiento post-fusión y selección de cíbridos.....	7
3.4.2. Análisis de ácidos nucleicos.....	7
3.4.2.1. Extracción de DNA a partir de pellets celulares.....	7
3.4.2.2. Cuantificación de DNA.....	8
3.4.2.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	8
3.4.2.3.A. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	8
3.4.2.3.B. Digestión mediante enzimas de restricción.....	9
3.4.2.3.C. Separación de los fragmentos por electroforesis con bromuro de etidio.....	10
3.4.3. Ensayos de caracterización del cíbrido	10
3.4.3.1. Preparación de las líneas celulares.....	10
3.4.3.2. Ensayo de medida del ATP.....	10
3.4.3.3. Ensayo de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	11
3.4.3.4. Ensayo de Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM).....	11
3.4.3.5. Estudio de la curva de crecimiento celular.....	12
3.4.4. Estudio de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa:	12
3.4.4.1. Separación electroforética de los complejos mitocondriales mediante Blue-Native PAGE (BN-PAGE).....	12
3.4.4.1.A. Preparación de las muestras de cultivos celulares.....	12
3.4.4.1.B. Cuantificación de las proteínas: Método de Bradford.....	13
3.4.4.1.C. Electroforesis en gel NativePAGE.....	13

3.4.4.1.D.	Medida histoquímica de actividades enzimáticas de los complejos I y II tras BN-PAGE.	14
3.4.4.2.	Puesta a punto de la medida cinética de la actividad enzimática del complejo I. Cuantificación enzimática de la Citrato Sintasa.	15
3.4.4.2.A.	Recolección de la muestra.	15
3.4.4.2.B.	Preparación de la muestra.	15
3.4.4.2.C.	Cuantificación de las proteínas: ensayo de proteínas BCA.	15
3.4.4.2.D.	Puesta a punto de la medida de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria en cubeta.	15
3.4.4.2.E.	Puesta a punto de la medida de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria en placa de 96 pocillos.	16
3.4.4.2.F.	Cuantificación enzimática de la Citrato Sintasa.	16
4.	Resultados.	17
4.1.	Estudio del paciente 3548.	17
4.2.	Caracterización del híbrido transmitocondrial mutante.	18
4.2.1.	Comprobación de la incorporación de la mutación m.11232T>C al híbrido 3548.	18
4.2.2.	Estudio de la curva de crecimiento.	18
4.3.	Análisis de las funciones mitocondriales.	19
4.3.1.	Estudio de la síntesis de ATP en la mitocondria.	19
4.3.2.	Estudio de la producción de ROS.	20
4.3.3.	Estudio del potencial de membrana mitocondrial.	20
4.4.	Estudio del sistema OXPHOS.	21
4.4.1.	Medida de la actividad del complejo I y II mediante BN-PAGE.	21
4.4.2.	Medida de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria.	21
4.4.2.1.	Puesta a punto de la técnica.	21
4.4.2.2.	Actividad enzimática del complejo I de los híbridos de estudio.	22
4.4.3.	Medida de la actividad enzimática de la citrato sintasa.	22
5.	Discusión.	23
6.	Conclusiones.	24
7.	Conclusions.	24
8.	Bibliografía.	24

Abreviaturas

Acrónimo	Significado	Acrónimo	Significado
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A	NARP	Neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa
ATP	Adenosín trifosfato	NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium
BN-PAGE	Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis	ND4	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 4, complex I
BrdU	Bromodesoxiuridina	OAA	Ácido oxaloacético
BSA	Álbumina sérica bovina	OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
CI	Complejo I	CS	Citrato sintasa
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltoside	pb	Pares de bases
DMEM	Dubeccos Modified Eagle Medium	PBS	Tampón fosfato salino
DMSO	Dimetilsulfóxido	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DNTB	ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)	PEG	Polietilenglicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico	PMS	Metasulfato de fenacina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	RFU	relative fluorescence units
GF-AFC	Gly-Phe-7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin	RLU	Relative Light Units
KP	Tampón fosfato potásico	RNA	Ácido ribonucleico
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes	rRNA	RNA ribosómico
MERRF	Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease	ROS	Especies reactivas de oxígeno
MMP	Potencial de membrana mitocondrial	SFB	Suero fetal bovino
mtDNA	DNA mitocondrial	tRNA	RNA de transferencia
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido		

Tabla 1: listado de abreviaturas mencionadas en el presente trabajo y su significado.

Resumen

La mitocondria es el orgánulo encargado de generar energía (ATP) en la célula. Cuenta con su propio sistema genético independiente que codifica, entre otros, proteínas del sistema OXPHOS. Las enfermedades mitocondriales se producen por defectos en dichas proteínas. Estos defectos pueden deberse a mutaciones en el DNA nuclear o en el mtDNA. Las patologías mitocondriales presentan una clínica muy heterogénea y su diagnóstico es complicado. Se agrupan en síndromes (Síndrome de MELAS, MERRF, NARP) y las mutaciones generalmente presentes están bien descritas.

El estudio de las patologías mitocondriales se produce en líneas celulares híbridas al ser un buen modelo de estudio que permite unificar el DNA nuclear en todos los híbridos producidos.

En este trabajo, se crea un híbrido transmitocondrial con plaquetas del paciente 3548 que muestra un fenotipo mitocondrial posiblemente asociado a la mutación m.11232T>C que afecta a la subunidad 4 del complejo I de la cadena respiratoria. Esta mutación ha sido descrita con anterioridad en una ocasión.

Como parte de la caracterización del híbrido 3548 portador de la mutación de estudio, se realizan estudios de la curva de crecimiento, de los niveles de síntesis de ATP, de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del potencial de membrana mitocondrial (MMP). Debido a que la mutación afecta a una subunidad del complejo I, se pretende analizar la actividad de este a través de dos técnicas; BN-PAGE en combinación con detección catalítica y medida de la actividad enzimática por espectrofotometría (puesta a punto de la técnica).

El híbrido 3548 sigue el mismo patrón de crecimiento que los híbridos control y no se encuentran diferencias significativas (p -valor $<0,05$) en los niveles de ATP ni ROS. No obstante, tiene un MMP significativamente menor que los híbridos controles. La técnica de medida de la actividad enzimática del complejo I no reporta resultados fiables.

Abstract

Mitochondria generate energy in ATP form for the cell. This organelle has its own independent genetic system that encodes, among others, proteins of the OXPHOS system. Mitochondrial diseases are caused by defects in these proteins. These defects may be due to mutations in nuclear DNA or mtDNA. Mitochondrial pathologies present a very heterogeneous clinical manifestation and diagnosis is complicated. They are grouped into syndromes (MELAS, MERRF, NARP syndromes) and mutations usually present are well described.

Mitochondrial pathologies study occurs in cybrid cell lines as it is a good study model that allows unifying the nuclear DNA in all the cybrids produced.

In this work, a transmitochondrial cybrid is created with platelets from patient 3548 that shows a mitochondrial phenotype possibly associated with the m.11232T>C mutation that affects subunit 4 of complex I of the respiratory chain. This mutation has only been previously described once.

As part of 3548 cybrid characterization harbouring the study mutation, studies of the growth curve, levels of ATP synthesis, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) are performed. Since the mutation affects a subunit of complex I, it is attempted to analyse its activity through two techniques; BN-PAGE in combination with catalytic detection and measurement of enzymatic activity by spectrophotometry (fine tuning of the technique).

3548 cybrid follows the same growth pattern as the control cybrids and no significant differences (p -value $<0,05$) are found in the levels of ATP or ROS. However, it has a significantly lower MMP than

control hybrids. The technique for measuring the enzymatic activity of complex I does not report solid results.

1. Antecedentes

La mitocondria es el orgánulo citoplasmático principal del cual la célula obtiene energía a través del catabolismo de glúcidos y lípidos en forma de ATP gracias al sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Dicho orgánulo, cuenta con su sistema genético celular propio: el DNA mitocondrial (mtDNA), que es independiente del nuclear. El mtDNA fue secuenciado en su totalidad por primera vez en 1981. (1)

El genoma mitocondrial humano es un DNA de doble hebra, de pequeño tamaño (~16000 pb) y circular cerrado que se transmite únicamente por vía materna a la descendencia. Este mtDNA contiene los genes de 22 tRNAs, los dos rRNA (12S y 16S) y codifica 13 proteínas que forman parte del sistema OXPHOS. Es decir, la mayoría de las proteínas que forman parte de la cadena respiratoria son codificadas por el genoma nuclear.

El sistema OXPHOS está formado por cinco complejos que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria. El transporte de electrones desde el NADH hasta el O₂ a través de los complejos genera un gradiente de protones. La energía almacenada en este gradiente permite la síntesis de ATP en el complejo V.

El mtDNA de los mamíferos se caracteriza por la falta de intrones y por contener varias copias del mismo en la matriz mitocondrial. Tiene su propio código genético diferenciado del código genético universal y de la misma manera que el genoma nuclear está sujeto a sufrir mutaciones, el DNA mitocondrial también puede alterarse. (2) Las mutaciones se acumulan en el mtDNA al carecer de mecanismos de reparación.

Otros aspectos relevantes sobre el mtDNA y que ayudan a comprender las enfermedades mitocondriales y la dificultad que estas conllevan, pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Poliplasmia. En la mitocondria existe más de una molécula de mtDNA, el número varía entre 1.000 y 10.000 copias dependiendo del tipo celular.
- Segregación mitótica. Cuando todas las moléculas de mtDNA de un individuo normal son iguales se denomina homoplasmia. No obstante, pueden aparecer mutaciones en algunas moléculas del mtDNA, coexistiendo mtDNA normal y mutado. A lo que se denomina heteroplasmia. Estas moléculas se segregan al azar entre las células hijas por lo que se hace difícil predecir el fenotipo en ellas.
- Efecto Umbral. Cuando el número de copias de DNA mutado sobrepasa un porcentaje determinado, aparecen los síntomas de la patología mitocondrial.

El mtDNA se categoriza en haplogrupos en función de los SNP (Single-nucleotide polymorphism) que contienen. Los mtDNAs pertenecientes al mismo haplogrupo descienden del mismo ancestro y han sido muy útiles en los estudios de migración de las diferentes poblaciones. Diversos estudios realizados a lo largo de los años demostrarían que los haplogrupos condicionan ciertas funciones celulares. (3) Debido a esta importancia del haplogrupo en la función mitocondrial es importante usar controles del mismo haplogrupo para los estudios funcionales.

Las enfermedades mitocondriales están asociadas a defectos en las proteínas que participan en la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Estos defectos pueden deberse a mutaciones en el DNA nuclear o en el mtDNA (tanto mutaciones puntuales como reorganizaciones). Las patologías mitocondriales presentan, en general, una clínica muy heterogénea y el nivel de heteroplasmia

(porcentaje de mtDNA mutado frente a wild-type) es fundamental en la sintomatología. La mayoría de las mutaciones deletéreas que se producen en el mtDNA afectan al complejo I por ser el de mayor tamaño.

La edad de aparición de estas enfermedades puede ir desde la infancia hasta la edad adulta y la sintomatología es tan amplia que el diagnóstico es complicado. (4) Muchas de las enfermedades se agrupan en síndromes:

- Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON). La mayoría de los casos se deben a tres mutaciones principales: m.11778G>A, m.3460G>A y m.14484T>C. Todas ellas presentes en genes del Complejo I. El síntoma principal es la pérdida de visión. (5)
- Síndrome de MELAS. La mutación más común es m.3243A>G. La sintomatología se agrupa en los siguientes puntos: encefalopatía, miopatía, acidosis láctica y derrame cerebral.
- Síndrome de NARP. Cursa con un retraso en el desarrollo intelectual y se asocia principalmente a las mutaciones m.8993T>G y m.8993T>C, presentes en la subunidad ATP6 de la ATP sintasa.
- Síndrome de MERRF. Un alto porcentaje de los casos se deben a la presencia de la mutación m.8334A>G. Los pacientes sufren un deterioro intelectual progresivo. Es una enfermedad poco común.

En este tipo de enfermedades, una misma mutación ha sido asociada a varios síndromes y por consiguiente, genera fenotipos diferentes en los pacientes. El estudio de estas enfermedades se lleva a cabo gracias a la generación de líneas celulares híbridas.

Los híbridos transmitocondriales se producen al fusionar células enucleadas del paciente (plaquetas o fibroblastos) y células *Rho* 0 que carecen de mtDNA consiguiendo crear líneas celulares con un DNA nuclear homogéneo y el mtDNA del paciente de interés. (5) Este modelo celular permite analizar las células en las mismas condiciones ambientales y con la misma genética nuclear, la única diferencia será la mutación en estudio. De esta manera, se pueden determinar parámetros celulares, bioquímicos y de función mitocondrial que permitan determinar si la mutación mitocondrial produce un fenotipo patológico respecto a los controles empleados.

2. Hipótesis y objetivos

Al grupo de biogénesis y patología mitocondrial llega el informe médico de un paciente (3548) con fenotipo mitocondrial posiblemente asociado a la mutación m.11232T>C que afecta a la subunidad 4 del complejo I de la cadena respiratoria. Se propone su estudio con el fin de determinar si la mutación es la causa de su patología y de si se trata de una nueva mutación asociada a un fenotipo mitocondrial.

Los objetivos de este estudio se pueden recoger, por consiguiente, en los siguientes puntos:

- Creación y caracterización de un híbrido transmitocondrial portador de la mutación de estudio m.11232T>C.
- Creación de un híbrido transmitocondrial control haplogrupo D (haplogrupo del paciente).

3. Material y métodos

3.1 Material biológico

En este estudio se utilizan cuatro líneas celulares principales, ACH y 34J como los dos híbridos control con haplogrupo H (mayoritario en población europea) y haplogrupo J, respectivamente. Dichos híbridos fueron constituidos por el grupo anteriormente y fueron obtenidos gracias a muestras de donantes sanos.

Para este estudio, se crean dos híbridos por fusión de plaquetas con células p⁰ 143-B, línea celular de osteosarcoma que carecen de DNA mitocondrial. El primero de ellos se realiza por plaquetas extraídas de la muestra de sangre de un donante sano con haplogrupo mitocondrial D (característico en la población latinoamericana) como control al que se referenciará como HgD. El segundo de ellos se realiza con las plaquetas aisladas de una muestra de sangre de un paciente con tres mutaciones mitocondriales, la primera de ellas asociada a individuos con enfermedades mitocondriales; 1) m.11232T>C; 2) m.3335T>C; 3) m.15164T>C.

3.2 Aparatos

Aparato	Modelo	Casa Comercial	Función
Incubador	DHD autoflow	Nuaire	Cultivo celular
Campana	NU-437-400E	Nuaire	Cultivo celular
Microscopio invertido	DMIL	Leica	Visualización.
Centrífugas	X-22	Allegra	Centrifugación cultivos celulares.
	MiniSpin plus	Eppendorf	Centrífuga eppendorf.
	5415 R	Eppendorf	Centrífuga eppendorf con temperatura ajustable.
Balanzas	PA124C	OHAUS	Pesado hasta 120g.
	ML204	Mettler Toledo	Balanza analítica.
Espectrofotómetros	ND-100	NanoDrop	Cuantificación DNA.
	NovoSTAR	BMG LABTECH	Espectrofotometría-Luminiscencia-Fluorescencia. Lector placa de 96 pocillos.
	FLUOstar omega	BMG LABTECH	Espectrofotometría-Luminiscencia-Fluorescencia con filtros. Lector placa de 96 pocillos.
	SPECTROstar	BMG LABTECH	Espectrofotometría. Lector placa de 96 pocillos y puerto de cubeta.
Contador celular	Countess Automated Cell Counter	ThermoFisher Scientific	Recuento celular automatizado mediante Azul Tripán.
Homogeneizador	Digital IKA-WERKE	EUROSTAR	Extracción de proteínas. De 50 a 20000 g.
Pipetas	Nichipet EX	Nichiryo	Volúmenes de 0,5-10 µl, de 20-200 µl y de 100-1000 µl.
	Finnpipette	ThermoFisher Scientific	Multicanal. De 50 a 300 µl.
	PipetBoy2	Integra	Pipeteador automático.
Termociclador	T3	Biometra	PCR
pH-metro	MicropH 2000	CRISON	Medida y ajuste de pH de disoluciones.

Fuente de alimentación	PowerPac Universal	Bio-Rad	Electroforesis.
Cubeta	Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad	Electroforesis ácidos nucleicos.
	XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen	Electroforesis proteínas.
Visor geles electroforesis	Gel Doc XR+System	Bio-Rad	Revelar geles mediante rayos UltraVioleta.
Termobloque	Multiplaces	Selecta	Incubar muestras de 30-200°C.
Baño termostatzado	Precistern	Selecta	Atemperado medios de cultivo celular.
Ultracongelador	CFC Free	Sanyo	Almacenamiento muestras biológicas a -80°C.
Neveras	Diversas marcas y modelos.		Almacenamiento reactivos a 15°C y a -20°C en congelador integrado
Trituradora de hielo	QJH-I110	Imperium	Mantener las muestras a 4°C durante el periodo de trabajo.

Tabla 2: tabla de aparatos empleados para la realización de este estudio. Los datos se completan con el modelo y marca además de la función o técnica en la que se utilizan.

3.3 Reactivos

La mayoría de los reactivos usados proceden de las siguientes casas comerciales: SIGMA, Merck, Milipore, Invitrogen y Panreac que se almacenan siguiendo las instrucciones de producto. Los medios y reactivos de cultivo celular empleados pertenecen a la marca Gibco: DMEM, PBS, tripsina y SFB.

Por otro lado, todo el material estéril de plástico utilizado en cultivos celulares pertenece a la empresa TPP; puntas de 5, 10, 25 y 50 ml, placas de 100 y 150 mm y falcon de 15 y 50 ml.

3.4 Métodos

3.4.1. Creación híbridos mitocondriales.

3.4.1.1. Aislamiento de plaquetas.

En primer lugar se aíslan las plaquetas del paciente para la creación del híbrido 3548. Se recogen 15-20 ml de sangre con EDTA que actúa como anticoagulante (en este caso los tubos son transportados). El volumen de los tubos recogidos se añade a un falcon de 50 ml en el que se adiciona citrato sódico al 0,1 M y NaCl 0,15 M en la proporción 1/9 en volumen. Se mezcla por inversión y se procede a centrifugar el falcon a una temperatura de 12°C durante 20 min a 1500 RPM.

Con la centrifugación se consigue separar los componentes sanguíneos (plasma y fracciones celulares) según su densidad, es por ello que en el falcon se observan tres fases diferentes. La fase con menor densidad y situada en la parte superior es el plasma que contiene las plaquetas. A continuación, se sitúan los leucocitos formando un anillo interfásico blanco. En el fondo del falcon y con mayor densidad los eritrocitos. Se recoge gran parte del sobrenadante obtenido (plasma) y se conserva en un falcon de 15 ml. Dicho sobrenadante se vuelve a centrifugar en las siguientes condiciones; a una temperatura de 15°C durante 20 min a 4200 RPM (1500 g). En esta centrifugación se obtendrá el pellet de plaquetas que se utilizará para la fusión posterior.

3.4.1.2. Preparación células Rho 0 (ρ^0).

Se preparan las células *Rho 0*; este tipo celular carece de DNA mitocondrial y por tanto su cadena respiratoria es nula. Es fundamental en el medio de cultivo adicionar tanto glucosa, glutamina y piruvato como uridina, además de SFB al 10% (medio de cultivo ρ^0). Se siembran las células y se deja que alcancen una alta confluencia. Se tripsinizan, se cuentan y se resuspenden en medio DMEM alta glucosa con 10% SFB libre de calcio (Ca^{2+}) para obtener una suspensión celular de 1×10^6 células/ml que será necesaria en el siguiente paso.

Las células ρ^0 proceden de una línea celular humana de osteosarcoma (143B.TK⁻) y fueron desarrolladas por King y Attardi. Esta línea celular es sometida durante varias semanas a un tratamiento con bromuro de etidio a bajas concentraciones que elimina el mtDNA pero no el genoma nuclear. Son dependientes de uridina y piruvato que pueden utilizarse como marcadores de selección. (6)

3.4.1.3. Fusión celular.

De la suspensión celular de células ρ^0 se pipetea 2 ml y se adicionan sobre el pellet de plaquetas obtenido anteriormente. Este paso debe realizarse con cuidado para evitar dañar las células. La suspensión se centrifuga a 1400 RPM (200 g) durante 5 minutos a temperatura ambiente, sin freno y se desecha el sobrenadante. Se adicionan 100 μl de una solución de polietilenglicol (PEG) al 50% sobre el pellet obtenido y se resuspende. El PEG actúa ayudando a que las membranas celulares se fusionen por lo que se deja incubando la solución durante un minuto aproximadamente. A continuación, se procede a resuspender de nuevo durante 30 segundos y se adicionan 10 ml del medio de cultivo ρ^0 . Esta solución se centrifuga a 1400 RPM (200 g) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y el pellet se siembra en una placa de cultivo con medio de fusión. Este medio está compuesto por DMEM con un 10% de SFB, 50 $\mu\text{g/ml}$ de uridina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).

3.4.1.4. Tratamiento post-fusión y selección de híbridos.

Tras 48 horas en cultivo, se procede a cambiar el medio por medio fresco de fusión. Cuando las células alcanzan la confluencia se doblan en dos placas de cultivo y de nuevo, cuando alcanzan la confluencia, se procede a su congelación en criotubos y a la selección de los híbridos presentes respectivamente. En el proceso de selección, el medio está constituido por DMEM con 10% SFB dializado y 100 $\mu\text{g/ml}$ de BrdU sin uridina ni piruvato que permitirá eliminar las células *Rho 0* que no se han fusionado.

El proceso de selección de los híbridos se prolonga unas 3 semanas aproximadamente, en las que el medio de cultivo se cambia durante 2-3 días. Una vez se da por finalizado, los híbridos seleccionados se expanden de manera prolongada con el objetivo de favorecer la recuperación de sus nuevos niveles de mtDNA para su posterior análisis. Para ello, se cultivan en medio DMEM con 10% SFB de manera que, una vez alcanzada la confluencia, son dobladas, hasta alcanzar un número próximo a 30-35 pases.

Durante dicho proceso, cada 5 pases, también se congelan criotubos a modo de reserva celular en caso de que fuera necesario recurrir a ellos.

3.4.2. Análisis de ácidos nucleicos.

3.4.2.1. Extracción de DNA a partir de pellets celulares.

La extracción de DNA de los híbridos del estudio se realiza a partir de pellets celulares obtenidos tras tripsinizar placas de 100 mm en cultivo y centrifugar las células recogidas a 1400 RPM durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y se congelan a -20°C los pellets hasta el momento de la extracción.

La extracción de DNA se lleva a cabo mediante el Speedtools tissue DNA extraction Kit de Biotools, en concreto siguiendo el protocolo establecido en el manual del kit en el apartado A, protocolo estándar

para tejido humano o animal y para células en cultivo. El DNA puro se trasvasa a tubos eppendorf y las muestras se almacenan a 4°C.

3.4.2.2. Cuantificación de DNA.

Para conocer la concentración de DNA presente en las muestras, se utilizó el espectrofotómetro NANO-DROP. Este aparato mide la absorbancia en todo el rango del espectro. Solo es necesario cargar una gota de muestra (1µl) para realizar la medida sobre el pedestal inferior. A continuación, se procede a bajar el brazo para cuantificar.

Los ácidos nucleicos muestran un pico de absorbancia a la longitud de onda de 260 nm. Se elige el programa DNA-50 (se trata de cuantificar DNA de doble hebra para el cual a absorbancia_{λ=260nm} igual a 1, la concentración es 50 µg/µl) y el software integrado devuelve la concentración de la muestra analizada. Además, analiza la pureza de la extracción, factor importante en el rendimiento y calidad de la muestra. Para ello el programa calcula las razones de Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ y Abs₂₆₀/Abs₂₃₀. A 280 nm muestran un pico de absorción las proteínas por lo que valores para la relación Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ menores de 1,5 indicarían contaminación por proteínas, mientras que valores por encima de 2, contaminación por presencia de RNA. A 230 nm absorben los fenoles, hidratos de carbono, compuestos aromáticos y sales por lo que el valor para la relación Abs₂₆₀/Abs₂₃₀ para muestras puras debe encontrarse en torno a 2.

3.4.2.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

La RFLP-PCR es una técnica de biología molecular altamente empleada y que permite diferenciar muestras de DNA mediante fragmentos de diferente tamaño generados gracias al uso de endonucleasas de restricción. Una aplicación muy común es el diagnóstico de enfermedades. En este estudio se emplea para comprobar que el cíbrido 3548 es portador de la mutación m.11232T>C frente a los tres cíbridos controles.

3.4.2.3.A. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Tras extraer el DNA, el primer paso es la amplificación del fragmento de interés para su posterior digestión. La PCR fue desarrollada por Mullis en 1988. Es una técnica que aumenta el número de copias exponencialmente de un fragmento de DNA de interés mediante una polimerasa (enzima encargada de sintetizar DNA) y unos cebadores; oligonucleótidos de unas 20 pares bases diseñados para ser complementarios al fragmento a amplificar y que por tanto hibridan con él. En este estudio el fragmento a amplificar tiene una longitud de 314 pb. Se utilizan los primers hmtL11107 (cebador directo) y hmtH11381 (cebador reverso) a una concentración igual a 25 µM cuyas secuencias aparecen contenidas en la tabla 3.

Cebador	Secuencia
hmtL11107	TTCACAGCCACAGAACTAATC
hmtH11381	AAGTGGAGTCCGTAAAGAGG

Tabla 3: secuencia de los cebadores utilizados para amplificar el fragmento de interés de los cíbridos mitocondriales.

Para preparar la PCR se utilizan los volúmenes indicados en la tabla 4. La Taq DNA polimerasa viene incluida en un mix de TakaRa; EmeraldAmp Max PCR Master Mix (2X Premix). El agua destilada empleada también procede de TakaRa.

Reactivo	Volumen (µl)
Master Mix 2X	22,5
Oligo hmtL11107	5
Oligo hmtH11381	5
DNA (100 ng)	-

Agua destilada	Hasta volumen final 50 µl
----------------	---------------------------

Tabla 4: Volúmenes de los reactivos a adicionar para realizar la PCR.

Además de las muestras, es necesario amplificar un blanco (todos los componentes excepto muestra de DNA) para comprobar que no se han contaminado. Las muestras se llevan al termociclador donde se escoge programa para realizar la PCR (Tabla 5):

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	45 s	35
Annealing	60	30 s	35
Elongación	72	90 s	35
Elongación final	72	5 min	1
Enfriamiento	20	Infinito	

Tabla 5: programa diseñado en el termociclador para realizar la PCR. Se indican las etapas, temperatura, tiempo y número de ciclos.

Tras finalizar el proceso de amplificación se comprueba si las muestras han amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para preparar el gel se pesa 1 gramo de agarosa que se diluye en 100 ml de buffer TBE 1X. Este buffer se realiza a diluyendo el TBE 10X constituido por 108 g de TRIS, 55 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0,5 pH=8.

La solución de agarosa y TBE 1X se funde durante 2 minutos en un horno microondas hasta obtener una solución transparente. En una campana de flujo, se añade el bromuro de etidio (1 µg/ml) al Erlenmeyer y se vierte en una cama de 100 ml de Bio-Rad sellada con cinta y con el peine montado. Se deja polimerizar durante 20 minutos aproximadamente.

El gel se introduce en una cubeta y se rellena hasta quedar cubierto con TBE 1X. Se cargan 10 µl de las muestras amplificadas además del blanco en el gel con 2 µl de tampón de carga en los pocillos. Este tampón de carga está constituido por Ficoll 400 al 15%, azul de bromofenol al 0,2% y tampón TBE. La cubeta se conecta a una fuente de alimentación y se deja correr el gel a 100 V. Pasado el tiempo necesario, se revela el gel. Los amplificados se almacenan a 4°C.

3.4.2.4.B. Digestión mediante enzimas de restricción.

Los amplificados se digieren tomando 5 µl del producto a los que se adicionan 5 µl del tampón de incubación (3 µl agua destilada, 1 µl de Buffer G contenido en el kit de la enzima y 1 µl de la enzima escogida). Para esta digestión se utiliza la endonucleasa *Mnl* I de Thermo Fisher a 10U/µl. La incubación tiene lugar en un termobloque a 37°C durante toda la noche.

La enzima de restricción *Mnl* I reconoce los sitios CCTC(7/6)[^]. En este estudio, la RFLP-PCR se emplea con el objetivo de confirmar que el cíbrido 3548 es portador de la mutación m.11232T>C que afecta a la proteína ND4. . La presencia de la mutación produce un nuevo sitio de restricción generando un cambio en el patrón de corte de la enzima.

El amplificado tiene un tamaño de 314 pb y la digestión con la enzima produce 3 fragmentos para los DNA que no portan la mutación y 4 para el DNA que porta la mutación (Fig. 1).

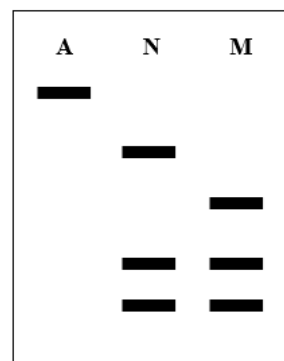


Figura 1: esquema que ilustra el patrón de bandas obtenido tras la digestión. A(amplificado), N (native; muestra que no porta la mutación de estudio), M(mutante).

Estos fragmentos tienen los siguientes tamaños; 225, 76, 13 pb y 150, 76, 75, 13 pb respectivamente.

3.4.2.5.C. Separación de los fragmentos por electroforesis con bromuro de etidio.

Para visualizar los fragmentos, se prepara un gel de agarosa al 2,5% siguiendo el protocolo comentado anteriormente. El gel durante los primeros minutos se corre a 50 V permitiendo que las muestras salgan de los pocillos de manera adecuada. Pasado este periodo, el gel se corre unas dos horas a 80 V y se lleva a revelar.

3.4.3. Ensayos de caracterización del cíbrido

3.4.3.1. Preparación de las líneas celulares

Se usaron las 4 líneas celulares principales del estudio; ACH, 34J, HgD y 3548. Se utilizaron dos condiciones y cuatro replicados por cada línea celular y condición. Se comparan las medidas en DMEM Baja Glucosa 10% SFB frente a DMEM Galactosa 10% SFB. En la segunda condición se obliga a las células a utilizar el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones para obtener ATP al no contar con glucosa pero sí piruvato y galactosa y ver de este modo si el cíbrido 3548 tiene afectado el proceso. Por el contrario, en el medio suplementado con glucosa, las células mayoritariamente utilizan la glicólisis para obtener energía.

Durante el día 1, se siembran en una placa de 96 pocillos 1000 células/pocillo siendo el volumen final 200 µl en cada pocillo. Así anteriormente se realiza una suspensión celular de cada línea a una concentración de 10^4 células/mL de la cual se pipetea 100 µl para añadir a cada pocillo. Inicialmente todos los pocillos se siembran con medio DMEM baja glucosa con el fin de evitar que el número de células sea diferente debido a la condición; con medio DMEM galactosa es posible que a las células les cueste proliferar. Tras 24 horas en cultivo, se aspira el medio de todos los pocillos y se añade el medio correspondiente según la condición.

3.4.3.2. Ensayo de medida del ATP

Este estudio se realizó utilizando el Fluorímetro-Luminómetro-Espectrofotómetro NOVOSTAR tanto en modo luminiscencia como en modo fluorescencia. Además de la medida de ATP, se realiza una medida del número de células vivas para poder relativizar los datos obtenidos (a mayor número de células, mayor producción de ATP).

Tras la preparación de las células en una placa de 96 pocillos de fondo blanco, el día 3 se procede a la medida del ATP. Se sacan los reactivos CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay de Promega a temperatura ambiente y se atemperan en el baño el medio DMEM free y el reactivo CellTiter-Fluor® Reagent de Promega.

En primer lugar, se adiciona el sustrato del kit CellTiter-Glo en su buffer y se agita para que se estabilice. Este kit cuantifica el ATP presente en las células a través de la oxigenación de la luciferina en presencia de ATP y oxígeno molecular catalizada por una luciferasa termoestable que transforma a la luciferina en oxiluciferina. (7) A continuación, se prepara el reactivo CellTiter-Fluor, adicionando 5 µl de reactivo por cada 5 ml de Buffer. Este kit mide el número de células vivas mediante un sustrato fluorogénico (GF-AFC) permeable que debido a la actividad proteasa de una célula viva produce fluorescencia. (8)

Una vez preparados los reactivos, se vacían los pocillos y se añaden 100 µl de CellTiter-Fluor a cada uno de ellos, se incuban 30 minutos a 37°C y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se mide la fluorescencia con una excitación:380nm/emisión:520nm.

Tras haber realizado la cuantificación del número de células vivas, se procede a medir el ATP. En este ensayo se cuantifica la cantidad de ATP mitocondrial para lo que es necesario preparar un medio de cultivo en campana con un inhibidor de la glucólisis (2-DeoxiGlucosa) y piruvato para cuantificar el ATP sintetizado exclusivamente por el sistema de fosforilación oxidativa (Tabla 7). Se lavan los pocillos dos veces con PBS y se añaden 100 µl del medio correspondiente en cada pocillo. Se incuba 2 horas en la estufa a 37°C y 5% CO₂. Al acabar la incubación, se añaden 100 µl de reactivo CellTiter-Fluor por pocillo sobre el medio y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Se procede a medir la luminiscencia de los pocillos.

DMEM sin glucosa	Piruvato	2-Deoxiglucosa
10 ml	1 mM	5 mM

Tabla 6: composición del medio para la medida de ATP mitocondrial. Se indica la concentración de los sustratos y el volumen de medio de cultivo necesario para el ensayo.

3.4.3.3. Ensayo de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

En este ensayo se utiliza MitoSOX (Red mitochondrial superoxide indicator) de Invitrogen. Este reactivo es un colorante que detecta la presencia de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria de células vivas. Se trata de un fluoróforo permeable cuya diana específica son las mitocondrias donde en presencia de superóxido y no otras ROS es oxidado por la superóxido dismutasa mostrando su fluorescencia roja. (9) Es necesario sembrar las células en una placa de 96 pocillos de fondo y paredes negras.

En primer lugar, se descongelan los reactivos a temperatura ambiente. Se prepara una disolución stock de MitoSOX a 5 mM, para ello se disuelve el vial (50 µg) en 13 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de esta disolución, se prepara la disolución de trabajo a 5 µM.

Se adicionan 100 µl de MITOSOX 5 µM a cada pocillo y se incuba durante 10 minutos, a 37°C en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavan los pocillos tres veces con PBS y se añaden 100 µl de PBS para realizar la medida de fluorescencia. Se utiliza el espectrofotómetro NovoSTAR en modo fluorescencia a una excitación/emisión de 510/580 nm.

Tras realizar la primera medida de fluorescencia y con el fin de poder relativizar los datos en función del número de células viables, se realiza una segunda medida. Para ello, se retira el volumen de los pocillos y se adicionan 100 µl/pocillo de la sonda nuclear Hoechst 33342 a 1 µg/ml (diluido en PBS). Se incuba durante 5 minutos, se elimina el volumen y se vuelve a adicionar 100 µl PBS únicamente.

La sonda Hoechst 33342 es un colorante fluorescente que se intercala en regiones ricas en adenina-timina de la doble hebra del DNA y por tanto se utiliza para cuantificar el número de células. Así tras finalizar el periodo de incubación y adicionar el PBS, se mide la fluorescencia en el FLUOstar omega (excitación:346 nm - emisión:460 nm).

3.4.3.4. Ensayo de Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM).

En este estudio se utiliza el kit MITO-ID Membrane potencial detection de Enzo que contiene un colorante catiónico que se acumula en las mitocondrias con el PMM sin dañar formando agregados fluorescentes naranjas. Es decir, el estado del PPM es directamente proporcional a la fluorescencia naranja emitida. Es necesario sembrar las células en una placa de 96 pocillos de fondo y paredes negras.

Se descongelan los reactivos del kit a temperatura ambiente y se prepara el reactivo con un volumen final igual a 10 ml. Así se añaden en un falcon de 15 ml, 8,7 ml de agua destilada, 1 ml de Assay Buffer 10X, 200 µl de Assay Buffer 50X y 100 µl de MITO-ID MP Detection Reagent. Una vez preparado el reactivo, se añaden 100 µl/pocillo del reactivo preparado y se incuba durante 30 minutos a temperatura

ambiente en oscuridad. Cuando el periodo de incubación finaliza, se procede a medir en modo fluorescencia (Excitación:550 nm - Emisión:580 nm) en el NovoSTAR.

Tras realizar la primera medida de fluorescencia y con el fin de poder relativizar los datos en función del número de células viables, se realiza una segunda medida. Para ello, se retira el volumen de los pocillos y se adicionan 100 µl/pocillo de la sonda nuclear Hoechst 33342 a 1 µg/ml (diluído en PBS). Se incuba durante 5 minutos, se elimina el volumen y se vuelve a adicionar 100 µl PBS únicamente. Se mide la fluorescencia en el FLUOstar omega (excitación:346 nm - emisión:460 nm).

3.4.3.5. Estudio de la curva de crecimiento celular

Para realizar este ensayo, las células se siembran en una placa de 96 pocillos transparente. El día 2, tras el cambio de medio para someter a las células a las dos condiciones nombradas, la placa se traslada desde la Facultad de Veterinaria de Zaragoza al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), para seguir en cultivo durante 7 días a 37°C y 5% CO₂ en el Incucyte. Este incubador permite conocer la curva de crecimiento de las células gracias a la toma de imágenes y un análisis integrado de los datos en el software correspondiente.

3.4.4. Estudio de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa:

3.4.4.1. Separación electroforética de los complejos mitocondriales mediante Blue-Native PAGE (BN-PAGE).

Se realiza con el kit “Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells” de Abcam y el kit “NativePAGE Sample Prep Kit” de Life Technologies. La técnica BN-PAGE permite separar las proteínas de membrana mitocondriales y los complejos de la cadena respiratoria. Para ello se realiza una solubilización de las membranas biológicas empleando bajas concentraciones de detergente aniónicos que permiten mantener la actividad de los complejos. (10)

3.4.4.1.A. Preparación de las muestras de cultivos celulares.

Para este estudio son necesarias 4 placas de 150 mm al 80-90% de confluencia de las líneas celulares ACH, 34J, HgD y 3548. Cuando en las placas de cultivo se alcanza la confluencia deseada, se tripsinizan y se recogen las células. Para obtener los pellets, la suspensión celular se centrifuga a 1400 RPM (150 g) a temperatura ambiente. Se desecha el sobrenadante y una vez obtenidos los pellets se congelan a -80°C y posteriormente se descongelan para romper las membranas. A partir de este punto se realiza todo el protocolo en hielo y en centrifuga 5415R Eppendorf a 4°C.

Se resuspende el pellet celular en 500 µl del Reagent A del kit y se procede a cuantificar la cantidad de proteína aproximada mediante Bradford y se ajusta la concentración a 5 mg/ml de proteína. Cuando se ha ajustado la concentración en cada muestra, se incuba en hielo 10 minutos. A continuación se transfieren las células resuspendidas a un homogenizador para homogenizar con 10 golpes a 500 g. El homogenado se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante. El pellet se resuspende en 500 µl de una solución de Reagent A y B 1:1, se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos. Se recoge este segundo sobrenadante y se unen ambos sobrenadantes en un eppendorf. Se centrifuga a 12000 g durante 15 minutos, se descarta el sobrenadante y se guarda el pellet.

Se realiza, por tanto, un fraccionamiento celular para separar los componentes celulares y obtener un pellet donde estén presentes las mitocondrias. Las primeras centrifugaciones tienen lugar a baja velocidad donde los componentes celulares más pesados como el núcleo, las células enteras y el citoesqueleto sedimentan en un pellet. Al centrifugar a media velocidad los sobrenadantes recogidos de las anteriores, sedimentan las mitocondrias. (11)

Este pellet resultante se resuspende en 50 µl NativePAGE 1X Sample Buffer (kit de Life Tech.) al que le añadimos “inhibidor de proteasas”. Se cuantifica la proteína de dichas muestras mediante Bradford ya que la cantidad de detergente a añadir en el siguiente paso depende de la cantidad de proteína. Así, se añade DDM (n-Dodecyl-beta-Maltoside Detergent) al 10% (kit de Life Tech.) para tener en la disolución 2,5 gramos de detergente por cada gramo de proteína y se incuba 15 minutos en hielo. Tras la incubación se centrifuga a 16000 g durante 90 minutos. Se recoge el sobrenadante y se cuantifica la proteína final mediante Bradford. Se guarda en alícuotas según su uso posterior a -80°C.

3.4.4.1.B. Cuantificación de las proteínas: Método de Bradford.

El método de Bradford se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie Brillante G-250 a las proteínas, en concreto a los residuos aromáticos y básicos (arginina principalmente). La unión produce un cambio de color en el Azul de Coomassie produciendo un pico de absorción máximo a los 595 nm. (12)

En este ensayo se utiliza el Proteín Assat Dye Reagent Concentrate de Bio-Rad. Para ello se prepara una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Tabla 8) partiendo de una solución a 2 mg/ml:

Concentraciones (mg/ml) de BSA	Volumen solución 2mg/ml BSA (µl)	Volumen agua destilada (µl)
1	500	500
0,5	250	750
0,25	125	875
0,125	62,5	437,5
0,0625	31,3	469
Blanco	-	500

Tabla 7: Volúmenes para preparar la curva de calibrado de BSA a partir de una solución stock de 2 mg/ml que se utiliza en el método de Bradford.

En un falcon de 50 ml se realiza una dilución 1:5 del reactivo nombrado anteriormente en agua destilada. Todos los ensayos se realizan en placas de 96 pocillos donde en cada pocillo se añaden 10 µl de la muestra diluida o de la recta de calibrado y 200 µl del reactivo diluido. Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se mide la absorbancia de los pocillos en el espectro NovoSTAR a 595 nm.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se realiza una recta de calibrado a partir de las concentraciones conocidas de BSA. Una vez constituida esta recta, se extrapolan los valores de absorbancia de las muestras para conocer las concentraciones (teniendo en cuenta las diluciones que en cada caso se realizan).

3.4.4.1.C. Electroforesis en gel NativePAGE.

Se realiza el Blue Native PAGE utilizando el sistema de Life Technologies “NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System”. Se trata de una electroforesis 1D en la que las proteínas se separan en función de su tamaño y no en función de la relación carga/tamaño debido al uso del colorante aniónico azul de Coomassie G-250. (10)

Se preparan las muestras adicionando el volumen adecuado del colorante NativePAGE 5% G-250 Sample Additive (incluido en NativePAGE Sample Prep Kit). El volumen depende de la concentración de detergente contenida en cada muestra; así el colorante tiene que estar en una proporción 1:4 con el DDM. Se disponen los tampones necesarios (Tabla 9) con los reactivos contenidos en el kit:

	20X Running Buffer	20X Cathode Additive	Agua destilada
Buffer del ánodo	30 ml	-	570 ml
Buffer cátodo oscuro	10 ml	10 ml	180 ml
Buffer cátodo claro	10 ml	1 ml	189 ml

Tabla 8: Volúmenes para preparar los tampones necesarios para realizar el Blue Native PAGE.

Se pone a punto un gel NativePAGE del gradiente adecuado, en este caso del 4-16%. Se lava con agua destilada. Se retira cuidadosamente el peine y se lavan los pocillos con agua destilada. Se colocan los geles en el sistema de geles “XCell-SureLock” de Life Technologies.

A continuación, se carga el volumen adecuado de las muestras en el gel para cargar 40 µg de proteína sin añadir el buffer del cátodo ni el del ánodo. Se emplea el marcador Native Marker Unstained protein standard del cual se cargan 10 µl.

Una vez cargadas las muestras, se lleva el sistema a la cámara fría y se rellena la parte de arriba con el buffer de cátodo oscuro y la parte de abajo con el buffer del ánodo. Se corre el gel a 150 V durante 90 minutos en una fuente de alimentación. Cuando el frente ha migrado un tercio del gel, se pausa la electroforesis y se retira el buffer del cátodo oscuro y se adiciona el buffer del ánodo. Una vez acabada la electroforesis, se apaga la fuente y se desmonta el sistema. El gel se saca del soporte y se procede con la técnica adecuada.

3.4.4.1.D.. Medida histoquímica de actividades enzimáticas de los complejos I y II tras BN-PAGE.

La actividad de los complejos que forman parte del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se conserva al realizar una separación electroforética en gel BlueNative-PAGE. Se emplean técnicas de detección histoquímica que permiten analizar si hay alguna deficiencia en los complejos analizados. En este estudio se miden las actividades de los complejos I y II ya que el paciente de estudio tiene una mutación en un gen que codifica para una subunidad del complejo I. Además se mide la actividad del complejo II por ser un complejo codificado por genes nucleares y no mitocondriales.

Una vez finalizada la electroforesis, se procede a abrir los soportes donde se encuentra el gel y se extrae para poder cortar las calles que interesan analizar siguiendo el protocolo para cada complejo.

En primer lugar se procede a equilibrar el gel durante 10 minutos en el buffer correspondiente a cada complejo (Tabla 10). A continuación, se desecha el buffer y se adiciona el buffer con los reactivos necesarios para detectar la actividad de cada complejo (Tabla 10). Se incuba el tiempo necesario a temperatura ambiente y en oscuridad.

Complejo	Buffer	Reactivos
Complejo I	2 mM Tris/HCl pH=7,4	0,1 mg/ml NADH 2,5 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium Chloride (NBT)
Complejo II	50 mM tampón fosfato pH=7,4	4,5 mM EDTA 84 mM Succinato 0,2 Metasulfato de fenacina (PMS) 2 mg/ml NBT

Tabla 9: Concentraciones de los tampones y reactivos necesarios para la medida de las actividades de los complejos respiratorios.

Cuando la reacción ha finalizado, se procede a lavar y fijar el gel en una solución al 45% de metanol y 10% de acético durante 15 minutos. Es posible que haya que realizar varios lavados. A continuación, se procede a secar el gel y a su escaneado.

3.4.4.2. Puesta a punto de la medida cinética de la actividad enzimática del complejo I. Cuantificación enzimática de la Citrato Sintasa.

Para realizar la medida de ambas actividades, se mantienen en cultivo 5 placas de 150 mm de los híbridos ACH, 34J y 3548 en medio DMEM baja glucosa. Cuando la confluencia alcanza el 80%, las placas se tripsinizan para obtener los pellets celulares de cada una de las placas como replicados biológicos que se almacenaran a -80°C .

3.4.4.2.A. Recolección de la muestra.

Los pellets se descongelan y se realiza un doble lavado con PBS frío centrifugando 10 minutos a 400 g. Los pellets se resuspenden en 500 μl de buffer manitol frío y deben ser almacenados rápidamente a -80°C a menos que el siguiente paso se vaya a realizar a continuación. Las muestras se mantienen en hielo durante todo el procedimiento.

3.4.4.2.B. Preparación de la muestra.

Las muestras se homogenizan con 10 golpes a 500 g y el homogenado se transfiere a un eppendorf. Las muestras se mantienen en hielo y se cuantifica la concentración de proteína total.

3.4.4.2.C. Cuantificación de las proteínas: ensayo de proteínas BCA.

La cantidad total de proteínas puede ser medida mediante el ensayo de BCA utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay de ThermoFisher. Este ensayo de cuantificación de proteínas combina la reacción de Biuret con la detección de color gracias al ácido bicinonónico (BCA). El reactivo de Biuret está formado por sulfato cúprico (CuSO_4) en medio alcalino (NaOH). La reacción consiste en la reducción del cobre (II) (Cu^{2+}) por la presencia de proteínas en un entorno alcalino a ion cuproso (Cu^+). Así el BCA, una sal de sodio, forma un intenso complejo de color morado al interaccionar con el ion cuproso. Este complejo $\text{BCA-Cu}^{1+}\text{-BCA}$ es soluble en agua y presenta un pico de absorción a la longitud de onda de 562 nm. (13) Por lo tanto, cuanto mayor sea la absorción y más oscuro el color, mayor concentración de proteínas habrá en la muestra analizada.

El reactivo para poder llevar a cabo la cuantificación de proteína se prepara mezclando los reactivos A y B contenidos en el kit en una proporción 50:1 respectivamente. Es necesario preparar también una recta de calibrado de BSA con estándares a concentración 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/ml y un blanco (Tabla 8 - presente en apartado método de Bradford). Además se preparan diluciones 1/4 y 1/8 de las muestras en agua destilada.

El ensayo se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos, se añaden 10 μl de las muestras diluidas o de los puntos de la recta de calibrado y después 200 μl del reactivo preparado. Se incuba la placa durante 30 min a 37°C y tras ello se deja disminuir la temperatura hasta la ambiental durante 5 minutos. A continuación se lleva a medir la absorbancia de la placa al NovoSTAR a la longitud de onda comentada.

Las concentraciones de proteína de las muestra se obtienen por extrapolación de la absorbancia gracias a la recta de calibrado construida.

3.4.4.2.D. Puesta a punto de la medida de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria en cubeta.

Cada muestra se analiza por doble, en una de las cubetas con rotenona; inhibidor del complejo I. El espectrofotómetro donde se llevan a cabo las medidas es el SPECTROstar. Se configura a una temperatura de 37°C y se ajusta el cero al aire.

Se prepara el medio de reacción para llevar a cabo la medida (Tabla 11). Además se necesita una solución de rotenona a 2,5 mM, una solución 1:1 etanol:DMSO y NADH 2 mM. Tanto la rotenona como el NADH deben estar protegidos de la luz.

Medio de reacción	Volumen/cubeta (µl)	Volumen/pocillo (µl)
500 mM KP pH=7,5	100	20
25 mM Decilubiquinona	4	0,8
50 mg/ml BSA	75	15
Agua destilada	746	144,2
TOTAL	925	180

Tabla 10: Volúmenes y reactivos para preparar el medio de reacción en el que tiene lugar la medida de la actividad del complejo I. Se muestra el volumen por cubeta y el volumen por pocillo para realizar la medida en placa de 96 pocillos.

Se transfieren 925 µl del medio de reacción y 20 µl de la muestra a la cubeta. Se mezcla mediante volteo. Se añaden 5 µl de la solución de rotenona para la cubeta en la que se inhibe la muestra o en su caso 5 µl de la mezcla de etanol y DMSO a la cubeta en la que se mide la actividad total sin rotenona. Se debe evitar adicionar la rotenona en las paredes. Se agita la cubeta por volteo y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Tras la incubación se adicionan 50 µl NADH 2 mM a la cubeta que dan comienzo a la reacción. Se mezcla mediante volteo y se mide en el espectrofotómetro durante 3 minutos la lectura a 340 nm.

Se calcula la $\Delta Abs/min$ con y sin rotenona considerando la reacción desde el minuto 1 hasta los 3. Así el coeficiente de extinción para el NADH es $\epsilon=6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Así la actividad del complejo I se calcula como la diferencia entre la actividad total sin rotenona y la actividad inespecífica sin rotenona.

3.4.4.2.E. Puesta a punto de la medida de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria en placa de 96 pocillos.

El espectro NOVOSTAR se programa para medir a la longitud de onda de 340 nm y de nuevo a 37 °C. Se prepara el medio de reacción para llevar a cabo la medida (tabla --) con los volúmenes adaptados al pocillo. El volumen final será igual a 200 µl.

Se preparan además las soluciones de rotenona a 0,5 mM y NADH 2 mM. Se añaden las soluciones anteriores a los pipeteadores del espectro. Se configura el NOVOSTAR para seguir el descenso de absorbancia durante 6 minutos; en el minuto cero inyectará 10 µl de NADH y en el minuto tres 5 µl de rotenona 0,5 mM.

Una vez configurado, se procede a adicionar los 180 µl de medio y los 5 µl de muestra para realizar la medida. Para calcular la actividad se sigue el mismo procedimiento que anteriormente.

3.4.4.2.F. Cuantificación enzimática de la Citrato Sintasa.

El espectrofotómetro donde se llevan a cabo las medidas es el NOVOSTAR en una placa de 96 pocillos. Se configura a una temperatura de 30°C y se ajusta el cero al aire. Se prepara el medio de reacción para llevar a cabo la medida (Tabla 12). Se analizan 15 muestras (5 replicados por las tres líneas celulares).

Medio de reacción	Volumen/pocillo (µl)	Volumen total (n=20)
1 mM DTNB	20	400 µl
8 mM Acetil-CoA	2	40 µl
10% Triton X-100	2	40 µl
0,5 M Tris-HCl pH=8,1	30	600 µl
Agua destilada	131	2620 µl
TOTAL	185	3,7 ml

Tabla 11: Volúmenes y reactivos para preparar el medio de reacción en el que tiene lugar la medida de la actividad de la CS. Se muestra el volumen por cubeta y el volumen total preparado para analizar el conjunto de muestras.

Además se necesita una solución de oxalacetato (OAA) 10 mM disuelto en 0,1M Tris-HCl pH=8,1.

Se transfieren los 185 μ l del medio de reacción al pocillo. El espectro NOVOstar cuenta con un sistema de pipeteador integrado gracias al cual se inyecta la solución de OAA a los pocillos. Se prepara el pipeteador y se adicionan los 5 μ l de muestra. El pipeteador se configura para adicionar 10 μ l a cada pocillo de OAA completando así los 200 μ l en el primer ciclo de medida. Se mide en el espectro el incremento de absorbancia durante 2 minutos.

Se calcula la Δ Abs/min considerando la reacción desde el minuto 0 hasta los 2 minutos. El coeficiente de extinción para el DTNB es $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4. Resultados.

4.1. Estudio del paciente 3548.

El paciente tiene un desarrollo normal durante su infancia y adolescencia. Tras ser sometido a una intervención quirúrgica, en el proceso de recuperación de la anestesia, aparecen dificultades en el habla, en el equilibrio y en la marcha. Tras varios días, el paciente se recuperó. Dos años después fue sometido a una segunda cirugía tras la que estuvo en un estado de coma y aparecieron lesiones cerebrales y síntomas persistentes como apraxia en la apertura de párpados, mutismo o hipersalivación.

Al paciente se le realizaron diversos estudios genéticos previos a este trabajo. En primer lugar se buscó en el genoma mitocondrial deleciones o duplicaciones. También se realizó un screening de las mutaciones m.8344, m.3243 y m.8993 respectivamente asociadas, por ser las más frecuentes, en las enfermedades MERRF, MELAS y NARP. Todos estos análisis resultaron ser negativos.

En tercer lugar se secuenciaron a través de técnicas NGS el genoma completo y se hallaron tres variantes homoplásmicas; (1) **m.11232T>C (p.L158P, ND4)**; (2) m.3335T>C (p.I10T, ND1); (3) m.15164T>C (p.F140L, CYTB). La primera de ellas se ha encontrado en pacientes con enfermedades mitocondriales y se clasificó como posible mutación patogénica. El único paciente del que se informa en la literatura para esta mutación era heteroplásmico. (14) Esta variante está presente también en la progenitora sana.

La mutación produce un cambio de aminoácido en la proteína mitocondrial subunidad ND4 (codificada por el gen MT-ND4) tal y como se indica anteriormente. La proteína ND4 (deshidrogenasa NADH subunidad 4) forma parte de la NADH deshidrogenasa; el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial que cataliza la transferencia de un electrón desde el NADH a la cadena respiratoria, en concreto a la ubiquinona que actúa como aceptor de electrones. Además se cree que la proteína ND4 podría estar implicada en el ensamblaje del complejo I. (15)

La mutación aparece clasificada en MITOMAP como neutral y posiblemente benigna en relación a su patogenicidad. Esta base de datos utiliza APOGEE, un clasificador basado en un modelo logístico de árbol (LMT). Aporta dos clases de patogenicidad: neutral y patogénica. Se tienen en cuenta 13 predictores independientes y 6 meta-predictores. En cuanto a la conservación, el aminoácido leucina está conservado en un 93,3%. En la mayoría de especies que analiza MITOMAP mediante alineamientos de secuencias, en esa posición el aminoácido correspondiente es una Leucina. (16)

4.2. Caracterización del cíbrido mitocondrial mutante.

4.2.1. Comprobación de la incorporación de la mutación m.11232T>C al cíbrido 3548.

Tras la digestión se comprueba si el patrón de bandas obtenido es el esperado (Fig. 2.).

Se confirma revelando el gel de agarosa al 2,5% que el cíbrido 3548 es portador de la mutación de estudio m.11232T>C y que, por lo tanto, el cíbrido es un buen modelo celular para la experimentación. Se observa la banda correspondiente al fragmento de 150 pb y no la de 225 pb, es decir, el cíbrido (y el paciente) es homoplásmico para la mutación. Por otro lado, en los controles que no portan esta mutación, se identifica la banda de 225 pb pero no la de 150 pb.

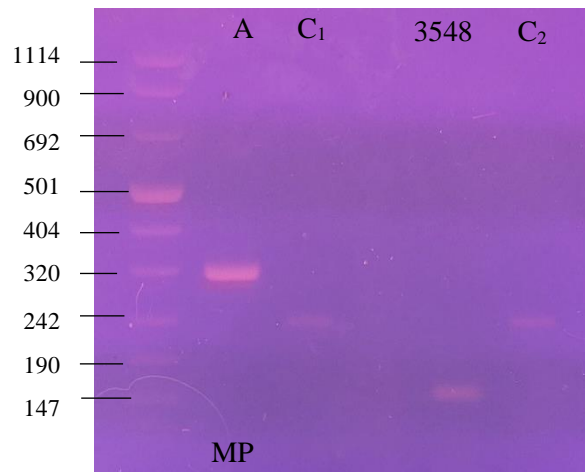


Figura 2: patrón de bandas obtenido al revelar el gel de agarosa tras la digestión. Se indica con MP: marcador de peso molecular, A: amplificado, C1: cíbrido control ACH, 3548: cíbrido 3548, C2: cíbrido control HgD. A la izquierda se indica el patrón de bandas del marcador con sus respectivos pesos moleculares.

4.2.2. Estudio de la curva de crecimiento.

El estudio de la curva de crecimiento se realiza como parte de la caracterización del cíbrido 3548. La mutación podría afectar a la capacidad de duplicación de las células cuando estas son “obligadas” a utilizar el ciclo de Krebs (y por tanto el sistema OXPHOS) para obtener ATP en el medio suplementado con galactosa.

Los datos obtenidos en el Incucyte se descargan y se analizan en su software. Se realiza un análisis de la confluencia de las imágenes obtenidas y se plasman en gráfico para observar y comparar la curva de crecimiento de los cíbridos control y patológico (3548) en las dos condiciones (Fig. 3).

No se observan diferencias en las curvas de crecimiento del cíbrido 3548 con respecto a las de los tres controles en medio de baja glucosa. Los cuatro cíbridos alcanzan altas confluencias pasados los 6 días en cultivo. En medio suplementado con galactosa, las cuatro líneas celulares crecen más despacio con respecto a sus curvas en medio suplementado con glucosa como era esperado. No obstante, el cíbrido 3548 sigue el mismo patrón de crecimiento que el cíbrido HgD (ambos con haplogrupo D).

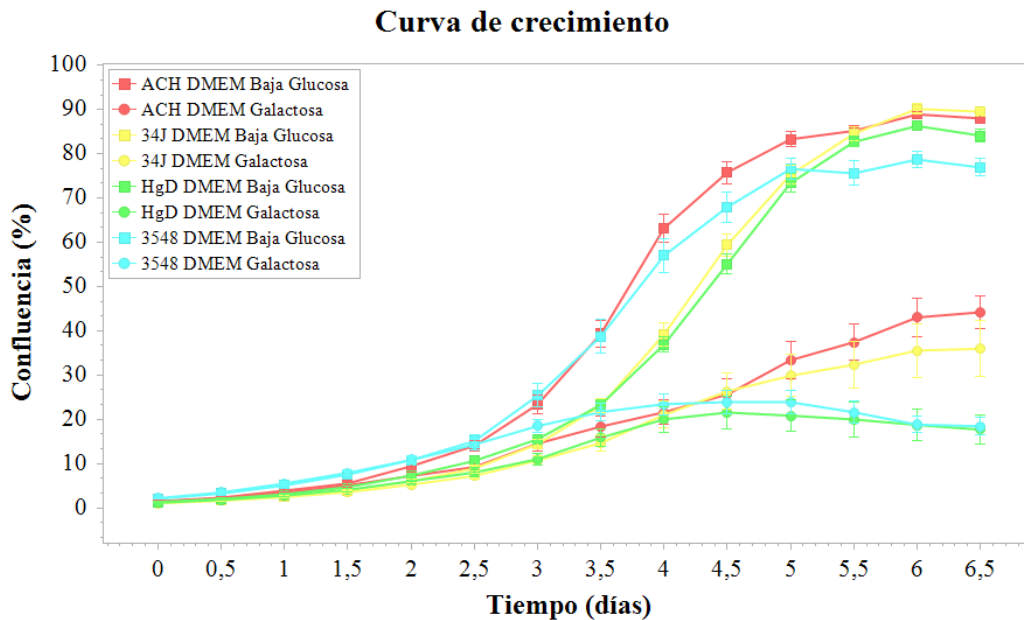


Figura 3: gráfico de la curva de crecimiento de los cíbridos transmitocondriales en medio suplementado con baja glucosa; confluencia (%) vs tiempo (días). Se muestra la media de la confluencia de los cuatro replicados biológicos y la desviación estándar.

4.3. Análisis de las funciones mitocondriales.

4.3.1. Estudio de la síntesis de ATP en la mitocondria.

Como parte del estudio y caracterización del cíbrido patológico 3548 portador de la mutación 11232, se cuantifica el ATP mitocondrial. La mutación podría afectar a la funcionalidad del complejo I, por tanto, al sistema OXPHOS y como consecuencia a la síntesis de ATP en la mitocondria. La cuantificación de ATP tiene lugar mediante luminiscencia y los datos se relativizan por número de células vivas cuantificadas por la emisión de fluorescencia. Los valores obtenidos se reflejan en un gráfico (Fig. 4) como media de los cinco replicados biológicos y la correspondiente desviación estándar. Solo se muestran los datos obtenidos para el cíbrido control de haplogrupo y el cíbrido patológico.

Los datos se analizan estadísticamente a través del T test no paramétrico Mann Whitney. No se hallan diferencias significativas en la producción de ATP mitocondrial en el cíbrido 3548. En todas las líneas celulares de estudio, el ATP cuantificado en medio suplementado con galactosa es menor que en el medio de baja glucosa.

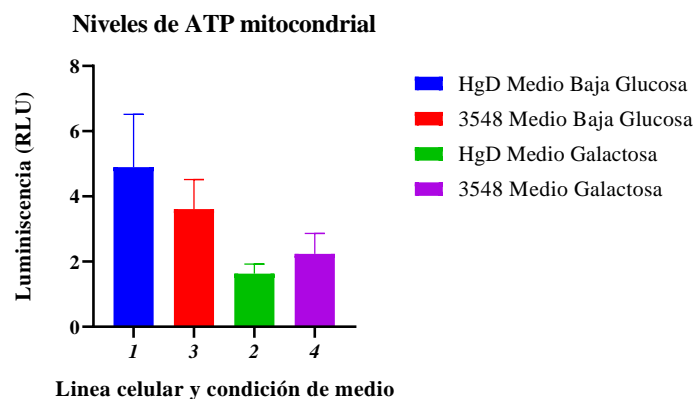


Figura 4: gráfico. Niveles de producción de ATP mitocondrial. Se representa la media y la desviación típica calculadas de los replicados biológicos para cada línea celular y en ambas condiciones de medio (suplementado con baja glucosa o galactosa).

4.3.2. Estudio de la producción de ROS.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se pueden definir como aquellas especies que contienen uno o más electrones no emparejados. Estas especies a bajas concentraciones juegan un papel muy importante en la defensa contra agentes infecciosos y participan en numerosas vías de señalización. (17)

En la caracterización del híbrido 3548, se decide estudiar la producción de superóxido en la mitocondria con el fin de averiguar si la mutación que porta desregula su síntesis en la mitocondria. La cuantificación de superóxido tiene lugar a través de fluorescencia. Los valores obtenidos se relativizan en función del número de células vivas y se recogen en un gráfico (Fig. 5).

Los niveles de producción de ROS del híbrido 3548 se encuentran en valores similares con respecto a los híbridos controles en ambas condiciones. Por lo que se descartan unas altas concentraciones de ROS como efecto de la mutación y causa del fenotipo.

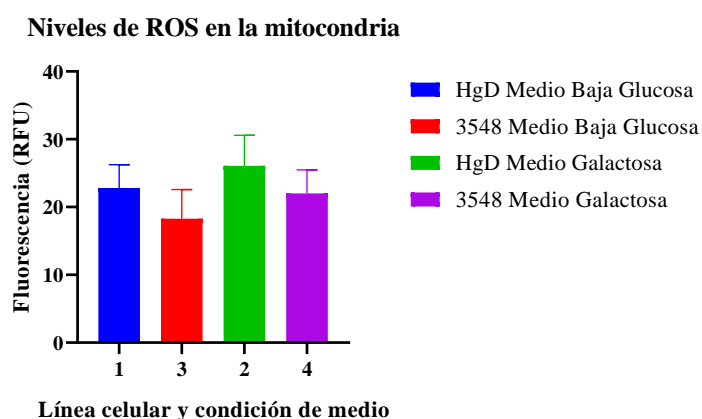


Figura 5: gráfico. Niveles de producción de ROS en la mitocondria. Se representa la media y la desviación típica calculadas de los replicados biológicos para cada línea celular y en ambas condiciones de medio (suplementado con baja glucosa o galactosa).

4.3.3. Estudio del potencial de membrana mitocondrial.

El potencial de membrana mitocondrial (MMP) es el resultado de un bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna desde la matriz al espacio intermembrana donde existe una acumulación de cargas positivas creando así un gradiente electroquímico. (18) Este bombeo de protones está acoplado al transporte de electrones en la cadena respiratoria (complejos I, III y IV) por lo que el estudio del MMP en el híbrido 3548 podría revelar defectos en el complejo I si el potencial no es el adecuado.

El ensayo de medida del MMP se lleva a cabo mediante fluorescencia. Los resultados se recogen en forma de gráfico (Fig. 6).

Se observa que el híbrido 3548 en condiciones de baja glucosa tiene menor potencial de membrana respecto al híbrido control HgD y 34J (no se muestra en el gráfico). Es probable que en medio suplementado con galactosa la diferencia también fuese significativa con una menor desviación estándar ya que la tendencia es que el MMP del 3548 es menor con respecto a los controles. Este hecho sería corregible con un mayor número de replicados.

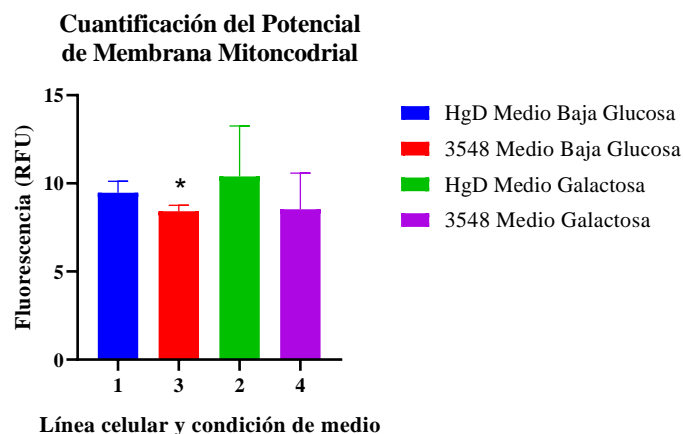


Figura 6: gráfico. Cuantificación del MMP. Se representa la media y la desviación típica calculadas de los replicados biológicos para cada línea celular y en ambas condiciones de medio (suplementado con baja glucosa o galactosa). Se indica con el símbolo (*) la diferencia significativa encontrada con valor de p -valor $< 0,05$, en concreto p -valor = 0,023.

4.4. Estudio del sistema OXPHOS.

4.4.1. Medida de la actividad del complejo I y II mediante BN-PAGE.

La electroforesis BN-PAGE permite separar los complejos de la cadena respiratoria manteniendo su actividad. En combinación con la detección catalítica, es una buena técnica para estudiar posibles defectos en los complejos. Se detecta el complejo I al estar afectada su subunidad ND4 por la mutación

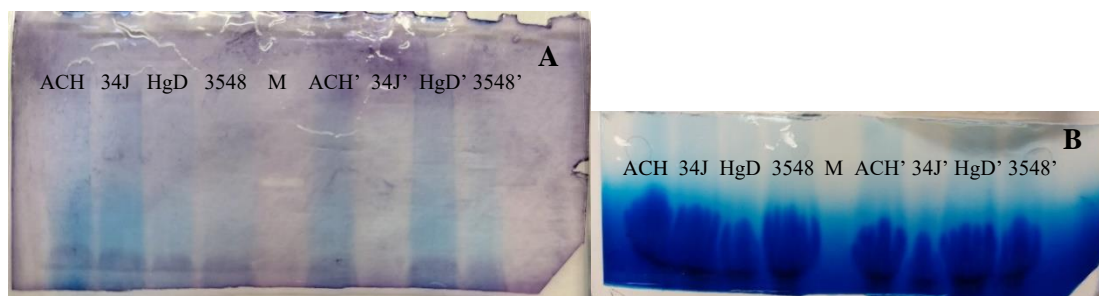


Figura 7: en la imagen A se muestra la detección del complejo I de la cadena respiratoria. En la imagen B se muestra la detección del complejo II. Ambas imágenes están tomadas tras lavar y fijar los geles de poliacrilamida.

puntual de estudio y el complejo II como control debido a que los genes están codificados en el núcleo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.

La detección del complejo I no resulta muy satisfactoria. En los replicados segundos (') la banda correspondiente al complejo no se observa. En los replicados primeros donde la banda se ve con mayor claridad no parecen observarse diferencias entre el híbrido 3548 portador de la mutación de estudio y los controles. En cuanto a la detección del complejo II, tampoco se aprecian diferencias en la intensidad de las bandas entre el híbrido 3548 y los híbridos control por lo que no parece haber diferencias significativas en la actividad.

4.4.2. Medida de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria.

4.4.2.1. Puesta a punto de la técnica.

En primer lugar, se intenta llevar a cabo la medida de la actividad en cubeta. No se logran resultados. Por ello, se decide adaptar el protocolo para realizar el ensayo en placa de 96 pocillos. Este formato ofrece varias ventajas; la cantidad de muestra empleada es menor, permite realizar las medidas de varias

muestras al mismo tiempo y en el mismo pocillo se mide la actividad total y la actividad inespecífica con el complejo I inhibido con rotenona.

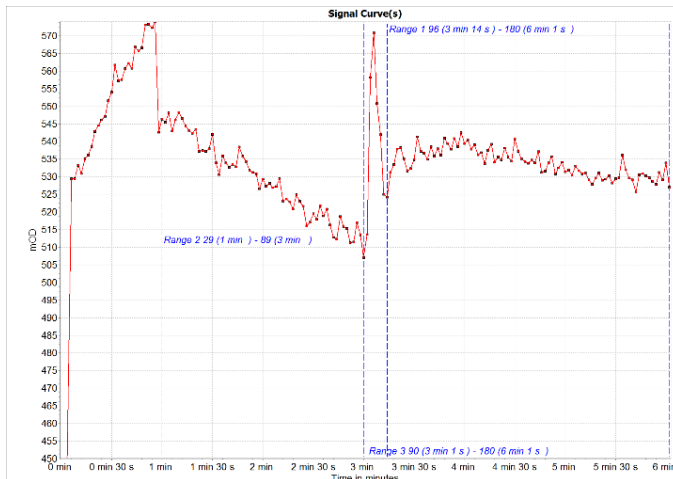


Figura 8: espectro ($\lambda=3140$ nm). Medida de la actividad del complejo I en cíbrido 34J. Seguimiento del descenso de la absorbancia (mOD) durante 6 minutos. En el minuto 3, tiene lugar la inyección de la solución

En las pruebas realizadas se adicionan 40-50 μg de proteína. Si las muestras están demasiado diluidas y el volumen a adicionar supera el 10% del volumen final del pocillo (200 μl), se reajusta el volumen de agua destilada del medio de reacción. El descenso de la absorbancia se sigue en el espectro (Fig. 8). Se calcula la pendiente del rango 2 como la actividad total (no solo del complejo I, también de otras posibles NADH deshidrogenasas presentes). La pendiente del rango 1 corresponderá a la actividad inespecífica puesto que el complejo I estará inhibido por la rotenona.

4.4.2.2. Actividad enzimática del complejo I de los cíbridos de estudio.

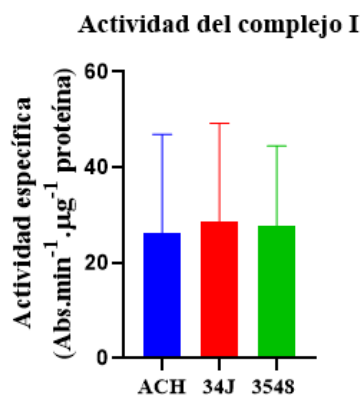


Figura 9: Gráfico. Actividad específica del CI (Abs.min⁻¹.μg⁻¹ proteína). Se representa el valor promedio de los replicados y la desviación estándar

El interés en la medida de la actividad del complejo I viene suscitado por la mutación puntual en el gen MT-ND4. Inicialmente, la prueba (Fig. 8) dio buenos resultados. Sin embargo, los replicados de los cíbridos a medir se encontraban bastante diluidos y fue necesario reajustar los volúmenes de agua destilada. Las medidas no resultaron muy satisfactorias, en algunos replicados se observaba un aumento de la absorbancia y en otros la actividad inespecífica era mayor que la actividad total.

Así se plasman los datos obtenidos en forma de gráfico (Fig. 9). Se puede observar una gran desviación estándar en las actividades resultantes. En consecuencia, poca reproducibilidad del ensayo, debido a lo cual, no se pueden concluir diferencias entre las actividades de los cíbridos.

4.4.3. Medida de la actividad enzimática de la citrato sintasa.

La medida de la actividad de la citrato sintasa está correlacionada con el contenido mitocondrial de las células y se utiliza en este sentido como un biomarcador. (19) En este estudio, la finalidad de dicha medida era relativizar las actividades del complejo I por contenido mitocondrial gracias a la citrato sintasa.

Los resultados se muestran en la figura 10 que conforma un gráfico de la actividad específica calculada a partir de los valores obtenidos en el espectro.

No se encuentran diferencias significativas en la actividad del cíbrido portador de la mutación con respecto a los controles. Las diferencias entre los controles podrían deberse a la alta desviación estándar del ensayo.

Actividad de la citrato sintasa

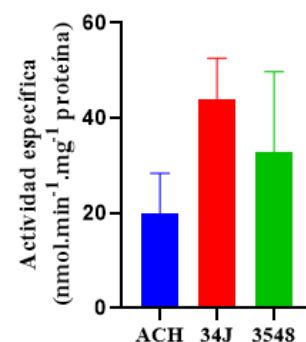


Figura 10: Gráfico. Actividad específica de la CS (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína). Se representa el valor promedio de los replicados y la desviación estándar.

5. Discusión

Los cíbridos son una importante herramienta de experimentación y análisis de las enfermedades mitocondriales gracias a los cuales es posible la creación de células con el mismo bagaje genético a excepción del mtDNA permitiendo estudiar las consecuencias de las mutaciones presentes. En este estudio, se consigue crear un cíbrido portador del mtDNA del paciente 3548. Dicho paciente presenta un haplogrupo D raramente representado en la población caucásica europea por lo que se crea un cíbrido de un donante sano con este haplogrupo como cíbrido control. Se confirma mediante RFLP-PCR la presencia de la mutación m.11232T>C en el cíbrido 3548.

El siguiente objetivo del estudio conforma la caracterización del cíbrido y las posibles implicaciones de la mutación. Como parte de este análisis, se procede a estudiar la curva de crecimiento de los cíbridos transmitocondriales. El cíbrido 3548 sigue la misma curva de crecimiento que los cíbridos controles, incluso cuando es sometido al estrés de utilizar la galactosa y no la glucosa como fuente de obtención de energía.

La cuantificación de ATP, del potencial de membrana mitocondrial (MMP) y de especies reactivas de oxígeno (ROS) son características sencillas de medir y que reportan gran información. Tanto en la cuantificación de ATP como en ROS no se encuentran diferencias significativas en los niveles de síntesis en el cíbrido 3548. No obstante, en la cuantificación del MMP, el cíbrido 3548 parece tener una disminución del potencial significativa respecto a los controles.

Relacionado con la caracterización del cíbrido, se analiza la actividad del complejo I mediante dos técnicas: detección catalítica junto a BN-PAGE y seguimiento de la cinética por cambios de absorbancia. El BN-PAGE junto a la detección catalítica no muestra buenos resultados, no obstante, no parecen observarse cambios en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria en el cíbrido portador de la mutación. Por otro lado, la medida de la actividad enzimática del complejo I se debía poner a punto. Tras numerosas pruebas, se pensaba que el protocolo había sido optimizado para la medida en placa de 96 pocillos. Finalmente, en la medida de las actividades de los replicados biológicos, el ensayo muestra poca reproducibilidad y debe seguir poniéndose a punto.

Tras los resultados negativos de dichos análisis, en parte, esperados, se hipotetiza que la aparición del fenotipo sea consecuencia de la exposición del paciente al sevoflurano. El sevoflurano es un anestésico inhalado ampliamente usado en pacientes pediátricos tanto en la inducción de la anestesia general como en el mantenimiento de esta. En los últimos tiempos, en algunos estudios se muestra una neurotoxicidad causada por una exposición temprana a este anestésico en algunas personas. Se ha demostrado que el sevoflurano afecta a las dinámicas mitocondriales, mitofagia e induce la apoptosis vía mitocondrial. (20) Además, se ha encontrado que pacientes con defectos en el complejo I son hipersensibles al sevoflurano durante el periodo de inducción de la anestesia. Sin embargo, son necesarios estudios más amplios para poder confirmar estos hechos. (21)

Esta afirmación se basa en el historial clínico del paciente; durante su infancia, mostró un desarrollo normal y es, tras dos intervenciones quirúrgicas en las que se ve expuesto a dicho anestésico, cuando aparecen los primeros síntomas y no antes. Consecuentemente, sería interesante repetir dichos análisis tras exponer a los cíbridos transmitocondriales al anestésico y estudiar las plausibles diferencias que se encontrarían.

6. Conclusiones

En este estudio, se producen dos cíbridos, uno de ellos, 3548, portador de la mutación m.11232T>C y el segundo con haplogrupo D como cíbrido control HgD. Los resultados obtenidos comparando los datos obtenidos para el cíbrido 3548 con los tres cíbridos controles pueden recapitularse en los siguientes puntos:

- El cíbrido 3548 presenta la misma curva de crecimiento que los cíbridos controles.
- No se encuentran diferencias significativas en el estudio de los niveles de ATP y ROS.
- El potencial de membrana mitocondrial es significativamente menor (p -valor $<0,05$) en el cíbrido 3548 en contraste con los cíbridos control.
- La actividad del complejo I del cíbrido 3548 no presenta diferencias con respecto a los cíbridos control en la técnica BN-PAGE.
- El protocolo de medida de la actividad del complejo I debe seguir poniéndose a punto, los resultados obtenidos no son sólidos.
- El cíbrido 3548 no parece mostrar una función mitocondrial alterada y no puede confirmarse con este estudio que el fenotipo se deba a la presencia de la mutación m.11232.

7. Conclusions

In this study, two cybrids were produced, one of them, 3548, carrying the mutation m.11232T>C and the second with haplogroup D as a control HgD cybrid. The results obtained by comparing the data obtained for the 3548 cybrid with the three control cybrids can be summarized in the following points:

- 3548 cybrid shows the same growth curve as the control cybrids.
- No significant differences were found in the study of ATP and ROS levels.
- Mitochondrial membrane potential is significantly lower (p -value <0.05) in the 3548 cybrid in contrast to the control cybrids.
- Activity of complex I of the 3548 cybrid does not present disparities compared to the control cybrids in the BN-PAGE technique.
- Protocol for measuring the activity of complex I must be improved, the results obtained are not solid.
- 3548 cybrid does not seem to show altered mitochondrial function and it cannot be confirmed with this study that the phenotype is due to the presence of the m.11232 mutation.

8. Bibliografía

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457–65.
2. Taanman JW. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 1999 Feb 9;1410(2):103–23.
3. Abedi S, Yung G, Atilano SR, Thaker K, Chang S, Chwa M, et al. Differential effects of cisplatin on cybrid cells with varying mitochondrial DNA haplogroups. *PeerJ*. 2020 Oct 1;8.
4. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2016 Oct 20;2.
5. Pello R, Martín MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M, et al. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular

- model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 15;17(24):4001–11.
6. King MP, Attardi G. Human Cells Lacking mtDNA: Repopulation with Exogenous Mitochondria by Complementation. *New Ser.* 1989;246(4929):500–3.
 7. Promega. CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay [Internet]. 2015 [cited 2022 Jun 5]. Available from: https://www.promega.es/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570
 8. Promega. CellTiter-Fluor Cell Viability Assay [Internet]. [cited 2022 Jun 7]. Available from: <https://www.promega.es/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/fluorescent-cell-viability-assay/?catNum=G6080>
 9. Invitrogen. MitoSOXTM Red mitochondrial superoxide indicator (M36008) [Internet]. [cited 2022 Jun 7]. Available from: <https://www.thermofisher.com>
 10. Wittig I, Braun HP, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):418–28.
 11. Alberts, B, Johnson, A, Lewis J. Fractionation of Cells - Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf. In 2002 [cited 2022 Jun 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26936/>
 12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72(1–2):248–54.
 13. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76–85.
 14. Mitchell AL, Elson JL, Howell N, Taylor RW, Turnbull DM. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):175.
 15. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D480–9.
 16. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. 2019; Available from: www.mitomap.org
 17. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 Jan 1;39(1):44–84.
 18. Cooper GM, Hausman RE. *The cell : a molecular approach.* ASM Press; 2007. 820 p.
 19. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *Authors J Physiol C.* 2012;590:3349–60.
 20. Liu J, Li L, Xie P, Zhao X, Shi D, Zhang Y, et al. Sevoflurane induced neurotoxicity in neonatal mice links to a GSK3 β /Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2022;181:72–81.
 21. Hsieh VC, Niezgodka J, Sedensky MM, Hoppel CL, Morgan PG. Anesthetic Hypersensitivity in a Case-Controlled Series of Patients with Mitochondrial Disease. *Anesth Analg.* 2021;133(4):924–32.