

EFECTO DE LAS MUTACIONES EN EL
ADN MITOCONDRIAL SOBRE LA
EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS
EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL
MARC CUADROS ARASA

Tesis Doctoral

**EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN EL ADN MITOCONDRIAL
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA
FUNCIÓN MITOCONDRIAL**

Memoria presentada por

Marc Cuadros Arasa

Trabajo realizado en el grupo de Patología Mitocondrial del Institut de Recerca
del Hospital Vall de Hebron bajo la dirección de:

Dra. Elena García Arumí

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

Tutora: Dra. Anna Meseguer Navarro

Marc Cuadros Arasa Dra. Elena García Arumí Dra. Anna Meseguer Navarro

Barcelona 2013

Ya los tenemos aquí, los agradecimientos, sin duda una de las partes de las tesis que suscita más expectación. Durante los años de tesis han sido muchas las personas con las que he tenido la oportunidad de coincidir haciendo que esta sea, una de las experiencias más enriquecedoras que he tenido. Así que las siguientes palabras van dedicadas a todos aquellos que habéis formado parte de esta historia.

Comenzaremos por la directora de tesis, Elena muchas gracias por darme la oportunidad de trabajar en el grupo de patología mitocondrial y confiar en mí. Toni gracias por darme la oportunidad de trabajar en tu grupo y por toda la ayuda prestada todos estos años. Ramón gracias por tus aportaciones siempre acertadas sobre mi trabajo.

A continuación vienen los agradecimientos para mis compañeros de laboratorio, sin duda los mejores compañeros que uno puede tener. Empezaré por Gisela, gracias por estar siempre hay, dándome el mejor consejo en todo momento y por preocuparte para que todo lo que me sucediera fuera lo mejor. A Mari por ser una compañera increíble dispuesta a ayudarme siempre que lo he necesitado. A Yolanda por todo el apoyo recibido todos estos años, por preocuparte por mí en todo momento y por miles de pequeños grandes detalles que han hecho que haya sido una gran suerte haber compartido todo este tiempo contigo. A M^a Jesús por toda la ayuda recibida y por interesarte siempre que las cosas me fueran bien. A Javi por los ratos buenísimos que me has hecho pasar, quien no recuerda aquellos viernes en cultivos donde un rutinario proceso de laboratorio como pasar unas células, se convertía en poco menos que en una fiesta donde a dúo podían sonar canciones del Tito Bob o un “estáis grabando”. Ramiro, otro que menudos buenos ratos me ha hecho pasar, memorables eran aquellos momentos en que decidía contarte una de sus innumerables historias donde todo el mundo callaba para no perderse el acontecimiento y que decir cuando nos hacía el truco de la caja, que hartón de reír, gracias por estas y por otras muchísimas cosas. Por cierto Ramiro, siempre nos quedará Can Lluís.

Agradecimientos

A Emiliano por ser un compañero excelente, por todas las cosas que he aprendido contigo y por los buenísimos momentos que me has hecho pasar. A Tomàs por mejorar mí cultura cinematográfica y por demostrarme que es posible cantar la canción de David el gnomo sin atragantarse. A Lluís por toda la ayuda recibida, por ser un compañero excelente y por los grandes momentos que hemos pasado juntos. A Tòfol por todas las cosas que me has enseñado, por tus consejos siempre acertados y por esa pasión contagiosa por la ciencia. A las nuevas incorporaciones decirles que apuntan maneras de buenos compañeros y desearles toda la suerte para ellos.

Pero por si fuera poco, además de tener unos compañeros fantásticos durante estos años he tenido la suerte de conocer a muchas personas que han hecho de mi periodo de tesis una experiencia increíble.

A mis vecinos del laboratorio de enfermedades neurodegenerativas, empezaré por Annabelle sin duda la persona más risueña del institut siempre con la capacidad de sacarte la mejor de las sonrisas, Esther dicen que las personas tímidas esconden personas excepcionales, sin duda este es tu caso, por cierto, como nos costaba subir la cuesta para ir a Inglés, Celine un placer increíble hablar contigo y siempre con el mejor de los consejos, Ariadna, Iria, Jordi y Marta gracias por los buenos momentos que me habéis hecho pasar.

Ahora toca mi primer laboratorio, donde empecé. Gracias Pep por darme mi primera oportunidad, por enseñarme muchísimas cosas que posteriormente me han servido para llegar al día de hoy, por valorar siempre mi trabajo y por ser un tío genial, gracias Sole por tu amabilidad y por desearme siempre lo mejor y a Anna Almazán por su simpatía.

Durante esta época tuve la suerte de compartir laboratorio con Ariadna e Irene muchas gracias chicas y por supuesto con los “patxutxos” gracias Valentí por los buenos ratos y a Mariano por hacerme reír como nunca antes lo había hecho, a Neus por ser una persona genial y a Lide por hacerme sentir como Patrick Swayze en Dirty Dancing, por introducir léxico nuevo en mí vocabulario como mira..... Nachete o ApreTTY woman y por todos los ratos irrepetibles que me has hecho pasar.

Sin movernos de ese pasillo pero en el ala Norte encontramos el laboratorio de neuroinmuno gracias a Mireia, Zoraida, Carme, Núria, Nico, Sunny por ser tan buena gente a mis Thelma & Louise preferidas Ester y M^a José por todos los buenos momentos vividos tanto aquí como al otro lado del charco y como no a Marta, muchísimas gracias porque gracias a ti he hecho cosas que jamás pensaba que haría, que han hecho de esta etapa una experiencia increíble.

Ahora vamos por el laboratorio de fisiopatología renal gracias a Maya, Joan, Maria, Jordi, Bea, Conxi, Natalia, Edu y Toni por todos los ratos inolvidables que hemos pasado juntos y por acogerme como uno más de vosotros.

Mención especial merecen las conejitas del Institut las sexys David, Edu y Toni pero que bien lo pasamos, jamás me había reído tanto.

Por supuesto, ahora vienen los culpables de que mi aventura americana se convirtiera en la experiencia más inolvidable de mi vida, gracias a Carlos por acogerme en tu grupo como uno más y por tu increíble calidad humana, gracias al resto del grupo Aline, Milena, Xiao, Alicia, Shon, Panchi, Sandra, Sofia, Lloye y como no Susana que junto con Clara fueron las dos grandes culpables que mi experiencia en Miami fuera maravillosa. También quiero agradecer a Leticia, Jezabel, Alberto, Rebeca, Lisette, Andrea, Jaime, Abdul, Martin, Manu y Rodrigo lo amables que fuisteis conmigo e hicierais que me sintiera como en casa, un abrazo muy fuerte a todos.

También me gustaría dar las gracias a Alberto, por su pasión por la ciencia, por esas ganas de aprender y a Laura por esas risas que nos echábamos en cultivos, mucha suerte a los dos en vuestra aventura suiza.

A Jordi, Laia, Gerard y Toni por ser muy colegas y hacer que los días sean mucho mejores si tienes la suerte de cruzarte con ellos por el pasillo.

Pocas veces he agradecido tanto un experimento, y no se trata de lo maravillosos que fueron los resultados obtenidos, noooo.... si no porque me permitieron conocer a Anna, gracias por ser como eres, una persona fantástica.

A Pep Villena, Rosi, Natalia y Jaime, gracias por ser muy buena gente.

También quería dar las gracias por toda la ayuda prestada a los compañeros de la UCTS Ricardo, Alex, Irene, Alex S, Isra, Jose Luis, M^a Ángeles y Rosa.

A Montse y Flor, gracias por hacer de los momentos tensos en el trabajo los mas agradables gracias a vuestra presencia.

Agradecimientos

A Víctor y Oriols por esas siempre interesantes conversaciones con las que uno no para de aprender.

A los compañeros de la UBP Vall d'Hebron por todo el apoyo recibido durante la etapa final de la tesis.

Para acabar y espero no haberme dejado a nadie, unas palabras para mi familia, gracias por convertirme en quien soy, por estar siempre en los momentos buenos y sobretodo en los no tan buenos y por procurar que viva mi vida de manera libre y plena. Gracias a mis hermanas Eva y Thais por todo el apoyo recibido, sin ellas nada de las cosas buenas que me han sucedido y creerme que son muchas, no se hubiesen dado, y a mis padres gracias por ser como sois, simplemente maravillosos. Gracias a Noelia, por todo el apoyo recibido, por traerme la ilusión y por hacer que cada día sea una aventura que me muero por vivir.

Agradecimientos

Índice

INTRODUCCIÓN

1. La Mitocondria.....PÁG. 1-3
2. La Cadena Respiratoria. Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS).....PÁG. 4-6
3. El ADN mitocondrial (ADNmt).....PÁG. 6-8
4. Genética Mitocondrial.....PÁG. 8-11
5. Las enfermedades mitocondriales.....PÁG. 11-25
6. Modelos animales y celulares en el estudio de las enfermedades mitocondriales...PÁG. 25-27
7. Perfil de expresión genética en las enfermedades mitocondriales.....PÁG. 27-34

OBJETIVOS.....PÁG. 35-38

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo celular.....PÁG. 39-53
2. Técnicas generales.....PÁG. 53-57
3. Selección del medio oxidativo.....PÁG. 58
4. Condiciones experimentales del estudio con cíbridos.....PÁG. 59
5. Caracterización de las líneas de cíbridos, evaluación del medio oxidativo.....PÁG. 59-65
6. Estudios de expresión.....PÁG. 65- 71
7. Análisis estadístico.....PÁG. 71

ANEXO MATERIAL Y MÉTODOS.....PÁG. 72-74

RESULTADOS

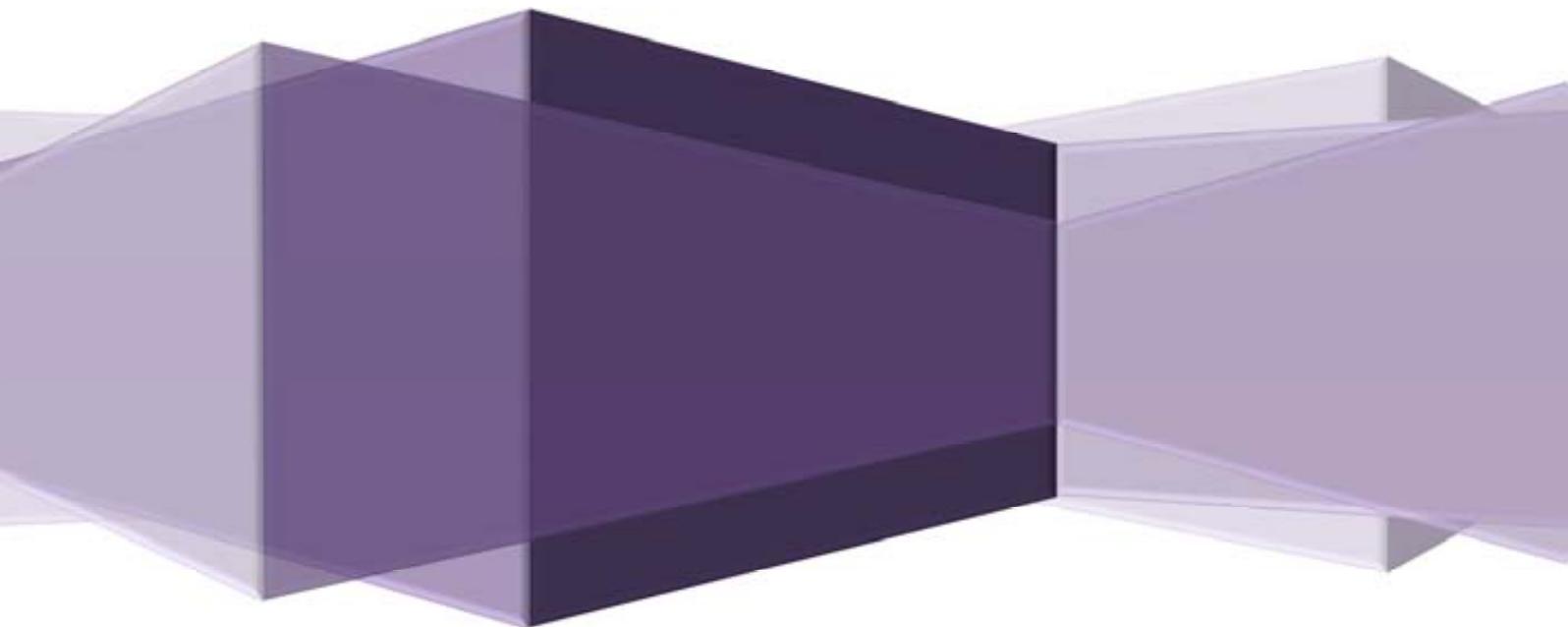
1. Validación de las líneas de cíbridos.....PÁG. 75-81
2. Establecimiento de las condiciones de cultivo óptimas para manifestar el defecto en el sistema OXPHOS.....PÁG. 81-82
3. Crecimiento celular de cíbridos con mutaciones en ARNt y subunidades OXPHOS.....PÁG. 82-83
4. Validación del medio oxidativo.....PÁG. 83-86
5. Potencial de membrana mitocondrial.....PÁG. 87
6. Concentración de lactato y succínico.....PÁG. 88-89
7. Estudios de expresión en cíbridos.....PÁG. 89-122

DISCUSIÓN.....PÁG. 123-148

CONCLUSIONES.....PÁG. 149-154

BIBLIOGRAFIA.....PÁG. 155-173

Introducción



1. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo intracelular pequeño de dimensiones comprendidas entre 0,5-1 μm presente en prácticamente todas las células eucariotas. Está formada por una doble membrana; la interna y la externa, las cuales definen dos espacios: la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. En la matriz se localizan las moléculas de ADN mitocondrial (ADNmt), las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas necesarios en la traducción de las proteínas codificadas en el ADNmt y enzimas implicadas en otros procesos metabólicos como ciclo de Krebs, β -oxidación de los ácidos grasos. La membrana externa es permeable para moléculas pequeñas (<10 Kda), mientras que la interna es mucho más selectiva. Esta restricción de paso de moléculas por parte de la membrana interna es determinante para mantener el gradiente de protones necesario en la síntesis del ácido adenosin trifosfato (ATP).

La mitocondria también interviene en la biosíntesis de otros componentes celulares: pirimidinas, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, grupo hemo, urea y una gran variedad de metabolitos [1].

Debido a su importancia, se ha considerado que una de las funciones fundamentales de la mitocondria es la oxidación de sustratos energéticos (metabolismo oxidativo), cuya finalidad es la de producir energía en forma de ATP. El último paso, conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS), es realizado por cinco complejos multienzimáticos (Complejo I-V), localizados en la membrana mitocondrial interna. Esta visión metabólica es parcial y ha cambiado radicalmente en los últimos 15 años al identificarse varios procesos celulares en los que la mitocondria desempeña un papel central, fundamentalmente la muerte celular programada (apoptosis) [2], la señalización intracelular mediada por calcio [3] y especies reactivas de oxígeno (ROS) [4].

Una de las características más peculiares de la mitocondria es la posesión de un sistema genético propio, con parte de la maquinaria necesaria para la expresión de proteínas funcionales, siendo las mitocondrias altamente dependientes de un gran número de proteínas codificadas en el núcleo, tanto para la formación del orgánulo como para la expresión de su genoma.

2. La Cadena Respiratoria. Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS)

La mitocondria genera la mayor parte de la energía que requieren las células eucariotas mediante la oxidación aeróbica de substratos. El proceso oxidativo está acoplado a la cadena de transporte electrónico, encargada de transformar el potencial oxidorreductor generado en el metabolismo oxidativo en energía en forma de ATP.

La cadena respiratoria está constituida por cinco complejos multienzimáticos y dos moléculas que actúan como nexos de unión (el coenzima Q y el citocromo C). Los tres primeros complejos (complejo I, II, III) actúan como transportadores electrónicos. El complejo IV utiliza los electrones que recibe para reducir el O_2 a H_2O . El complejo V es la ATP sintasa, encargada de la síntesis de ATP. Además, para el perfecto funcionamiento del sistema son necesarios tres enzimas más: la dihidroorotato CoQ oxidorreductasa (DHO-CoQO), la flavoproteína transportadora de electrones CoQ oxidorreductasa (ETF-CoQO) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), encargado de exportar al exterior el ATP sintetizado, a la vez que introduce en la matriz el ADP y el P_i .

La glucólisis y el ciclo de Krebs generan una cantidad relativamente baja de energía en forma de ATP. En cambio, aportan el poder reductor necesario para la síntesis de ATP mediante seis reacciones de deshidrogenación (una en la glucólisis, otra en la reacción de la piruvato deshidrogenasa y cuatro en el ciclo de Krebs). Estas reacciones reducen 10 moles de NAD^+ a NADH, y dos moles de FAD a $FADH_2$, por molécula de glucosa.

Los coenzimas reducidos $NADH + H^+$ y $FADH_2$, procedentes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente al O_2 . La transferencia de electrones de unos transportadores a otros, que se realiza de forma secuencial a favor de potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de H^+ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico que se establece se manifiesta como un gradiente de pH y una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna. La energía generada por la disipación del gradiente de H^+ a través de la ATP-sintasa es utilizada para fosforilar el ADP, con la consiguiente formación de ATP.

Esta reacción es reversible y la ATP-sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP [5].

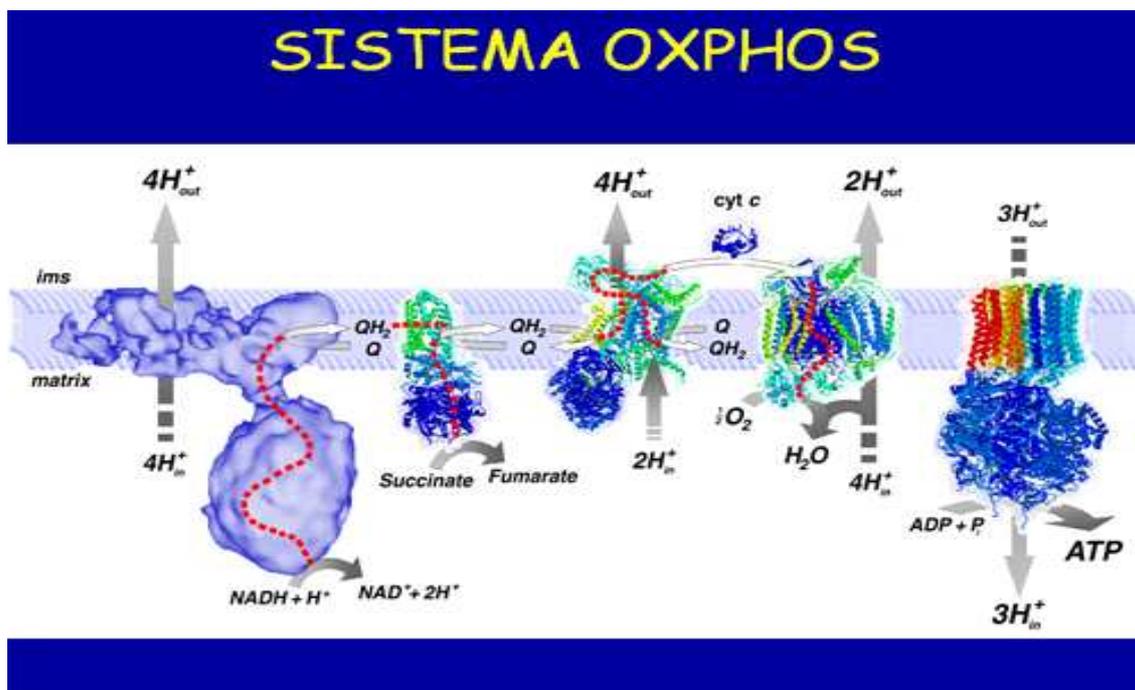


Fig.1 Representación esquemática del sistema OXPHOS.

El correcto funcionamiento del sistema OXPHOS requiere la acción coordinada de una serie de complejos enzimáticos multiheteroméricos localizados en la membrana interna mitocondrial.

Estos incluyen los complejos I, III, y IV, responsables de la translocación de los protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, la ATP sintasa, o complejo V y una serie de complejos accesorios que suministran electrones a la coenzima Q (ubiquinona) que incluyen el complejo II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa), la flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa y la dihidroorotato deshidrogenasa [6].

Algunos procesos de transporte en la membrana mitocondrial son dependientes del gradiente electroquímico generado por el sistema OXPHOS, e incluyen el transporte no sólo de metabolitos sino también de iones inorgánicos como fosfato, sodio, potasio o calcio.

El sistema OXPHOS también juega un papel crucial en el mantenimiento de los balances (equilibrios) redox, ácido-base y metabólico de la célula, y por extensión en los compartimentos extracelulares [6].

Además, el potencial electroquímico generado por el sistema OXPHOS está implicado en el proceso de termogénesis que tiene lugar en el tejido adiposo marrón. Mediante la acción de la proteína desacoplante 1 (UCP1), la energía química generada por el gradiente de protones se disipa en forma de calor [7]. Existen otras proteínas desacoplaentes (UCP2 y UCP3) implicadas en la regulación de la producción de ROS como mecanismo de protección ante el estrés oxidativo.

3. El ADN mitocondrial (ADNmt)

Aunque han pasado más de cuatro décadas desde el descubrimiento del ADNmt [8] y actualmente se ha secuenciado completamente el ADNmt de cientos de especies diferentes, aún se desconocen muchos aspectos sobre los mecanismos implicados en regular su replicación y expresión.

Cada mitocondria contiene su propio genoma en un número de copias que oscila entre uno y diez. El ADNmt es una molécula circular de doble cadena que se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados, por analogía a los cromosomas bacterianos, nucleoides [9]. Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. En humanos se han descrito 27 proteínas presentes en los nucleoides junto al ADNmt.

De éstas, 11 están directamente implicadas en el metabolismo del ADNmt como la ADN polimerasa mitocondrial γ , una proteína con actividad 5'-3' ADN helicasa (Twinkle), la proteína de unión a cadena sencilla (mtSSB), o el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) [10].

Estudios realizados en levadura sobre los mecanismos que controlan la segregación de los nucleoides apuntan a la existencia de una maquinaria dedicada a coordinar dicha segregación con la dinámica mitocondrial y la división celular [11].

En humanos, la molécula de ADNmt tiene un tamaño de 16549 pares de bases y su secuencia completa fue publicada en 1981 [12]. Su capacidad codificante es muy limitada puesto que codifica exclusivamente 37 genes: 13 polipéptidos que forman parte de complejos OXPHOS, 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de transferencia (ARNt).

Las trece proteínas codificadas en el genoma mitocondrial son subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS: 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6) de las 46 que forman el complejo I (NADH deshidrogenasa), una (citocromo b, Cit b) de las 11 del complejo III (complejo bc₁), tres (COI, COII, COIII) de las 13 del complejo IV (citocromo C oxidasa) y dos (ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (ATP sintasa) (Figura 2). El resto de subunidades polipeptídicas que forman estos complejos, juntamente con todas las subunidades del complejo II, y todas las proteínas reguladoras del metabolismo del ADNmt, están codificadas por el genoma nuclear. Todas ellas se traducen en el citoplasma y son importadas a la mitocondria mediante translocasas localizadas en las membranas mitocondriales [13].

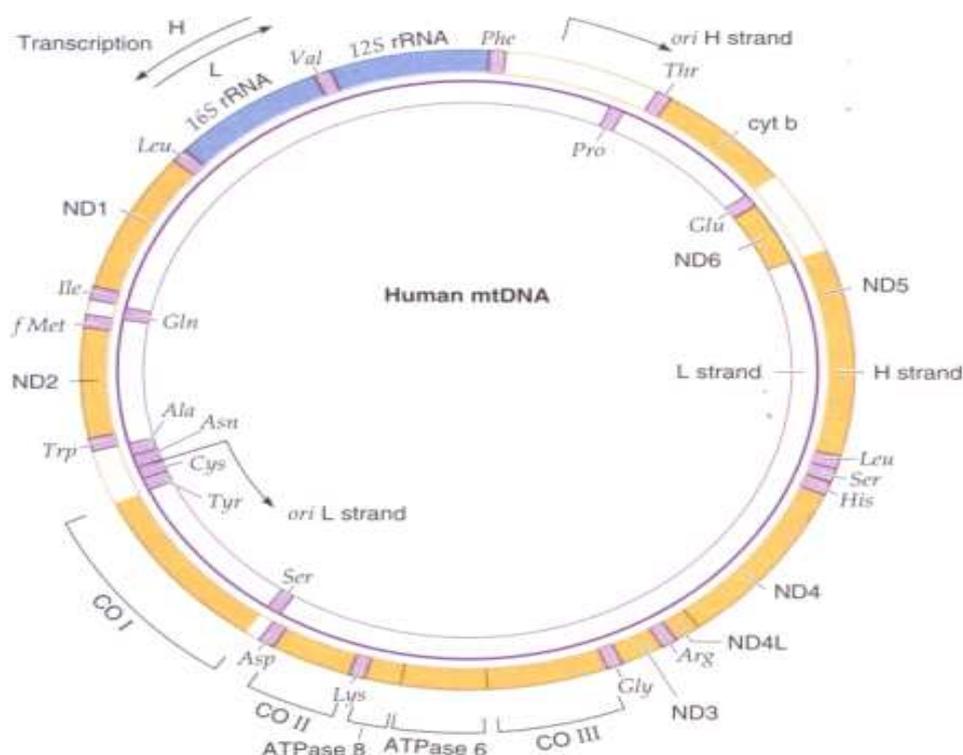


Fig.2 Representación del ADNmt humano. En el exterior se representa la cadena pesada y en el interior la cadena ligera. Los ARNt se representan por el código de letras del aminoácido correspondiente. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de la cadena pesada (ori H) y ligera (ori L).

En mamíferos, la composición de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente: una de ellas es rica en residuos de guanina y timina y se denomina cadena pesada (H), mientras que la otra se denomina cadena ligera (L). Algunas de las características del ADNmt se pueden considerar consecuencias evolutivas de su pasado. Así, los genes estructurales del ADNmt no poseen ni 5' ni 3' UTR; no contienen intrones, y los espacios intergénicos son mínimos, llegando en algunos casos a solapar entre ellos. En la única región no codificante, que se denomina D-loop en mamíferos, se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (ori H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP).

4. Genética Mitocondrial

La genética del ADNmt presenta una serie de características que la diferencian de la del ADN nuclear (ADNn) y que hay que tener en cuenta a la hora de abordar el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales.

4.1 Herencia Materna

El ADNmt se hereda por vía materna. La pequeña cantidad de genoma mitocondrial contenido en el espermatozoide raramente entra en el ovulo, y cuando lo hace es eliminado de forma activa.

Por lo tanto, una madre afectada podrá transmitir la enfermedad a toda su descendencia, pero sólo sus hijas la transmitirán a la siguiente generación.

La cantidad de moléculas que lleve cada uno de sus óvulos puede ser muy variable, debido a un fenómeno de restricción y amplificación conocido como *Bottle-Neck* (cuello de botella). Este fenómeno hace que el número de moléculas de ADNmt que se transmiten de madre a hijo sea muy pequeña [14]. Para hacerse una idea, en vaca se ha estimado que tan sólo 5 moléculas de ADNmt repueblan el ADNmt de la siguiente generación [15].

La concepción clásica de la transmisión del ADNmt exclusivamente vía materna se cuestionó cuando en el año 2002 se publicó un trabajo donde se mostraban evidencias de herencia paterna en un paciente de miopatía mitocondrial esporádica con una microdelección en el gen ND2 [16].

Además, el estudio de este caso permitió demostrar la existencia de recombinación entre las dos poblaciones de ADNmt presentes en el paciente [17].

Sin embargo, estudios posteriores no han encontrado evidencias de herencia paterna en pacientes con miopatías mitocondriales esporádicas [18], [19]. Así pues, se puede seguir considerando que como regla general el ADNmt se hereda de la madre, siendo los casos de herencia paterna un hecho excepcional debido a un fallo en la eliminación del ADNmt paterno durante la fusión de los gametos.

4.2 Poliplasmia

En cada célula hay centenares o miles de moléculas de ADNmt, dependiendo de sus requerimientos energéticos.

4.3 Homoplasmia y heteroplasmia

Es la consecuencia de la naturaleza poliploide de cientos a miles de copias por célula del genoma mitocondrial. De una manera simplificada, homoplasmia es cuando todas las copias del genoma mitocondrial son idénticas y heteroplasmia cuando coexisten dos o más genotipos distintos.

Algunas mutaciones pueden afectar a todas las copias del genoma mitocondrial (mutación homoplásmica) mientras que otras sólo estarán presentes en algunas copias del genoma (mutación heteroplásmica).

4.4 Efecto umbral

El efecto umbral hace referencia a la existencia de un nivel mínimo de mutación para que exista expresión fenotípica o bioquímica del defecto mitocondrial [20]. El fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje de ADNmt mutado, es decir, del grado de heteroplasmia.

Si el número de moléculas mutadas es pequeño se produce una complementación de la función con las moléculas de ADN normales y no se manifiesta el fenotipo mutado. En cambio, si el número de moléculas mutadas sobrepasa un umbral determinado se manifestará la patología.

Este umbral viene regido por las necesidades energéticas de cada tejido; si la producción de ATP llega a estar por debajo de los mínimos necesarios para el funcionamiento de los tejidos, se manifiesta la patogenicidad. Por este motivo los tejidos que tienen mayores requerimientos energéticos como son músculo y sistema nervioso central, suelen ser los más afectados.

4.5 Transmisión del ADNmt

Una mutación homoplásmica se transmite a toda la descendencia materna. Sin embargo, existen factores adicionales que hacen que la expresión del defecto mitocondrial pueda ser diferente entre los portadores de dicha mutación. Por ejemplo, muchos pacientes con LHON tienen mutaciones homoplásmicas en el ADNmt. Aunque toda la descendencia herede la mutación sólo algunos, aproximadamente el 50% de los hombres y el 10% de las mujeres desarrollaran la enfermedad, indicando que existen factores de origen nuclear modulando la expresión fenotípica de estas mutaciones [21].

El caso de las mutaciones heteroplásmicas es aún más complicado. A los factores nucleares y medioambientales se une el hecho de que durante la oogénesis se produce un cuello de botella genético que hace que la cantidad de ADN mutado que hereda la descendencia sea variable [20].

4.6 Segregación mitótica

Aunque el mecanismo de distribución de las mitocondrias (y el ADNmt) en las células hijas durante el proceso de división celular no se conoce, hoy en día se asume que las mitocondrias se segregan al azar. Como consecuencia, a partir de una condición inicial de heteroplasma, durante la proliferación celular (por ejemplo en la embriogénesis) las diferentes células van heredando diferentes proporciones de moléculas con mutación y salvajes.

El resultado final es que los diferentes tejidos del organismo constituyen un mosaico y, a priori, el porcentaje de ADNmt mutado presente en un determinado tejido es impredecible, y varía entre los diferentes hermanos de una familia que sufre una enfermedad mitocondrial.

4.7 Elevada tasa de mutación

La tasa de mutación espontánea del ADNmt es de unas 10 veces superior a la del ADNn [22]. Debido a esto, hay una gran variación de secuencias entre especies y, hasta, entre individuos de una misma especie. Además de estas diferencias, en un individuo determinado, se producen constantemente a lo largo de la vida una heterogeneidad en el ADNmt como consecuencia de las mutaciones originadas en las células somáticas.

Se ha propuesto que la acumulación de este daño mitocondrial podría ser la causa de la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos en el proceso de envejecimiento [23]. La variación existente en la secuencia del ADNmt de diferentes individuos es muy útil para estudios antropológicos, etnológicos y forenses, y a la vez es la base de la hipótesis que postula que el hombre actual descende de una mujer que vivió en África hace unos 200.000 años (Eva Mitocondrial) [24].

5. Las enfermedades mitocondriales

Dado el amplio número de procesos celulares en los que participa la mitocondria, no es extraño que los defectos en la fisiología mitocondrial estén asociados a un número cada vez más amplio de enfermedades y síndromes que abarcan prácticamente todas las especialidades médicas. El concepto de enfermedad mitocondrial data de 1962, cuando el grupo de Rolf Luft describió a una paciente con hipermetabolismo severo no debido a enfermedad tiroidea [25]. Curiosamente, la primera enfermedad mitocondrial descrita puede que sea también la menos frecuente; sólo se ha descrito un caso más de síndrome de Luft desde que se describió el primero hace más de 40 años.

A partir de la sistematización de los estudios bioquímicos, fue posible una primera clasificación de las enfermedades mitocondriales en función de las 5 etapas principales del metabolismo mitocondrial que estaban afectadas: transporte de sustratos, utilización de sustratos, ciclo de Krebs, cadena de transporte electrónico y acoplamiento oxidación/fosforilación [26].

Pronto el uso del término enfermedad mitocondrial se empezó a restringir a aquellas enfermedades donde el defecto afectaba a la cadena respiratoria.

Las primeras mutaciones en el ADNmt se describieron en 1988. Se trataba de una deleción en el ADNmt de pacientes con miopatía mitocondrial [27] y una mutación en el gen ND4 en una familia con neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) [28].

En 1989 se describió una familia donde la oftalmoplejía externa progresiva era heredada de manera autosómica dominante asociada a la presencia de deleciones múltiples en el ADNmt [29].

Era la primera evidencia de un nuevo grupo de enfermedades mitocondriales de origen nuclear. Esto hizo volver la mirada al núcleo y la primera mutación en el ADN nuclear asociada a enfermedad mitocondrial fue descrita en 1995 por el grupo de A. Munnich [30]. Se trataba de una mutación en una subunidad de la succinato deshidrogenasa en dos hermanas con síndrome de Leigh.

Desde entonces, se han descrito más de 250 mutaciones patogénicas en el ADNmt, que presentan una gran heterogeneidad genética, bioquímica y clínica. Las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy variadas [31], entre las más comunes encontramos: demencia, trastornos motores, intolerancia al ejercicio, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, ptosis, oftalmoplejia, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera, cardiomiopatía, disfunciones pancreáticas y hepáticas, diabetes, etc. En general son trastornos multisistémicos que afectan a los tejidos y órganos que más dependen de la energía mitocondrial (sistema nervioso central, músculo esquelético y cardiaco, riñones y sistema endocrino), aunque cualquier otro tejido puede estar afectado.

A nivel radiológico estas encefalopatías se pueden manifestar con calcificaciones de los ganglios de la base, necrosis bilateral del estriado, hipoplasia cerebelosa, infartos cerebrales o cerebelares y leucoencefalopatía. Los indicadores típicos de laboratorio que se relacionan con estas patologías son un aumento de proteínas en el líquido cefalorraquídeo, aumento de la creatina quinasa (CK), acidosis láctica y mioglobinuria.

Otras características que suelen relacionarse con las enfermedades mitocondriales son la presencia de fibras rojo rasgadas (RRFs), que son acúmulos subsarcolémicos de mitocondrias anormales en la periferia de la fibra muscular, la presencia de fibras no reactivas a la tinción histoquímica de citocromo C oxidasa (COX), o el defecto bioquímico de uno o varios complejos de la cadena respiratoria. Todo y con eso, algunas enfermedades mitocondriales pueden no presentar ninguna de estas características típicas, especialmente en pacientes en edad pediátrica.

Cada año se describen nuevas mutaciones en ambos genomas y son identificados nuevos genes implicados a su vez en nuevos procesos, como aquellos que afectan a la fusión o fisión mitocondrial o a la composición lipídica de la membrana.

Sin embargo aún se desconoce cuáles son los mecanismos patogénicos de las mutaciones conocidas, incluso de aquellas identificadas desde hace más tiempo, como son, por ejemplo, las mutaciones que afectan a los ARNt del ADNmt [32]. Además, cada vez se dedica más atención al papel que pueda jugar la mitocondria en el desarrollo de las enfermedades metabólicas y degenerativas asociadas a la edad [33].

Desgraciadamente, un campo donde prácticamente no se han producido avances es en el de los tratamientos de estas enfermedades, a día de hoy claramente insuficientes cuando no inexistentes [34].

La epidemiología de las enfermedades mitocondriales es complicada dado el amplio espectro de presentaciones clínicas y la dificultad de asignar un origen definido a muchos de los fenotipos. Esto ha conducido tradicionalmente a una subestimación de la prevalencia de este grupo de enfermedades [35]. Un estudio epidemiológico realizado en el Norte de Inglaterra se estimó una prevalencia de 9,2 pacientes con manifestaciones clínicas por cada 100.000 habitantes en edad laboral (entre 16 y 65 años) [36].

Adicionalmente, dos estudios independientes de enfermedades de la cadena respiratoria en niños estimaron unos valores para la prevalencia de 4,7 [37] y 5 [38] por cada 100.000 nacimientos.

5.1 Clasificación de las enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales pueden presentar herencia materna, mendeliana o una combinación de las dos y también existen casos esporádicos. A esta complejidad en el patrón de herencia, se ha de sumar la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas. Por lo tanto, su clasificación se basa en las características moleculares y genéticas de las mutaciones.

Dependiendo del genoma mutado que origina la enfermedad mitocondrial se distinguen dos tipos de enfermedades mitocondriales:

- Enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADNmt.
- Enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en genes nucleares.

5.1.1 Enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADNmt

Se pueden dividir en dos grandes grupos:

- Enfermedades asociadas a mutaciones puntuales.
- Enfermedades debidas a reorganizaciones del ADNmt por inserciones y/o deleciones.

5.1.1.1 Enfermedades asociadas a mutaciones puntuales

Para considerar una mutación como patogénica hay una serie de criterios que se consideran básicos dentro de la genética mitocondrial:

- Tiene que haber correlación entre el porcentaje de la mutación y el fenotipo.
- Tiene que co-segregar juntamente con el fenotipo.
- Tiene que afectar a una base muy conservada evolutivamente.

Dentro de las enfermedades mitocondriales destacan las siguientes:

Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON)

Se caracteriza por ceguera bilateral aguda o subaguda, debida a la atrofia del nervio óptico, que se manifiesta en la segunda o tercera década de la vida y es más prevalente en hombre que en mujeres, hecho que hace pensar en el papel modulador de algún factor nuclear codificado en el cromosoma X [39].

Normalmente los pacientes sólo tienen afectada la vista, pero pueden haber casos donde también hay afectación cardíaca, neuropatía periférica y ataxia cerebelosa [40]. Son muchas las mutaciones que se han asociado a esta patología, pero sólo tres son consideradas primarias o patogénicas por si solas, las que afectan a los nucleótidos m.11778 G>A (la más frecuente), m.3460G>A y m.14484T>C. Todas estas mutaciones afectan a subunidades del complejo I del sistema OXPHOS.

El resto de mutaciones se consideran secundarias, se presentan siempre en forma homoplásmica, y se desconoce su relación directa con la enfermedad.

Síndrome de Neuropatía, Ataxia i Retinitis Pigmentaria (NARP)

Descrito por Holt y colaboradores en 1990 [41], se trata de un síndrome multisistémico, caracterizado por debilidad muscular neurogénica, retraso en el desarrollo, neuropatía sensorial, convulsiones, ataxia, demencia y retinopatía pigmentaria. Se ha asociado con la transversión T a G y la transición T a C en el nucleótido 8993 del gen de la subunidad 6 de la ATPasa.

La mutación más frecuente es la m.8993T>G, que provoca la sustitución de una leucina altamente conservada por una arginina (L156R).

Los mecanismos por los cuales esta mutación causa defecto en la síntesis de ATP aún no se conocen por completo. Se ha postulado que la subunidad ATP6 mutada puede impedir la translocación de protones a través de F_0 y evitar la rotación del anillo c, mediante la modificación de la distribución de la carga en el canal de protones [42]. Alternativamente, esta mutación puede causar cambios estructurales en la interfase con el anillo c, lo que provoca un acoplamiento ineficiente entre el transporte de protones y la síntesis de ATP [43].

Ambas hipótesis se basan en los hallazgos del aumento del potencial de membrana y el pH de la matriz en cíbridos y en linfocitos con la mutación m.8993T>G [44], [45]. No está claro si esta mutación causa un plegamiento defectuoso y dificultad de ensamblaje del complejo V.

Por último el déficit en la síntesis de ATP no puede ser el único mecanismo patogénico, ya que la mutación m.8993T>C no da lugar a defectos en la síntesis de ATP [46].

Síndrome de Leigh de herencia materna

Es una enfermedad muy heterogénea con trastornos degenerativos multisistémicos que aparecen en el primer año de vida. Se trata de una entidad devastadora que se caracteriza por disfunciones del tallo cerebral y de los ganglios basales, desmielinización, regresión psicomotora, retraso en el desarrollo, convulsiones, ataxia y neuropatía periférica.

El origen de este síndrome es la mutación m.8993T>G, la misma que en NARP, pero con un porcentaje de la mutación siempre superior al 95%. También hay casos de Leigh debidos a mutaciones en genes nucleares.

Síndrome de MELAS (Encefalopatía Mitocondrial con Acidosis Láctica y Episodios de Accidentes Cerebrovasculares)

En el 90% de los casos se ha asociado a la transición A a G en el nucleótido 3243 del gen ARNt^{Leu (UUR)} del ADNmt [47]. Se caracteriza por accidentes cerebrovasculares de repetición, que provocan disfunción cerebral subaguda y cambios en la estructura cerebral, acidosis láctica y/o RRFs. Estas características pueden ir acompañadas también de encefalopatía con convulsiones generalizadas, cefaleas, sordera, demencia y diabetes.

Esta mutación provoca manifestaciones fenotípicas muy variadas. Otras mutaciones pueden estar implicadas en este síndrome. En cultivo de cíbridos transmitocondriales con la mutación m.3243A>G se ha encontrado disminución de los niveles de síntesis proteica mitocondrial y actividades reducidas de los complejos I y IV de la cadena respiratoria [48], [49]. También provoca una reducción de la aminoacilación del ARNt^{Leu (UUR)} del 70-75% [50].

Además las moléculas mutadas de ARNt^{Leu (UUR)} presentan la alteración en la modificación de uridina a 5-taurinomethyluridina en la primera posición del anticodón [51]. El ARNt^{Leu (UUR)} mutado carente de modificación puede reconocer solamente el codón UUA pero no el codón UUG [52].

Debido a que el codón UUG es el más utilizado en la secuencia codificante de la subunidad ND6 del complejo I, el defecto en la actividad del complejo I es la característica más destacada en mitocondrias aisladas de músculo esquelético en pacientes con MELAS. En casos severos, el defecto no se limita al complejo I, puede extenderse al complejo IV y otros [53], [54].

Además esta mutación produce, disminución de la producción de ATP [55], reducción del potencial de membrana mitocondrial [56], [57], [58], incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [55], incremento de la producción de lactato, aumento del calcio citoplasmático, reducción de la secreción de insulina, envejecimiento prematuro y la desregulación de genes implicados en el metabolismo de los grupos amino y de la síntesis de urea.

Estos hechos se han propuesto como causas del síndrome MELAS.

La mutación m.3243A>G también se ha asociado con otras enfermedades mitocondriales.

Síndrome de MERRF (Epilepsia Mioclónica con fibras rojo-rasgadas)

Se caracteriza por epilepsia mioclónica, ataxia cerebelosa y miopatía. En algunos casos puede ir acompañada de demencia, sordera, atrofia óptica, neuropatía periférica, retinopatía y oftalmoparesis [40]. Sigue un patrón de herencia materna, y la mutación más frecuente es la transición A a G en la posición 8344 del ARNt^{Lys} [59]. Otras mutaciones, como la m.8356 T>C [60] y la m.8363G>A [61], también localizadas en el ARNt^{Lys}, se asocian a este síndrome.

La mutación m.8344A>G siempre se presenta en heteroplasmia y requiere un 95% de los genomas mutados para manifestar la patología.

Estudios con híbridos han demostrado que la mutación causa una severa reducción de los niveles de proteínas mitocondriales [62], [63], [64].

Esta reducción es debida a un defecto en la aminoacilación del ARNt^{Lys}, que origina una terminación prematura de la traducción [63]. Esta mutación se encuentra también asociada a otros fenotipos clínicos como son el síndrome de Leigh, miopatía, CPEO [65] y lipomatosis simétrica múltiple (MSL) [66]. Además, se ha observado en fibroblastos de pacientes con la mutación m.8344A>G una correlación positiva entre esta mutación y la reducción de la actividad de los complejos I y IV [59], [67].

Mutación m.14487T>C en ND6

Esta mutación se caracteriza por provocar distonía progresiva generalizada con necrosis bilateral del estriado [68], afecta a la subunidad ND6 del complejo I provocando la sustitución de la metionina en la posición 63 muy conservada evolutivamente por valina (M63V). Esta mutación causa disminución de la actividad del complejo I en fibroblastos y en cíbridos [69], así como alteración de los niveles completamente ensamblados del complejo I en fibroblastos y cíbridos, sugiriendo que puede impedir el ensamblaje del complejo I [68]. Además por estudios realizados en nuestro grupo, sabemos que esta mutación produce en cíbridos sobreproducción de ROS provocando daño oxidativo en lípidos y en ADNmt [70].

Síndrome de intolerancia al ejercicio

Es una miopatía mitocondrial esporádica en la cual la intolerancia severa al ejercicio es la característica fundamental. Este síndrome está causado por mutaciones que afectan al citocromo b. Asociada a este síndrome principal, algunos pacientes pueden presentar también mioglobinuria y acidosis láctica. Generalmente la biopsia muscular presenta RRFs. Se ha asociado a mutaciones restringidas al músculo esquelético, el único tejido afectado [71], [72], [73], [74], [75]. Andreu y colaboradores sugieren que dichas mutaciones pueden tener un origen somático, generándose en las primeras fases del desarrollo embrionario.

5.1.1.2 Enfermedades asociadas a reorganizaciones del ADNmt

Al contrario de lo que sucede con las mutaciones puntuales, las deleciones y/o las inserciones suelen ser espontáneas, aunque también se han publicado algunos casos de herencia materna. Se han descrito varios centenares de reorganizaciones del ADNmt.

Se presentan en forma de heteroplasmia y pueden aumentar la gravedad con la edad. Algunos de los síndromes clínicos descritos son los siguientes.

Síndrome de Oftalmoplejía Crónica Externa Progresiva (CPEO)

Se caracteriza por oftalmoplejía, ptosis bilateral de párpados y miopatía. Suele ir acompañada de intolerancia al ejercicio y debilidad muscular. La biopsia muscular suele presentar fibras rojo rasgadas (RRFs) y fibras COX negativas (no presentan actividad del complejo IV del sistema OXPHOS). En general es una enfermedad benigna que acostumbra a aparecer en la adolescencia o en adultos jóvenes, y se inicia de manera esporádica, sin historia familiar. Se ha asociado fundamentalmente a deleciones grandes y únicas en el ADNmt. Pero también se han encontrado otras formas de este síndrome asociadas a mutaciones puntuales de herencia materna o con deleciones múltiples de herencia autosómica dominante.

Síndrome de Kearns-Sayre

Enfermedad progresiva multisistémica que aparece antes de los 20 años, y se caracteriza por oftalmoplejía externa progresiva y retinopatía pigmentaria. Además, suele ir acompañada de ataxia, miopatía mitocondrial, bloqueo de la conducción cardíaca, niveles de proteína CFS (fluido cerebrovascular) superior a 100 mg/dl, sordera y demencia, así como fallo renal y endocrino. La biopsia muscular presenta RRFs y fibras COX negativas. Los pacientes raramente superan los 40 años de vida. La enfermedad se relaciona con deleciones grandes en el ADNmt de origen esporádico.

Síndrome de Pearson

El síndrome de medula ósea-páncreas de Pearson es una enfermedad de los primeros años de vida que afecta a la hematopoyesis y a la función pancreática exocrina. Las características clínicas más comunes suelen ser anemia sideroblástica con vacuolización de precursores de la médula ósea, asociada a disfunción pancreática exocrina. Además, acostumbran a desarrollar fallo hepático progresivo, atrofia de las vellosidades intestinales, diabetes mellitus y disfunción tubular renal [76]. Los niños afectados desarrollan más tarde un fenotipo Kearns-Sayre.

Estos pacientes presentan deleciones grandes únicas, que en general son esporádicas, todo y que se han descrito algún caso de herencia materna.

Duplicaciones en el ADNmt

Pueden ser esporádicas o de herencia materna [77]. La mayoría de los fenotipos que originan no se diferencian de los que provocan las deleciones. Se han encontrado duplicaciones con pacientes con síndrome de Kearns-Sayre, de Pearson, en diabetes mellitus, tubulopatía renal y miopatía mitocondrial [78]. También se han encontrado duplicaciones y hasta triplicaciones en individuos normales, pero siempre en baja proporción [79].

5.1.1.3 Mecanismos patogénicos

El mecanismo patogénico de muchas de las enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt es actualmente desconocido. Según la explicación convencional estas mutaciones producen un defecto en la biosíntesis de proteínas mitocondriales que a su vez provoca un defecto OXPHOS y por lo tanto la causa de estos síndromes sería un defecto en la producción de energía en forma de ATP. Según esta explicación cabría esperar fenotipos parecidos para estas mutaciones, pero la realidad es que la misma mutación puede causar fenotipos distintos, y a su vez, un mismo fenotipo puede estar causado por distintas mutaciones [35].

Por ejemplo, la mutación m.3243A>G es probablemente la causa más común de MELAS, pero también ha sido encontrada en pacientes con oftalmoplejía externa progresiva crónica, síndrome de Kearns-Sayre o diabetes mellitus aislada.

A su vez la causa más frecuente del síndrome de Kearns-Sayre es la deleción común del ADNmt, que a su vez se ha encontrado en pacientes con MELAS, diabetes mellitus aislada o cardiomiopatía.

Algunos tejidos parecen ser especialmente vulnerables a mutaciones específicas en ciertos ARNt; por ejemplo, el MERRF está asociado casi siempre a mutaciones en el ARNt^{Lys}; la cardiomiopatía a mutaciones en el ARNt^{Ile}; la diabetes mellitus a la mutación m.14709T>C en el ARNt^{Glu}.

Pero la razón por la que unos tejidos son más vulnerables a ciertas mutaciones que a otras sigue siendo un completo misterio [32].

Existen evidencias de que la expresión de las mutaciones patogénicas puede estar modulada por el resto de la secuencia del ADNmt [32].

De una manera más general, ciertos haplotipos podrían afectar a la fosforilación oxidativa, predisponiendo o protegiendo de ciertas enfermedades. Los haplogrupos mitocondriales han sido asociados con cardiomiopatías, enfermedad de Alzheimer, o enfermedad de Parkinson [32]. En este sentido, algunos autores defienden que las variantes genéticas que permitieron a nuestros ancestros adaptarse a las distintas condiciones medioambientales, clima y alimentación principalmente, están teniendo una profunda influencia en la disposición a padecer enfermedades de la población actual [33].

Así pues, la patogénesis de las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt parece ser el resultado de una combinación de la propia mutación, el resto de la molécula de ADNmt, el fondo nuclear, factores medioambientales, la distribución de la mutación en los distintos tejidos, y la dependencia de estos con respecto al sistema de fosforilación oxidativa.

5.1.2 Enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en genes nucleares

Considerando que actualmente se desconoce la causa genética en más del 50% de los pacientes diagnosticados de enfermedad mitocondrial, probablemente la mayoría de las enfermedades mitocondriales son debidas a mutaciones en los genes nucleares que codifican alguna de las 1500 proteínas que forman el proteoma mitocondrial. Se conocen únicamente la mitad de estos genes, lo que implica una gran dificultad a la hora de diagnosticar correctamente las enfermedades mitocondriales de origen nuclear.

Calvo y colaboradores realizando una aproximación *in silico* identificaron un gran número de genes nucleares candidatos a ser responsables de enfermedades de la cadena respiratoria [80].

Las mutaciones en genes nucleares que afectan de una manera directa a la cadena respiratoria pueden ser clasificadas en 3 grupos principales:

- Mutaciones en genes que codifican subunidades de los complejos de la cadena respiratoria.
- Mutaciones en genes que codifican proteínas accesorias necesarias para el correcto ensamblaje y función de los complejos de la cadena.
- Mutaciones que afectan a la estabilidad y replicación del ADNmt.

Aparte de estos tres grupos, existiría un cuarto donde se incluirían aquellas mutaciones que afectan de un modo indirecto a la cadena respiratoria.

5.1.2.1 Mutaciones en subunidades estructurales de los complejos de la cadena respiratoria

Aunque 72 de las 85 subunidades de los complejos que forman la cadena respiratoria están codificadas en el núcleo, las mutaciones en dichos genes son poco frecuentes. Esto podría ser un reflejo de la naturaleza altamente deletérea de dichas mutaciones, que darían lugar a letalidad durante la embriogénesis.

Hasta la fecha han sido descritas mutaciones en subunidades del complejo I (NDUFS1, 2, 3, 4, 7 y 8, NDUFV1 y 2 y NDUFA1, 2 y 11), asociadas a síndrome de Leigh, encefalomiopatía, leucodistrofia, y en las cuatro subunidades del complejo II (SDHA, B, C y D) asociadas a síndrome de Leigh y ataxia en el caso de la subunidad A, y más raramente a paraganglioma y feocromocitoma en el caso de las subunidades B, C, y D. También se han descrito mutaciones en subunidades del complejo III (UQCRB y UQCRQ) asociadas a hipoglicemia, acidosis láctica y severo retraso psicomotor con signos extrapiramidales, así como una mutación en el complejo IV (COX6B1) asociado a encefalomiopatía infantil [81].

5.1.2.2 Mutaciones en proteínas accesorias

Existen enfermedades debidas a defectos en los complejos I, III, IV y V por mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas implicadas en el correcto ensamblaje de estos complejos.

Un ejemplo claro lo constituyen las deficiencias de la citocromo oxidasa (COX) donde son numerosas las mutaciones descritas en genes implicados en su ensamblaje y estabilidad, como son SCO1, SCO2, SURF1, COX10, COX15 y LRPPRC.

También han sido descritas mutaciones en el gen BSCL1, involucrado en el ensamblaje del complejo III, y ATP12, implicado en el ensamblaje del complejo V [35]. Así como una mutación en un gen de ensamblaje del complejo I (B17.2L) asociada a un cuadro de leucoencefalopatía [82].

5.1.2.3 Mutaciones en proteínas implicadas en el mantenimiento y replicación del ADNmt

El ADNmt depende para su correcta replicación, reparación y estabilización de numerosas proteínas codificadas en el ADN nuclear. Mutaciones en estas proteínas pueden producir daños cuantitativos (depleción) o cualitativos (deleciones) en el ADNmt.

Entre las enfermedades asociadas a una disminución en la cantidad del ADNmt cabe destacar por su gravedad, el síndrome de depleción mitocondrial. Este síndrome suele presentarse con dos cuadros clínicos diferentes: una forma hepatocerebral, con debut neonatal y un grado de depleción de ADNmt severo, y una forma miopática, de debut más tardío y un menor grado de depleción.

La forma hepatocerebral está asociada en la práctica totalidad de los casos a mutaciones en el gen que codifica la deoxiguanosina quinasa (DGUOK) [83], mientras que la forma miopática lo está con mutaciones en el gen que codifica la timidina quinasa 2 (TK2) [84].

Mutaciones en el gen que codifica la timidina fosforilasa (TP) causan el síndrome de encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE), asociado normalmente a una depleción menos severa en el ADNmt que la observada en el síndrome de depleción [85]. Estos tres genes están implicados en el metabolismo de nucleótidos.

Otros genes implicados en depleción mitocondrial son MPV17 [86], que codifica una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial de función desconocida, SUCLA2, que codifica la subunidad β de la succinil-CoA sintetasa [87], RRM2B que codifica la ribonucleótido reductasa controlada por p53 (p53R2) [88], y SUCLG1 que codifica la subunidad alfa de la succinato-coenzima A ligasa (SUCL) [89].

Un apartado especial merece el gen POLG que codifica la subunidad catalítica de la polimerasa γ mitocondrial. Cerca de 50 mutaciones patogénicas han sido descritas en este gen asociadas a un amplio número de enfermedades mitocondriales, y acompañadas tanto de depleción como de deleciones en el ADNmt [90].

Las primeras mutaciones fueron descritas en familias con oftalmoplejía externa progresiva en su forma autosómica dominante (adPEO) asociada a deleciones múltiples del ADNmt [91], enfermedad que también ha sido asociada a mutaciones en los genes C10orf2, que codifica para la helicasa mitocondrial [92] y ANT1, que codifica para una isoforma del transportador de nucleótidos de adenina mitocondrial [93].

Todas las mutaciones en el gen POLG asociadas a adPEO afectan al dominio polimerasa de la proteína. Estudios basados en la caracterización bioquímica de proteínas recombinantes portadoras de mutaciones en dicho dominio, muestran una correlación entre la severidad del fenotipo observado en pacientes y la disminución de la actividad polimerasa y de la procesividad causada por las mutaciones [94]. También han sido descritas mutaciones heterocigotas compuestas en pacientes con las formas esporádica y la recesiva de PEO (arPEO). Estas mutaciones suelen afectar al dominio exonucleasa o a la región espaciadora de la proteína.

Estudios bioquímicos en proteínas recombinantes portadoras de mutaciones en la región espaciadora muestran una drástica disminución de la eficacia catalítica, así como de la capacidad de interactuar con la subunidad accesoria [95].

Durante los últimos años, el espectro clínico ocasionado por mutaciones en el gen POLG ha aumentado considerablemente.

Se ha escrito una alta incidencia de enfermedad psiquiátrica, síndrome parkinsoniano e insuficiencia gonadal primaria, provocando una menopausia precoz, en familias con mutaciones dominantes en el gen POLG [96], [97].

Otras patologías que han sido asociadas a mutaciones recesivas en el gen POLG son el síndrome de ataxia mitocondrial de herencia autosómica recesiva (MIRAS) [98] y la enfermedad de Parkinson asociada a neuropatía periférica [99]. En todos los casos la enfermedad se acompaña de presencia de deleciones múltiples en el ADNmt.

Adicionalmente, las mutaciones recesivas en el gen POLG son la mayor causa del síndrome de Alpers-Huttenlocher, una forma de hepatoencefalopatía severa infantil, que se acompaña de depleción del ADNmt [100].

Así pues, existe un gran interés en el estudio de este gen dado el cada vez mayor número de mutaciones descritas, asociadas a un amplio abanico de patologías humanas.

5.1.2.4 Mutaciones en genes que alteran de un modo indirecto la función OXPHOS

Dentro de este grupo se encontrarían las mutaciones en un número creciente de genes, que codifican proteínas esenciales para diferentes procesos de la fisiología mitocondrial. Por ejemplo, aquellas que afectan a la composición lipídica de la membrana, como es el caso de las mutaciones en el gen G4.5 que codifica para un grupo de proteínas, las tafazinas, que alteran la biosíntesis de la cardiolipina y provocan el síndrome de Barth, consistente en cardiopatía, miopatía y neutropenia cíclica.

También se incluirían las mutaciones en genes implicados en los procesos de fusión mitocondrial, como son las mutaciones en MFN2 que causan la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT) subtipo 2A [101], o las mutaciones en OPA1 que causan el síndrome de atrofia óptica autosómica dominante (DOA), y mutaciones en GDAP1 asociadas a CMT subtipo 4A [102].

6. Modelos animales y celulares en el estudio de las enfermedades mitocondriales

La limitada disposición de muestras humanas, hacen necesario el uso de organismos modelo para el estudio de la patogénesis de estas enfermedades. Con este objetivo se han usado hasta la fecha diferentes organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* o *Mus musculus* [103]. Entre ellos el ratón es el que ofrece más ventajas al ser el más cercano a los humanos tanto a nivel genético como fisiológico y morfológico.

Sin embargo, la utilidad de estos modelos se ha restringido hasta el momento al estudio de mutaciones en el ADN nuclear, dada la enorme dificultad, de obtener modelos de enfermedad mitocondrial causada por mutaciones en el ADNmt. Han sido muchos los esfuerzos realizados en los últimos 15 años para la obtención de modelos de ratón con mutaciones o deleciones en el ADNmt.

Entre los modelos de ratón con alteraciones en el ADNmt que se han conseguido obtener, destaca el ratón portador de una gran delección (Δ ADNmt4696) [104]. La metodología utilizada se basa en la enucleación de líneas celulares portadoras de la delección en el ADNmt y la inyección de estas en el espacio perivitelino (10-15 citoplastos/embrión) y la electrofusión con embriones en estadio unicelular.

Otro modelo, es el ratón con la mutación de resistencia a cloranfenicol (T2433C en el 16S ARNr). Para conseguirlo se transfirieron mitocondrias con esta mutación en células ES hembra que se microinyectaron en blastocisto (en la masa celular interna) y posteriormente implantadas en ratones hembra pseudogestantes [105].

Recientemente se han generado dos modelos de ratón con mutaciones puntuales en el ADNmt uno con la mutación (m.6589T>C en el gen COI) y otro con la mutación (m.13997A>G en el gen ND6) [106].

Pero la dificultad técnica en la generación de estos modelos ha impedido tener un mayor número de modelos de ratón con alteraciones en el ADNmt. Seguramente en los próximos años se obtendrán un mayor número de modelos murinos que aporten mucha información acerca de la fisiopatología asociada a alteraciones en el ADNmt.

Pero hasta el momento, el modelo más utilizado en el estudio de los mecanismos patogénicos asociados a mutaciones en el ADNmt, es el modelo de cíbridos transmitocondriales [20].

Este modelo se obtiene a partir de líneas celulares humanas cuyo ADNmt ha sido completamente eliminado (células Rho 0 (ρ^0)), siendo repobladas con mitocondrias procedentes de un paciente o donante. Las células ρ^0 no poseen una cadena respiratoria funcional y dependen de piruvato y uridina exógenos para crecer, lo que permite la fácil selección de los transformantes que contienen el ADNmt del paciente [107]. Este sistema ha permitido el estudio de las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de mutaciones en el ADNmt [108], [109]. También se ha utilizado para estudiar el efecto del fondo genético nuclear sobre la segregación de mutaciones patogénicas [110], o para demostrar la presencia de recombinación heteróloga en el ADNmt en células humanas [111].

Sin embargo, las líneas celulares de híbridos transmitocondriales se mantienen en un medio de cultivo con alta concentración de glucosa, quedando parcialmente enmascarado el fenotipo de estas mutaciones ya que la principal fuente energética de estas células en este medio es la glicolisis. Para estudiar la posible patogenicidad de una mutación en el ADNmt se utiliza un medio de cultivo con galactosa que fuerza la utilización del sistema OXPHOS para la obtención de ATP [112]. Sin embargo, en algunas mutaciones del ADNmt las células dejan de ser viables a las pocas horas de estar cultivadas en este medio, lo que impide estudiar el defecto en el sistema OXPHOS en células viables. Por esta razón sería conveniente establecer unas nuevas condiciones de cultivo que permitieran manifestar el déficit del sistema OXPHOS pero que a la vez las células fueran viables. El estudio de las líneas de híbridos en unas condiciones de cultivo donde la utilización de sustratos dependa de la función del sistema de fosforilación oxidativa manteniendo su viabilidad, puede aportar información clave en el estudio de los mecanismos patogénicos de mutaciones en el mtDNA.

El hecho de poder disponer de sistemas experimentales que ayuden a comprender las consecuencias moleculares y metabólicas de los defectos en el sistema OXPHOS es de vital importancia a la hora de elucidar los mecanismos patogénicos, decidir tratamientos eficaces y desarrollar terapias racionales para estas enfermedades [6].

7. Perfil de expresión genética en las enfermedades mitocondriales

En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo en determinar la respuesta transcripcional nuclear en las enfermedades mitocondriales para determinar las consecuencias patofisiológicas de las diferentes mutaciones que afectan a la función mitocondrial. Para ello una de las herramientas utilizadas ha sido el análisis de microarrays, técnica que permite examinar la expresión de miles de transcritos en paralelo.

Los estudios de microarrays realizados hasta el momento, reflejan como las diferentes enfermedades mitocondriales presentan alteraciones transcripcionales comunes, mientras que otras parecen ser específicas de un determinado fenotipo [113].

En un estudio realizado por Cortopassi y colaboradores, [114] en el que se examinaba el perfil transcripcional de 5 enfermedades mitocondriales (LHON, FRDA, MELAS, KSS y NARP) en 9 modelos celulares distintos, observaron un exceso de alteraciones transcripcionales compartidas, entre las células con patología mitocondrial, por encima de lo esperado.

Entre los genes más significativamente compartidos y con una mayor expresión se encontraron miembros de la *unfolded protein response (UPR)* como (ATF4, CHOP, GRP58, GRP78/Bip, GRP 75, MTHSP70 y DNAJB6).

Estos cambios indicarían que en las enfermedades mitocondriales analizadas se produce una inducción de la (*UPR*), provocando la inhibición de procesos como la síntesis proteica y la secreción vesicular [115], [116].

La *UPR* es una respuesta al estrés celular relacionado con el retículo endoplasmático y la mitocondria.

El proceso se activa por acumulación de proteínas incorrectamente plegadas en retículo endoplasmático y/o mitocondria y tiene como objetivo restaurar la función normal de la célula, al detener la traducción de proteínas y activar las vías de señalización que conducen a aumentar la producción de las chaperonas moleculares implicadas en el plegamiento de las proteínas. Si el objetivo no se alcanza en un tiempo determinado, o la interrupción es prolongada, la célula se dirigirá hacia la apoptosis.

Además en el mismo estudio observaron que entre las alteraciones transcriptómicas más compartidas e inhibidas se encontraban los factores de iniciación de la traducción (EIFS38 y EIF4B), así como (COUP-tf2, Rab11a, y Rab31/22, dos ATPasas lisosomales, Niemann-Pick C2, TBC1D8, TFPI, y DPYSL-2) implicados en las vías de secreción vesicular, evidenciando que la síntesis proteica y la secreción vesicular son dos de las funciones más afectadas en la enfermedad mitocondrial.

Además de su función en la secreción vesicular, muchos de estos genes están implicados en migración celular (COUP-tf2, Rab11a, DPYSL-2).

Curiosamente en este estudio se encontraron transcritos específicos de oligodendrocitos que estaban infraexpresados en los diferentes tipos celulares analizados, como (DEGS1) implicado en la síntesis de ceramida, el mayor precursor de la esfingomielina (el mayor componente de la vaina de mielina, así como (Rab31/22b) involucrado en el transporte vesicular de lípidos a la vaina de mielina.

El impacto negativo de la deficiencia mitocondrial en la biogénesis de lípidos, secreción vesicular y genes específicos de oligodendrocitos sugieren que la demielinización, puede ser una importante característica fisiopatológica de la enfermedad mitocondrial, especialmente porque la mielina es transportada por secreción vesicular.

Hay abundante bibliografía acerca de la idea que la disfunción mitocondrial causa demielinización en enfermedades mitocondriales tales como Leigh [117], MELAS [118], MERRF [119], MNGIE [120] y deficiencia en el complejo IV [121].

En un trabajo posterior realizado por Fujita y colaboradores [122] mediante análisis de microarrays en cíbridos con las mutaciones en el ADNmt m.3243A>G y m.8993T>G asociadas a los síndromes MELAS y NARP también observaron la sobreexpresión de (CHOP, ATF4).

Lo que reafirma la idea de un cierto perfil común en las enfermedades mitocondriales. Ellos sugieren que la presencia de mutaciones en el ADNmt pueda alterar los niveles de aminoácidos libres provocando la sobreexpresión de CHOP y ASNS a través del aumento de la expresión de ATF4 y su unión a AARE y NSRE-1 respectivamente.

La idea que el metabolismo de aminoácidos esta alterado en las enfermedades mitocondriales parece confirmarse ya que en un estudio de análisis de microarrays realizado en biopsias de tejido muscular en pacientes con la mutación m.3243A>G y la delección común de 4977pb en el ADNmt, observaron la alteración de la regulación de varios genes implicados en el metabolismo de los grupos amino y en la regulación del ciclo de la urea (incluyendo los genes sobreexpresados ARG2, ASNS y ASS) [113].

El ciclo de la urea está directamente implicado en el metabolismo de la arginina, y la última reacción es la catalizada por la arginasa. La ARG2 está presente en tejidos como el riñón y el cerebro, localizada en la mitocondria y caracterizada por una baja expresión [123].

Su principal función es la de producir ornitina a partir de arginina. La arginina también juega un importante papel fisiológico en la síntesis de otras poliaminas como el óxido nítrico y la creatina [124]. Una concentración de arginina por debajo de los niveles normales causada por la sobreexpresión de ARG2 puede reconducir el óxido nítrico hacia la formación de peroxinitrito, el cual, actúa como segundo mensajero que puede provocar apoptosis por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial. De hecho, se ha visto que el óxido nítrico y su metabolito tóxico el peroxinitrito puede inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, provocando una insuficiencia energética [125].

La baja concentración de arginina podría causar la reducción de la actividad de la argininosuccinato, contribuyendo a la aparición de muchos aspectos característicos de la enfermedad mitocondrial.

Ese es el caso de la aciduria argininosuccinica, una enfermedad mitocondrial caracterizada por retraso mental, epilepsia y ataxia, donde la arginina plasmática esta disminuida. Además los pacientes con síndrome MELAS presentan bajas concentraciones de arginina y citrulina en plasma y se ha observado que la infusión intravenosa de L-arginina mejora la isquemia cerebral en pacientes MELAS durante la fase aguda del ictus [126].

Además la arginina tiene actividad anti oxidante y promueve la producción del factor de crecimiento humano (FCH). Por lo tanto la deficiencia crónica de arginina puede reducir los niveles en plasma de (FCH) e influenciar en el desarrollo normal, provocando la baja estatura hecho observado en los desórdenes mitocondriales.

En el estudio realizado por Crimi y colaboradores [113] examinaron las vías implicadas en el metabolismo de la arginina y observaron que 6 enzimas implicados en el metabolismo de la arginina estaban sobreexpresados con una sobreexpresión media de >1.4 . Estos resultados son consistentes con la observación de que todo el metabolismo de la arginina esta alterado de manera coordinada en células musculares con mutaciones en el ADNmt.

Pero además las enfermedades mitocondriales también presentan alteraciones transcripcionales que parecen ser específicas de un determinado fenotipo.

En un análisis de microarrays realizado en cíbridos con las mutaciones m.11778G>A y m.3460G>A características del síndrome LHON, se observaron alteraciones transcripcionales muy específicas permitiendo a los autores formular una hipótesis acerca del mecanismo fisiopatológico de la mutación [127]. Entre las alteraciones específicas encontraron la sobreexpresión de la aldosa reductasa. El incremento de la expresión de este enzima produce el incremento de productos enzimáticos como el sorbitol o el galactitol que causan estrés osmótico y toxicidad, a las células ganglionares de la retina, activando la cascada apoptótica. Otro gen sobreexpresado es el gen pro-apoptótico ITM2B. Además también observaron la infraexpresión de sialiltransferasa1 y Raf1, factores implicados en supervivencia y proliferación celular.

Por último encontraron infraexpresado el MTHFD1 implicado en la síntesis del folato, el cual ayuda específicamente en la reparación del daño en las células ganglionares de la retina, las principales células afectadas en LHON [128].

Según los autores, el efecto aditivo del incremento de ROS detectado en cíbridos LHON, junto con el estrés osmótico causado por el incremento de expresión de la aldosa reductasa, tiene como resultado la disminución de la expresión de factores de supervivencia y proliferación (Raf1 y Siat1), que combinado con la sobreexpresión de genes pro-apoptóticos (ITM2B) y de alteraciones en la biosíntesis de tetrahidrofolato (MTHFD1) puede predisponer a las células ganglionares de la retina a la apoptosis, provocando la muerte celular específica observada en pacientes de LHON y en líneas celulares con mutaciones LHON [129] [130].

Estudios posteriores como el realizado por Abu-Amero y colaboradores [131] en leucocitos de pacientes con el síndrome LHON, confirman algunas de las alteraciones observadas en el estudio anterior como la infraexpresión de MTHFD1 y aportan nuevas, como la infraexpresión de OPA1.

Crimi y colaboradores [113] evidenciaron que las enfermedades mitocondriales presentan alteraciones transcripcionales específicas cuando compararon la expresión de biopsias musculares de pacientes mitocondriales con distinto fenotipo que compartían la misma mutación puntual en el ADNmt m.3243A>G. El análisis de microarrays mostraba un restringido pero diferente perfil de expresión.

Muchos de los genes estaban infraexpresados en PEO ^{m.3243A>G} mientras que en MELAS ^{m.3243A>G} presentaban niveles de expresión normales. En este estudio, muchos de los genes diferencialmente expresados influyen en el proceso de transcripción, en particular, en la regulación de la actividad de la ARN-polimerasa II. La alteración de la expresión de las proteínas asociadas a la ARN-polimerasa II, como la sobreexpresión de TAF15 en MELAS ^{m.3243A>G}, en respuesta a las alteraciones en el ADNmt pueden producir cambios en la expresión de otros genes. De hecho, es también conocido que las enfermedades relacionadas con la mutación m.3243A>G, se caracterizan por presentar una sobreexpresión de genes que regulan el proceso de transcripción [132].

Además observaron, que en pacientes m.3243A>G con fenotipo PEO presentaban una infraexpresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos.

Los autores proponen que una infraexpresión de la oxidación de ácidos grasos, acoplada con deficiencia en la cadena respiratoria, podría permitir el aumento de la utilización de las proteínas como fuente de energía provocando una degradación proteica generalizada, un mecanismo que daría lugar a una miopatía progresiva, el cual ha sido observado en pacientes PEO ^{m.3243A>G}.

Por último también observan en MELAS ^{A3243G} la sobreexpresión del gen RYR3, que codifica un canal de Ca²⁺ responsable de la liberación de calcio desde los almacenes intracelulares (retículo sarcoplasmático) ante estímulos extracelulares.

La sobreexpresión de este gen en MELAS ^{m.3243A>G}, según los autores, puede reflejar cambios en la homeostasis del Ca²⁺ muscular en este desorden de cadena respiratoria.

Los datos muestran que hay una significativa huella transcripcional compartida entre las diferentes enfermedades mitocondriales estudiadas tales como: activación de UPR, inhibición síntesis proteica así como de la secreción vesicular y alteración del metabolismo de aminoácidos.

Además, estos estudios muestran como las enfermedades mitocondriales presentan alteraciones transcripcionales específicas que ayudan a comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad.

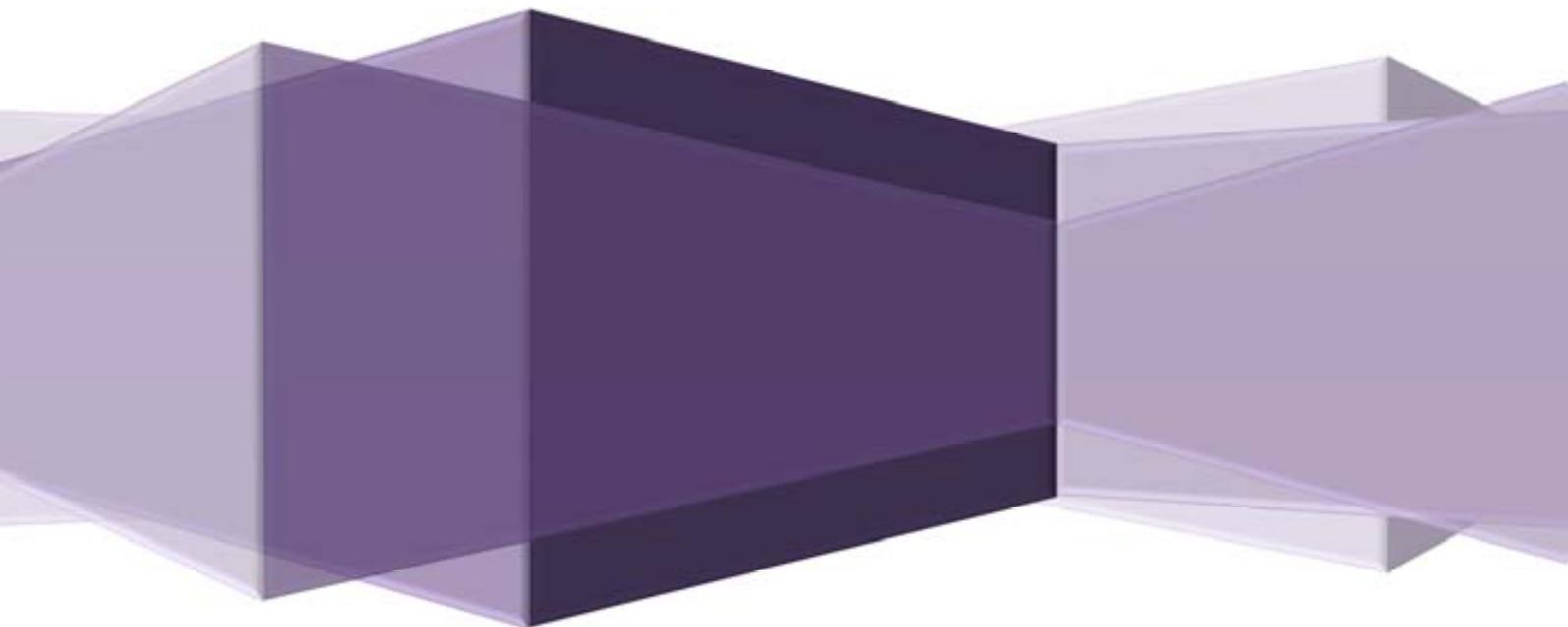
Es tal el grado de especificidad, que incluso una misma mutación, con manifestación fenotípica diferente puede presentar alteraciones transcripcionales específicas [113].

Sin embargo, existen discrepancias entre los diferentes estudios de expresión en procesos tales como el ciclo celular y la apoptosis.

Respecto al ciclo celular, observamos como en el estudio realizado por Cortopassi [114] observan una activación del ciclo celular en las diferentes enfermedades mitocondriales analizadas, caracterizado por la sobreexpresión del protooncogén c-Myc. En cambio en el estudio de Crimi y colaboradores [113] observan la sobreexpresión de p21, gen que está estrechamente regulado por p53, a través del cual esta proteína media la parada del ciclo celular en la fase G1. Respecto a la apoptosis, existen datos contradictorios respecto el papel de la apoptosis en la patogénesis de las enfermedades mitocondriales [133], [134].

Por ejemplo, en el estudio realizado por Crimi y colaboradores [113] observan en músculo PEO ^{m.3243A>G} la sobreexpresión del gen anti-apoptótico CFLAR así como la infraexpresión de otros genes implicados en la apoptosis como IGFR2, PTK2, EGFR y PDE4B por lo que parece improbable que la apoptosis juegue un papel principal en la patogénesis en PEO ^{A3243G}. En cambio, en el caso del síndrome LHON, se ha observado apoptosis tanto en pacientes como en cíbridos.

Objetivos

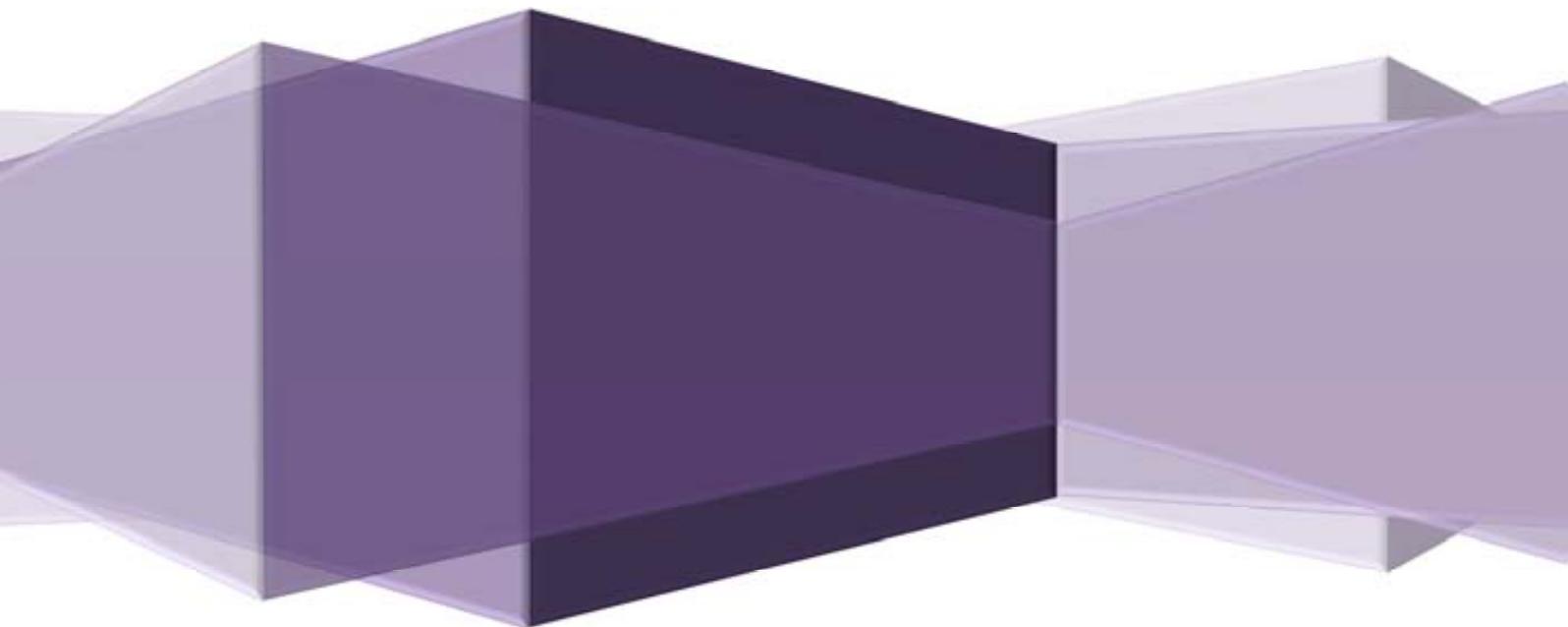


El objetivo general de esta tesis es estudiar los perfiles de expresión de ARNm en líneas celulares mitocondriales con distintas mutaciones patogénicas del ADNmt en condiciones donde la fuente de obtención de energía proviene fundamentalmente a partir del sistema OXPHOS con objeto de esclarecer los mecanismos patogénicos implicados en mutaciones del ADNmt. El estudio de la expresión en líneas de híbridos en unas condiciones de cultivo donde la utilización de sustratos dependa de la función del sistema de fosforilación oxidativa puede aportar información clave en el estudio de los mecanismos patogénicos de mutaciones en el mtDNA.

Para ellos se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de líneas de híbridos para las mutaciones m.14487T>C, m.8993T>G, m.3243A>G y m.8344A>G del ADNmt y de sus controles isogénicos o de haplogrupo.
- Obtención de las condiciones de cultivo “oxidativas” en híbridos donde la obtención de ATP dependa del sistema OXPHOS.
- Determinación del metabolismo energético, contenido de ATP, metabolitos finales de la glicolisis y potencial de membrana en los híbridos generados en condiciones glicolíticas u oxidativas.
- Estudio de los perfiles de expresión génica en estos híbridos en condiciones glicolíticas u oxidativas.
- Esclarecer la presencia o no de una respuesta transcripcional común en los híbridos portadores de diferentes mutaciones en el ADNmt.

Material y métodos



1. Cultivo celular

1.1 Generación de cíbridos transmitocondriales

Los cíbridos transmitocondriales humanos son líneas celulares que se obtienen a partir de la fusión de células carentes de ADN mitocondrial (células ρ^0) con plaquetas o cíbridos enucleados, repoblando con ADNmt exógeno a las células ρ^0 [135]. Las células ρ^0 que se utilizaron fueron líneas celulares de osteosarcoma, deficientes en timidina kinasa y que poseen resistencia a puromicina (143B TK⁻ P^R).

1.1.1 Generación de cíbridos transmitocondriales utilizando plaquetas como donadoras de ADN mitocondrial

1.1.1.1 Obtención de las plaquetas

En primer lugar se obtuvo la sangre del paciente, a continuación se transfirieron 15-20 ml de sangre en un tubo de 50 ml al cual se le añadió 10% de citrato sódico 0,1M NaCl 0,15M y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó a 200 xg durante 20 minutos a 12°C (sin freno) y se recogieron las $\frac{3}{4}$ partes del plasma (evitando coger células de la interfase). El plasma se introdujo en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1500 xg durante 20 minutos a 15°C (sin freno) posteriormente se eliminó el sobrenadante.

El pellet (plaquetas aisladas) se resuspendió en 2 ml NaCl 0,15M, Tris-HCl 15 mM pH 7,4 y seguidamente se añadieron 8 ml más de NaCl 0,15M, Tris-HCl 15 mM pH 7,4 y se mezcló. La mitad de este volumen (5ml) se centrifugó a 1500 xg 20 minutos a 15°C (sin freno) se eliminó el sobrenadante y el pellet de plaquetas se utilizó para la fusión. La otra mitad se congeló para mantener un stock de plaquetas por si fallaba la fusión.

1.1.1.2 Congelación de las plaquetas

Los 5 ml restantes de plaquetas se centrifugaron a 1500 xg 20 minutos a 15°C (sin freno) y se eliminó el sobrenadante.

Se resuspendió el pellet obtenido en una solución que contenía (NaCl 0,15M y Tris-HCl 15 mM pH 7,4, 20% FBS (suero fetal bovino) y 10% de DMSO. A continuación se congeló a -80°C y después se almacenó en nitrógeno líquido.

1.1.1.3 Preparación de las células ρ^0

En cada fusión se tripsinizaron 10^6 células ρ^0 al 80%-90% de confluencia. Se centrifugó a 1500 xg 5 minutos (con freno) y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el pellet en 2 ml de DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) con 10% de SFB de manera que se obtuvo una concentración de 5×10^5 células/ml.

1.1.1.4 Fusión de las plaquetas con las células ρ^0

Se añadió con cuidado los 2 ml de suspensión de células ρ^0 (5×10^5 células/ml) sobre el pellet de plaquetas a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 180 xg durante 10 minutos (sin freno) a temperatura ambiente.

A continuación se eliminó el sobrenadante y se añadió 0.1 ml de polietilenglicol (PEG) al 42% por las paredes del tubo. Se resuspendió el pellet hasta que prácticamente no quedasen grumos y se esperó 1 minuto, después se resuspendió 30 segundos. A continuación se añadieron 10 ml de medio ρ^0 (DMEM con 10% de SFB, 50 $\mu\text{g/ml}$ de uridina, 100 $\mu\text{g/ml}$ BrdU), primero se añadieron 0,9 ml, se resuspendió durante 10 segundos y posteriormente se añadieron los 9,1 ml restantes (siempre por las paredes del tubo de 50 ml) y se centrifugó a 180 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente (sin freno).

Se eliminó el sobrenadante para eliminar la toxicidad del PEG y se resuspendió el pellet en 10 ml de medio ρ^0 , primero 0,9 ml, se resuspendió durante 10 segundos y posteriormente se añadieron los 9,1 ml restantes (siempre por las paredes). Después se sembró toda la suspensión en 1 placa de cultivo de 100 mm de diámetro.

A los 2 días de sembrar la fusión se cambió el medio ρ^0 para eliminar los restos de plaquetas no fusionadas. Cuando la placa llegó a confluencia se tripsinizaron las células y se sembraron en 2 placas. Cuando las placas llegaron al 80-90% de confluencia, una placa se congeló y la otra se tripsinizó y se diluyó el pellet de células en 10 ml de medio de selección (DMEM con 10% de SFB dializado, 100 $\mu\text{g/ml}$ BrdU).

Cuando la generación de híbridos se realizó a partir de plaquetas se utilizó un medio de selección con 5-bromodeoxiuridina (BrdU) para que las células nucleadas que pudieran haber quedado en la fracción plaquetaria, como los glóbulos blancos y los híbridos que se hubieran podido formar con estas células y que sintetizan timidina kinasa, incorporasen BrdU dentro de su ADN y murieran.

Se contaron las células y se diluyeron a 10^6 cel/ml. De esta solución se cogieron 0,1 ml que se añadieron a un tubo de 15 ml que contenía 9,9 ml de medio de selección (primera dilución), de esta se cogieron otros 0,1 ml que se pusieron en otro tubo de 15 ml con 9.9 ml de medio de selección (segunda dilución) que contenía 100 células/ml.

A partir de esta segunda dilución se realizaron 3 diluciones más:

- se cogió 1 ml de (segunda dilución) y se añadió a un tubo de 50 ml con 9 ml de medio de selección. De esta manera se obtuvo una solución de 10 células /ml y se pusieron 0,2 ml en cada pocillo de placa de 96, cada pocillo debería tener 2 células.

- se cogió 1 ml de (segunda dilución) y se añadió a un tubo de 50 ml con 19 ml de medio de selección. De esta manera se obtuvo una solución de 5 células /ml y se pusieron 0,2 ml en cada pocillo de placa de 96, cada pocillo debería tener 1 célula.

- se cogió 1 ml de (segunda dilución) y se añadió a un tubo de 50 ml con 39 ml de medio de selección. De esta manera se obtuvo una solución de 2.5 células /ml y se pusieron 0,2 ml en cada pocillo de placa de 96, cada pocillo debería tener 0.5 células.

Esta metodología de dilución límite se utilizó para garantizar que cada clon de híbrido proviniese de una única célula, evitando la mezcla de clones. Una vez se obtuvieron las diferentes placas de 96 pocillos con las diferentes diluciones en medio de selección, a los pocillos se les hizo un seguimiento diario para determinar que clones crecían en el medio de selección y aquellos que crecieron se expandieron. Primero en placa de 24 pocillos y si seguían creciendo se pasaban a placa de 6 pocillos y si seguían creciendo finalmente a placa de 100 mm. Una vez finalizado el proceso de expansión del clon también finalizó el proceso de selección y a partir de ese momento el medio de cultivo que se utilizó para cultivar al híbrido fue el medio ρ^0 .

Mediante esta metodología se obtuvieron los cíbridos:

- control isogénico para la mutación m.3243A>G, haplogrupo T.
- cíbrido homoplásmico para la mutación m.3243A>G, haplogrupo T.
- control de haplogrupo para la mutación m.8993T>G, haplogrupo H₁. Cíbrido cedido por el grupo del Profesor Julio Montoya de la Universidad de Zaragoza.
- cíbrido homoplásmico para la mutación m.8993T>G, haplogrupo H₁. Cíbrido cedido también por el grupo del Profesor Julio Montoya.

Generación de cíbridos utilizando cíbridos enucleados como donadores de ADN mitocondrial

1.1.2.1 Método de enucleación celular

Nuestro laboratorio disponía de cíbridos con las mutaciones de interés m.8344A>G y m.14487T>C pero estos cíbridos tenían un número elevado de divisiones; hecho que podía hacer que el *background* nuclear entre los cíbridos WT y mutados fuera diferente ya que los cíbridos como líneas tumorales que son, pueden presentar reorganizaciones cromosómicas [136]. Por esta razón se decidió obtener cíbridos, a partir de cíbridos existentes y así obtener cíbridos con el mismo *background* nuclear.

Se sembraron los cíbridos a enuclear y cuando alcanzaron un 80% de confluencia se trataron durante 15 horas con actinomicina D a una dosis de 0.5 µg/ml [137]. Pasado este periodo se eliminó el medio con actinomicina D y se realizó un lavado con el mismo medio de cultivo sin actinomicina D. Posteriormente se dejaron las células con medio de cultivo sin actinomicina D durante las 2 horas previas a la fusión.

1.1.2.2 Fusión de las células enucleadas con las células ρ^0

Se tripsinizaron las células ρ^0 y las células enucleadas donadoras de mitocondrias (cíbridos m.8344A>G y su correspondiente control así como cíbridos m.14487T>C y su correspondiente control). Se centrifugaron a 530 xg 2 minutos a temperatura ambiente y a continuación se contaron las células. Se introdujeron 2×10^6 cíbridos enucleados en un tubo de 15 ml. Se centrifugaron a 530 xg 2 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se añadió por las paredes del tubo 1×10^6 de células ρ^0 .

Se centrifugó a 530 xg 2 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. A continuación se añadió por las paredes del tubo 0,5 ml de PEG al 45% y se resuspendió bien el pellet, se esperó 1 minuto y se resuspendió 30 segundos más.

Posteriormente se añadió 0,9 ml de **medio A** que contenía (DMEM con 10% de SFB, 50 µg/ml de uridina y 0,4 µg/ml de puromicina) y se resuspendió el pellet durante 10 segundos, se añadieron 9.1 ml de este medio. Se centrifugó la solución a 180 xg 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante para eliminar la toxicidad del PEG.

Se añadió 0,9 ml de **medio A** y se resuspendió el pellet durante 10 segundos, posteriormente se añadieron 9.1 ml de este medio. Finalmente se sembró la fusión en 1 placa de 100 mm de diámetro y a partir de aquí se hicieron los mismos pasos que los realizados en el caso de la fusión con plaquetas. Con la única diferencia que en este caso el medio de selección estaba formado por DMEM 10% de SFB dializado y 0,4 µg/ml de puromicina.

Los cíbridos enucleados cuya enucleación no hubiera sido efectiva murieron ya que eran sensibles a puromicina.

Mediante esta metodología se obtuvieron los cíbridos:

- control isogénico para la mutación m.8344A>G, haplogrupo J₁.
- cíbrido homoplásmico para la mutación m.8344A>G, haplogrupo J₁.
- control de haplogrupo para la mutación m.14487T>C, haplogrupo H₂.
- cíbrido homoplásmico para la mutación m.14487T>C, haplogrupo H₂.

1.2 Métodos de *screening* de los cíbridos generados

Después del periodo de selección se realizaron diferentes estudios de comprobación. Se cuantificó el número de copias de ADNmt de los cíbridos y se determinó el % de mutación del ADNmt.

1.2.1 Cuantificación del número de copias de ADNmt

Se extrajo ADN de los cíbridos utilizando el *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El contenido de ADNmt se cuantificó mediante PCR a tiempo real multiplex y se utilizó el equipo *PCR Real-Time 7500* (Applied Biosystems).

El número de copias de ADNmt se refirió al número de copias del gen RNAasa P (gen nuclear de copia única). Para cuantificar el ADNmt se utilizó una sonda *TaqMan* del ARN ribosomal 12S (MT-RNR1) (6FAM-5'TGCCAGCCACCGCG3'-MGB) marcada en su extremo 5' con el *reporter* fluorescente, 6FAM y los *primers* mtF805 (5'CCACGGGAAACAGCAGTGATT3') y mtR927 (5'CTATTGACTTGGTTAATCGTGTGA3'). Para cuantificar el ADNn se utilizó el Kit comercial *RNAseP, Control Reagents* (Applied Biosystems), y la sonda fluorescente específica del ADNn estaba marcada con el fluoróforo VIC.

Los 20 µl de la reacción de PCR contenían 10 µl de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µl de *RNAseP PDARs* y 112 nM de cada *primer* de ADNmt, 125 nM de sonda *TaqMan* para el ADNmt y de 2 a 10 ng de ADN genómico. Las condiciones de PCR fueron:

50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 seg	} 40 ciclos
60°C	1min	

La curva de calibración que se utilizó para cuantificar el número de copias de ADNmt y ADNn, se basaba en la relación lineal entre los valores de los Ct y el logaritmo del número de copias. Para generar los calibradores de esta curva se amplificó un fragmento de ADNmt de 122 pares de bases entre la posición 805 y 927 y un fragmento del ADNn de 87 pares de bases correspondiente al gen (RNAasaP), a partir de ADN de una muestra sanguínea usando los *primers* y las condiciones anteriormente descritas.

Los productos de PCR se clonaron en un vector *TOPO^R TA cloning reagent set* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La identidad del inserto clonado se confirmó por secuenciación. Una vez confirmada, se extrajo el ADN y se cuantificó por medidas de absorbancia.

El número de copias de cada calibrador se calculó a partir de la concentración de ADN y el peso molecular de cada molécula de plásmido generado. La curva de calibración se generó realizando diluciones seriadas de la solución stock.

1.2.2 Determinación del porcentaje de mutación en los híbridos mitocondriales por PCR-RFLP

1.2.2.1 Detección de la mutación m.8993T>G en el gen ATP6

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los siguientes oligonucleótidos:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
QSD L	5'-CTATAAACCTAGCCATGGCC-3'	365	56°C
QSD H	5'-AGAGGCTTACTAGAAAGTGTG-3'		

Esta mutación genera una diana de restricción para la enzima de restricción Hpa II. El patrón de bandas resultante es el de una banda de 365 pb para el ADNmt WT y de 2 bandas de 194 y 171 pb para el ADNmt 100% mutado.

1.2.2.2 Detección de la mutación m.3243A>G en el gen ARNt^{Leu (UUR)}

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los siguientes oligonucleótidos:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
3243F	5'-CCTCCCTGTACCAAAGGAC-3'	238	55°C
3243B	5'-GCGATTAGAATGGGTACAATG-3'		

Esta mutación genera una diana de restricción para la enzima de restricción Hae III. El patrón de bandas resultante es el de tres bandas de 169 pb, 37 pb y 32 pb para el ADNmt WT y de 4 bandas de 97 pb, 72 pb, 37 pb y 32 pb para el ADNmt 100% mutado.

1.2.2.3 Detección de la mutación m.8344A>G en el gen ARNt^{Lys}

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los siguientes oligonucleótidos:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
<i>Mr1L</i>	5'-GTAGTATTTAGTTGGGGCATTTC	108	55°C
<i>Mr1H*</i>	5'-CTACCCCTCTAGAGCCCAC-3'		

(*) = Oligonucleótido con mispairing en su secuencia.

Esta mutación genera una diana de restricción para la enzima de restricción Bgl I. El patrón de bandas resultante es el de una banda de 108 pb para el ADNmt WT y de 2 bandas de 73 y 35 pb para el ADNmt 100% mutado.

1.2.2.4 Detección de la mutación m.14487T>C en el gen ND6

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los siguientes oligonucleótidos:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
<i>ND6F</i>	5'-CAGCTTCCTACACTATTAAATG-3'	365	56°C
<i>ND6R</i>	5'-GTTTTTTTAATTTATTTAGCTGGA-3'		

Esta mutación genera una diana de restricción para la enzima de restricción Hpa II. El patrón de bandas resultante es el de una banda de 365 pb para la muestra portadora del ADNmt WT y de 2 bandas de 194 y 171 pb para la muestra portadora del ADNmt 100% mutado.

A continuación se detallan la mezcla de reacción y las condiciones de PCR utilizados para la amplificación de cada uno de los fragmentos.

	Volumen
10x Reaction buffer	5 ul
ds ADN molde 100 ng/ul	1 ul
dNTPs 2,5 mM	5 ul
Primer F (2 uM)	10 ul
Primer R (2 uM)	10 ul
Taq ADN polimerasa 5 U/ul	0,5 ul
Agua MilliQ	18.5 ul

94°C	3 min	} 30 ciclos
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	45 seg	
72°C	2 min	

Para el análisis de los fragmentos que se obtuvieron después de la digestión, se utilizó el *LabChip Bioanalyzer DNA 1000* (Agilent) y se procesaron mediante el *Agilent 2100 Bioanalyzer Automated Analysis System*. 1 µl de la digestión se cargó en el chip y mediante electroforesis capilar se distribuyó por peso molecular, a lo largo de un polímero que contiene un fluoróforo. El programa generó un informe en el que se pudo ver una representación gráfica del electroferograma por tamaño molecular de la muestra así como su concentración.

1.2.3 Secuenciación del ADNmt mediante chips de resecuenciación (*MitoChip v2.0*)

Para confirmar que el ADNmt de los híbridos generados no presentaba otros cambios en el ADNmt. Se realizó la resecuenciación del ADNmt mediante chips de resecuenciación (*MitoChip v2.0*).

Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1.2.3.1 Amplificación de ADN por PCR larga

El ADNmt de estudio se amplificó en 3 fragmentos:

POSICIÓN	PRIMER FORWARD	SECUENCIA
16331-16365	Mito I	5'-ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCC-3'
3646-3680	Mito II	5'-TACTCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTC-3'
8753-8787	Mito III	5'-TCATTTTATTGCCACAACCTCCTCGGACTC-3'

POSICIÓN	PRIMER REVERSE	SECUENCIA
3700-3729	Mito I	5'-TGAGATTGTTTGGGCTACTGCTCGCAGTGC-3'
9124-9158	Mito II	5'-GCTTGGATTAAGGCGACAGCGATTTCTAGGATAGT-3'
16532-16566	Mito III	5'-CGTGATGTCTTATTTAAGGGGAACGTGTGGGCTAT-3'

Los tamaños de los fragmentos generados fueron:

FRAGMENTO	TAMAÑO
Mito I	3968 pb
Mito II	5513 pb
Mito III	7814 pb

Los reactivos para preparar la reacción de amplificación por PCR larga fueron los siguientes; el volumen final de la reacción fue de 50 μ l.

	Volumen
Tampón LA-Taq 10x	5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	5 μ l
dNTPs 2,5 mM	8 μ l
Primer F (2 μ M)	5 μ l
Primer R (2 μ M)	5 μ l
Taq LA	0.5 μ l
Agua MilliQ	20.5 μ l
ADN (100 ng/ μ l)	1 μ l

En cada *array* se procesó también un fragmento que se utiliza como control de la hibridación (IQ); este control IQ se amplificó por PCR larga utilizando:

	Volumen
Tampón LA-Taq 10x	20 ul
MgCl ₂ 25 mM	20 ul
dNTPs 2,5 mM	32 ul
Primer F 7,5 Kb (20 uM)	6 ul
Primer R (20 uM)	6 ul
Taq LA	2 ul
Agua MilliQ	104 ul
IQ Control template (9,2 pg/ul)	10 ul

Las condiciones en las que se realizaron las reacciones de PCR fueron:

94°C	1 min	} 30 ciclos
98°C	10 seg	
68°C	11 min	
72°C	10 min	

1.2.3.2 Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar el tamaño de los fragmentos amplificados se realizó electroforesis. Se preparó un gel al 0.8% de agarosa con Tris-borato EDTA (TBE 1x) y 2,5 µl de bromuro de etidio. Se cargó 2 µl de muestra con 1 µl de tampón de carga y el marcador *lambda Hind III*. La electroforesis se realizó en tampón TBE 1x, aplicando un voltaje de 70 V durante tres horas. Pasado el tiempo se visualizó el gel en una cámara de fluorescencia *Universal Hood II* (Bio-Rad).

1.2.3.3 Cuantificación de los productos de PCR mediante *PicoGreen*

La cuantificación del producto de PCR larga se realizó utilizando el kit *Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay* (Invitrogen).

Para preparar la curva estándar se utilizó el *ADN lambda del kit*. Se preparó la siguiente curva.

Tabla 1. Curva estándar para la cuantificación de los productos de PCR larga

CONCENTRACIÓN	VOLUMEN NECESARIO DE LA DILUCIÓN DE ADN	VOLUMEN NECESARIO DE TE 1X
50 ng/ul	10 ul (ADN 100 ng/ul)	10 ul
40 ng/ul	16 ul (ADN 100 ng/ul)	24 ul
30 ng/ul	6 ul (ADN 100 ng/ul)	14 ul
20 ng/ul	10 ul (ADN 40 ng/ul)	10 ul
10 ng/ul	10 ul (ADN 40 ng/ul)	30 ul
5 ng/ul	10 ul (ADN 10 ng/ul)	10 ul
0 ng/ul	0 ul	10 ul

La reacción se realizó en una placa de 96 pocillos. En cada pocillo se añadió 190 μ l de *Pico Green*, 5 μ l de muestra o ADN estándar y 5 μ l de TE 1x. Se determinaron las muestras por triplicado en un fluorímetro *FLx800*, las lecturas se realizaron con una longitud de onda de excitación de 528 nm y una longitud de onda de emisión de 485 nm.

Los fragmentos de ADNmt amplificados junto con el IQ se llevaron al Servicio científico técnico del Instituto de Recerca Vall d'Hebron, donde se realizaron los siguientes pasos:

- mezcla equimolar de los fragmentos Mito I, Mito II, Mito III y IQ.
- purificación y cuantificación.
- fragmentación enzimática (con el kit *Gene Chip Resequencing Assay Kit*, (Affymetrix).
- marcaje terminal utilizando una transferasa terminal y el fluoróforo Bio-N6-ddATP.
- hibridación del *MitoChip*.
- lectura en *ScannerGCS 3000*.

1.2.3.4 Análisis de datos

Los datos obtenidos una vez escaneado el chip se analizaron mediante el software *GSEQ* (Affymetrix).

Los parámetros del algoritmo utilizados fueron los siguientes:

Tabla 2. Parámetros del algoritmo utilizados

NOMBRE	VALOR	DESCRIPCIÓN
<i>AberrantSNR2</i>	100	<i>Max Signal-To-Noise-Ratio</i>
<i>No Signal</i>	2	<i>No Signal Fold Threshold (mean/probe ratio)</i>
<i>Model Type</i>	1	<i>GenomeModel (0=diploid, 1=haploid)</i>
<i>Quality Score</i>	3	<i>Quality Score Threshold</i>
<i>Sample Reliability</i>	0,5	<i>Base Reliability Threshold across Sample</i>
<i>SeqProfile Threshold</i>	-0,175	<i>Sequance Profile Threshold</i>
<i>Trace Threshold</i>	1	<i>TraceThreshold</i>
<i>Weak Signal</i>	40	<i>Weak Signal Fold Threshold (mean/probe ratio)</i>

El *software* GSEQ proporcionó los resultados en archivos en formato *FASTA*, con los que se realizó un *BLAST* frente la secuencia de referencia del ADNmt (NC_012920).

2. Técnicas generales

2.1 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN total a partir de células en cultivo se utilizó el *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó mediante el *RNeasy Mini kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el uso de columnas de afinidad que evitan la manipulación de sustancias tóxicas, como el fenol y el cloroformo.

2.3 Tratamiento con DNAsa

La digestión del ADN contaminante en las muestras de ARN, se realizó mediante el *RNase-Free DNase Set* (Qiagen), durante el proceso de extracción del ARN mediante el *RNeasy Mini kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4 Retrotranscripción

El paso de ARN a cDNA se realizó mediante el *High Capacity cDNA Archive kit* (*Applied Biosystems*).

En cada reacción se pueden procesar un máximo de 10 µg de ARN en un volumen final de 25 µl. En nuestro caso se procesaron 2 µg de ARN.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

	Volumen
10x RT buffer	5 ul
dNTPs 100 mM	2 ul
10x random primers	5 ul
MultiScribe RT 50U/ul	2,5 ul
Agua	Hasta 25 ul

Cada muestra de ARN se llevó a un volumen de 25 µl y se le añadió a cada una 25 µl de la mezcla de reacción (volumen final de reacción 50 µl). La retrotranscripción se llevó a cabo en 3 pasos: 25°C 10 minutos, 37°C 2 horas y 85°C 5 segundos. Después de estos tres pasos, la muestra se guardó en varias alícuotas a – 20°C.

2.5 Determinación espectrofotométrica del ADN

La cuantificación de la concentración de ADN se realizó mediante *NanoDrop-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies), se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. El ADN a una concentración de 50 µg/ml, presenta una absorbancia de 1 a esta longitud de onda. Las concentraciones se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ng DNA}/\mu\text{l} = \text{Abs } 260 \text{ nm} \times 50.$$

Para determinar la pureza de la muestra, se utilizó el cociente Abs 260/Abs 280. Se aceptaron niveles de pureza entre 1,7 y 2.

2.6 Determinación del ARN mediante electroforesis capilar en *nanochip*

En las muestras de ARN para determinar la concentración y la calidad de la muestra, se utilizó el *ARN 6000 nanochips* (Agilent) y se procesaron mediante el *Agilent 2100 Bioanalyzer Automated Analysis System*.

1 μ l de la muestra se cargó en el chip y mediante electroforesis capilar se distribuyó por peso molecular, a lo largo de un polímero que contiene un fluoróforo. El programa generó un informe en el que se pudo ver una representación gráfica del electroferograma por tamaño molecular de la muestra, la concentración, el cociente entre los ARN ribosómicos 18s y 28s, y un índice de la integridad de la muestra.

2.7 Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la amplificación del fragmento deseado, los productos de la PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa horizontales. Los geles tenían un porcentaje de agarosa de entre un 0,8% y un 1,5% en TBE, dependiendo del fragmento que se quisiera resolver.

En todos los geles, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 5 μ g/ml. La electroforesis se efectuó a 100 V durante el tiempo necesario para la correcta separación de las bandas.

2.8 Purificación de fragmentos de PCR

Los fragmentos de PCR se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular con el *OLAquick PCR Purification kit (Qiagen)*, siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.9 Secuenciación

La secuenciación se utilizó para confirmar, que los cíbridos creados presentaban el ADNmt de interés y en la proporción deseada. Las condiciones que se especifican a continuación fueron comunes para todos los fragmentos.

En la reacción de secuencia se preparó una mezcla que contenía los siguientes reactivos:

	VOLUMEN
<i>Big Dye terminator kit v. 1.0</i>	2 ul
Cebador 2 uM	2 ul
ADN 100 ng/ul	1 ul
Agua	Hasta 10 ul

Las condiciones de la reacción de secuencia fueron:

96°C	10 seg	} 25 ciclos
50°C	5 seg	
60°C	4 min	

Los productos de la reacción de secuencia se purificaron por centrifugación con columnas *Autoseq G-50* (Amersham Biosciences), siguiendo las especificaciones del fabricante.

A continuación figuran los cebadores que se utilizaron para secuenciar los diferentes fragmentos.

- mutación m.8993T>G en el gen ATP6

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen ATP6 fueron:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
13 F	5'-TTTCCCCTCTATTGATCCC-3'	816	55°C
13 R	5'-GTGGCCTTGGTATGTGCTTT-3'		

- mutación m.3243A>G en el gen ARNt^{Leu (UUR)}

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen ARNt^{Leu (UUR)} fueron:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
3243F	5'-CCTCCCTGTACCAAAGGAC-3'	238	55°C
3243R	5'-GCGATTAGAATGGGTACAATG-3'		

- mutación m.8344A>G en el gen ARNt^{Lys}

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen ARNt^{Lys} fueron:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
7361F 8490R	5'-AGAACCCTCCATAAACCTGG-3' 5'-ATGGGCTTTGGTGAGGGAGG-3'	1129	55°C

- mutación m.14487T>C en el gen ND6.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen ND6 fueron:

NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)	Tm
21F 21R	5'-GCATAATTAACCTTTACTTC-3' 5'-AGAATATTGAGGCGCCATTG-3'	938	55°C

A continuación se detallan la mezcla de reacción y las condiciones de PCR utilizados para la amplificación de cada uno de los fragmentos.

	Volumen
10x Reaction buffer	5 ul
ds ADN molde 100 ng/ul	1 ul
dNTPs 2,5 mM	5 ul
Primer F (2 uM)	10 ul
Primer R (2 uM)	10 ul
Taq ADN polimerasa 5 U/ul	0,5 ul
Agua MilliQ	18.5 ul

94°C	3 min	} 30 ciclos
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	45 seg	
72°C	2 min	

3. Selección del medio oxidativo

El medio de cultivo que se utiliza en este modelo celular (cíbridos de células 143B) es DMEM con una elevada concentración de glucosa (medio GL) que permite el crecimiento celular incluso en células carentes de ADNmt (células ρ^0), en estas condiciones el ATP se obtiene por la vía glicolítica [112]. Para estudiar la posible patogenicidad de una mutación en el ADNmt se utiliza un medio de cultivo que fuerza la utilización del sistema OXPHOS para la obtención de ATP: DMEM 1 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 $\mu\text{g/ml}$ uridina, 2 mM glutamina y 10% SFB dializado [112].

Sin embargo, en algunas mutaciones del ADNmt (p.e. mutaciones en ARNt) las células dejan de ser viables a las pocas horas de estar cultivadas en este medio, lo que impide estudiar el defecto en el sistema OXPHOS en células viables.

Por esta razón uno de los objetivos de esta tesis era establecer unas nuevas condiciones de cultivo que permitieran manifestar el déficit del sistema OXPHOS pero que a la vez las células fueran viables. Las nuevas condiciones de cultivo debían contener glucosa a muy baja concentración para prevenir la obtención de grandes cantidades de ATP vía glicolítica y de ese modo forzar la utilización de la fosforilación oxidativa, pero al mismo tiempo el medio suministrará el ATP necesario para su viabilidad. Por ese motivo se utilizaron 2 combinaciones de glucosa y galactosa:

- DMEM 0,25 g glucosa/L-0,75 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 $\mu\text{g/ml}$ uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado (medio OX).
- DMEM 0,5 g glucosa/L-0,5 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 $\mu\text{g/ml}$ uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado (medio OX 0.5).
- Además se utilizó un medio glucolítico (medio GL) DMEM 4,5 g glucosa suplementado con 1 mM de piruvato, 50 $\mu\text{g/ml}$ uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado.

Para obtener el medio oxidativo óptimo se cultivaron células ρ^0 en estos tres medios siguiendo el diseño experimental descrito en el apartado 4 de material y métodos pero en este caso se cultivaron durante cinco días y en lugar de 2 medios de cultivo se utilizaron 3 (GL, OX y OX 0.5). Se estudió el crecimiento celular los cinco días que duró el estudio.

4. Condiciones experimentales del estudio con cíbridos

Los estudios con cíbridos transmitocondriales se realizaron siguiendo el siguiente diseño experimental.

Inicialmente se sembraron 10 placas de 100 mm con 4×10^5 células en cada placa, en 15 ml de medio glicolítico (GL) (DMEM 4,5 g glucosa/L suplementado con 1 mM de piruvato, 50 $\mu\text{g/ml}$ uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado) para cada línea de cíbrido.

Al día siguiente (día 0), el medio de cultivo fue remplazado y a 5 de las placas se les añadió 15 ml de medio (GL) y a las otras 5 se les añadió 15 ml de medio oxidativo (OX) (DMEM 0,25 g glucosa/L-0,75 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 $\mu\text{g/ml}$ uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado).

En estas condiciones de cultivo los cíbridos se mantuvieron durante 3 días, remplazándoles diariamente el medio. En cada estudio se analizaron simultáneamente 2 clones independientes WT junto con 2 clones independientes 100% mutados para cada tipo de mutación estudiada.

Transcurridos los 3 días (día 3) se analizaron los siguientes parámetros:

- crecimiento celular.
- concentración de ATP, ADP, AMP y adenosina.
- potencial de membrana mitocondrial.
- concentración de lactato y succinato.

5. Caracterización de las líneas de cíbridos, evaluación del medio OX

5.1 Crecimiento celular

Se determinó el crecimiento celular el día 0 y el día 3. Al día siguiente de sembrar las 4×10^5 células en cada una de las 10 placas de 100 mm (día 0) se procedió a la tripsinización de 2 placas de 100 mm. Primero se lavó la monocapa de células con PBS a 37°C. Se retiró el PBS de la placa, se añadió 2 ml de tripsina a las células y se incubaron 2 minutos a 37°C dentro del incubador de cultivos. A continuación se neutralizó la tripsina con 5 ml de medio de cultivo y se traspasaron las células desenganchadas a un tubo de 15 ml que se centrifugó a 1500 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio.

Después se cogieron 10 μ l de la suspensión de células y 10 μ l de azul de tripano (Invitrogen) y se añadieron en un *ependorf*. Finalmente se utilizaron 10 μ l de la solución anterior para determinar el número de células mediante *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen).

Pero además de realizarse la determinación del número de células el día 0 del estudio también se realizó el último día del estudio (día 3) para poder calcular el crecimiento celular relativo de cada línea de cíbrido en cada condición de cultivo (GL o OX).

5.2 Determinación de ATP, ADP, AMP y adenosina en las diferentes líneas de cíbridos

5.2.1 Preparación de las muestras

El día 3 del estudio se determinó la concentración de ATP, ADP AMP y adenosina, para ello se utilizaron 10 placas de 100 mm, 5 con medio (GL) y 5 con medio (OX) para cada tipo de línea celular. El día 3 se llevaron estas placas a una cámara a 4°C donde se eliminó el medio y se realizaron 2 lavados con PBS frío. Se añadieron 450 μ l de PBS frío a cada placa, se rascaron las células, y se pasaron a través de una jeringa de 1 ml con una aguja de 21 G para lisarlas. A continuación, los lisados celulares se centrifugaron a 13000 xg durante 1 minuto a 4°C, 50 μ l del sobrenadante se utilizaron para determinar la concentración proteica y el resto se ultrafiltró utilizando (Amicon ultra -0,5 ml 3K Ultracel[®]- 3K membrane) a 12000 xg durante 30 minutos a 4°C. El ultrafiltrado se almacena a -80°C hasta el día de análisis de los metabolitos.

5.2.2 Preparación de la recta patrón

La recta patrón para determinar la concentración ATP, ADP, AMP y adenosina en los cíbridos se muestra en la tabla 3.

Se preparó una primera dilución con una concentración final de ATP de 50 μ M, 20 μ M de ADP y 4 μ M de AMP y Adenosina. A partir de esta dilución inicial se obtuvieron los siguientes puntos de la recta patrón.

Tabla 3. Recta patrón para determinar la concentración de ATP, ADP, AMP y adenosina

Solución estándar	ATP	ADP	AMP	Adenosina
A	37,5 uM	15 uM	3 uM	3 uM
B	25 uM	10 uM	2 uM	2 uM
C	12,5 uM	5 uM	1 uM	1 uM
D	6,25 uM	2,5 uM	0,5 uM	0,5 uM
E	3,125 uM	1,25 uM	0,25 uM	0,25 uM

5.2.3 Separación cromatográfica por UPLC

Se utilizó el sistema cromatográfico *ACQUITY™*. El detector utilizado fue un detector UV (*TUV Detector*) y la columna que se utilizó fue una *ACQUITY UPLC® BEH Amide*, 2.1 x 100 mm, 17 µm (*Waters*). El análisis se realizó a un flujo constante de 0,5 ml/min, usando tampón fosfato 10 mM a un pH de 4,5 (solvente B) y acetonitrilo (solvente A). El gradiente que se utilizó fue:

Tabla 4. Gradiente utilizado para determinar la concentración de ATP, ADP, AMP y adenosina

Tiempo (min)	A%	B%
0	74	26
3.30	74	26
4.80	58	42
5	74	26
6	74	26

La temperatura de la columna fue de 25°C y la de la muestra de 6°C.

La lectura se realizó a 260 nm. Los cromatogramas que se obtuvieron se integraron utilizando el *software Empower*.

Se calculó la carga energética de adenilato con la siguiente fórmula: $(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$, indicador que coordina muchas reacciones metabólicas siendo un factor muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular [138]. Si el valor de este parámetro es inferior a 0.6 hay degradación de nucleótidos de adenina, comprometiendo la homeostasis celular [138].

5.3 Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se midió con el fluoróforo yoduro de 5,59,6,69-tetrachloro-1,19,3,39-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Invitrogen). JC-1 es un colorante catiónico que atraviesa la membrana interna mitocondrial a favor de gradiente electroquímico, acumulándose en la matriz mitocondrial.

Al aumentar la concentración, la emisión pasa del verde (≈ 525 nm) al rojo (≈ 590 nm), siendo la relación fluorescencia roja/fluorescencia verde proporcional al potencial de membrana mitocondrial [139].

El día 3 se procedió a la determinación del potencial de membrana, para ello se tripsinizaron las células y se contaron siguiendo la metodología del apartado 5.1. Para cada muestra se necesitaron 1,5 millones de células.

De las cuales:

- 0.5 millones de células no se trataron para determinar la fluorescencia propia de las células.
- 0.5 millones de células se trataron con CCCP (molécula desacoplante) y con JC-1. Para verificar que la fluorescencia roja observada era debida al potencial de membrana mitocondrial.
- 0.5 millones de células que se trataron con JC-1.

Una vez se pusieron $0,5 \times 10^6$ células en cada uno de los *ependorfs* se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml del medio en el que se quería medir el potencial, ya fuera medio (GL) o medio (OX). A continuación se añadieron 3 μ l de CCCP (50 mM) sólo a las muestras que debían tratarse con CCCP y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Pasados los 5 minutos se añadieron 20 μ l de JC-1 (200 μ M) tanto a los tubos que habían sido tratados previamente con CCCP como a los que solamente se trataron con JC-1.

Se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Los tubos que no se trataron ni con CCCP ni con JC-1 también se incubaron y cada 5 minutos se agitaron para evitar la precipitación de las células. Pasados los 30 minutos se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de PBS. Se volvió a centrifugar a 200 xg durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Finalmente se resuspendió el pellet con 500 µl de PBS y se transfirió a un tubo de citometría para determinar el potencial de membrana.

La determinación de la fluorescencia de las muestras se realizó con una longitud de onda de excitación de 527 nm y con una longitud de onda de emisión de 590 nm utilizando el citómetro *FAC SCalibur*. Se utilizó el software *Cell Quest* (Becton Dickinson) y se analizaron 10000 células por muestra. El potencial de membrana mitocondrial se valoró mediante el porcentaje de la relación entre la fluorescencia roja y verde de cada muestra dividido por la relación entre la fluorescencia roja y verde obtenida de los híbridos WT cultivados en medio (GL).

5.4 Determinación de lactato y succinato

5.4.1 Preparación de las muestras

Se utilizó el mismo método que en la determinación de ATP, ADP, AMP y adenosina. Los lisados celulares se centrifugaron a 13000 g durante 1 minuto a 4°C. 50 µl de sobrenadante fueron utilizados para determinar la concentración proteica y el resto se ultrafiltró utilizando (Amicon ultra -0,5 ml 3K Ultracel®- 3K membrane) centrifugando a 12000 xg durante 30 minutos a 4°C. El ultrafiltrado se almacenó a -80°C hasta su uso.

5.4.2 Preparación de la recta patrón

La recta patrón para determinar la concentración del lactato y succinato en los híbridos se muestra en la tabla 5. Todas las alícuotas tanto las de la recta patrón como las de las muestras se diluyeron al 1/5 con acetonitrilo.

Se preparó una primera dilución utilizando 680 μl de medio de cultivo DMEM y se llevó a un volumen final de 1000 μl con una concentración de lactato y succinato de 832 μM y 40 μM respectivamente. A partir de esta dilución inicial se obtuvieron los siguientes puntos de la recta patrón.

Tabla 5. Recta patrón para determinar la concentración de lactato y succinato

Solución estándar	Lactato	Succinato
A	499,55 μM	25,40 μM
B	166,51 μM	8,46 μM
C	83,25 μM	4,23 μM
D	16,65 μM	0,84 μM
E	5,55 μM	0,27 μM

5.4.3 Separación cromatográfica por UPLC

Se utilizó un sistema cromatográfico *UPLC MS/MS system* compuesto por *ACQUITY Ultra Performance LC (Waters) system* y *MS/MS XEVO TQ (Waters) Mass*. La columna que se utilizó fue una *ACQUITY UPLC[®] BEH Amide, 2.1 x 100 mm, 17 μm (Waters)*.

El análisis se realizó a un flujo constante de 0,6 ml/min, usando acetato de amonio 10 mM a un pH de 4,3 (solvente B) y acetonitrilo (solvente A). El gradiente que se utilizó fue:

Tabla 6. Gradiente utilizado para determinar la concentración de lactato y succinato

Tiempo (min)	A%	B%
0	85	15
0.6	85	15
2	30	70
2.10	85	15
4	85	15

La temperatura de la fuente fue de 150°C, gas de colisión 0,15 L/h, temperatura de solvatación del gas de 150°C y un flujo de solvatación del gas de 800 L/h.

El voltaje del capilar fue de 1,02 KV con un modo de ionización negativo, con un voltaje de cono de $-33,72$ V. Los picos que se obtuvieron se integraron utilizando el *software Masslynx*. 4.1. Para el lactato se cogieron las transiciones MRM 88,60 y 42,40 m/z y para el succinato 116,60 y 72,60 m/z .

6. Estudios de expresión

El objetivo principal de los estudios de expresión fue el de determinar genes diferencialmente expresados como consecuencia de la presencia de diferentes mutaciones en el ADNmt en diferentes condiciones de cultivo. Para los estudios de expresión se utilizaron técnicas de PCR a tiempo real y microarrays de ARN.

6.1 Tarjetas microfluídicas

Las tarjetas microfluídicas son sistemas que permiten cuantificar la expresión de varios genes, de manera simultánea y a partir de una pequeña cantidad de muestra (Figura 3). Los estudios de expresión en las tarjetas, se basan en PCR a tiempo real (RT-PCR) utilizando tecnología *TaqMan*.

Para nuestros estudios se eligió el formato de 8 carriles por tarjeta y 48 pocillos por carril.

En cada carril de la tarjeta microfluídica se cargó la siguiente mezcla de reacción:

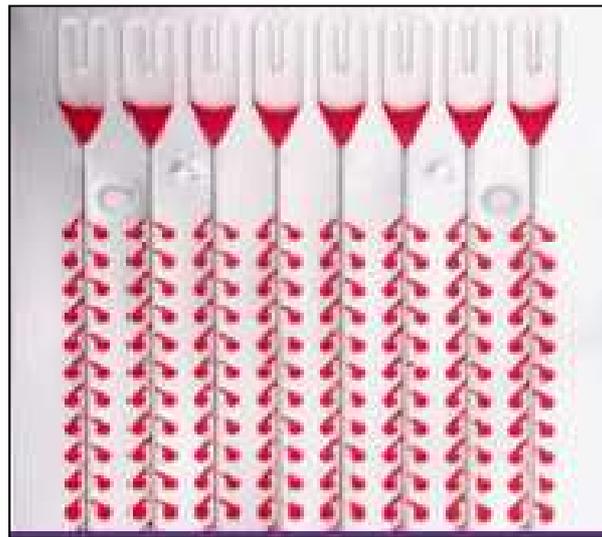


Figura 3. Imagen de una tarjeta microfluídica. Se pueden observar los 8 carriles que configuran cada tarjeta y en cada carril, se encuentran los 48 pocillos en los cuales podemos encontrar la sonda y los *primers* para el estudio de un gen concreto.

	Volumen
2x <i>Taqman Universal PCR Master Mix</i> (Applied Biosystems)	52,5 ul
cDNA (100 ng ARN)	25 ul
Agua	Hasta 105 ul

Una vez cargados todos los pocillos de la tarjeta, se centrifugó en posición vertical 1 minuto a 2000 xg en una *Microfuge Heraeus* (Sorvall), transcurrido este tiempo se volvió a centrifugar de nuevo, 1 minuto a 2000 xg.

Tras la centrifugación se utilizó un sellador especial de tarjetas microfluídicas (Applied Biosystems) y se eliminó el fragmento de la tarjeta que contenía los pocillos. Se realizó la RT-PCR en un *7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems), con el *software SDS 2.3* (Applied Biosystems), utilizando las siguientes condiciones:

50°C	2 min	
94,5°C	10 min	
97°C	30 seg	} 40 ciclos
59,7°C	1min	

Para procesar los datos se utilizó el *software RQ 1.2* (Applied Biosystems).

Se estudiaron 48 genes implicados en diferentes procesos (Tabla 7): metabolismo glucolítico, metabolismo lipídico, transportadores mitocondriales, activadores transcripcionales, replicación del ADNmt, transcripción del ADNmt, subunidades OXPHOS codificadas por el ADNn y ADNmt, factores de ensamblaje, proteínas desacoplantes, apoptosis, entre otros.

En la tarjeta también se incluyeron 4 genes de expresión constitutiva: que se utilizaron para normalizar los resultados: ciclofilina A (*PPIA*), ARNr 18S (*18S*), proteína ribosomal larga (*RPLPO*) y proteína de unión a la caja TATA (*TBP*) (Tabla 7). En cada tarjeta se estudiaron 4 muestras por duplicado.

Tabla 7. Genes seleccionados para su estudio utilizando tarjetas microfluídicas

GENES ESTUDIADOS	REFERENCIA DEL ENSAYO
Aconitasa 2; <i>ACO2</i>	Hs00426616_m1
ATP sintasa beta subunidad nuclear del complejo V; <i>ATP5B</i>	Hs00266077_m1
Acil-coA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media; <i>ACADM</i>	Hs00163494_m1
<i>BAX</i>	Hs00180269_m1
<i>BCL2</i>	Hs00608023_m1
Proteína quinasa IV dependiente de calcio/calmodulina; <i>CAMKIV</i>	Hs00174318_m1
Citocromo oxidasa subunidad 4 codificada ADN nuclear; <i>COX4I1</i>	Hs00266371_m1
Carnitina Palmitoiltransferasa I isoforma muscular subunidad alfa; <i>CPT1B</i>	Hs00189258_m1
ATPasa 6 codificada por el ADN mitocondrial; <i>MT-ATP6</i>	Hs02596862_g1
Citrato Sintasa; <i>CS</i>	Hs00830726_m1
Citc1 codificada por el ADN nuclear; <i>CYC1</i>	Hs00357717_m1
Factor respiratorio nuclear 2; <i>NRF2</i>	Hs00745591_m1
Glutation Peroxidasa 1; <i>GPX1</i>	Hs00829989_m1
Hexokinasa isoenzima 2; <i>HK2</i>	Hs00606086_m1
Lactato deshidrogenasa subunidad muscular; <i>LDHA</i>	Hs00855332_g1
Mitofusina 2; <i>MFN2</i>	Hs00208382_m1
Citocromo b codificado por el ADN mitocondrial; <i>MT-CYB</i>	Hs02596867_s1
NADH deshidrogenasa 6 codificada por el ADN mitocondrial; <i>MT-ND6</i>	Hs01588974_g1
Citocromo oxidasa I codificada por el ADN mitocondrial; <i>MT-CO1</i>	Hs02596864_g1
NDUFS2 codificada por el ADN nuclear; <i>NDUFS2</i>	Hs00190020_m1
Nucleotidasa mitocondrial dNT2; <i>NT5M</i>	Hs00220234_m1
Piruvato dehidrogenase E1 isozima subunidad alfa; <i>PDHA1</i>	Hs00264851_m1
Subunidad Catalítica de la Polimerasa gamma; <i>POLG</i>	Hs00160298_m1
Glicogeno fosforilasa isoforma muscular; <i>PYGM</i>	Hs00194493_m1
SCO1 proteína de ensamblaje del complejo IV; <i>SCO1</i>	Hs00190189_m1
SDHC subunidad del complejo II; <i>SDHC</i>	Hs00818427_m1
Sirt3 histona deacetilasa mitocondrial; <i>SIRT3</i>	Hs00202030_m1
DNC transportador mitocondrial; <i>SLC25A19</i>	Hs00222265_m1
ANT1; <i>SLC25A4</i>	Hs00154037_m1
ANT2; <i>SLC25A5</i>	Hs00854499_g1
Ent1; <i>SLC29A1</i>	Hs00191940_m1
Superóxido dismutasa 1; <i>SOD1</i>	Hs00533490_m1
Factor respiratorio nuclear 1; <i>NRF1</i>	Hs00602161_m1
Superóxido dismutasa 2; <i>SOD2</i>	Hs00167309_m1
SURF1 proteína de ensamblaje del complejo IV; <i>SURF1</i>	Hs00162467_m1
Coactivador 1α del receptor y activado del proliferador de peroxisomas; <i>PPARGC1A</i>	Hs00173304_m1
Factor de transcripción A mitocondrial; <i>TFAM</i>	Hs00273372_s1
Factor de transcripción B1 mitocondrial; <i>TFB1M</i>	Hs00274971_m1
Factor de transcripción B2 mitocondrial; <i>TFB2M</i>	Hs00254651_m1
Proteína desacoplante UCP2; <i>UCP2</i>	Hs00163349_m1
Proteína de unión al ubiquinol citocromo c reductasa; <i>UQCRB</i>	Hs00559884_m1
Proteína del core de la ubiquinol citocromo c reductasa; <i>UQCRC1</i>	Hs00163415_m1
Controles Endógenos	
18s rRNA eucariótico; <i>18S</i>	Hs99999901_s1
Proteína mayor del ribosoma; <i>RPLPO</i>	4333761T
Ciclofilina A; <i>PPIA</i>	Hs99999904_m1
Proteína de unión a la caja TATA; <i>TBP</i>	4333770F

6.2 PCR a tiempo real (RT- PCR) con sondas *TaqMan*

Además de los estudios de expresión realizados utilizando tarjetas microfluídicas, también se determinó la expresión de cuatro genes con ensayos individuales diseñados por (Applied Biosystems) y comercialmente disponibles (referencia* indicada en la tabla), que consisten en una mezcla de cebadores y sonda para un gen determinado:

Tabla 8. Sondas *TaqMan* utilizadas en RT-PCR

Gen	Referencia*
PGC1A	Hs00173304_m1
PGC1B	Hs00370186_m1
TFB1M	Hs00274971_m1
BCL-2	Hs00608023_m1

Para la realización de la RT-PCR se utilizaron placas de 384 pocillos y cada muestra se determinó por triplicado. Los reactivos para la mezcla de reacción y las condiciones de RT-PCR fueron:

	Volumen
2x <i>Taqman Universal PCR Master Mix</i> (Applied Biosystems)	5 ul
Cebadores y sonda específicos (ver referencia*)	0,5 ul
cDNA (10 ng ARN)	2,5 ul
Agua	Hasta 10 ul

50°C	2 min	} 40 ciclos
95°C	10 seg	
95°C	15 seg	
60°C	1min	

La RT-PCR se realizó en un *7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) y los datos se analizaron mediante el programa *SDS 2.3* (Applied Biosystems).

Además de realizar estudios de expresión sobre genes concretos mediante sondas *TaqMan*, también se realizó un estudio de expresión global utilizando microarrays de ARN.

6.3 **Microarrays de ARN**

Para el estudio con microarrays de ARN se utilizó el *array Human Exon 1.0 ST Array* (Affymetrix Gene Chip array). El experimento se realizó en el servicio de genómica de la UCTS del IR-HUVH y el análisis estadístico en el servicio de bioinformática de la UCTS del IR-HUVH.

- Procedimiento.

Para la determinación de la concentración y la calidad de las muestras de ARN, se utilizó el *ARN 6000 nanochips* (Agilent) y se procesaron utilizando el *Agilent 2100 Bioanalyzer Automated Analysis System*. Sólo se procesaron aquellas muestras con una elevada calidad (RIN mayores de 8). A continuación se sintetizó el cDNA de doble cadena a partir de los extractos de ARN total, utilizando el *One Cycle cDNA Synthesis kit* (Affymetrix). Después se sintetizó el ARNc antisentido marcado con biotina utilizando el mismo kit y partiendo de 5 µg de ARN total y del *oligo dT primer* siguiente: 5'GGCCAGTGAATTGTA ATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT) 24. Se purificaron los ARNcs utilizando las columnas del *kit Gene Chip Sample Clean up Module* (Affymetrix).

Se fragmentó 20 µg de ARNc a 94°C durante 30 minutos en 40 µl de Tampón A (ver anexo) y se añadieron las muestras fragmentadas al cóctel de hibridación (ver anexo). Se equilibró el *array* de sondas a temperatura ambiente y se prehibridó con tampón de hibridación 1x (ver anexo) a 45°C durante 10 minutos con rotación. Después se hibridó con 200 µl de la mezcla el *Human Exon 1.0 ST Array* (Affymetrix Gene Chip array) a 45°C durante 16 horas con rotación.

Se lavaron los *Gene Chips* y se marcaron con estreptavidina ficoeritrina según el protocolo de *EukGE-WS2-v5* proporcionado por (Affymetrix). Finalmente se escanearon los *Gene Chip* en un *Agilent G3000 Gene Array Scanner*.

6.3.1 Análisis estadístico de los *microarrays*

- Pre-procesamiento.

Los valores de expresión que se obtuvieron de los archivos .CEL fueron procesados utilizando el método RMA [140] que consta de tres niveles de procesamiento:

- Fase 1: corrección de fondo.
- Fase 2: normalización.
- Fase 3: sumarización a nivel de exones.

Los valores de expresión de los exones correspondientes a cada uno de los genes fueron promediados para conseguir un único valor para cada gen. Se utilizaron límites conservadores para reducir posibles falsos negativos.

- Selección de los genes diferencialmente expresados.

La selección de los genes se basó en un modelo de análisis lineal con moderación empírica de Bayes de la variancia estimada. De hecho, este es un método similar a un “t-test” con una mejor estimación de la variancia [141].

Aquellos genes con un p-valor inferior a 0.01 se consideraron como diferencialmente expresados.

La representación de los perfiles diferenciales se realizó mediante los diagramas *Heatmap*, que son diagramas rectangulares donde se representa la expresión de cada gen seleccionado (filas) a cada muestra (columnas) utilizando una escala de color que va de valores bajos a valores altos de expresión.

Los genes que muestran un perfil similar entre condiciones, son agrupados en un diagrama que proporciona una idea de grupos de genes que pueden ser simultáneamente sobreexpresados o infraexpresados y pueden potencialmente estar co-regulados.

- Análisis de la significancia biológica.

El análisis mediante el *Gene Ontology* (GOA) se basa en un sistema de sobrerrepresentación [142] que determina si los genes catalogados como diferencialmente expresados, parecen ser más o menos frecuentes de lo normal en algunas de las categorías del GO que podrían estar relacionadas con los procesos biológicos implicados en el análisis. Se realizó un análisis similar con el programa IPA (*IngenuityPathwayAnalysis*), para establecer que vías moleculares están afectadas por los genes seleccionados y también para representar las relaciones que aparecen entre genes.

- *Software* utilizado.

Todos los análisis estadísticos, excepto el IPA, se realizaron utilizando el lenguaje estadístico R y las librerías que se desarrollaron para el análisis de datos del *microarray* por el *Bioconductor Project* (<http://www.bioconductor.org>). Los principales métodos y herramientas se utilizaron tal y como describen Gentleman y colaboradores [143]. El análisis del IPA se realizó utilizando la herramienta *Ingenuity Pathways Tool*, disponible en (<http://www.ingenuity.com>).

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado en los parámetros: crecimiento celular, concentración de ATP, ADP, AMP y Adenosina, potencial de membrana mitocondrial, concentración de láctico, succínico y estudios de expresión realizados mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) con sondas *TaqMan* fue el test U de Mann-Whitney.

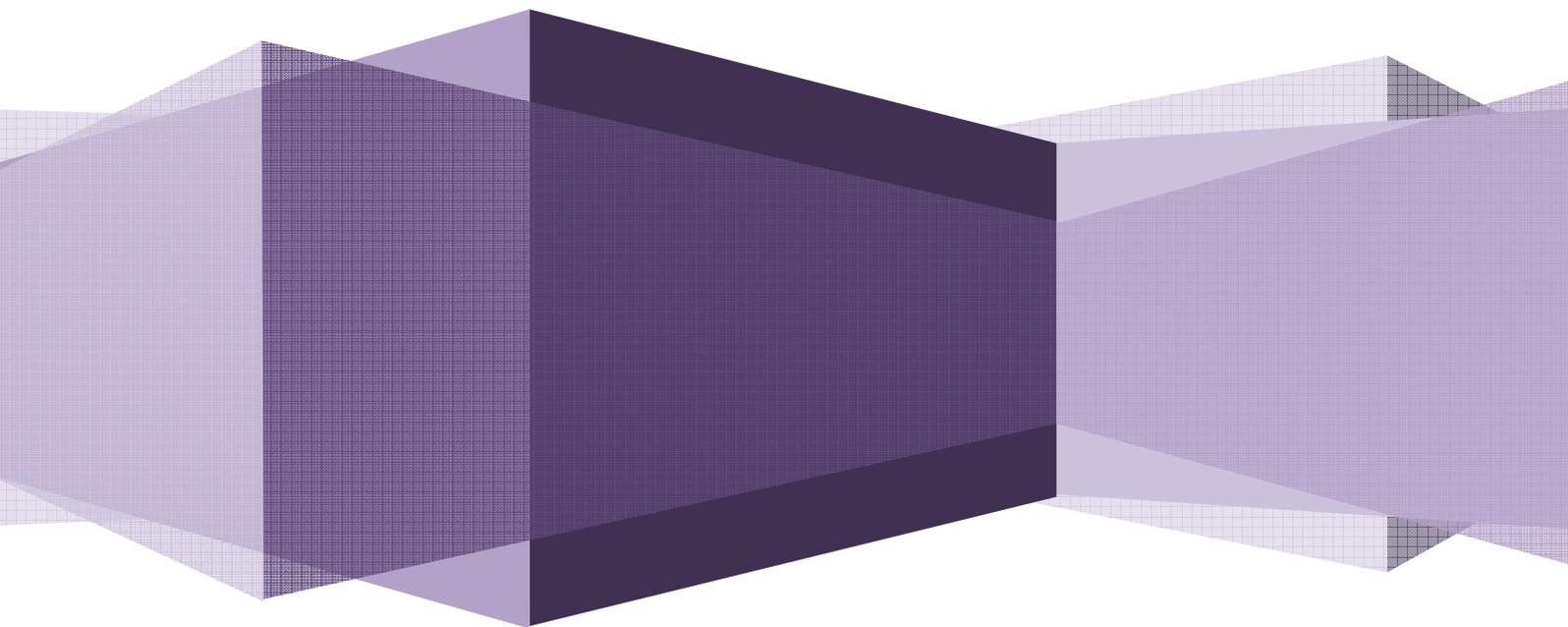
Tabla 1 Anexo:

TAMPONES GENERALES			
NOMBRE	COMPOSICIÓN		COMENTARIOS
PBS 1x	NaCl	137 mM	Esterilizar en el autoclave.
	KCl	2,5 mM	
	Na ₂ PO ₄	10 mM	
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM	
TBS 1x	Tris-HCl pH 8,0	50 mM	Esterilizar en el autoclave.
	NaCl	150 mM	
TBE	Tris base	89 mM	
	Ácido bórico	89 mM	
	EDTA	2 mM	

Tabla 2 Anexo:

TAMPONES EXPERIMENTO <i>MICROARRAYS</i> ARN			
NOMBRE	COMPOSICIÓN		
TAMPÓN A	Tris-Acetato pH 8,1	40 mM	
	KOAc	100 mM	
	Mg(OAc) ₂	30 mM	
COCKTAIL DE HIBRIDACIÓN	Oligonucleótido control B2	50 pM	
	Control de hibridación eucariotas BioB	1,5 pM	
	Control de hibridación eucariotas BioC	5 pM	
	Control de hibridación eucariotas BioD	25 pM	
	Cre	100 pM	
	<i>Herring sperm</i> DNA	0,1 mg/ml	
	BSA acetilado	0,5 mg/ml	
TAMPÓN DE HIBRIDACIÓN 1x	MES	100 mM	
	[Na ⁺]	1 M	
	EDTA	20 mM	
	Tween-20	0,01% (v/v)	

Resultados



1. Validación de las líneas de cíbridos

1.1 Cuantificación del número de copias de ADNmt

Una vez obtenidos los diferentes clones de cíbridos se realizó la determinación del número de copias de ADNmt para confirmar que se había producido incorporación de ADNmt y que las diferencias entre los cíbridos mutados y control no se atribuyesen a un diferente número de copias de ADNmt. En la tabla 9 se muestra el número de copias de ADNmt (nº copias MT-RNR1/nº copias RNasaP) de los diferentes clones de cíbridos obtenidos.

Tabla 9. Número de copias de ADNmt de los diferentes clones de cíbridos

Tipo de cíbrido		m.14487T>C	m.8993T>G	m.3243A>G	m.8344A>G
WT	nº copias ADNmt CI 1	428	545	725	230
	nº copias ADNmt CI 2	374		740	215
	nº copias ADNmt CI 3	363		732	235
	nº copias ADNmt CI 4	437		746	220
MUT	nº copias ADNmt CI 1	580	500	732	450
	nº copias ADNmt CI 2	496		728	355
	nº copias ADNmt CI 3	480		735	460
	nº copias ADNmt CI 4	593		724	345

1.2 Determinación del porcentaje de mutación en los cíbridos transmitocondriales por PCR-RFLP

Una vez cuantificado el número de copias de ADNmt, se determinó el % de mutación mediante PCR-RFLP. Esto nos permitió seleccionar clones con todas las moléculas de ADNmt sin la mutación (cíbridos WT), clones con todas las moléculas de ADNmt mutadas (cíbridos MUT) y clones donde coexisten moléculas de ADNmt sin y con la mutación (cíbridos heteroplasmicos), los cuales se descartaron para la realización de este estudio. A continuación se muestra como ejemplo los resultados de PCR-RFLP obtenidos en el caso de la mutación m.3243A>G (Figura 4).

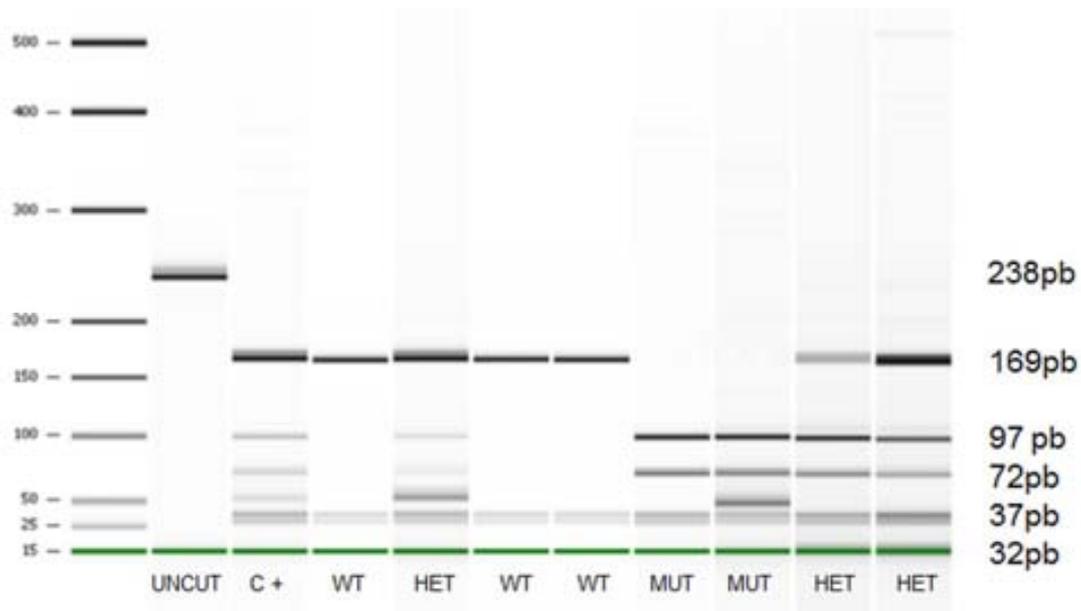


Fig.4 Determinación del % de la mutación m.3243A>G mediante PCR-RFLP. Esta mutación genera una diana de restricción para la enzima de restricción Hae III. El patrón de bandas resultante es el de tres bandas de 169 pb, 37 pb y 32 pb para el ADNmt WT, de 4 bandas de 97 pb, 72 pb, 37 pb y 32pb para el ADNmt 100% mutado y de 5 bandas de 169 pb, 97 pb, 72 pb, 37 pb y 32 pb para el ADNmt donde coexisten moléculas de ADNmt sin y con la mutación (cíbridos heteroplasmicos).

1.3 Secuenciación del ADNmt mediante chips de resecuenciación

Se realizó la secuenciación completa del ADNmt de los cíbridos generados para descartar la presencia de mutaciones adicionales. A continuación se muestran los cambios nucleotídicos encontrados en los diferentes tipos de cíbridos. En todos los casos los cambios encontrados pertenecen a polimorfismos descritos (www.mitomap.org) a excepción de la mutación de interés en los cíbridos mutados. (Las posiciones nucleotídicas marcadas en color marrón, son posiciones a tener en cuenta para la asignación del haplogrupo mitocondrial).

En los cíbridos m.14487T>C y en su control de haplogrupo (WT), con un porcentaje de asignación del 99,23% y 99,16% respectivamente, se encontraron los siguientes cambios nucleotídicos respecto la secuencia de referencia (NC_012920) y los marcadores de su haplogrupo H₂.

Tabla 10. Cambios nucleotídicos encontrados en los cíbridos WT y m.14487T>C

Posición	Loci mitocondriales	Sec.ref	WT	m.14487 T>C	
263	D-LOOP	A	G	G	noncod
750	MT-RNR1	A	G	G	noncod
1438	MT-RNR1	A	G	G	noncod
2352	MT-RNR2	T	C	T	noncod
2706	MT-RNR2	A	G	G	noncod
3010	MT-RNR2	G	G	A	noncod
3107	MT-RNR2	N	-	-	noncod
4512	MT-ND2	G	A	G	A-T
4769	MT-ND2	A	G	G	syn
5480	MT-ND2	A	G	A	syn
6776	MT-CO1	T	C	T	syn
7028	MT-CO1	C	T	T	syn
8860	MT-ATP6	A	G	G	T-A
11935	MT-ND4	T	C	T	syn
13768	MT-ND5	T	T	C	F-L
14487	MT-ND6	T	T	C	Distonia Leigh ataxia M-V
15326	MT-CYB	A	G	G	T-A
16192	D-LOOP	C	T	C	noncod
16239	D-LOOP	C	C	T	noncod
16242	D-LOOP	C	C	T	noncod
16519	D-LOOP	T	C	C	noncod

En los cíbridos m.8993T>G y en su control de haplogrupo (WT), con un porcentaje de asignación 99,52% y 99,49% respectivamente, se encontraron los siguientes cambios nucleotídicos respecto la secuencia de referencia (NC_012920) y los marcadores de su haplogrupo H₁.

Tabla 11. Cambios nucleotídicos encontrados en los cíbridos WT y m.8993T>G

Posición	Loci mitocondriales	Sec.ref	WT	m. 8993 T>G	
263	D-LOOP	A	G	G	noncod
305	D-LOOP	C	C	G	noncod
310	D-LOOP	T	T	C	noncod
308	D-LOOP	C	T	C	noncod
750	MT-RNR1	A	G	G	noncod
1438	MT-RNR1	A	G	G	noncod
2706	MT-RNR2	A	G	G	noncod
3010	MT-RNR2	G	A	A	noncod
4769	MT-ND2	A	G	G	syn
7028	MT-CO1	C	T	T	syn
8723	MT-ATP6	G	A	A	R-Q
8860	MT-ATP6	A	G	G	T-A
8993	MT-ATP6	T	T	G	NARP/Leigh/MILS L-R
12771	MT-ND5	G	A	A	syn
15217	MT-CYB	G	A	A	syn
15326	MT-CYB	A	G	G	T-A
15553	MT-CYB	G	A	A	syn
16274	D-LOOP	G	A	A	noncod
16519	D-LOOP	T	C	C	noncod

En los cíbridos m.3243A>G y en su control isogénico (WT), con un porcentaje de asignación 99,36% en ambos casos, se encontraron los siguientes cambios nucleotídicos respecto la secuencia de referencia (NC_012920) y los marcadores de su haplogrupo T.

Tabla 12. Cambios nucleotídicos encontrados en los cíbridos WT y m.3243A>G

Posición	Loci mitocondriales	Sec.ref	WT	m. 3243 A>G	
73	D-LOOP	A	G	G	noncod
200	D-LOOP	A	G	G	noncod
263	D-LOOP	A	G	G	noncod
709	MT-RNR1	G	A	A	noncod
750	MT-RNR1	A	G	G	noncod
930	MT-RNR1	G	A	A	noncod
1438	MT-RNR1	A	G	G	noncod
1888	MT-RNR2	G	A	A	noncod
2706	MT-RNR2	A	G	G	noncod
3243	MT-TL1	A	A	G	MELAS noncod
4216	MT-ND1	T	C	C	Y-H
4769	MT-ND2	A	G	G	syn
4917	MT-ND2	A	G	G	N-D
5147	MT-ND2	G	A	A	syn
7028	MT-CO1	C	T	T	syn
8697	MT-ATP6	G	A	A	syn
8860	MT-ATP6	A	G	G	T-A
10463	MT-TR	T	C	C	noncod
11167	MT-ND4	A	G	G	syn
11251	MT-ND4	A	G	G	syn
11719	MT-ND4	G	A	A	syn
11812	MT-ND4	A	G	G	syn
13368	MT-ND5	G	A	A	syn
14233	MT-ND6	A	G	G	syn
14766	MT-CYB	C	T	T	T-I
14905	MT-CYB	G	A	A	syn
15326	MT-CYB	A	G	G	T-A
15452	MT-CYB	C	A	A	L-I
15607	MT-CYB	A	G	G	syn
15928	MT-TT	G	A	A	noncod
16126	D-LOOP	T	C	C	noncod
16294	D-LOOP	C	T	T	noncod
16304	D-LOOP	T	C	C	noncod
16519	D-LOOP	T	C	C	noncod

En los cíbridos m.8344A>G y en su control isogénico (WT), con un porcentaje de asignación 99,43 y 99.46% respectivamente, se encontraron los siguientes cambios nucleotídicos respecto la secuencia de referencia (NC_012920) y los marcadores de su haplogrupo J₁.

Tabla 13. Cambios nucleotídicos encontrados en los híbridos WT y m.8344A>G

Posición	Loci mitocondriales	Sec.ref	WT	m. 8344 A>G	
73	D-LOOP	A	G	G	noncod
185	D-LOOP	G	A	A	noncod
228	D-LOOP	G	A	A	noncod
263	D-LOOP	A	G	G	noncod
295	D-LOOP	C	T	T	noncod
462	D-LOOP	C	T	T	noncod
489	D-LOOP	T	C	C	noncod
750	MT-RNR1	A	G	G	noncod
1438	MT-RNR1	A	G	G	noncod
3010	MT-RNR2	G	A	A	noncod
4216	MT-ND1	T	C	C	Y-H
4769	MT-ND2	A	G	G	syn
7028	MT-CO1	C	T	T	syn
8344	MT-TK	A	A	G	MERRF noncod
8860	MT-ATP6	A	G	G	T-A
10398	MT-ND3	A	G	G	T-A
11251	MT-ND4	A	G	G	syn
11719	MT-ND4	G	A	A	syn
12612	MT-ND5	A	G	G	syn
13708	MT-ND5	G	A	A	A-T
13934	MT-ND5	C	T	T	T-M
14766	MT-CYB	C	T	T	T-I
14798	MT-CYB	T	C	C	F-L
15326	MT-CYB	A	G	G	T-A
15452	MT-CYB	C	A	A	L-I
16069	D-LOOP	C	T	T	noncod
16126	D-LOOP	T	C	C	noncod
16222	D-LOOP	C	T	T	noncod

2. Establecimiento de las condiciones de cultivo óptimas para manifestar el defecto en el sistema OXPHOS

De los resultados de crecimiento celular obtenidos con las células ρ^0 en los tres medios de cultivo, se observó que a los cinco días las células ρ^0 eran capaces de sobrevivir en ambas condiciones (medios OX 0.5 y OX). En el caso de las células ρ^0 en presencia del medio OX presentaban un crecimiento constante, mientras que en presencia del medio OX 0.5 el crecimiento aumentaba hasta el quinto día en el que se producía una disminución del mismo.

El hecho de que en ambos casos a partir del cuarto día de estudio las células presentaban una morfología anómala junto con el constante y menor crecimiento en el medio OX a los tres días, hizo que se estableciera como medio oxidativo el medio de cultivo OX (DMEM 0,25 g glucosa/L-0,75 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 μ g/ml uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado) y como tiempo de estudio, 3 días.

En estas condiciones de cultivo las células ρ^0 eran capaces de mantener la viabilidad celular.

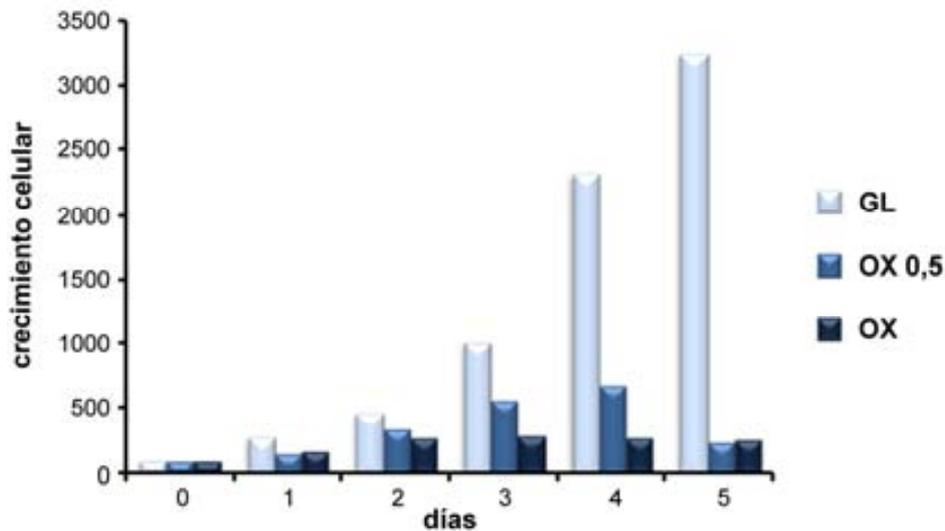


Fig.5 Establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo en células ρ^0 . El crecimiento celular se expresó en n° células día x/n° células día 0 $\times 100$. (GL) DMEM 4,5 g glucosa/L, (OX 0,5) DMEM 0,5 g glucosa/L-0,5 g galactosa/L y (OX) DMEM 0,25 g glucosa/L-0,75 g galactosa/L.

3. Crecimiento celular de cíbridos con mutaciones en ARNt y subunidades OXPHOS

Todas las líneas de cíbridos (tanto las WT como las mutadas) presentaron una disminución significativa del crecimiento en condiciones oxidativas respecto al crecimiento observado en condiciones glicolíticas (Figura 6).

En presencia del medio glicolítico todas las líneas de cíbridos (tanto WT como mutadas) no presentaron diferencias significativas en su crecimiento, mientras que en condiciones oxidativas solamente se observaron diferencias significativas en el caso de los cíbridos con la mutación m.8344A>G, donde el crecimiento fue significativamente inferior respecto su control WT (Figura 6).

Como en el caso de las células ρ^0 , todas las líneas de cíbridos fueron perfectamente viables en el medio oxidativo durante tres días, incluso en aquellos casos con defectos OXPHOS más severos como las mutaciones en ARNt.

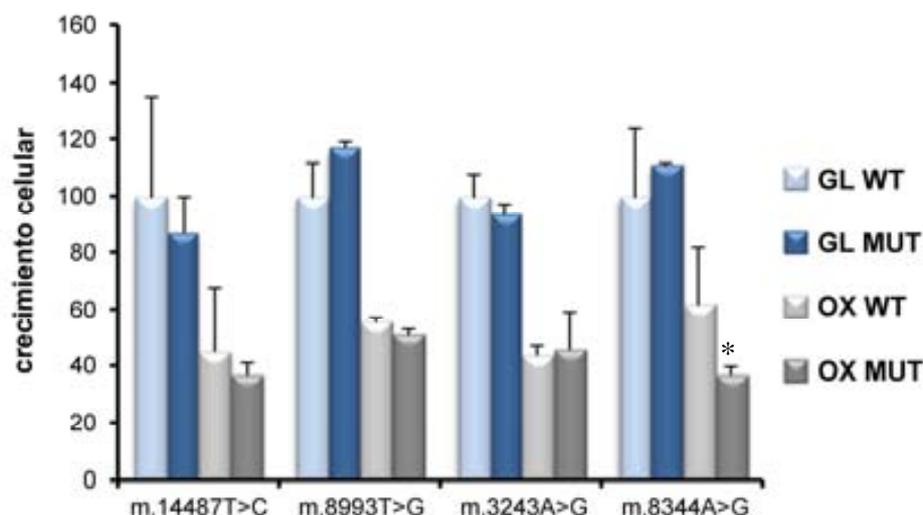


Fig.6 Crecimiento de las diferentes líneas de cíbridos en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. El crecimiento celular se expresó en n° células el día 3/ n° células el día 3 (GL WT) \times 100. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX y (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

4. Validación del medio oxidativo

Para comprobar que el cultivo de los cíbridos durante 3 días en medio OX manifestaba el déficit en el sistema OXPHOS se realizó la determinación del contenido de ATP.

En condiciones glicolíticas los cíbridos con mutaciones en ARNt (m.3243A>G, m.8344A>G) presentaron una disminución en el contenido de ATP respecto a sus controles WT (25,18% en m.3243A>G y 49,34% en m.8344A>G) siendo significativa esta disminución únicamente en el caso de la mutación m.8344A>G. Sin embargo en condiciones oxidativas estos cíbridos mostraron una mayor y significativa disminución en el contenido de ATP (79,98% en m.3243A>G y 96,77% en m.8344A>G) (Figura 7).

Estos resultados demostraron que el medio oxidativo no permitía la obtención de cantidades considerables de ATP vía glicolisis (en células ρ^0 0.40 μmol ATP/g proteína en medio oxidativo) viéndose obligada la célula a utilizar el sistema OXPHOS para la obtención de ATP.

Por esa razón, en los casos donde el sistema OXPHOS está seriamente afectado por la mutación en el ADNmt (mutaciones en ARNt; m.3243A>G y m.8344A>G) la disminución del contenido de ATP fue mayor. Este hecho ponía en evidencia que en las condiciones establecidas el medio OX era capaz de expresar el defecto en el sistema OXPHOS.

Sin embargo, en condiciones glicolíticas era posible obtener cantidades considerables de ATP vía glicolítica (en células ρ^0 29.61 $\mu\text{mol ATP/g proteína}$) debido a la elevada capacidad glicolítica de las células 143B. Por esa razón, la disminución del contenido de ATP en condiciones glicolíticas no fue tan elevada (Figura 7).

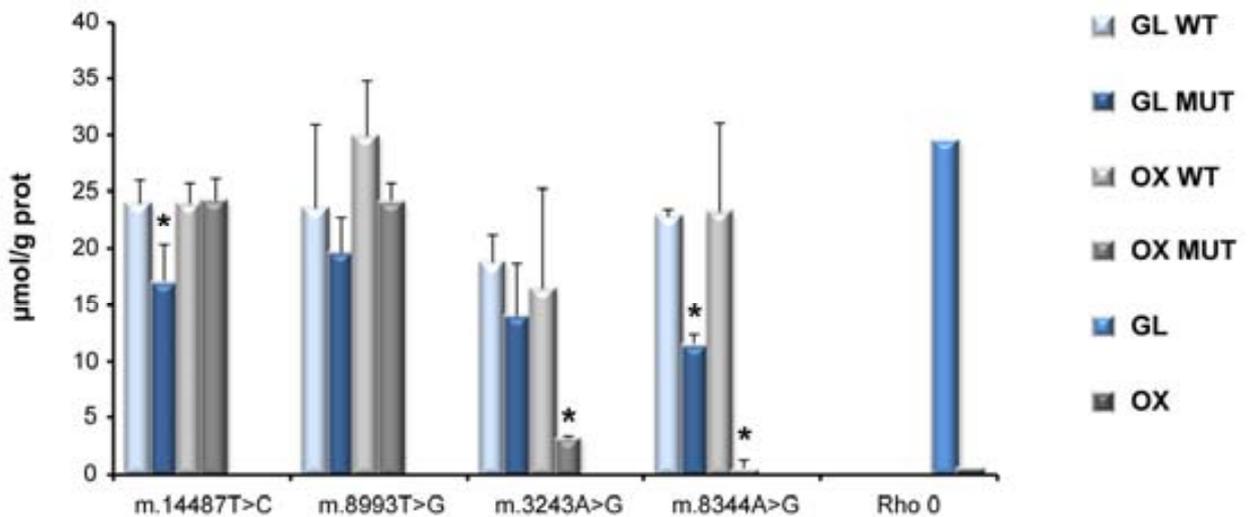


Fig.7 Contenido ATP de las diferentes líneas de cíbridos y células ρ^0 en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX, (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX, (GL) células ρ^0 cultivadas en GL y (OX) células ρ^0 cultivadas en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

En condiciones glicolíticas los cíbridos con mutaciones en subunidades OXPHOS (m.14487T>C y m.8993T>G) mostraron una disminución en el contenido de ATP en comparación con sus respectivos controles WT (28,66% en m.14487T>C y 16,80% en m.8993T>G) siendo esta disminución significativa en el caso de la mutación m.14487T>C.

Cabe destacar que en condiciones oxidativas estos cíbridos mutados mostraron contenidos de ATP similares a los observados en sus controles en condiciones glicolíticas (m.14487T>C 24.34 $\mu\text{mol ATP/g}$ proteína y m.8993T>G 24,23 $\mu\text{mol ATP/g}$ proteína) (Figura 7).

Estos resultados indican que en presencia de un medio que estimula la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa, como es el medio oxidativo, los cíbridos con mutaciones homoplásmicas en m.14487T>C y m.8993T>G son capaces de tener un contenido de ATP normal.

Paralelamente al contenido de ATP se determinaron los nucleótidos de adenina (ADP, AMP y Adenosina) para tener una completa información del estado energético celular.

Respecto a los cíbridos con mutaciones que afectan a las subunidades OXPHOS (m.14487T>C y m.8993T>G) no se observaron diferencias significativas en el contenido de nucleótidos de adenina entre los cíbridos mutados y WT ni en condiciones glicolíticas ni en condiciones oxidativas. Respecto a las mutaciones que afectan a los ARNt (m.3243A>G y m.8344A>G), tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido de nucleótidos de adenina entre los cíbridos mutados y WT en condiciones glicolíticas (Figura 8). En cambio, en condiciones oxidativas se observó una disminución significativa en el contenido de nucleótidos de adenina, lo que indicaría que la degradación de nucleótidos ocurre como resultado de la gran depleción energética que sufren estos cíbridos en condiciones oxidativas [138], (Figura 8).

La carga energética de adenilato presentó un valor inferior a 0.6 en los cíbridos con mutaciones (m.3243A>G, m.8344A>G) y en las células ρ^0 en condiciones oxidativas, indicando degradación de nucleótidos de adenina, comprometiendo la homeostasis celular [138], (Figura 9).

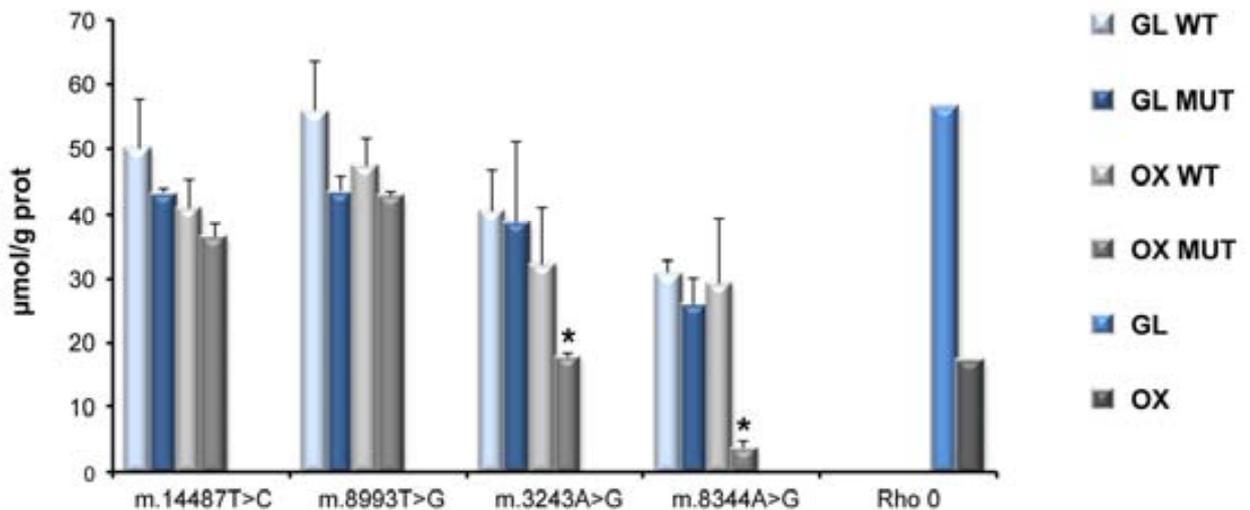


Fig.8 Contenido de nucleótidos de adenina (ATP+ADP+AMP+ADENOSINA) en las diferentes líneas de cíbridos y células ρ^0 en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX, (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX, (GL) células ρ^0 cultivadas en GL y (OX) células ρ^0 cultivadas en OX. Media \pm DE. * $p<0.05$.

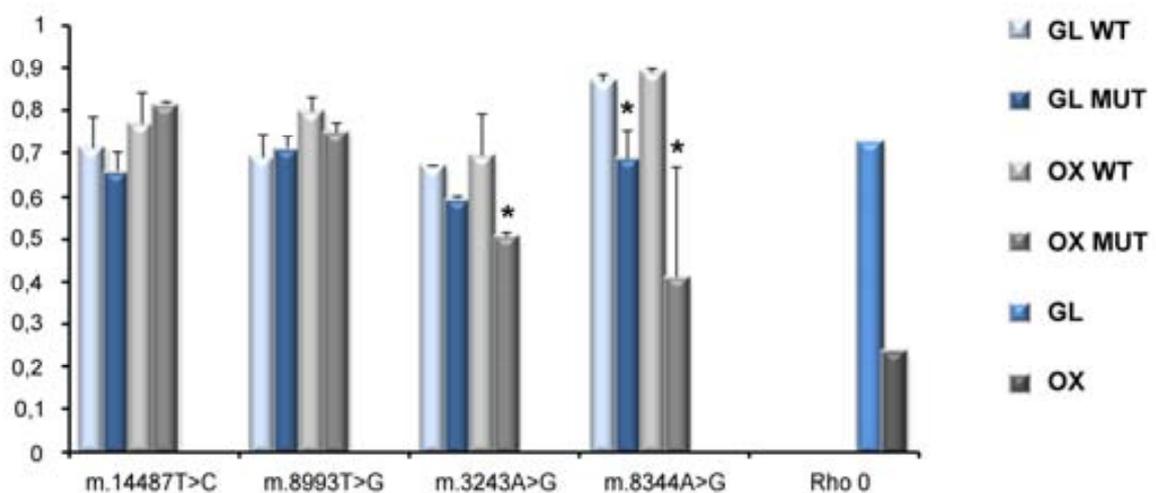


Fig.9 Carga energética de adenilato en las diferentes líneas de cíbridos y células ρ^0 en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. La carga energética de adenilato se calculó mediante la fórmula $(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX, (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX, (GL) células ρ^0 cultivadas en GL y (OX) células ρ^0 cultivadas en OX. Media \pm DE. * $p<0.05$.

5. Potencial de membrana mitocondrial

Uno de los parámetros que mejor reflejan la función mitocondrial es el potencial de membrana mitocondrial. Se determinó el potencial de membrana utilizando JC-1.

En todas las mutaciones se observó una disminución en el potencial de membrana comparado con sus controles en condiciones glicolíticas, pero esta disminución fue sólo significativa en el caso de las mutaciones m.3243A>G y m.14487T>C. En cambio, en condiciones oxidativas se observó una disminución estadísticamente significativa del potencial de membrana en las cuatro mutaciones estudiadas. Estos resultados sugieren que el medio oxidativo propuesto fuerza la utilización de la fosforilación oxidativa evidenciando los defectos provocados por las mutaciones en el ADNmt (Figura 10). En las células ρ^0 sin un sistema OXPHOS funcional es donde se observan los valores más bajos de potencial de membrana (Figura 10).

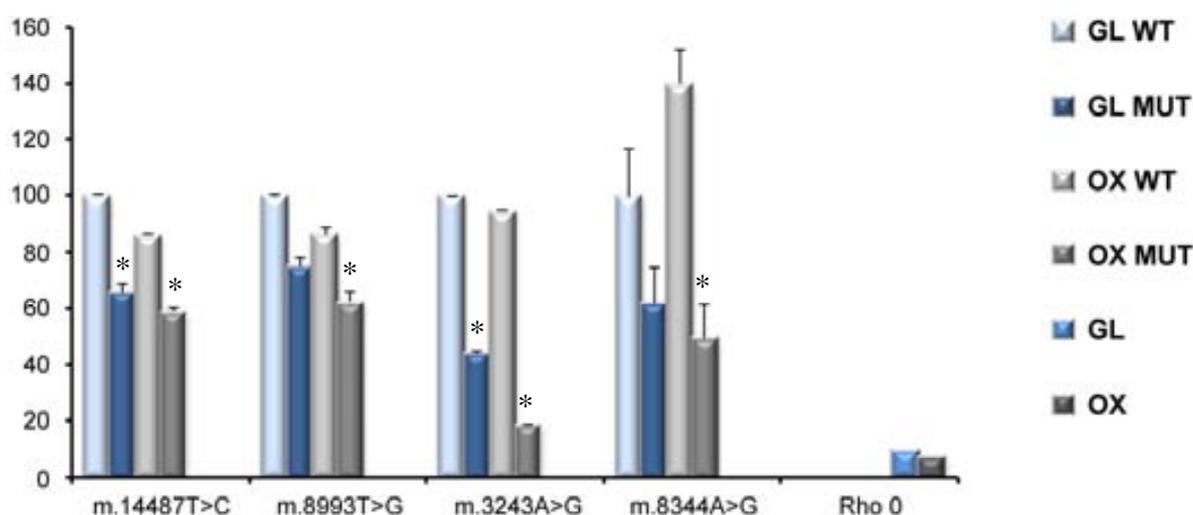


Fig.10 Potencial de membrana mitocondrial en las diferentes líneas de híbridos y células ρ^0 en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. El potencial de membrana mitocondrial se expresó en potencial de membrana de cada muestra/potencial de membrana híbridos (GL WT) x 100. (GL WT) híbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) híbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) híbridos WT cultivados en OX, (OX MUT) híbridos mutados cultivados en OX, (GL) células ρ^0 cultivadas en GL y (OX) células ρ^0 cultivadas en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

6. Concentración de lactato y succinato

En condiciones glicolíticas se observó un incremento del lactato intracelular en todos los cíbridos con mutaciones en su ADNmt. El incremento de la concentración de lactato para las diferentes mutaciones comparado con sus respectivos controles fue de 44%, 58%, 137% y 62% para m.14487T>C, m.8993T>G, m.3243A>G y m.8344A>G respectivamente (Figura 11), siendo este incremento significativo en el caso de las mutaciones m.8993T>G, m.3243A>G y m.8344A>G.

En condiciones oxidativas, también se observaron diferencias en la concentración de lactato intracelular. En concreto se observó un incremento del lactato intracelular en todas las mutaciones como en condiciones glicolíticas, pero en estas condiciones el incremento fue mayor. El incremento del lactato para las diferentes mutaciones comparado con sus respectivos controles fue de 117%, 340%, 370% y 149% para m.14487T>C, m.8993T>G, m.3243A>G y m.8344A>G respectivamente (Figura 11). Siendo significativo este incremento en el caso de las mutaciones m.3243A>G y m.8344A>G.

Estos resultados indican una vez más, que el medio oxidativo manifiesta de una manera más evidente el defecto en el sistema OXPHOS que el medio glicolítico.

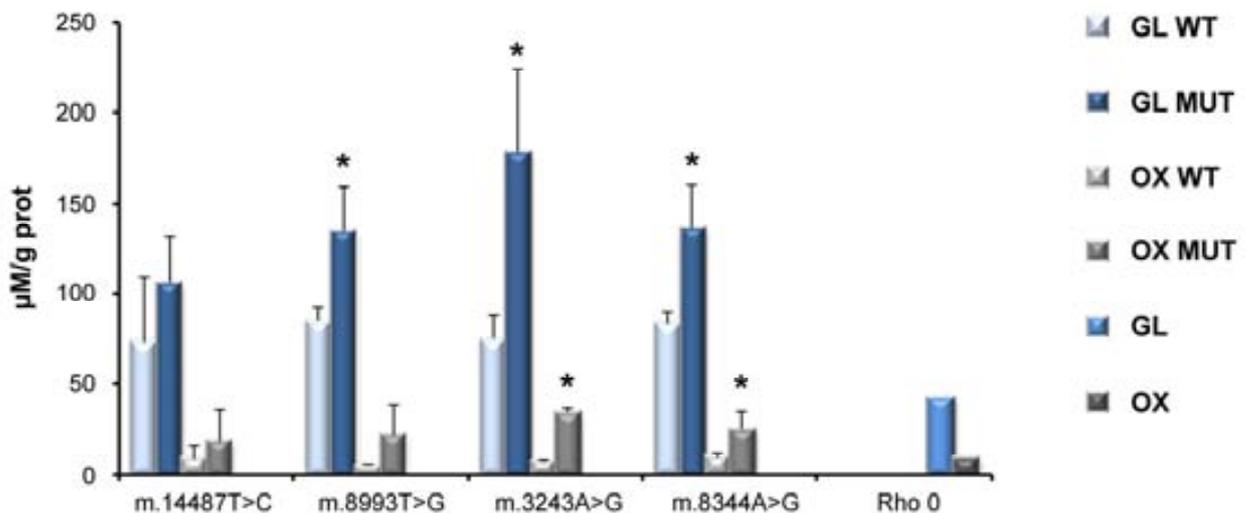


Fig.11 Concentración de lactato intracelular en las diferentes líneas de cíbridos y células ρ^0 en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX, (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX, (GL) células ρ^0 cultivadas en GL y (OX) células ρ^0 cultivadas en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

Se determinó la concentración de succinato, sustrato de la succinato deshidrogenasa (SDH) enzima que forma parte del complejo II así como del ciclo de Krebs.

No se observaron diferencias en el contenido de succinato entre los cíbridos controles y los mutados a excepción de los cíbridos portadores de la mutación m.14487T>C que presentaban una disminución significativa en el contenido de succinato del 67% en condiciones glicolíticas y del 86% en condiciones oxidativas. Esta disminución en la concentración de succinato podría atribuirse a una mayor utilización del succinato por la SDH para la obtención de FADH₂ y por tanto compensar el déficit de complejo I potenciando la fosforilación oxidativa a través del complejo II (Figura 12).

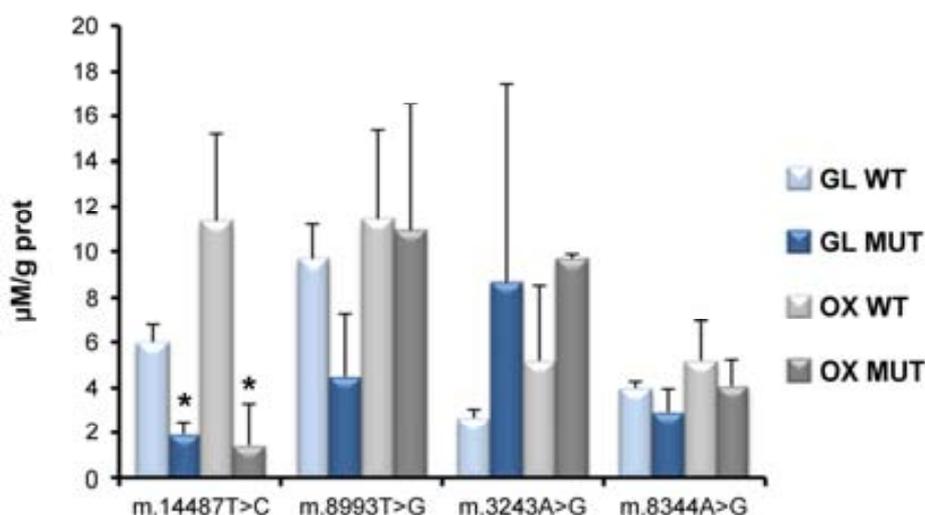


Fig.12 Concentración de succinato en las diferentes líneas de cíbridos en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX y (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX. Media ± DE. *p<0.05.

7. Estudios de expresión en cíbridos

Con el objetivo de caracterizar la respuesta transcripcional de los cíbridos portadores de mutaciones en el ADNmt en condiciones oxidativas y glicolíticas se hicieron dos aproximaciones metodológicas. Se estudió por PCR a tiempo real la expresión de ciertos genes así como estudios más globales con microarrays de expresión.

7.1 Determinación de la expresión de genes implicados en la función mitocondrial por PCR a tiempo real

Se estudió la expresión de genes implicados en la función mitocondrial, por PCR a tiempo real utilizando sondas *TaqMan*, en cíbridos portadores de mutaciones en ADNmt, en las dos condiciones de cultivo (GL y OX).

7.1.1 Expresión de coactivadores transcripcionales y factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial

Se determinó la expresión de PGC1A y PGC1B coactivadores transcripcionales implicados en el programa de biogénesis mitocondrial, así como NRF-1 y NRF-2, factores de transcripción de genes que codifican proteínas mitocondriales.

Respecto la expresión de PGC1A se observó una disminución significativa de su expresión tanto en condiciones glicolíticas como oxidativas en cíbridos con mutaciones m.8993T>G y m.3243A>G respecto a sus controles (WT). En cambio para las otras dos mutaciones de estudio m.14487T>C y m.8344A>G no se encontraron diferencias significativas en la expresión de PGC1A. Además tanto en los cíbridos controles como mutados se observó un incremento significativo de la expresión de PGC1A en el medio oxidativo respecto al glicolítico.

En el caso de la expresión de PGC1B no se observaron diferencias significativas de expresión entre los cíbridos WT y mutados ni en condiciones glicolíticas ni oxidativas en las cuatro mutaciones de estudio.

Respecto la expresión de NRF-1 no se observaron diferencias significativas de expresión ni en condiciones glicolíticas ni oxidativas para las cuatro mutaciones a excepción de la mutación m.3243A>G en condiciones oxidativas donde sí se apreció una sobreexpresión significativa de NRF-1 respecto a su control.

En el caso de NRF-2 los niveles de ARNm fueron significativamente inferiores en condiciones glicolíticas en presencia de las mutaciones m.14487T>C y m.8993T>G. Sin embargo, en presencia de la mutación m.8344A>G se observó una sobreexpresión significativa de NRF-2 en condiciones glicolíticas. La mutación m.3243A>G fue la única donde no existieron diferencias significativas de expresión de NRF-2 ni en condiciones glicolíticas ni oxidativas.

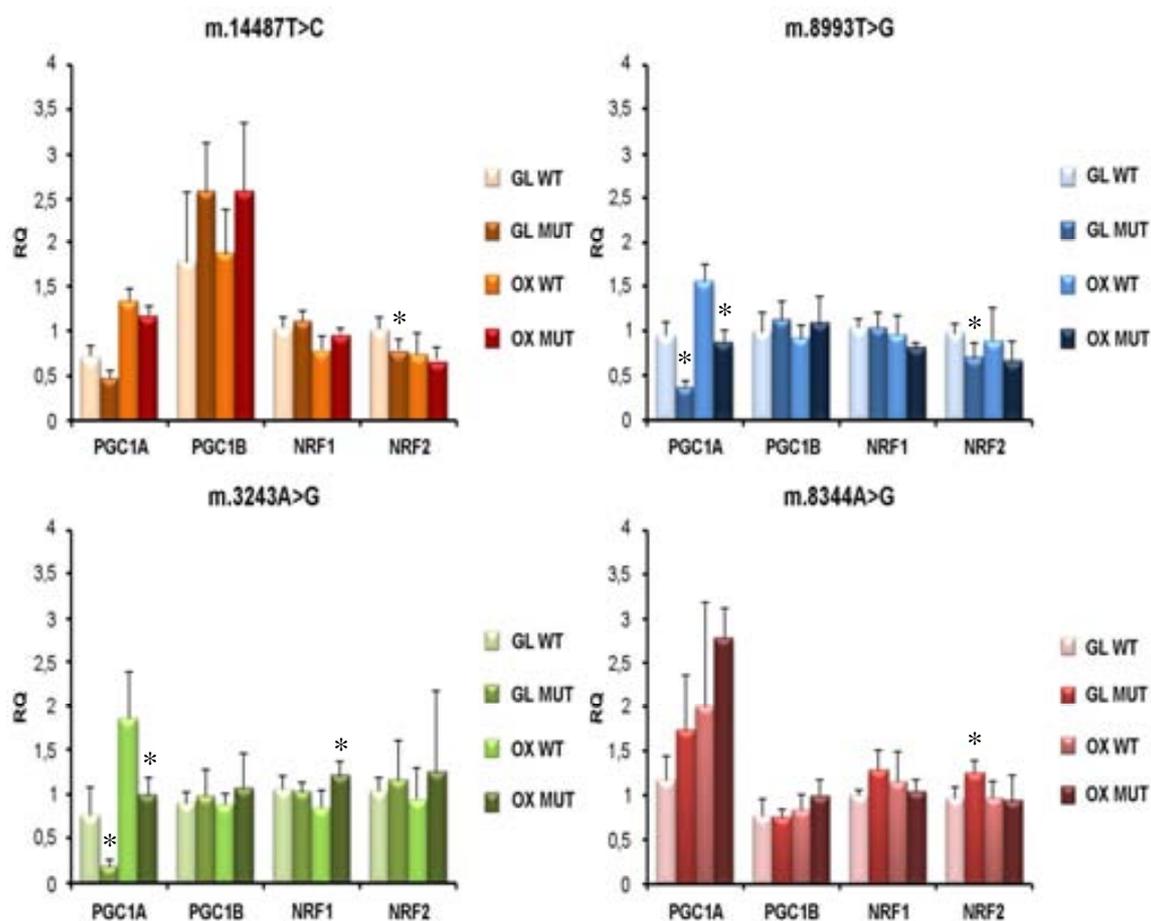


Fig.13 Expresión de genes que codifican coactivadores transcripcionales y factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial en las diferentes líneas de cíbridos en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX y (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

7.1.2 Expresión de genes implicados en la replicación, transcripción y traducción del ADNmt

Se estudió la expresión de genes relacionados con la replicación, transcripción y traducción del ADNmt. Para ello se determinó la expresión de TFAM y TFB2M constituyentes junto con la ARN-Pol de la maquinaria básica transcripcional. También se determinó la expresión de TFB1M implicado en la traducción del ADNmt (metilación de la subunidad 12s, necesario para el mantenimiento de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial). Finalmente se determinó la expresión de POLG subunidad catalítica de la polimerasa gamma implicada en la replicación del ADNmt.

Respecto a la expresión de TFAM se observó una sobreexpresión significativa en condiciones glicolíticas en presencia de las mutaciones m.14487T>C y m.8344A>G. En cambio en la mutación m.3243A>G la presentó en condiciones oxidativas. En el caso de la mutación m.8993T>G no existieron diferencias significativas en la expresión de TFAM ni en condiciones glicolíticas ni oxidativas. En TFB2M no existieron diferencias significativas en su expresión en los cíbridos mutados ni en las diferentes condiciones de cultivo. La expresión de TFB1M no presentó cambios significativos en las distintas mutaciones ni en condiciones glicolíticas ni oxidativas a excepción de la mutación m.8993T>G donde se observó una sobreexpresión únicamente en condiciones glicolíticas. Respecto a POLG sólo presentó una expresión significativamente inferior en el caso de la mutación m.3243A>G en condiciones glicolíticas.

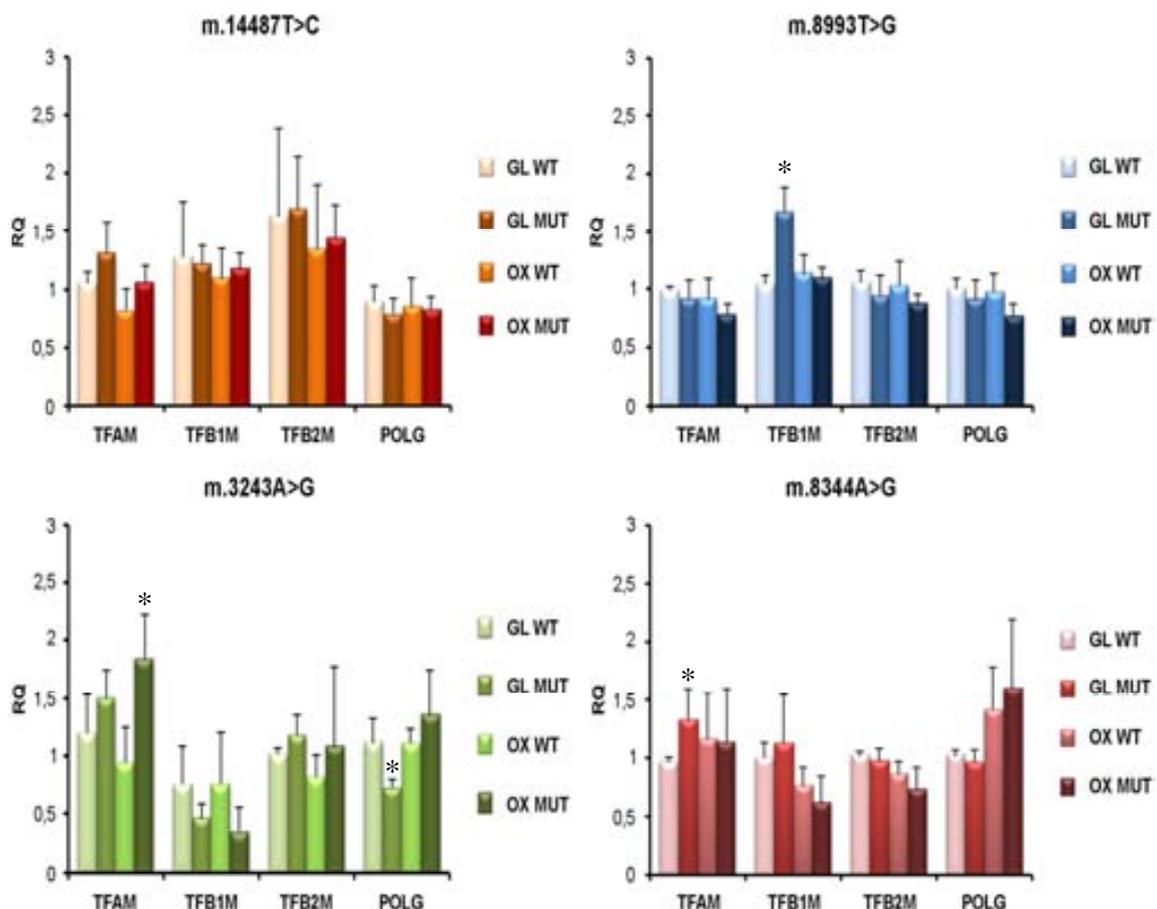


Fig.14 Expresión de genes implicados en la replicación, transcripción y traducción del ADNmt en las diferentes líneas de cíbridos en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX y (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

7.1.3 Determinación de la expresión de las subunidades de la fosforilación oxidativa codificadas por el ADN nuclear

Se estudió la expresión de las subunidades de la fosforilación oxidativa codificadas por el ADN nuclear, se determinó la expresión de NDUFS2, SDHC, CYC1, COX4I1 y ATP5B subunidades codificadas por el ADNn que forman parte de los complejos I, II, III, IV y V respectivamente.

Respecto la expresión de NDUFS2 hay que destacar su sobreexpresión en presencia de las mutaciones que afectan a ARNt como m.8344A>G y m.3243A>G en condiciones glicolíticas. Además en el caso de la mutación m.3243A>G esta sobreexpresión también se dio en condiciones oxidativas.

En el caso de la mutación m.14487T>C que afecta al complejo I también existía sobreexpresión de esta subunidad en condiciones oxidativas.

En el caso de la subunidad SDHC cabe destacar el diferente patrón de expresión en las dos mutaciones que afectan a subunidades. Por un lado en presencia de la mutación m.8993T>G existe disminución significativa de la expresión de SDHC en las dos condiciones de cultivo mientras que en presencia de la mutación m.14487T>C existe un incremento de su expresión en condiciones oxidativas. En el caso de las mutaciones que afectan a ARNt no se observaron cambios significativos en la expresión de esta subunidad.

Para la subunidad CYC1 sólo se observaron cambios significativos en presencia de la mutación m.8993T>G, donde existía un incremento significativo de su expresión tanto en condiciones glicolíticas como oxidativas.

Respecto a la subunidad del complejo IV COX4I1 sólo existían cambios significativos en el caso de la mutación m.14487T>C estando sobreexpresada COX4I1 tanto en condiciones glicolíticas como oxidativas.

Finalmente en el caso de la subunidad ATP5B del complejo V sólo se observaron cambios significativos, en el caso de la mutación m.14487T>C estando sobreexpresada en condiciones oxidativas.

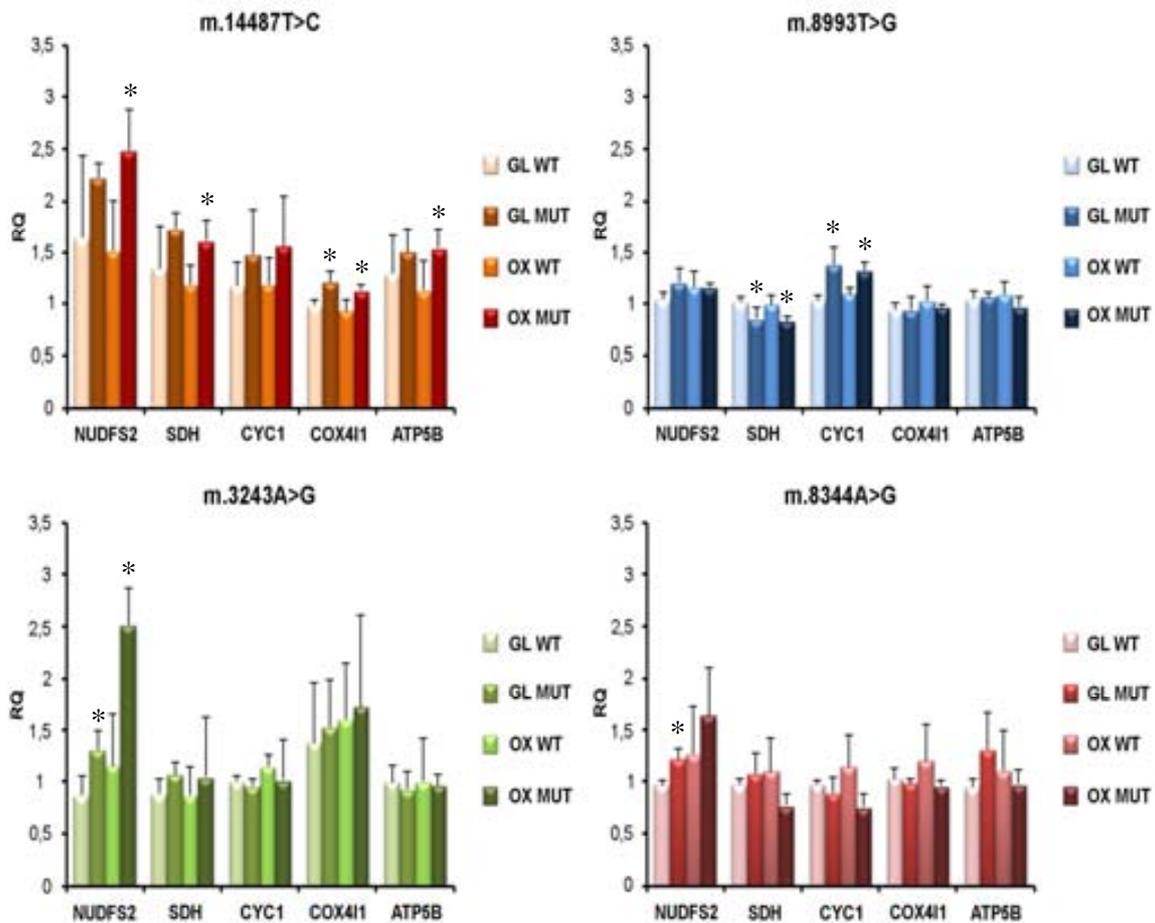


Fig.15 Expresión de subunidades de la fosforilación oxidativa codificadas por el ADN nuclear en las diferentes líneas de híbridos en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) híbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) híbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) híbridos WT cultivados en OX y (OX MUT) híbridos mutados cultivados en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

7.1.4 Determinación de la expresión de las subunidades de la fosforilación oxidativa codificadas por el ADN mitocondrial

Otro aspecto que se abordó era la expresión de las subunidades de la fosforilación oxidativa codificadas por el ADN mitocondrial ante diferentes mutaciones del ADNmt. Para ello se determinó la expresión de MT-ND6, MT-CYB, MT-COX I y MT-ATP6 subunidades codificadas por el ADNmt que forman parte de los complejos I, III, IV y V respectivamente.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de las subunidades MT-ND6, MT-CYB, MT-CO1 y MT-ATP6 en presencia de las diferentes mutaciones de estudio ni en las diferentes condiciones de cultivo, con la única excepción de la subunidad MT-CYB del complejo III que presentó una sobreexpresión significativa en condiciones glicolíticas en presencia de la mutación m.3243A>G.

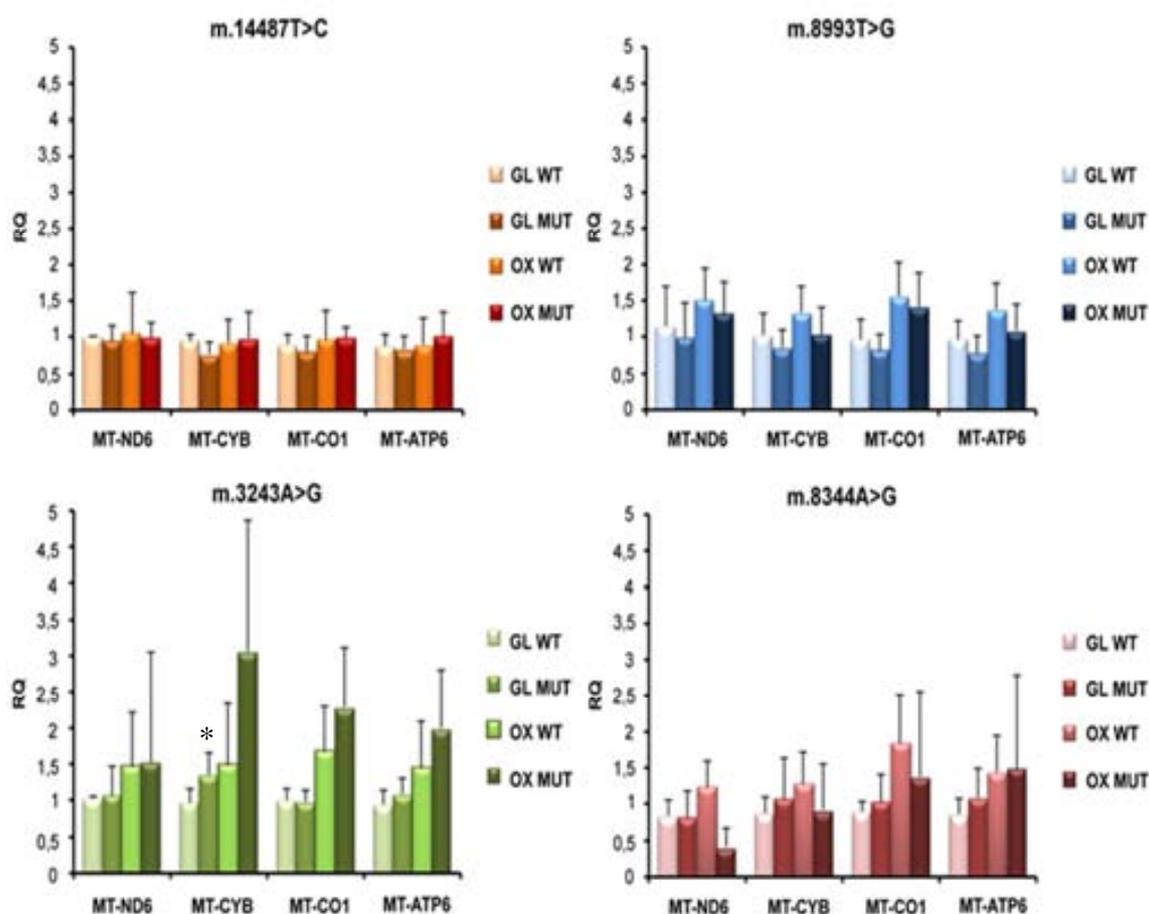


Fig.16 Expresión de subunidades de la fosforilación oxidativa codificadas por el ADN mitocondrial en las diferentes líneas de cíbridos en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX y (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

7.1.5 Expresión de genes implicados en el catabolismo de carbohidratos

También se estudió la expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos. Se determinó la expresión de: HK2, enzima que cataliza el primer paso del metabolismo de la glucosa, la conversión de glucosa a glucosa - 6 - fosfato; la expresión de LDHA, enzima que cataliza la conversión de piruvato y NADH a lactato y NAD; la expresión de PDHA1, gen codifica la subunidad E1 alfa que forma parte del enzima E1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa, complejo multienzimático encargado de la conversión del piruvato a acetil-CoA y CO₂. También se estudiaron enzimas del ciclo de Kerbs: CS, enzima que cataliza la síntesis de citrato a partir de oxalacetato y acetil coenzima A y la expresión de ACO2, que cataliza la conversión de citrato a isocitrato.

Respecto la expresión de la HK2 solamente se observó un incremento significativo de su expresión en presencia de la mutación m.3243A>G en condiciones glicolíticas. Cabe destacar que HK2 tendía a incrementar su expresión en condiciones oxidativas tanto en presencia como en ausencia de mutación.

En el caso de LDHA solamente se observaron cambios significativos de su expresión en presencia de la mutación m.14487T>C, estando incrementada tanto en condiciones glicolíticas como oxidativas. Tanto en los híbridos WT como mutados existía una tendencia a disminuir la expresión de LDHA en condiciones oxidativas respecto a las condiciones glicolíticas.

Finalmente en ACO2 solamente se observó una disminución significativa de su expresión en presencia de la mutación m.8993T>G en condiciones glicolíticas.

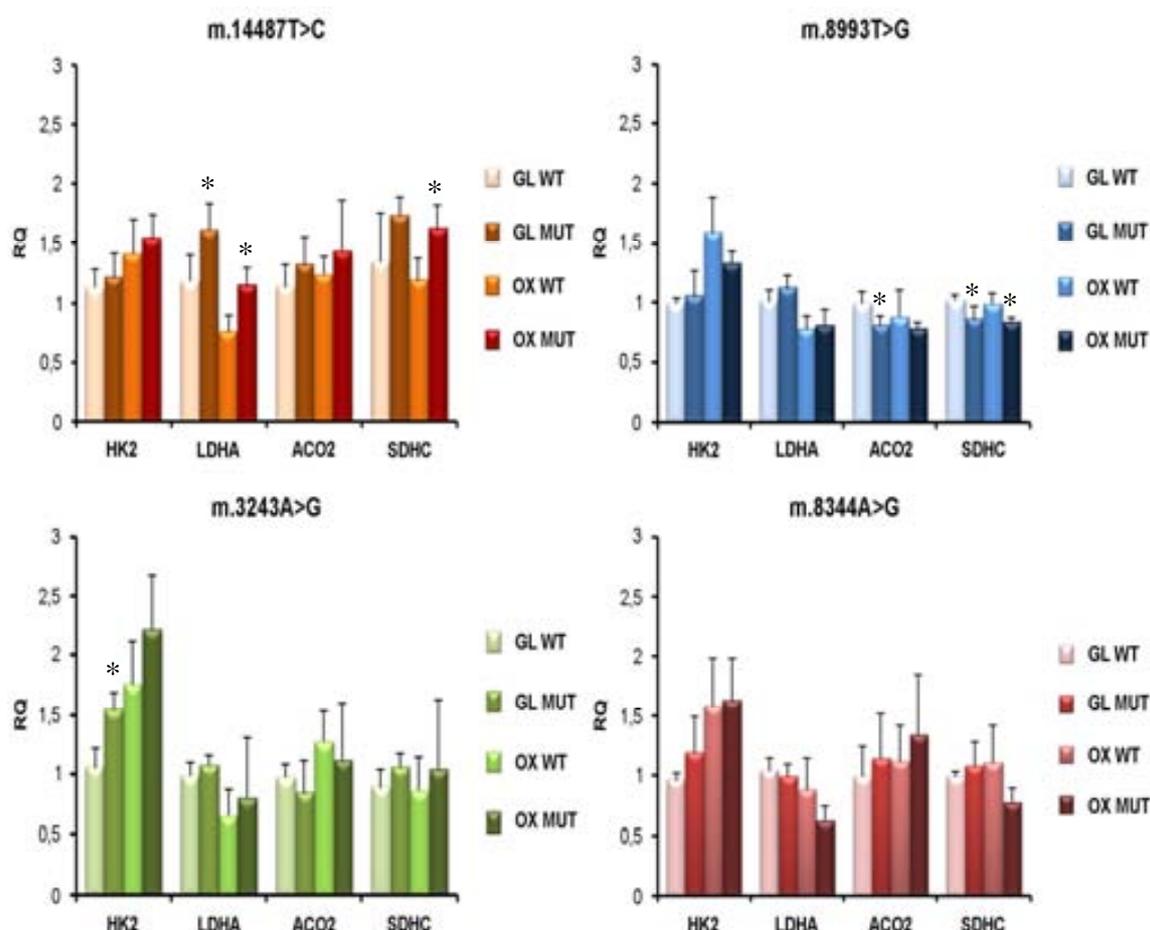


Fig.17 Expresión de genes que codifican enzimas implicados en el catabolismo de carbohidratos en las diferentes líneas de cúbidos en condiciones glicolíticas y oxidativas durante 3 días. (GL WT) cúbidos WT cultivados en GL, (GL MUT) cúbidos mutados cultivados en GL, (OX WT) cúbidos WT cultivados en OX y (OX MUT) cúbidos mutados cultivados en OX. Media \pm DE. * $p < 0.05$.

7.2 Resultados del estudio de expresión utilizando microarray de ARN

Con el objetivo de determinar genes diferencialmente expresados que permitieran obtener información acerca de los mecanismos patológicos implicados en las diferentes mutaciones de estudio, se realizó un experimento de microarray de ARN utilizando las dos condiciones de cultivo (medio GL y medio OX) y siguiendo el diseño experimental descrito en el apartado 4 de material y métodos. Los genes diferencialmente expresados se obtienen de comparar el perfil de expresión del cúbido con la mutación vs el perfil de expresión del cúbido control (WT), para unas determinadas condiciones de cultivo.

Este tratamiento de los datos proporcionó una lista de genes diferencialmente expresados. Se aceptó como gen diferencialmente expresado, aquel que presentó un *p-valor* inferior a 0.01. En total se obtuvieron 8 listas de genes diferencialmente expresados, teniendo en cuenta que se estudiaron 4 mutaciones distintas, en dos condiciones de cultivo diferentes.

Dada la naturaleza de los procesos biológicos, estos genes diferencialmente expresados no se han estudiado de forma aislada sino que se han tenido en cuenta las interacciones que se dan en los sistemas biológicos. El objetivo principal de la búsqueda de la significancia biológica es ayudar a responder cuestiones del tipo, si los genes que aparecen en estos listados tienen funciones similares o están implicados en procesos parecidos y sobretodo encontrar cuales son estos procesos y como están relacionados con el problema biológico de interés. En nuestro estudio, para estudiar la significancia biológica, se realizó un análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways* (IPA), que permitió determinar en qué procesos biológicos estaban implicados los genes diferencialmente expresados.

A continuación se muestra en la tabla 14 el número de genes diferencialmente expresados para cada una de las mutaciones de estudio en las diferentes condiciones de cultivo.

Tabla 14. Número de genes diferencialmente expresados.

Condiciones de cultivo		m. 14487 T>C	m. 8993 T>G	m. 3243 A>G	m. 8344A > G
GL	n° genes sobreexpresados	213	164	825	30
	n° genes infraexpresados	123	161	890	40
OX	n° genes sobreexpresados	168	148	886	753
	n° genes infraexpresados	162	221	1632	666

El número de genes diferencialmente expresados en las mutaciones que afectan a subunidades del sistema OXPHOS era muy similar en ambas condiciones de cultivo a diferencia de las mutaciones que afectan a ARNt donde se observó un incremento del número de genes diferencialmente expresados en condiciones oxidativas, siendo el número en condiciones oxidativas muy superior al observado en las mutaciones que afectan a subunidades del sistema OXPHOS.

La figura 18 muestra la representación de los perfiles diferenciales de expresión mediante diagramas *Heatmap* donde se representa la expresión de cada gen seleccionado (filas) en cada una de las muestras estudiadas (columnas) utilizando una escala de color que va desde valores bajos de expresión (verde) hasta valores altos (rojos). Los genes que muestran un perfil similar entre condiciones, son agrupados en un diagrama que proporciona una idea de grupos de genes que pueden ser simultáneamente sobre o infraexpresados y que pueden estar co-regulados.

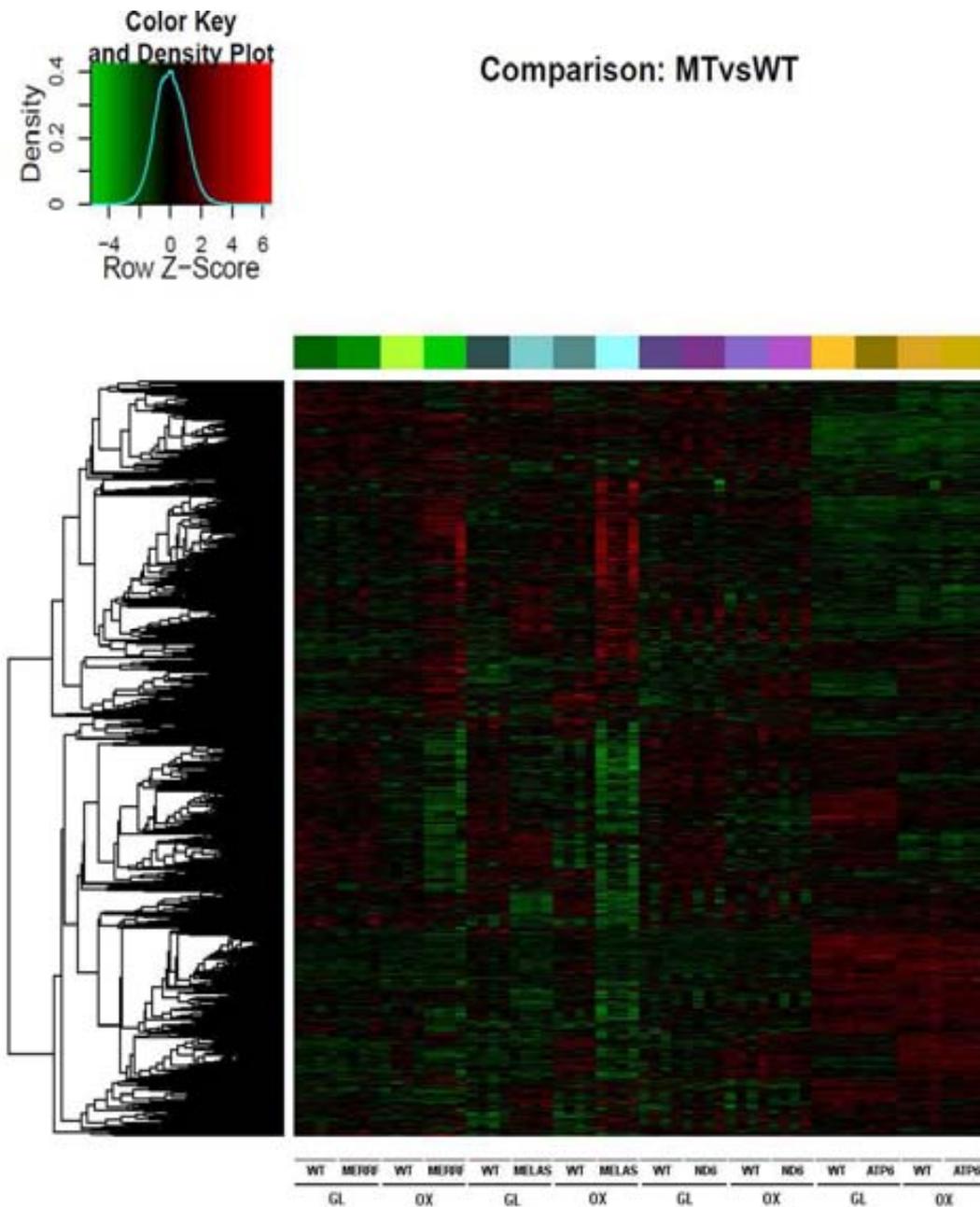


Fig.18 Representación de los perfiles de expresión génica mediante *Heatmap*. (GL WT) cíbridos WT cultivados en GL, (GL MUT) cíbridos mutados cultivados en GL, (OX WT) cíbridos WT cultivados en OX y (OX MUT) cíbridos mutados cultivados en OX.

7.2.1 Resultados de expresión en los cíbridos MERRF (m.8344A>G)

A continuación se detallan los genes diferencialmente expresados en cíbridos portadores de la mutación m.8344A>G en las diferentes condiciones de cultivo estudiadas.

MERRF (m.8344A>G) en condiciones glicolíticas (GL)

En condiciones glicolíticas se obtuvieron 70 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 30 genes estaban sobreexpresados y 40 genes infraexpresados.

Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways* (IPA), se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 15. Principales redes asociadas a la mutación m. 8344A>G (GL)

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cell Cycle, Hereditary Disorder, Skeletal and Muscular Disorders	24
2	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Tissue Development, Cancer	24
3	Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	15
4	Neurological Disease, Hereditary Disorder, Nervous System Development and Function	2
5	Cancer, DNA Replication, Recombination, and Repair, Developmental Disorder	2

Tabla 16. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.8344A>G (GL)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	2,99E-04 - 4,61E-02	13
Cell Morphology	4,17E-04 - 4,44E-02	9
Cell Cycle	9,27E-04 - 4,87E-02	5
DNA Replication, Recombination, and Repair	9,88E-04 - 2,84E-02	6
Lipid Metabolism	1,26E-03 - 2,66E-02	9
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Visual System Development and Function	2,00E-04 - 9,04E-03	3
Embryonic Development	3,63E-04 - 4,00E-02	9
Organ Development	3,63E-04 - 3,70E-02	7
Organismal Development	3,63E-04 - 4,11E-02	12
Renal and Urological System Development and Function	3,63E-04 - 2,69E-02	4

Tabla 17. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.8344A>G (GL)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Retinoate Biosynthesis I	7,57E-03	2/30 (0,067)
HGF Signaling	1,02E-02	3/102 (0,029)
Hereditary Breast Cancer Signaling	1,39E-02	3/119 (0,025)
Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cells	1,41E-02	2/40 (0,05)
Chondroitin and Dermatan Biosynthesis	1,8E-02	1/6 (0,167)

Top Molecules

Log Ratio up-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
ANK3	↑1,166	
LAMB3	↑1,047	
ST3GAL6	↑0,870	
ANPEP	↑0,822	
NT5E	↑0,800	
CORO2B	↑0,773	
TNFRSF19	↑0,744	
EPCAM	↑0,712	
ARG2 (includes EG:11847)	↑0,659	
EFHC1	↑0,657	

Log Ratio down-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
ANO1	↓-1,418	
FOXA1	↓-1,305	
RFC1	↓-1,255	
GPAM	↓-1,109	
RDH10	↓-0,978	
FLT1	↓-0,885	
AGTR1	↓-0,832	
ATP1A3	↓-0,816	
PDE7B	↓-0,755	
GEMIN6	↓-0,737	

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 18. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.8344A>G (GL)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,52	8,85E-03
ARG2	arginase, type II	1,57	2,54E-05
ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	-1,47	4,96E-04

MERRF (m.8344A>G) en condiciones oxidativas (OX)

En condiciones oxidativas se obtuvieron 1419 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 753 estaban sobreexpresados y 666 infraexpresados. Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways (IPA)*, se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 19. Principales redes asociadas a la mutación m.8344A>G (OX)

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cancer, Cardiovascular System Development and Function, Organ Morphology	30
2	Cellular Development, Cancer, Cellular Growth and Proliferation	28
3	Cell Death and Survival, Cell Signaling, Cardiovascular System Development and Function	26
4	Cellular Movement, Cancer, Cell Cycle	26
5	Cellular Movement, Cancer, Cell Morphology	24

Tabla 20. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.8344A>G (OX)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Gene Expression	1,48E-06 - 4,71E-02	175
Cell Cycle	3,43E-06 - 4,88E-02	111
Cellular Movement	3,43E-06 - 4,88E-02	110
Cellular Development	2,17E-04 - 4,88E-02	108
Cellular Growth and Proliferation	2,17E-04 - 4,88E-02	99
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Connective Tissue Development and Function	2,17E-04 - 4,88E-02	30
Tissue Development	1,23E-03 - 4,40E-02	64
Cardiovascular System Development and Function	1,49E-03 - 4,88E-02	47
Organismal Development	1,49E-03 - 4,88E-02	54
Embryonic Development	1,62E-03 - 4,23E-02	18

Tabla 21. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.8344A>G (OX)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Cholesterol Biosynthesis I	1,57E-05	7/13 (0,538)
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	1,57E-05	7/13 (0,538)
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	1,57E-05	7/13 (0,538)
Axonal Guidance Signaling	1,13E-03	46/430 (0,107)
Mevalonate Pathway I	1,23E-03	5/12 (0,417)

Top Molecules

Log Ratio up-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
SMAD7	↑2,106	
CDK15	↑1,757	
PPAPDC1A	↑1,743	
TGFB2	↑1,691	
KCNH1	↑1,666	
RUNX1T1	↑1,602	
DUSP10	↑1,565	
JHDM1D	↑1,542	
ANK3	↑1,498	
NEDD9	↑1,472	

Log Ratio down-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
FOS	↓-2,667	
RFC1	↓-2,646	
PPP1R10*	↓-2,578	
APLN	↓-2,238	
FABP4	↓-2,193	
PLAT	↓-2,164	
ANO1	↓-1,906	
LDLR	↓-1,875	
HSD17B2	↓-1,775	
ASF1B	↓-1,766	

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 22. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.8344A>G (OX)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
ERN1	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	1,29	4,53E-03
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	1,57	6,85E-05
DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	1,55	6,37E-05
CASP 4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	1,37	4,17E-03
CCNE1	cyclin E1	-1,93	1,65E-05
CCNE2	cyclin E2	-3,01	1,86E-09
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	-1,65	5,74E-04
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	1,39	5,66E-03
GSTM2	glutathione S-transferase mu 2 (muscle)	1,64	7,27E-04
CTH	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	1,89	2,89E-03
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	1,36	1,97E-04
GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	1,30	4,34E-03
GPR37	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	1,36	1,54E-03
PRKAA2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	1,61	1,77E-04
PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	1,93	4,05E-07
TSC2	tuberous sclerosis 2	1,42	1,88E-04
PIK3C3	phosphoinositide-3-kinase, class 3	1,31	1,60E-03
AKT1S1	AKT1 substrate 1 (proline-rich)	-1,46	6,90E-04
MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	-1,58	9,58E-05
PRR5L	proline rich 5 like	-1,48	3,67E-03
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	-2,00	7,28E-04
FASN	fatty acid synthase	-1,75	1,70E-04
CPT2	carnitine palmitoyltransferase 2	-1,92	1,26E-06
NDUFS6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	-1,65	1,92E-04
NDUFB6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	-1,50	1,41E-05
NDUFB3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3, 12kDa	-1,60	5,19E-04
UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	-1,50	3,24E-03
COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	-2,10	1,69E-03

7.2.2 Resultados de expresión en los híbridos MELAS (m.3243A>G)

A continuación se detallan los genes diferencialmente expresados obtenidos en híbridos portadores de la mutación m.3243A>G en las diferentes condiciones de cultivo estudiadas.

MELAS (m.3243A>G) en condiciones glicolíticas (GL)

En condiciones glicolíticas se obtuvieron 1715 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 825 estaban sobreexpresados y 890 infraexpresados.

Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways* (IPA), se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 23. Principales redes asociadas a la mutación m.3243A>G (GL)

Top Networks	
I D	Score
1 Gene Expression, Cellular Development, Cancer	29
2 Connective Tissue Development and Function, Tissue Development, Cardiovascular System Development and Function	29
3 Infectious Disease, Inflammatory Disease, Neurological Disease	27
4 Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Neurological Disease	27
5 Connective Tissue Disorders, Cancer, Reproductive System Disease	27

Tabla 24. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.3243A>G (GL)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	1,97E-05 - 4,61E-02	170
Cell Morphology	3,14E-04 - 4,49E-02	86
Gene Expression	4,13E-04 - 4,49E-02	203
Cellular Development	4,51E-04 - 4,61E-02	116
Cellular Growth and Proliferation	4,51E-04 - 4,61E-02	47
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Cardiovascular System Development and Function	1,56E-04 - 4,54E-02	75
Hematopoiesis	3,32E-04 - 2,39E-02	10
Immune Cell Trafficking	3,32E-04 - 4,49E-02	23
Skeletal and Muscular System Development and Function	4,51E-04 - 3,16E-02	38
Tissue Development	8,49E-04 - 4,55E-02	94

Tabla 25. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.3243A>G (GL)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	6,8E-04	25/140 (0,179)
Epoxyqualene Biosynthesis	8,48E-03	2/2 (1)
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	8,83E-03	39/311 (0,125)
Glycogen Degradation III	1,4E-02	4/12 (0,333)
PTEN Signaling	1,77E-02	18/131 (0,137)

Top Molecules

Log Ratio up-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
SRGN	↑4,934	
F2RL2	↑2,580	
FST	↑2,557	
LOC730755 (includes others)*	↑2,416	
MME	↑2,397	
SEMA5A	↑2,277	
FMN2	↑2,276	
EBF1	↑2,065	
HIST1H4A (includes others)*	↑1,998	
NEGR1	↑1,931	

Log Ratio down-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
SULF2	↓-4,529	
CKMT1A/CKMT1B*	↓-3,723	
IL1B	↓-3,632	
TINAGL1	↓-3,581	
BCOR	↓-3,544	
IL1A	↓-3,391	
TIMP3*	↓-3,230	
PDE7B	↓-3,101	
GSTM1	↓-3,042	
TLR4	↓-2,931	

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 26. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.3243A>G (GL)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
PRKAA2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	1,45	2,97E-03
ACACA	acetyl-CoA carboxylase alpha	-1,58	3,04E-03
ARG2	arginase, type II	1,98	6,38E-09
BCL2L1	BCL2-like 1	1,47	9,42E-04
BCL2L2	BCL2-like 2	1,65	2,45E-04
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	-1,52	3,32E-04
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	1,79	1,21E-06

MELAS (m.3243A>G) en condiciones oxidativas (OX)

En condiciones oxidativas se obtuvieron 2518 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 886 estaban sobreexpresados y 1632 infraexpresados.

Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways* (IPA), se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 27. Principales redes asociadas a la mutación m.3243A>G (OX)

Top Networks	
I Associated Network Functions	Score
D	
1 Cancer, Neurological Disease, Hematological Disease	30
2 Cellular Assembly and Organization, Developmental Disorder, Hereditary Disorder	26
3 Connective Tissue Disorders, Dermatological Diseases and Conditions, Gastrointestinal Disease	26
4 Cell Morphology, Endocrine System Development and Function, Lipid Metabolism	24
5 Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance	22

Tabla 28. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.3243A>G (OX)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Gene Expression	1,25E-07 - 4,70E-02	332
Cellular Movement	5,33E-07 - 3,86E-02	239
Cell Death and Survival	6,96E-06 - 4,70E-02	384
Cell Morphology	4,06E-05 - 4,53E-02	91
Cell Cycle	2,94E-04 - 4,70E-02	195
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Tissue Morphology	2,87E-05 - 4,53E-02	57
Skeletal and Muscular System Development and Function	9,84E-05 - 4,53E-02	57
Cardiovascular System Development and Function	9,86E-05 - 4,70E-02	98
Organismal Development	2,01E-04 - 4,53E-02	80
Tissue Development	8,12E-04 - 4,70E-02	133

Tabla 29. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.3243A>G (OX)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1,62E-04	41/187 (0,219)
TNFR1 Signaling	1,93E-04	16/51 (0,314)
PPAR Signaling	4,22E-04	24/100 (0,24)
Estrogen-mediated S-phase Entry	4,96E-04	10/27 (0,37)
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	1,05E-03	10/26 (0,385)

Top Molecules		
Log Ratio up-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
MMP3	↑4,248	
SRGN	↑3,853	
LOC730755 (includes others)*	↑3,039	
IL13RA2	↑2,741	
PRDM1	↑2,596	
MME	↑2,554	
F2RL2	↑2,531	
NOG	↑2,519	
ADAMTS1	↑2,318	
FST	↑2,070	

Log Ratio down-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
CKMT1A/CKMT1B*	↓-3,758	
TIMP3*	↓-3,609	
SULF2	↓-3,546	
GDF15	↓-3,394	
BCOR	↓-3,361	
PLTP	↓-3,292	
TINAGL1	↓-3,214	
CDH6	↓-3,065	
IL1B	↓-3,024	
COL6A3	↓-2,997	

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 30. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.3243A>G (OX)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
PRKAA2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	1,38	8,52E-03
PIK3C3	phosphoinositide-3-kinase, class 3	1,44	4,22E-05
FASN	fatty acid synthase	-2,09	2,01E-06
ACACA	acetyl-CoA carboxylase alpha	-1,69	8,02E-04
CPT2	carnitine palmitoyltransferase 2	-1,86	3,09E-06
ARG2	arginase, type II	2,03	2,19E-09
ASS1	argininosuccinate synthase 1	-2,24	2,75E-04
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	1,67	3,85E-05
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	-7,76	2,01E-15
GSTM2	glutathione S-transferase mu 2 (muscle)	-2,66	5,07E-09
GSTM3	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	-1,78	3,09E-05
GSTM4	glutathione S-transferase mu 4	-1,73	1,21E-06
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	-1,82	4,39E-03
CCNE1	cyclin E1	-1,60	1,41E-03
CCNA1	cyclin A1	-3,37	1,71E-09
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	-1,55	2,49E-03
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	-1,68	6,36E-06
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	-2,02	1,45E-03
DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	-3,70	1,13E-10
EIF2AK3	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	-1,98	4,19E-09
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1,54	3,07E-05
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,55	5,87E-03
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	1,82	5,30E-07
MBIP	MAP3K12 binding inhibitory protein 1	1,79	1,39E-04
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	-1,68	6,36E-06
JKAMP	JNK1/MAPK8-associated membrane protein	1,47	2,01E-03
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene	1,63	2,93E-03
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	1,97	4,62E-08
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	1,51	1,26E-03
BCL2L2	BCL2-like 2	1,52	1,60E-03
BCL2A1	BCL2-related protein A1	1,49	8,53E-03
UQCRB	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	1,60	8,24E-04
NDUFV3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3	-1,34	5,79E-03
NDUFB6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	-1,31	2,84E-03

7.2.3 Resultados de expresión en los híbridos con mutación en MT-ND6 (m.14487T>C)

A continuación se exponen los genes diferencialmente expresados obtenidos en híbridos portadores de la mutación m.14487T>C en las diferentes condiciones de cultivo estudiadas.

ND6 (m.14487T>C) en condiciones glicolíticas (GL)

En condiciones glicolíticas, se obtuvieron 336 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 213 estaban sobreexpresados y 123 infraexpresados.

Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways* (IPA), se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 31. Principales redes asociadas a la mutación m.14487T>C (GL)

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cell Death and Survival, Tumor Morphology, Cardiovascular System Development and Function	34
2	Cancer, Ophthalmic Disease, Embryonic Development	34
3	Cellular Movement, Cardiovascular System Development and Function, Organismal Development	25
4	Cancer, RNA Post-Transcriptional Modification, Reproductive System Disease	21
5	Cellular Movement, Cell Cycle, Infectious Disease	21

Tabla 32. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.14487T>C (GL)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Development	1,67E-05 - 3,74E-02	51
Cellular Growth and Proliferation	1,67E-05 - 3,74E-02	71
Cell Death and Survival	2,38E-05 - 3,74E-02	68
Cellular Movement	2,43E-05 - 3,74E-02	46
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	7,21E-04 - 3,74E-02	28
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Cardiovascular System Development and Function	9,10E-06 - 3,74E-02	25
Organismal Development	9,10E-06 - 3,74E-02	24
Tissue Development	1,67E-05 - 3,74E-02	35
Connective Tissue Development and Function	2,22E-03 - 3,74E-02	13
Hematological System Development and Function	2,29E-03 - 3,74E-02	17

Tabla 33. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.14487T>C (GL)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	3,7E-03	8/141 (0,057)
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	4,43E-03	8/140 (0,057)
Cardiac β -adrenergic Signaling	9,47E-03	7/137 (0,051)
cAMP-mediated signaling	1,68E-02	9/214 (0,042)
tRNA Splicing	1,69E-02	3/34 (0,088)

Top Molecules

Log Ratio up-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
SPP1 (includes EG:100359743)	↑2,135	
CDH11	↑1,895	
HTR1F	↑1,578	
VCAN	↑1,501	
AMPH	↑1,394	
LGR5	↑1,389	
CDCP1	↑1,293	
NCAM1	↑1,253	
ACTA2	↑1,225	
PDE10A	↑1,211	

Log Ratio down-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
DLL4	↓1,389	
IL8	↓1,386	
GABBR2	↓1,354	
SLC7A11	↓1,272	
TBXAS1	↓1,252	
JUP	↓1,198	
SAT1	↓1,178	
GIPC3	↓1,172	
CLEC2B	↓1,134	
HIST2H2BE (includes others)	↓1,059	

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 34. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.14487T>C (GL)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
GSTA4	glutathione S-transferase alpha 4	1,97	8,11E-05
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	1,89	1,13E-03
GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	1,66	1,80E-03
SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	2,21	3,76E-03

ND6 (m.14487T>C) en condiciones oxidativas (OX)

En condiciones oxidativas, se obtuvieron 330 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 168 estaban sobreexpresados y 162 infraexpresados. Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el software *Ingenuity Pathways* (IPA), se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 35. Principales redes asociadas a la mutación m.14487T>C (OX)

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cell-mediated Immune Response, Cellular Development, Cellular Function and Maintenance	40
2	Cardiovascular Disease, Cell Death and Survival, Cellular Assembly and Organization	33
3	Tissue Morphology, Cellular Movement, Organismal Development	31
4	Cancer, Gastrointestinal Disease, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	17
5	Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair, Cancer	15

Tabla 36. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.14487T>C (OX)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Development	2,37E-04 - 4,93E-02	33
Cellular Growth and Proliferation	2,37E-04 - 4,98E-02	31
Cell Morphology	3,24E-04 - 4,53E-02	22
DNA Replication, Recombination, and Repair	3,24E-04 - 4,53E-02	8
Energy Production	3,24E-04 - 1,80E-02	3
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Connective Tissue Development and Function	2,37E-04 - 3,58E-02	14
Visual System Development and Function	3,24E-04 - 3,58E-02	3
Hematological System Development and Function	3,38E-04 - 4,53E-02	15
Immune Cell Trafficking	3,38E-04 - 4,53E-02	15
Tissue Development	3,38E-04 - 4,53E-02	27

Tabla 37. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.14487T>C (OX)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
TR/RXR Activation	1,45E-04	8/89 (0,09)
IGF-1 Signaling	3,38E-04	8/102 (0,078)
Growth Hormone Signaling	1,39E-03	6/71 (0,085)
PI3K Signaling in B Lymphocytes	1,56E-03	8/128 (0,062)
VDR/RXR Activation	2,82E-03	6/79 (0,076)

Top Molecules

Log Ratio up-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
VCAN	↑2,654	
SPP1 (includes EG:100359743)	↑1,867	
HTR1F	↑1,729	
CDH11	↑1,694	
AMPH	↑1,514	
CDCP1	↑1,511	
SLC8A1	↑1,502	
NCAM1	↑1,445	
PDE10A	↑1,353	
RGS4	↑1,265	

Log Ratio down-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
PPARGC1A	↓-1,434	
HIST1H4A (includes others)*	↓-1,286	
FOSB	↓-1,284	
TGM2 (includes EG:21817)	↓-1,202	
FOS	↓-1,201	
EGR1	↓-1,156	
ADAMTS2	↓-1,147	
LIPG	↓-1,121	
TBXAS1	↓-1,105	
CD96	↓-1,090	

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 38. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.14487T>C (OX)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
GSTA4	glutathione S-transferase alpha 4	1,54	8,49E-03
HMOX1	heme oxygenase 1	1,78	6,23E-03
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	1,32	6,70E-03
SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	2,83	2,18E-04
ATP2B4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	1,85	3,97E-03
CAMK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	1,43	7,68E-03
NDUFB6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	1,26	8,03E-03

7.2.4 Resultados de expresión en los híbridos con mutación en ATP6 (m.8993T>G)

A continuación se exponen los genes diferencialmente expresados obtenidos en los híbridos portadores de la mutación m.8993T>G en las diferentes condiciones de cultivo estudiadas.

ATP6 (m.8993T>G) en condiciones glicolíticas (GL)

En condiciones glicolíticas, se obtuvieron 325 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 164 estaban sobreexpresados y 161 infraexpresados.

Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways* (IPA), se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 39. Principales redes asociadas a la mutación m.8993T>C (GL)

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cellular Movement, Cell Death and Survival, Cell Morphology	38
2	Cell Death and Survival, Embryonic Development, Organismal Development	35
3	Cancer, Connective Tissue Disorders, Dermatological Diseases and Conditions	15
4	Cellular Movement, Cancer, Gastrointestinal Disease	15
5	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Developmental Disorder, Gastrointestinal Disease	15

Tabla 40. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.8993T>G (GL)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	3,62E-05 - 4,90E-02	45
Cellular Development	3,03E-04 - 3,63E-02	50
Cellular Growth and Proliferation	3,03E-04 - 3,63E-02	46
Cell Death and Survival	1,12E-03 - 4,04E-02	56
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	2,19E-03 - 3,55E-02	19
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Tissue Development	2,19E-03 - 4,38E-02	25
Hematological System Development and Function	3,08E-03 - 3,55E-02	5
Cardiovascular System Development and Function	3,39E-03 - 4,38E-02	18
Embryonic Development	6,31E-03 - 4,90E-02	17
Organ Development	6,31E-03 - 4,38E-02	12

Tabla 41. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.8993T>C (GL)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Eicosanoid Signaling	3,45E-03	5/61 (0,082)
γ -linolenate Biosynthesis II (Animals)	3,78E-03	3/18 (0,167)
VDR/RXR Activation	1,29E-02	5/79 (0,063)
Glutamate Removal from Folates	1,79E-02	1/1 (1)
Stearate Biosynthesis I (Animals)	1,91E-02	3/33 (0,091)

Top Molecules

Log Ratio up-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
LAYN	↑1,345	
TM4SF18	↑1,252	
GATM	↑1,232	
MMP16*	↑1,151	
CA12	↑0,992	
DOK5	↑0,991	
HSD17B12	↑0,946	
AKR1C3	↑0,888	
PREX2	↑0,860	
FBXL2	↑0,847	

Log Ratio down-regulated

Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
GDF15	↓-2,560	
IGFBP5	↓-2,334	
SRGN	↓-1,937	
CALB2	↓-1,721	
S100A2	↓-1,623	
IL2RB	↓-1,296	
SPOCK1	↓-1,247	
EPHB6	↓-1,240	
SERPIND1	↓-1,114	
PLEK2	↓-1,086	

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 42. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.8993T>C (GL)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
ATM	ataxia telangiectasia mutated	1,41	4,21E-03
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	1,35	7,37E-03
BCL2L1	BCL2-like 1	-1,44	1,57E-03
CA12	carbonic anhydrase XII	1,98	2,55E-03
NAPRT1	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	1,54	1,37E-04
GPX7	glutathione peroxidase 7	1,49	5,53E-03

ATP6 (m.8993T>G) en condiciones oxidativas (OX)

En condiciones oxidativas, se obtuvieron 369 genes diferencialmente expresados, de los cuales, 148 estaban sobreexpresados y 221 infraexpresados.

Una vez realizado el análisis de los datos utilizando el *software Ingenuity Pathways* (IPA), se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 43. Principales redes asociadas a la mutación m.8993T>C (OX)

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Cancer, Connective Tissue Disorders, Hematological Disease	38
2	Skeletal and Muscular System Development and Function, Tissue Morphology, Organ Morphology	35
3	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hair and Skin Development and Function	31
4	Immunological Disease, Cancer, Hematological Disease	27
5	Cellular Development, Skeletal and Muscular System Development and Function, Cancer	20

Tabla 44. Funciones biológicas alteradas en presencia de la mutación m.8993T>G (OX)

Top Bio Functions		
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	1,24E-10 - 2,15E-02	61
Cellular Development	1,15E-08 - 2,15E-02	81
Cellular Growth and Proliferation	7,54E-07 - 2,15E-02	87
Cell Death and Survival	3,48E-05 - 2,15E-02	77
Cell Cycle	6,89E-05 - 2,15E-02	28
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Tissue Morphology	2,68E-06 - 2,15E-02	22
Cardiovascular System Development and Function	2,38E-04 - 2,15E-02	26
Hair and Skin Development and Function	4,62E-04 - 2,15E-02	16
Connective Tissue Development and Function	1,06E-03 - 2,15E-02	11
Hematological System Development and Function	2,16E-03 - 2,15E-02	23

Tabla 45. Vías canónicas alteradas en presencia de la mutación m.8993T>C (OX)

Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
VDR/RXR Activation	4,36E-05	9/79 (0,114)
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	1,79E-03	6/63 (0,095)
GDP-glucose Biosynthesis	4,43E-03	2/6 (0,333)
Glucose and Glucose-1-phosphate Degradation	6,54E-03	2/7 (0,286)
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	7,54E-03	7/115 (0,061)

Top Molecules		
Log Ratio up-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
RUNX1T1	↑1,155	
LPAR1	↑1,139	
PCDH18	↑1,117	
TM4SF18	↑1,106	
CA12	↑1,045	
COL12A1	↑0,978	
ADAMTS2	↑0,976	
LAYN	↑0,919	
AR	↑0,900	
ADM	↑0,894	
Log Ratio down-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
IGFBP1	↓1,865	
CALB2	↓1,820	
SRGN	↓1,647	

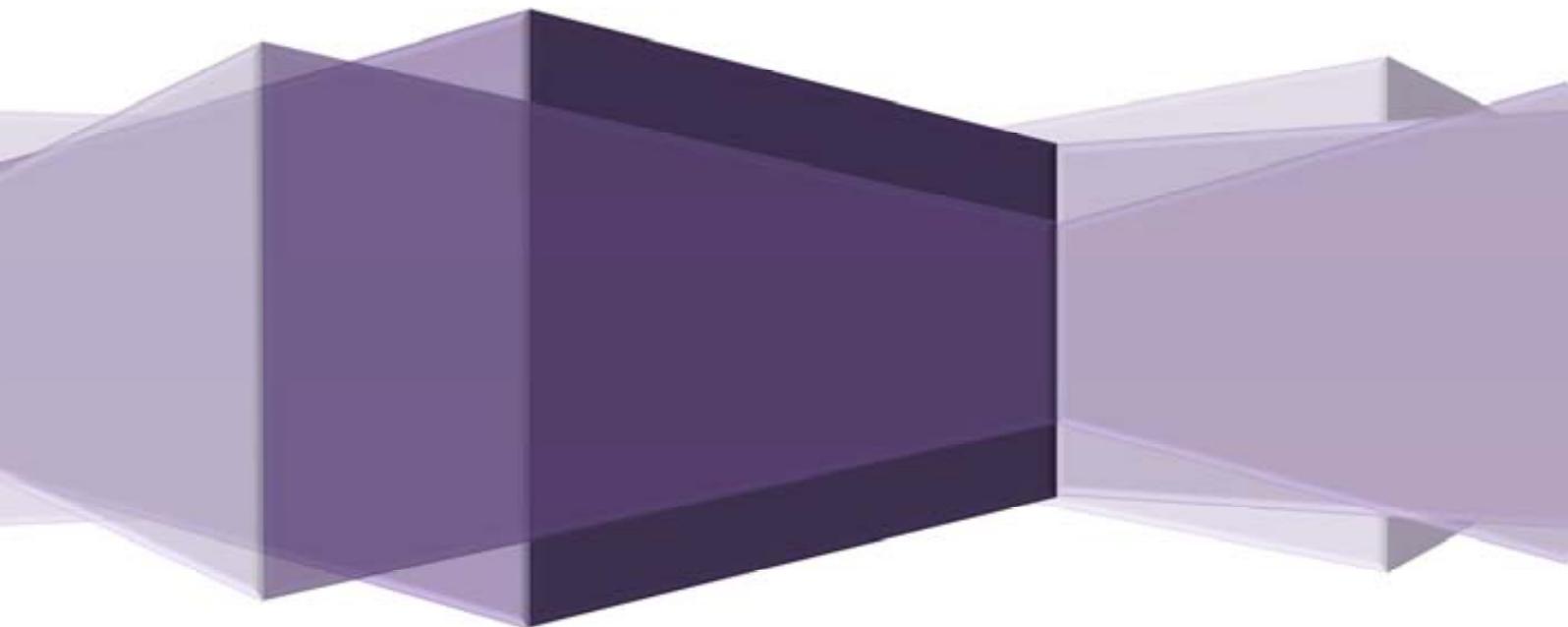
STC1	↑1,617
S100A2	↑1,609
GDF15	↑1,409
TAGLN3	↑1,360
IGFBP3	↑1,321
IGFBP5	↑1,320
CDKN1A	↑1,315

A partir de las vías canónicas alteradas se han seleccionado aquellos genes con posible implicación en la fisiopatología de la mutación.

Tabla 46. Genes con posible implicación en la fisiopatología de la m.8993T>C (OX)

SYMBOL	GENE NAME	FC	P. VALUE
ATM	ataxia telangiectasia mutated	1,41	4,21E-03
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A	1,35	6,03E-03
BCL2L1	BCL2-like 1	-1,41	2,94E-03
CA12	carbonic anhydrase XII	2,06	1,56E-03
NAPRT1	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	1,33	8,07E-03

Discusión



En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por intentar comprender las consecuencias y las respuestas adaptativas en los desórdenes del sistema OXPHOS. Sin embargo a pesar del aumento de los conocimientos acerca de la fisiopatología mitocondrial, los mecanismos moleculares que provocan afectación celular en los desórdenes mitocondriales no son totalmente conocidos. Una de las limitaciones al tratar de esclarecer la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales radica en el hecho que existen resultados dispares de la expresión de los genes implicados en los defectos del sistema OXPHOS [144]. Entre los factores que explican esta diversidad en los perfiles de expresión destacan los diferentes modelos celulares o muestras de tejidos utilizados, diferencias en el diseño experimental realizado y diferencias en el *background* genético del modelo utilizado [144]. Para obtener un mejor entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales, la expresión de los genes tanto nucleares como mitocondriales necesita ser evaluada de manera holística, es decir, teniendo en cuenta los procesos de señalización, los metabolitos involucrados y en modelos de patología mitocondrial bien definidos.

En el presente trabajo hemos tenido en cuenta todos estos factores para intentar esclarecer los mecanismos moleculares que provocan afectación celular en los desórdenes mitocondriales provocados por las cuatro mutaciones en el ADN mitocondrial estudiadas.

Se ha utilizado como modelo de estudio líneas celulares de cíbridos transmitocondriales (con un *background* genético de célula de osteosarcoma 143B), un modelo bien definido, muy utilizado en el estudio de enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt, en el que la única diferencia entre el cíbrido WT y el mutado es la presencia de mutación en el ADNmt lo que permite asociar las diferencias observadas a la presencia de la mutación. En algunos casos no es posible obtener el control isogénico de la mutación, en estos casos se utiliza como control cíbridos del mismo haplogrupo mitocondrial. Los cíbridos se han generado a partir de plaquetas de pacientes o bien a partir de cíbridos que tenían un número elevado de divisiones. Los cíbridos como líneas tumorales que son pueden presentar reorganizaciones cromosómicas hecho que podía hacer que el *background* nuclear entre los cíbridos WT y mutados fuera diferente [136].

Por esta razón se decidió obtener cíbridos, a partir de cíbridos existentes y así obtener cíbridos con el mismo *background* nuclear.

Se han estudiado cíbridos con 4 mutaciones distintas del ADNmt, dos que afectan a ARNt como son: m.8344A>G en MT-TK y m.3243A>G en MT-TL1 que causan dos de los síndromes mitocondriales más frecuentes como son el síndrome MERRF (*Myoclonus epilepsy and ragged-red fibers*) y MELAS (*Mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis and stroke-like episodes*) respectivamente, y dos mutaciones que afectan a subunidades de los complejos del sistema OXPHOS como son: m.14487T>C en MT-ND6 que afecta a la subunidad ND6 del complejo I que causa distonía y necrosis bilateral del estriado y m.8993T>G en MT-ATP6 que afecta a la subunidad ATP6 del complejo V y produce el síndrome NARP/MILS (*neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa/maternally inherited Leigh's syndrome*).

En el caso de las mutaciones m.8344A>G y m.3243A>G se pudo obtener un control isogénico de la mutación, cíbridos generados por la fusión con plaquetas del mismo paciente en los que se consiguió obtener cíbridos 100% WT (ninguna molécula de ADNmt era portadora de la mutación) y cíbridos 100% mutados (todas las moléculas de ADNmt tenían la mutación). En el caso de las mutaciones m.14487T>C y m.8993T>G no se consiguió obtener cíbridos con 0% de mutación del mismo paciente por lo que se utilizaron cíbridos sin mutaciones en el ADNmt pero del mismo haplogrupo mitocondrial que el cíbrido mutado para minimizar al máximo las diferencias en las secuencias del ADNmt. Se secuenció el ADNmt de los cíbridos generados; en los cíbridos con control isogénico la única diferencia entre los cíbridos mutados y sus controles isogénicos era la mutación de estudio. En el caso de los cíbridos que tenían control de haplogrupo las diferencias que presentaban entre ellos era la mutación de estudio y polimorfismos descritos sin efecto patogénico.

Además se confirmó el porcentaje de mutación por RFLP y también se cuantificó el número de copias de ADNmt para comprobar que los cíbridos mutados y WT tenían un número de copias de ADNmt similar y las diferencias de los resultados obtenidos se debían a la mutación y no al diferente número de copias de ADNmt.

Habitualmente estas células se cultivan en un medio con alta concentración de glucosa, donde la obtención de energía es fundamentalmente vía glicolítica [112]. En estas condiciones de cultivo incluso una célula carente de un sistema OXPHOS funcional, como ocurre en las células p^0 es perfectamente viable. Sin embargo, en este medio de cultivo con alta concentración de glucosa, el fenotipo de estas mutaciones puede quedar parcialmente enmascarado ya que la principal fuente de obtención de energía de estas células en este medio es la glicolisis. Por este motivo se planteó la utilización de unas condiciones de cultivo que manifestasen el defecto en el sistema OXPHOS.

Inicialmente se pensó utilizar el medio de cultivo que se usa normalmente para estudiar la posible patogenicidad de una mutación en el ADNmt: DMEM 1 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 μ g/ml uridina, 2 mM glutamina y 10% SFB dializado [112]. Estas condiciones de cultivo son óptimas para manifestar defectos en el sistema OXPHOS puesto que obligan a la célula a la utilización de la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP [112], pero en algunas mutaciones (en ARNt) las células dejan de ser viables a las pocas horas, lo que impide estudiar el defecto en el sistema OXPHOS en células viables. Por esta razón se decidió establecer unas nuevas condiciones de cultivo que manifestaran el déficit, por severo que fuera, del sistema OXPHOS pero que a la vez la célula mantuviera su viabilidad, aportando información relevante sobre los mecanismos patológicos de la mutación.

Las nuevas condiciones de cultivo debían contener glucosa a muy baja concentración para prevenir la obtención de grandes cantidades de ATP vía glicolítica (como ocurre en el medio GL) y de ese modo forzar la utilización de la fosforilación oxidativa, pero al mismo tiempo debían aumentar la capacidad de obtención de ATP respecto al medio formado por galactosa como principal substrato energético, ya fuera mediante la glicólisis o la fosforilación oxidativa. Por ese motivo se decidió utilizar diferentes combinaciones de galactosa y glucosa, esta última a muy baja concentración, 0.25 y 0.5 g/L (OX y OX 0.5 respectivamente).

Los resultados del estudio con células ρ^0 evidenciaron que a partir del cuarto día las células presentaban una morfología anómala y a los tres días un crecimiento constante y menor en el medio OX, por ello se estableció como modelo experimental el cultivo de las distintas líneas celulares en el medio oxidativo (OX); DMEM 0,25 g glucosa/L-0,75 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 μ g/ml uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado, durante tres días, condiciones de cultivo que eran capaces de mantener la viabilidad celular.

Para comprobar que el cultivo de los híbridos durante 3 días en medio OX manifestaba el déficit en el sistema OXPHOS se realizó la determinación del contenido de ATP. En condiciones glicolíticas los híbridos con mutaciones en ARNt (m.3243A>G, m.8344A>G) presentaron una disminución en el contenido de ATP siendo significativa esta disminución únicamente en el caso de la mutación m.8344A>G.

Sin embargo en condiciones oxidativas estos híbridos mostraron una mayor y significativa disminución en el contenido de ATP (79,98% en m.3243A>G y 96,77% en m.8344A>G) demostrando que el medio oxidativo no permitía la obtención de cantidades considerables de ATP vía glicolítica viéndose obligada la célula a utilizar el sistema OXPHOS para la obtención de ATP. Este hecho junto la disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial así como un mayor incremento en el lactato intracelular ponía en evidencia que en las condiciones establecidas, el medio OX era capaz de expresar el defecto en el sistema OXPHOS.

Una vez establecido el modelo experimental, la aproximación inicial era realizar estudios de expresión en los híbridos generados en condiciones glicolíticas y oxidativas mediante RT-PCR de genes implicados en la función mitocondrial. La realización de este experimento tenía como objetivo la caracterización transcripcional de posibles mecanismos compensatorios en presencia de las diferentes mutaciones del ADNmt. Una vez valorados los resultados obtenidos no se observó la presencia de mecanismos compensatorios claros que nos ayudaran a comprender la respuesta tanto mitocondrial como nuclear ante las diferentes mutaciones. Este hecho nos impidió obtener información relevante acerca de la fisiopatología de los defectos mitocondriales estudiados.

Uno de los mecanismos compensatorios que queríamos evaluar era la posible activación de la expresión de genes implicados en el proceso de biogénesis mitocondrial, fenómeno que consiste en la activación de una respuesta transcripcional que implica la sobreexpresión de coactivadores transcripcionales como PGC1A, PGC1B necesarios para la expresión de factores de transcripción como NRF-1 y NRF-2 encargados de activar la expresión de genes esenciales para la funcionalidad mitocondrial como subunidades del sistema OXPHOS, así como genes esenciales para realizar la replicación, la transcripción del ADNmt y la traducción mitocondrial. Curiosamente no se observó inducción de biogénesis mitocondrial en ninguna de las cuatro mutaciones estudiadas, en particular sorprendió no encontrar esta respuesta transcripcional en las mutaciones que afectan a ARNt con una mayor depleción en el contenido de ATP, como mecanismo compensatorio. Sí se observó la sobreexpresión aislada de algunos de los genes implicados en este proceso pero no de una manera coordinada con otros muchos genes como exige un proceso complejo como la biogénesis mitocondrial.

Una posible explicación a este fenómeno podría deberse al hecho de que los híbridos estudiados presentan la mutación en todas las copias de las moléculas de ADNmt y por lo tanto aumentar el nivel de mitocondrias defectuosas a través de la inducción de la biogénesis mitocondrial no corregiría el defecto, tal y como observaron Wenz y colaboradores [145].

En el estudio mediante RT-PCR sí que se observaron cambios significativos de expresión en determinados genes, pero eran cambios aislados de difícil interpretación.

Debido a que los resultados obtenidos mediante RT-PCR no aportaron información relevante acerca de la fisiopatología de los defectos mitocondriales estudiados se intentó una aproximación más global mediante experimentos de microarray. Posteriormente gracias al *software Ingenuity Pathways (IPA)*, se situaron los genes diferencialmente expresados en los diferentes procesos celulares donde intervienen.

A partir de la información obtenida mediante el IPA junto con una intensa búsqueda bibliográfica se realizó una selección de genes con una posible implicación en la fisiopatología de la mutación y que a diferencia del experimento mediante RT-PCR ha aportado información acerca de la fisiopatología de los defectos mitocondriales estudiados, como se muestra a continuación.

En este trabajo se han estudiado las mutaciones en el ADNmt de una manera global, analizando diferentes parámetros que pudieran ser de utilidad a la hora de intentar determinar sus mecanismos fisiopatológicos.

En el caso de la mutación más común del síndrome MERRF m.8344A>G que afecta al MT-TK se observó como en condiciones glicolíticas estaban alterados pocos de los parámetros estudiados para valorar la función mitocondrial. Entre ellos destacaba, la disminución significativa del contenido de ATP de un 49,34% así como un incremento significativo del 62% en la concentración de lactato intracelular respecto su cíbrido control. Estos resultados indicaban que existía un defecto en el funcionamiento de la fosforilación oxidativa, pero en estas condiciones de cultivo donde hay un exceso de glucosa en el medio y se puede obtener ATP vía glicolítica el cíbrido no presentaba alteraciones respecto a parámetros como el crecimiento celular, el contenido de nucleótidos de adenina o el potencial de membrana mitocondrial, lo que sugería que la homeostasis celular en estas condiciones esta preservada, como lo demostraba el hecho que los cíbridos MERRF en condiciones glicolíticas eran perfectamente viables durante todo el tiempo que se mantenían en cultivo.

En condiciones glicolíticas se encontraron 70 genes diferencialmente expresados. Entre ellos destacaba la sobreexpresión del gen **CDKN1A** cuya proteína p21 está altamente controlada por p53, interviniendo en la parada en la fase G1 del ciclo celular en respuesta a una variedad de estímulos estresantes. La proteína p21, se une e inhibe la actividad de los complejos ciclina-CDK2 o CDK4 realizando una esencial regulación del crecimiento, supervivencia y papel antiapoptotico en muchos tipos de células humanas. CDKN1A también presenta un papel regulatorio en la reparación de daños en el ADN nuclear y mitocondrial [113].

Otro gen sobreexpresado fue el **ARG2**, que codifica la enzima arginasa-2 mitocondrial. Su principal función es la de producir ornitina a partir de arginina. La arginina juega un importante papel fisiológico en la síntesis de otras poliaminas como el óxido nítrico y la creatina [124].

Finalmente observamos la infraexpresión del gen **ALDH1A3**, que codifica la aldehído dehidrogenasa 6, enzima implicado en la detoxificación de aldehídos generados por peroxidación lipídica.

En cambio en condiciones oxidativas en presencia de la mutación m.8344A>G, observamos la alteración de muchos de los parámetros estudiados. Entre ellos destacaba, una disminución significativa del crecimiento celular, una depleción drástica del contenido de ATP celular de un 96,77% (muy similar a la observada en ρ^0) así como un incremento significativo del 149% en la concentración de lactato intracelular respecto su cúbido control. También observamos una disminución significativa del contenido de nucleótidos de adenina así como del potencial de membrana mitocondrial. Un parámetro que deriva de la determinación del contenido de nucleótidos de adenina es la carga energética de adenilato; cuando su valor es inferior a 0,6 indica que se está produciendo una degradación de nucleótidos de adenina, viéndose seriamente afectada la viabilidad celular [138]. En el caso de los cúbidos con la mutación m.8344A>G en condiciones oxidativas ese valor fue de 0,41.

En condiciones oxidativas se encontraron 1419 genes diferencialmente expresados. Entre los genes sobreexpresados en estas condiciones destacaba el gen **ERN1 (IRE1)**. La proteína codificada por este gen es la *endoplasmatic reticulum to nucleus signaling 1*. Esta proteína tiene actividad kinasa y endoribonucleasa y es uno de los tres sensores localizados en la membrana del RE (retículo endoplasmático), junto con EIF2AK3/PERK y ATF6 implicados en la señalización de UPR (*unfolded protein response*) como consecuencia al estrés del RE.

La UPR es una respuesta molecular que intenta restablecer la capacidad de plegamiento de las proteínas del RE. Sin embargo, un severo o prolongado estrés del RE, puede promover la activación de la vía pro-apoptótica ERN1-TRAF2-JNK [146] (Figura 19).

ERN1 activo puede formar un complejo con la proteína adaptadora TRAF2, facilitando la activación de la *apoptosis signaling kinase 1* (ASK1) lo que provoca la activación de JNK, por lo tanto acoplado el estrés del RE con la señalización MAPK. Además de la sobreexpresión de ERN1 también se observó sobreexpresión de **JNK1** (MAPK8) lo que sugiere la posible activación de la vía pro-apoptótica ERN1-TRAF2-JNK.

La activación prolongada de ERN1 también provoca degradación selectiva de ARNm asociados a RE, a través de un proceso denominado *regulated Ire1a-dependent decay*; RIDD (Figura 19). El cual promueve la apoptosis por degradación de ARNms que codifican proteínas esenciales para la supervivencia celular [146]. Otro indicio del posible estrés que sufre el RE es la sobreexpresión del gen **GPR37** (PAELR). Se ha descrito que cuando este receptor huérfano es sobreexpresado experimentalmente, las moléculas de GPR37 tienden a no plegarse y a formarse complejos insolubles, los cuales se acumulan en el RE, provocando estrés en el RE pudiendo inducir muerte celular [147]. También se encontró como marcador de estrés del RE la sobreexpresión del gen **DNAJB2**, que codifica la chaperona HSP 40. Además también se observó sobreexpresión de la caspasa iniciadora **CASP 4** la cual puede ser activada por la vía estrés del RE-ERN1-TRAF2 [148].

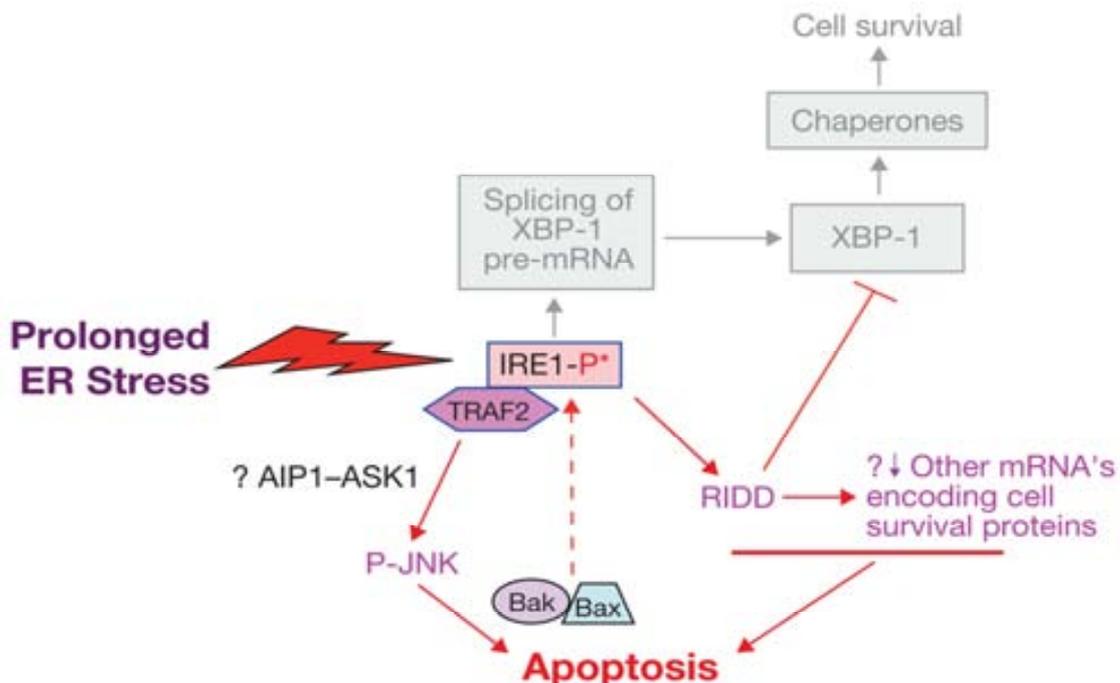


Fig.19 Representación de la activación de la vía pro-apoptótica ERN1-TRAF2-JNK y ERN1-RIDD.

Respecto a la expresión de genes implicados en el ciclo celular se observó la infraexpresión de genes esenciales para la transición G1/S como **CCNE1**, **CCNE2** y **CDC25A** lo cual sugiere una posible disminución de la proliferación celular, hecho que está en concordancia con la disminución significativa del crecimiento celular.

También se encontró la sobreexpresión de genes implicados en la protección celular frente a las especies reactivas de oxígeno, como **GCLC**, el primer enzima limitante en la síntesis de glutatión, **GSTM2** enzima implicado en la detoxificación de compuestos electrofílicos, productos del estrés oxidativo por conjugación con glutatión, **CTH** codifica para un enzima citoplasmático encargado de la síntesis de glutatión y **G6PD** uno de los principales enzimas capaces de sintetizar NADPH, el cual es necesario para un correcto funcionamiento del sistema antioxidante.

Además también se observó disminución de la expresión de **GPX3** enzima encargado de la reducción mediante glutatión de los lípidos que sufren peroxidación.

Cabe destacar la sobreexpresión de genes que codifican proteínas que participan en la vía de señalización AMPK, como **PRKAA2**, subunidad catalítica de la proteína kinasa activada por AMP, **PRKAB2**, subunidad reguladora de la proteína kinasa activada por AMP. AMPK es una proteína kinasa que actúa como sensor energético jugando un papel clave en la regulación del metabolismo energético celular. Una de las dianas de AMPK es el gen **TSC2**, que también se encontró sobreexpresado, que codifica la proteína *tuberous sclerosis 2*. TSC2 forma complejo con TSC1 y cuando es fosforilado por AMPK induce una rápida supresión de la actividad de mTORC1. Estos resultados indicarían que posiblemente AMPK está inhibiendo a mTORC1 a través de la vía de señalización TSC1/2- Rheb [149], lo que provocaría la inducción de la autofagia celular [150]. Además se ha encontrado la sobreexpresión del gen **PIK3C3**, subunidad catalítica de la PI3K tipo 3, que ejerce un papel esencial en el proceso de autofagia, al ser necesaria para la correcta formación de autofagosomas funcionales [151]. En relación a la posible disminución de la vía de señalización mTOR, se encontró disminución de la expresión de la subunidad de mTORC1, **AKT1S1** así como de las subunidades de mTORC2 como **MAPKAP1** y **PRR5L**.

La posible activación de AMPK, que se deduce de los resultados de expresión, es muy probable en una situación como esta, donde existe una gran depleción del contenido de ATP, uno de los principales estímulos que provoca su activación. Además estudios realizados por Chen y colaboradores en 2011 [152] han observado en cíbridos MERRF con la mutación m.8344A>G la formación de autofagosomas sugiriendo la activación constitutiva de autofagia.

Dada la gran depleción de ATP que presentan estos cíbridos no sorprende que se active un proceso como la autofagia donde los productos de degradación obtenidos, proporcionan sustratos para la generación de energía.

En respuesta a la reducción de los niveles intracelulares de ATP, AMPK inhibe los procesos que consumen energía: inhibiendo la biosíntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Nuestros resultados muestran indicios de inhibición de la biosíntesis de lípidos, como la disminución de la expresión de **HMGCR**, enzima clave en la regulación de la síntesis del colesterol, enzima cuya fosforilación por AMPK provoca la disminución de su actividad enzimática o la infraexpresión de **FASN**, enzima implicado en la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, cuya actividad y expresión se ve disminuida por la actividad de AMPK [153].

Respecto al metabolismo de lípidos también cabe destacar la disminución de expresión del gen **CPT2**, que codifica la enzima carnitina palmitoyltransferasa II, que cataliza la transesterificación de la acil-carnitina en la matriz mitocondrial originando acil-CoA, (el cual es el sustrato activado para la β -oxidación en la matriz) y carnitina. Este resultado va en consonancia con el hecho de que trastornos de la cadena respiratoria pueden causar una alteración secundaria de la β -oxidación, con el consiguiente acúmulo de acilcarnitinas (sustancia tóxica para la célula), produciendo una deficiencia secundaria de carnitina.

Finalmente la presencia de la mutación m.8344A>G en medio (OX), también afecta a la expresión de genes implicados en la fosforilación oxidativa. En concreto se observó disminución de la expresión de genes que codifican subunidades nucleares del sistema OXPHOS como **NDUFS6**, **NDUFB6** y **NDUFB3** del Complejo I, la subunidad **UQCRC1** del Complejo III y la subunidad **COX7B** del Complejo IV.

Los resultados obtenidos sugieren que esta mutación en condiciones oxidativas produce una gran depleción del contenido de ATP lo que provocaría la activación de la vía AMPK activando autofagia, mediante la inhibición de mTORC1 a través de la vía de señalización TSC1/2- Rheb. La activación de la autofagia tendría un doble objetivo, por una parte proporcionar sustratos para la generación de energía y por otra actuar como mecanismo protector para la eliminación del exceso de proteínas mal plegadas en el RE que es posible que se produzca dada la sobreexpresión de genes implicados en estrés del RE como ERN1, GPR37 y HSP 40. Posiblemente la autofagia no es capaz de compensar el gran déficit energético ni el estrés producido en el RE, originándose una situación prolongada de estrés en el RE que provocaría la inducción a la apoptosis principalmente vía ERN1-TRAF2-JNK [146]. Aunque no hay que descartar la influencia de procesos pro-apoptóticos como *regulated Ire1a-dependent decay* (RIDD) realizado también por ERN1 o la sobreexpresión de GPR37.

En el caso de la mutación más común del síndrome MELAS m.3243A>G que afecta al ARNt^{Leu} (UUR) (MT-TL1) en condiciones glicolíticas, se alteraron pocos de los parámetros estudiados para valorar la función mitocondrial. Entre ellos se observó un incremento significativo del 370% en la concentración de lactato intracelular además de una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial, no presentándose alteración en parámetros como el contenido de ATP, el crecimiento celular o el contenido de nucleótidos de adenina. Estos resultados sugieren al igual que ocurría en el caso de la mutación m.8344A>G en condiciones glicolíticas, que la homeostasis celular en estas condiciones esta bastante preservada.

En condiciones glicolíticas se encontraron 1715 genes diferencialmente expresados. Entre los genes diferencialmente expresados se observó sobreexpresión del gen **PRKAA2**, subunidad catalítica de la proteína kinasa activada por AMP (AMPK). En respuesta a la reducción de los niveles intracelulares de ATP, AMPK inhibe los procesos que consumen energía: inhibiendo la biosíntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Nuestros resultados mostraron indicios de inhibición de la biosíntesis de lípidos, como la infraexpresión de **ACACA**, gen que codifica la Acetil-CoA carboxilasa, enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos, cuya actividad se ve disminuida por la fosforilación de AMPK [154]. También se observó la sobreexpresión de **ARG2**, que codifica la enzima arginasa-2 mitocondrial, enzima que forma parte del ciclo de la urea, cuya principal función es la de producir ornitina a partir de arginina.

Además también estaban sobreexpresados genes que codifican proteínas cuya función es la de inhibir la muerte celular programada como **BCL2L1**, cuya proteína *Bcl-2-like protein 1*, es un potente inhibidor de la muerte celular, ya que se une y bloquea el canal aniónico voltaje dependiente (VDAC) impidiendo la liberación del citocromo C y **BCL2L2**, cuya proteína *Bcl-2-like protein 2*, contribuye a la reducción de la apoptosis celular bajo condiciones citotóxicas. También se observó la disminución de la expresión del gen pro-apoptótico **APAF1**, cuya proteína *apoptotic peptidase activating factor 1* tras la unión del citocromo C, forma el apoptosoma capaz de activar la caspasa 9 iniciando la cascada de caspasas que comprometen a la célula a la apoptosis. Pero si bien todos estos cambios de expresión apuntaban hacia la no activación de la muerte celular programada, también se observó sobreexpresión del gen pro-apoptótico **CASP4**, que codifica la caspasa 4. Del balance entre las señales pro y anti apoptóticas dependerá de si se da o no apoptosis.

En condiciones oxidativas en presencia de la mutación m.3243A>G, se observó una disminución significativa del contenido de ATP celular de un 79,98% así como un incremento del 370% en la concentración de lactato intracelular respecto su cúbido control. También se apreció una disminución significativa del contenido de nucleótidos de adenina así como del potencial de membrana mitocondrial. Un parámetro que deriva de la determinación del contenido de nucleótidos de adenina es la carga energética de adenilato; en este caso el valor fue de 0,51 inferior a 0,6 lo que indicaba que se estaba produciendo una degradación de nucleótidos de adenina, al igual que se observó en el caso de la mutación m.8344A>G [138].

En los estudios de expresión génica en cúbidos portadores de la mutación m.3243A>G, en condiciones oxidativas, se observó un número elevado de genes (2518 genes) diferencialmente expresados.

De entre los genes diferencialmente expresados en estas condiciones, tal y como sucedió con la mutación m.8344A>G en condiciones OX, encontramos la sobreexpresión del gen **PRKAA2**, subunidad catalítica de la proteína kinasa activada por AMP (AMPK). El hecho de que la AMPK regule positivamente la inducción de la autofagia a través de la inhibición de mTORC1 en condiciones de déficit energético junto con la sobreexpresión del gen **PIK3C3**, subunidad catalítica de la PI3K tipo 3, que ejerce un papel esencial en el proceso de autofagia, indicaba una posible inducción de la autofagia celular en estas condiciones. Estos resultados estaban en consonancia con estudios realizados por Cotán y colaboradores en 2011[155] en los que observaron un aumento en la actividad autofágica en cíbridos con la mutación m.3243A>G.

Dada la depleción de ATP que presentaban estos cíbridos es posible que se active un proceso como la autofagia donde los productos de degradación obtenidos proporcionan sustratos para la generación de energía.

En respuesta a la reducción de los niveles intracelulares de ATP, AMPK inhibe los procesos que consumen energía: inhibiendo la biosíntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos. Estos resultados mostraban indicios de inhibición de la biosíntesis de lípidos, como la disminución de la expresión de **FASN**, enzima implicado en la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, cuya actividad y expresión se ve disminuida por la actividad de AMPK [153]. Así como disminución de la expresión de **ACACA**, gen que codifica la Acetil-CoA carboxilasa, enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos, cuya actividad se ve disminuida por la fosforilación de AMPK [154].

Respecto al metabolismo de lípidos también cabe destacar la disminución de la expresión del gen **CPT2**, que codifica la enzima carnitina palmitoyltransferasa II, que cataliza la transesterificación de la acil-carnitina en la matriz mitocondrial originando acil-CoA, (el cual es el sustrato activado para la β - oxidación en la matriz) y carnitina.

Este resultado va en consonancia con el hecho de que trastornos de la cadena respiratoria pueden causar una alteración secundaria de la β - oxidación, con el consiguiente acúmulo de acilcarnitinas (sustancia tóxica para la célula), produciendo una deficiencia secundaria de carnitina.

Entre los genes diferencialmente expresados encontramos genes implicados en el metabolismo de la arginina como, la sobreexpresión de **ARG2**, que codifica la enzima arginasa-2 mitocondrial, enzima que forma parte del ciclo de la urea, cuya principal función es la de producir ornitina a partir de arginina. Otro gen implicado en el metabolismo de la arginina es el gen **ASS1** cuya expresión estaba disminuida, que codifica la enzima argininosuccinato sintetasa que cataliza la reacción limitante en la biosíntesis de arginina [156]. Estos cambios de expresión indicaban un posible aumento del catabolismo de la arginina junto con una posible disminución de su síntesis, lo que implicaría en caso de confirmarse estos cambios de expresión una disminución de la concentración de arginina celular, hecho observado en pacientes con el síndrome de MELAS [126].

Una concentración de arginina por debajo de los niveles normales causada por la sobreexpresión de ARG2 podría reconducir el óxido nítrico hacia la formación de peroxinitrito, el cual, actuaría como segundo mensajero pudiendo provocar apoptosis por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial [113]. De hecho, se ha visto que el óxido nítrico y su metabolito tóxico el peroxinitrito puede inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, provocando una insuficiencia energética [125]. La disminución de arginina puede producir que no haya suficiente óxido nítrico circulante a la hora de inducir vasodilatación, lo que provoca que los pacientes con el síndrome MELAS presenten una inhibición o retraso en la vasodilatación. Este defecto en la realización de la vasodilatación en un apropiado tiempo y espacio puede precipitar los episodios de accidente cerebro-vascular, uno de los aspectos característicos del síndrome MELAS. Los resultados que obtuvieron Koga y colaboradores apoyan esta hipótesis, encontraron disminución de la concentración de arginina en plasma en pacientes MELAS durante y entre episodios de accidente cerebro-vascular y observaron que la administración intravenosa de L-arginina (0.5g/kg) en la fase aguda mejoraba todos los síntomas del accidente cerebro-vascular así como la administración oral (0.15-0.30g/kg/día) disminuía tanto la frecuencia como la severidad de los accidentes cerebro-vasculares [157].

También se observó sobreexpresión de genes implicados en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno, como **GCLC**, el primer enzima limitante en la síntesis de glutatión. Sin embargo muchos genes que codifican enzimas que utilizan el glutatión para detoxificar productos del estrés oxidativo como, **GSTM1**, **GSTM2**, **GSTM3** y **GSTM4** estaban infraexpresados. Cabe destacar que se encontró sobreexpresado el gen **AOX1**, que codifica una aldehído oxidasa cuya actividad produce H_2O_2 pudiendo originar un potencial daño oxidativo y la disminución de la expresión de **HMOX1**, gen que codifica la enzima homoxigenasa 1, cuyo producto de su actividad catalítica genera bilirrubina, sustancia antioxidante, que protege frente al estrés oxidativo mitocondrial [158].

Respecto a la expresión de genes implicados en el ciclo celular se observó la disminución de la expresión de genes esenciales para la transición G1/S como **CCNE1**, **CCNA1** y **CDC25A** lo cual sugiere una posible disminución de la proliferación celular, si bien en este caso a diferencia de la mutación m.8344A>G no se observó una disminución significativa de la proliferación celular.

Cabe destacar la disminución de la expresión de genes implicados en el proceso de *UPR* (*unfolded protein response*) como: **HSPA5**, gen que codifica la chaperona HSP70, implicada en el plegamiento y ensamblaje de proteínas en el RE. **DDIT3**, gen que codifica el factor de transcripción CHOP, el cual es activado por estrés en el RE. **DNAJC3**, gen que codifica la chaperona HSP40 implicada en el *UPR* y **EIF2AK3**, gen que codifica la proteína PERK, efector crítico de la *UPR*.

También se observó la sobreexpresión de los genes **GADD45A** y **GADD45B**, genes cuya expresión es inducida en condiciones de estrés celular (como la producción de H_2O_2). Las proteínas codificadas por estos genes, responden al estrés, mediante la activación vía JNK/SAPK a través de MTK1/MEKK4 kinasa [159], provocando apoptosis [160]. Además, los genes **JNK1** (MAPK8), **MBIP** y **JKAMP** estaban sobreexpresados. **MBIP** codifica una proteína que inhibe la actividad de MAP3K12 induciendo la activación de la vía JNK/SAPK. **JKAMP** regula la duración de la actividad JNK1 en respuesta a diversos estímulos de estrés. Además **HSPA5** que codifica HSP70 que es capaz de inhibir JNK/SAPK [161] estaba infraexpresado.

Todos estos cambios podrían indicar que esta favorecida la apoptosis vía JNK/SAPK. Además se observó la sobreexpresión de **MYC**, que codifica el factor de transcripción c-Myc, el cual puede ser fosforilado por JNK1 (Ser-62 y Ser-71) ante señales estresantes, estimulando la actividad pro-apoptótica de c-Myc [162]. Finalmente como cambios de expresión que favorecerían un posible proceso apoptótico se encontró la sobreexpresión de genes, como **CASP4** y **CASP7**. Pero si bien todos estos cambios de expresión apuntarían hacia la activación de la muerte celular programada, también se observó la sobreexpresión de genes implicados en impedir la apoptosis como **BCL2L2** y **BCL2A1**. Del balance entre las señales pro y anti apoptóticas dependerá de si se da o no apoptosis.

Respecto a los genes que codifican subunidades del sistema OXPHOS, estaba sobreexpresado el gen **UQCRB** subunidad del complejo III y infraexpresados los genes **NDUFV3** y **NDUFB6** subunidades ambas del complejo I.

Una vez valorados todos los resultados la mutación m.3243A>G, en condiciones oxidativas, produciría una significativa depleción del contenido de ATP lo que podría provocar la activación de la vía AMPK, activando autofagia. La activación de la autofagia tendría como objetivo proporcionar sustratos para la generación de energía. Pero la afectación que provoca la mutación m.3243A>G en el sistema OXPHOS es tan grande que la autofagia no sería capaz de compensar el gran déficit energético que presentan estos cíbridos. Pero esta mutación, además de producir disminución de la síntesis de ATP, provoca la formación de ROS como H_2O_2 [163]. El estrés oxidativo observado en cíbridos con esta mutación podría producir la sobreexpresión de genes como **GADD45A** y **GADD45B**, cuya expresión es inducida en condiciones de estrés celular, provocando la activación de la vía pro-apoptótica GADD45-MTK1/MEKK4-JNK/SAPK [159], [160]. Además estudios realizados por Zhang y colaboradores indican que el H_2O_2 induce apoptosis en cíbridos con la mutación m.3243A>G [54]. Si a estos datos le añadimos la posible activación de c-Myc por JNK1 estimulando su actividad pro-apoptótica, así como la posible formación de peroxinitrito por disminución de la concentración de arginina celular, la disminución del potencial de membrana y la degradación de nucleótidos de adenina, son datos todos ellos que indicarían una grave afectación celular que podrían inducir un proceso apoptótico.

En el caso de la mutación m.14487T>C se observó que tanto en condiciones glicolíticas como oxidativas pocos de los parámetros estudiados de la función mitocondrial estaban alterados. Únicamente la disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial en ambas condiciones de cultivo así como la disminución del contenido de ATP de un 28,66% observado en condiciones glicolíticas, indicarían una posible afectación del sistema OXPHOS.

Cabe destacar que en condiciones oxidativas no se observó disminución del contenido de ATP, una posible explicación es que existan cambios adaptativos que provoquen que se favorezca la fosforilación oxidativa a través del complejo II del sistema OXPHOS. Una posible evidencia de este hecho es la sobreexpresión de la succinato deshidrogenasa (componente del complejo II del sistema OXPHOS) que junto con la disminución significativa de la concentración de succínico (sustrato de la SDHC), indicaría que se está favoreciendo la utilización de equivalentes de reducción a partir del complejo II. Además el gen **GPD2** que codifica la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 mitocondrial está sobreexpresado, favoreciendo que los electrones provenientes del NADH citosólico puedan incorporarse a la cadena de transporte de electrones mitocondrial en forma de FADH₂, favoreciendo la fosforilación oxidativa a través del complejo II. Este hecho junto con la sobreexpresión observada de la lactato deshidrogenasa indicarían que se está intentando eliminar el exceso de NADH dada la imposibilidad que tiene el complejo I del sistema OXPHOS de oxidar el NADH, para evitar de esa manera posibles alteraciones del balance re-dox. Estos cambios podrían explicar la ausencia de déficit energético en condiciones oxidativas.

La similitud de comportamientos en ambas condiciones de cultivo queda reflejada en la similitud de los perfiles de expresión obtenidos mediante el estudio de microarray, aunque con alguna pequeña diferencia. En condiciones glicolíticas se encontraron 336 genes diferencialmente expresados y en condiciones oxidativas 330 genes diferencialmente expresados. Entre los genes que se encontraron sobreexpresados está **GSTA4**, gen que codifica la enzima glutatión S-transferasa 4 de clase alfa. Esta enzima está localizada en citoplasma así como en el interior de la mitocondria [164], está altamente especializada en la detoxificación del 4-Hydroxynonenal (4-HNE), producto de la peroxidación lipídica, mediante su conjugación con glutatión.

La inducción de la expresión de las glutatión S-transferasas parece ser una respuesta adaptativa de las células para la protección contra el estrés oxidativo y contra la toxicidad de metabolitos endógenos y exógenos [165].

Experimentos que añaden el 4-HNE al medio de cultivo, han evidenciado que a altas concentraciones, el 4-HNE es capaz de inducir apoptosis vía JNK. Además estudios realizados transfectando GSTA4 a células en cultivo, mostraron una disminución significativa de los niveles de (4-HNE), sugiriendo que GSTA4 era capaz de regular los niveles celulares de (4-HNE) y de bloquear la activación de JNK [166]. La sobreexpresión de GSTA4 que se observó en presencia de la mutación m.14487T>C, tanto en condiciones GL como OX, podría proteger a la célula de posibles procesos apoptóticos. Estudios previos realizados por nuestro grupo, con cíbridos que presentaban esta mutación, mostraron un incremento en la producción de H₂O₂ así como un aumento de la peroxidación lipídica y de la oxidación del ADNmt. Estos datos indicarían que la sobreexpresión de este gen podría ser clave para impedir posibles procesos apoptóticos inducidos por 4-HNE, como consecuencia de la peroxidación lipídica que se ha observado en esta mutación.

En condiciones glicolíticas también se observó la sobreexpresión de genes implicados en la defensa antioxidante como **GSTM1** implicado en la detoxificación de productos del estrés oxidativo mediante su conjugación con glutatión así como la sobreexpresión de **GCLM**, enzima clave en la síntesis de glutatión. Mientras que en condiciones oxidativas se evidenció la sobreexpresión **HMOX1** implicado también en la defensa contra el estrés oxidativo. Estos resultados están en concordancia con el aumento de la producción de ROS así como del daño oxidativo en lípidos y ADNmt observado por Gonzalo y colaboradores en cíbridos con esta mutación [70].

Otro aspecto a tener en cuenta, es la posible alteración en los niveles de calcio intracelulares. El gen **SLC8A1**, considerado uno de los más importantes mecanismos celulares de eliminación de calcio citoplasmático, estaba sobreexpresado en ambas condiciones de cultivo. Además en condiciones oxidativas se observó la sobreexpresión **ATP2B4** capaz de transportar iones calcio contra grandes gradientes de concentración jugando un papel crítico en la homeostasis del calcio intracelular.

Por ello se podría suponer que esta mutación podría producir un aumento en la concentración de calcio citoplasmático, que provocaría la activación de **CAMK4**, gen que está sobreexpresado y que codifica la proteína quinasa tipo 4 dependiente de calcio/calmodulina que se activa con la presencia de calcio citoplasmático regulando la actividad transcripcional celular. CAMK4 es uno de los principales inductores de la expresión génica en respuesta al calcio citoplasmático fosforilando y activando varios factores de transcripción, entre ellos CREB. En presencia de disfunción mitocondrial se ha descrito que CREB puede ser fosforilado por CAMK4 [167]. Además CREB, parece ser un factor de transcripción clave contra el estrés oxidativo ya que es un directo regulador de la expresión de genes antioxidantes [168], [169].

Una vez visto el papel clave del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta mutación, no es de extrañar que se activen vías como la de CAMK4-CREB que activa la expresión de genes antioxidantes como **HMOX1** el cual se encontró sobreexpresado.

Finalmente, en condiciones oxidativas, se observó la sobreexpresión de los genes **NDUFB6** y **NUDFS2**, que codifican subunidades del complejo I del sistema OXPHOS, así como los genes **COX4I1** y **ATP5B** que codifican subunidades de los complejos IV y V del sistema OXPHOS todas ellas codificadas por el ADN nuclear.

Una vez valorados todos los resultados obtenidos en presencia de la mutación m.14487T>C, la producción de ROS así como el posible incremento de la concentración de calcio citoplasmático, podrían constituir uno de los elementos más importantes a tener en cuenta en la fisiopatología de esta mutación. El posible aumento del calcio citoplasmático podría tener graves consecuencias sobre la viabilidad celular, pero en estos resultados no se evidenció, sólo se observó la posible activación de la vía de señalización de CREB, lo que podría producir la sobreexpresión de genes implicados en la defensa antioxidante.

En el caso de la mutación m.8993T>G se observó que pocos de los parámetros estudiados de la función mitocondrial estaban alterados. Únicamente la disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial en condiciones oxidativas así como el incremento de la concentración de lactato intracelular en condiciones glicolíticas, indicaban una posible afectación del sistema OXPHOS.

Cabe destacar como los híbridos con la mutación m.8993T>G no presentaban una disminución significativa del contenido de ATP ni en condiciones GL ni OX, circunstancia también observada por D'Aurelio y colaboradores [170] indicando que la afectación celular provocada por esta mutación no se debía a un defecto energético.

La similitud de comportamientos en ambas condiciones de cultivo también se manifestaba en los perfiles de expresión, aunque con alguna pequeña diferencia. En condiciones glicolíticas se encontraron 325 genes diferencialmente expresados y en condiciones oxidativas 369 genes diferencialmente expresados.

Entre los genes que estaban diferencialmente expresados en ambas condiciones de cultivo, se observó la sobreexpresión del gen **CA12**, que codifica una anhidrasa carbónica encargada de catalizar la hidratación reversible del dióxido de carbono a bicarbonato, este último se ha descrito que estimula la actividad catalítica de la ATPasa [171].

Relacionado aunque indirectamente con el estrés oxidativo, en ambas condiciones de cultivo se observó la sobreexpresión del gen **NAPRT1**, que codifica la enzima nicotinato fosforibosiltransferasa, ATPasa que utiliza la hidrólisis del ATP para catalizar la conversión de ácido nicotínico a ácido nicotínico mononucleótido, esencial para que el ácido nicotínico incremente los niveles celulares de NAD y prevenir el estrés oxidativo de las células. En ambas condiciones de cultivo, se encontró sobreexpresado el gen **ATM**, que codifica la kinasa ataxia-telangiectasa mutada, una serina/treonina proteína kinasa que actúa como sensor ante daño en el ADN iniciando una respuesta que da lugar a la parada del ciclo celular, reparación del ADN o apoptosis. Relacionado con este proceso también se observó sobreexpresión de **MRE11A**, cuya proteína Mre11 junto con Rad50 y NBS1 forman el complejo (MRN) encargado de reconocer las roturas de doble cadena de ADN provocando la activación de ATM, aunque en este caso sólo en condiciones oxidativas.

Además en el gen **BCL2L1** (BCL-XL), cuya proteína es un potente inhibidor de la apoptosis mediante su unión al canal VDAC, previniendo la liberación del activador de caspasas y citocromo C, estaba disminuida su expresión en ambas condiciones de cultivo.

En condiciones glicolíticas, el gen **APAF1** cuya proteína Apaf-1, media la activación autocatalítica de la pro-caspasa 9 dependiente de citocromo C, permitiendo la activación de la caspasa 3 originando apoptosis, estaba sobreexpresado. En estas mismas condiciones, el gen **GPX7** cuya proteína tiene una fuerte capacidad de neutralizar el H_2O_2 previniendo el daño oxidativo en ADN, así como las roturas de doble cadena en ADN y apoptosis [172] también se encontró sobreexpresado. Todos estos resultados indicarían que el mecanismo fisiopatológico de esta mutación podría estar relacionado con el posible daño oxidativo que se produce sobre el ADN. En estudios realizados en fibroblastos con la mutación m.8993T>G, se observó que esta mutación causa producción de ROS [44].

Si se analizan de forma conjunta los resultados obtenidos para las cuatro mutaciones del ADNmt estudiadas, el medio oxidativo evidenció el comportamiento diferencial entre las mutaciones que afectan ARNt y las mutaciones en subunidades del sistema OXPHOS. Este comportamiento diferencial viene marcado por la gran disminución del contenido de ATP así como el aumento de la concentración del lactato intracelular que provocan las mutaciones en ARNt y que muestran el gran defecto en el sistema OXPHOS que provocan estas mutaciones. Este hecho indica que las mutaciones estudiadas que afectan a subunidades pueden provocar afectación celular no debiéndose a la disminución del contenido de ATP, en estos casos la producción de radicales libres así como el aumento del calcio citoplasmático podrían ser algunos de los posibles responsables de la afectación celular.

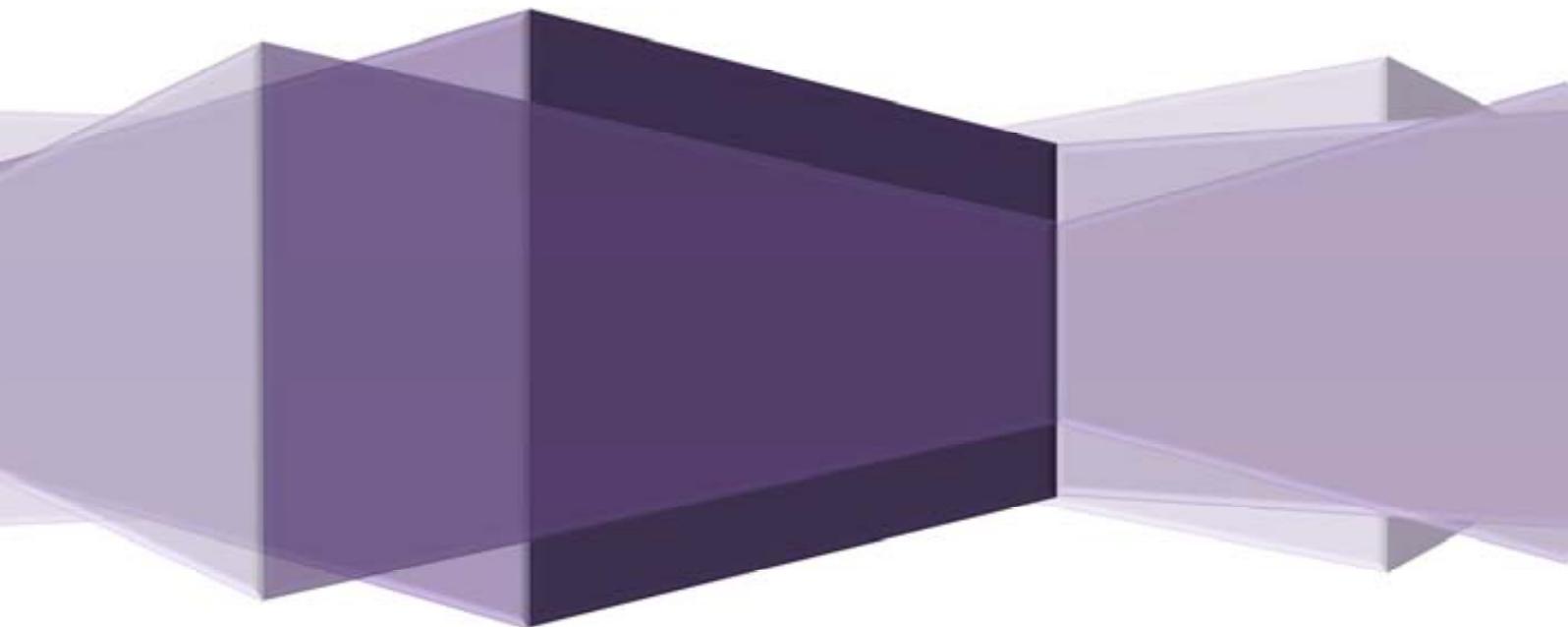
Este comportamiento diferencial entre mutaciones que afectan ARNt y las que afectan a subunidades del sistema OXPHOS, pone de manifiesto la ausencia de una respuesta transcripcional común para las diferentes mutaciones del ADNmt estudiadas. Autores como Cortopassi y colaboradores [114] sostienen que las mutaciones en el ADNmt presentan una respuesta transcripcional común caracterizada por la sobreexpresión de genes implicados en la *unfolded protein response (UPR)*.

Según nuestros resultados solamente se observó sobreexpresión de genes implicados en la (*UPR*) en el caso de la mutación m.8344A>G. Curiosamente en el caso de la otra mutación que afecta a ARNt m.3243A>G, no sólo no se observó sobreexpresión de genes implicados (*UPR*), sino que además existía disminución de la expresión de muchos genes implicados en esta respuesta celular. Otra respuesta transcripcional que según autores como Crimi y colaboradores [113] sería común en las alteraciones del ADNmt sería la sobreexpresión de genes implicados en el metabolismo de la arginina. Nuestros resultados muestran sobreexpresión de genes implicados en el metabolismo de la arginina sólo en el caso de la mutación m.3243A>G en ambas condiciones de cultivo y en m.8344A>G en condiciones oxidativas.

Todos los resultados obtenidos en este estudio, no solo muestran una respuesta transcripcional diferencial entre mutaciones que afectan a ARNt y subunidades sino que además se observa una respuesta nuclear específica para cada una de las mutaciones del ADNmt estudiadas, poniendo de manifiesto la complejidad de la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales.

El objetivo de esta tesis era intentar esclarecer los mecanismos fisiopatológicos implicados en las mutaciones estudiadas, en algunos casos, como en las mutaciones en ARNt se han propuesto posibles mecanismos que podrían explicar la afectación celular causada por estas mutaciones y en otros, como en las mutaciones que afectan a subunidades se han identificado aspectos a tener en cuenta en la fisiopatología de estas mutaciones. La posible implicación de los mecanismos propuestos debe ser ratificada en estudios posteriores.

Conclusiones



1. El medio oxidativo (DMEM 0,25g glucosa/L-0,75 g galactosa/L suplementado con 5 mM de piruvato, 50 µg/ml uridina, 2 mM glutamina y 5% SFB dializado) ha permitido mantener la viabilidad de cíbridos con mutaciones en el ADNmt durante tres días, incluso con mutaciones que afectan a ARNt, permitiendo manifestar el defecto en el sistema OXPHOS causado por estas mutaciones.
2. La utilización del medio glicolítico no permite manifestar el defecto en el sistema OXPHOS causado por mutaciones en el ADNmt, por lo que estas condiciones de cultivo no son las condiciones idóneas para el estudio de modelos celulares con mutaciones en el ADNmt en los que se quiera evidenciar el defecto energético que producen estas mutaciones.
3. Los cíbridos con mutaciones en ARNt (m.8344A>G y m.3243A>G) presentan en condiciones oxidativas una disminución significativa del contenido de ATP, de nucleótidos de adenina y del potencial de membrana mitocondrial así como un incremento significativo en la concentración de lactato intracelular.
4. Los cíbridos con mutaciones que afectan a subunidades del sistema OXPHOS (m.14487T>C y m.8993T>G) presentan en condiciones oxidativas disminución del potencial de membrana. Sin embargo, no presentan diferencias respecto a sus controles en el contenido de ATP, en el contenido de nucleótidos de adenina ni de lactato intracelular.
5. En ninguna de las líneas de cíbridos estudiadas se observó un aumento coordinado de la expresión de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial como mecanismo compensatorio, en ninguna de las condiciones de cultivo utilizadas.
6. El incremento en los niveles de expresión de SDHC y GPD2 en condiciones oxidativas, asociado a la disminución intracelular de succinato, sugiere la priorización de la fosforilación oxidativa a partir del complejo II en los cíbridos con la mutación m.14487T>C en MTND6.

7. La disminución significativa del contenido de ATP que presentan los cíbridos con mutaciones m.8344A>G y m.3243A>G en condiciones oxidativas, podría promover la activación de procesos autofágicos a través de la activación de AMPK.

8. Los resultados de expresión en condiciones oxidativas de los cíbridos con mutación m.8344A>G sugieren que se produce un estrés en el RE provocando la inducción de la apoptosis vía ERN1-TRAF2-JNK.

9. Los resultados de expresión en condiciones oxidativas de los cíbridos con mutación m.3243A>G apuntan a una inducción de la apoptosis vía GADD45-MTK1/MEKK4- JNK/SAPK.

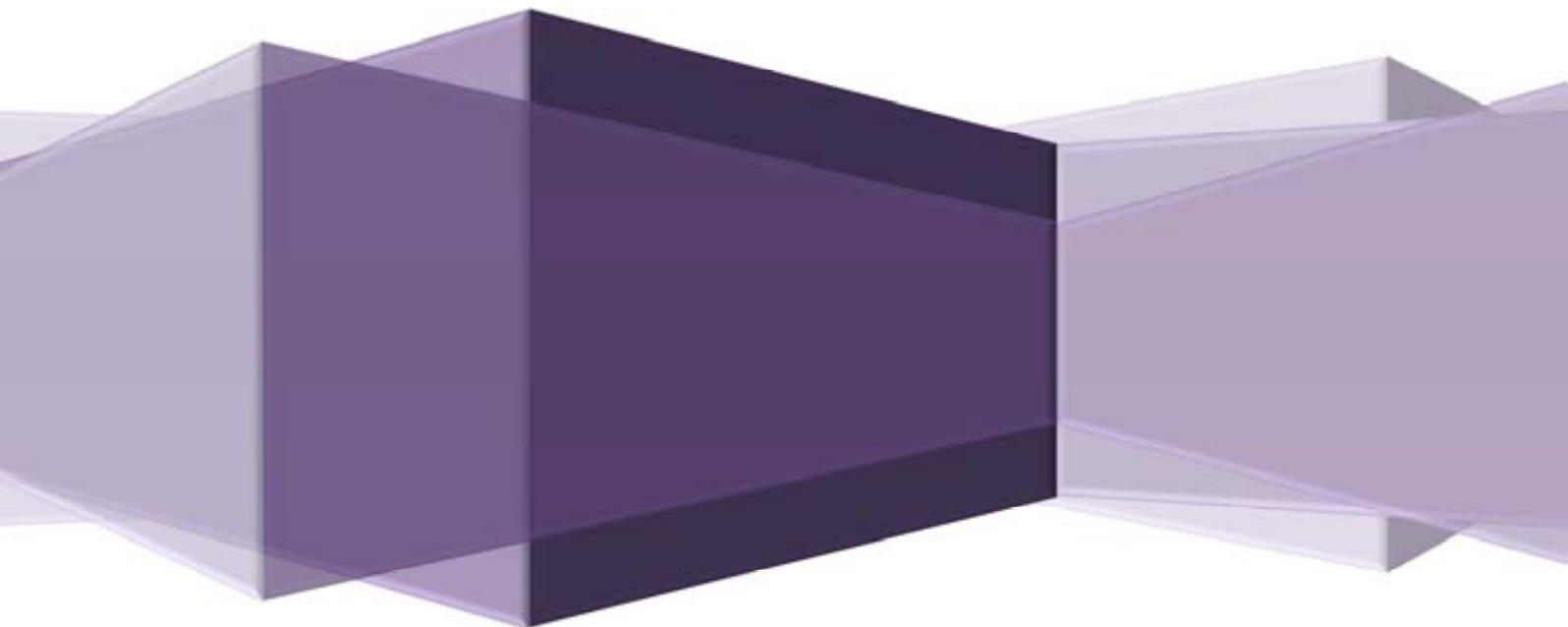
10. En los cíbridos con mutación m.14487T>C, la producción de ROS así como el posible incremento de la concentración de calcio citoplasmático podrían constituir elementos claves en la fisiopatología de esta mutación.

11. Los resultados de expresión en los cíbridos con la mutación m.8993T>G sugieren un posible daño en el ADN ya que se ha observado un incremento en la expresión de genes relacionados con la vía de reparación de roturas de doble cadena de ADN.

12. Los cíbridos con mutaciones en tRNAs presentan perfiles de expresión dependiendo de las condiciones de cultivo, mientras que los cíbridos con mutaciones en subunidades el efecto del medio de cultivo sobre la expresión es mucho menor. Este hecho puede atribuirse que en las mutaciones en tRNAs existe una disminución significativa de la concentración intracelular de ATP en condiciones oxidativas hecho que no se observa en las mutaciones en subunidades.

13. Las cuatro mutaciones estudiadas muestran una respuesta nuclear específica poniendo de manifiesto la complejidad de la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales.

Bibliografía



1. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of Mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.* 1988; **4**: 289-333.
2. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.* 2005; **121** (5): 671-4.
3. Bianchi K, Rimessi A, Prandini A, Szabadkai G, Rizzuto R. Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim Biophys Acta.* 2004; **1742** (1-3): 119-31.
4. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; **552** (Pt2): 335-44.
5. Scheffler IE. Mitochondria. *Wiley-Liss Inc.* 1999.
6. Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, Jacobs HT. Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab.* 2006; **3** (1): 9-13.
7. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; **84** (1): 277-359.
8. Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol.* 1963; **19**: 593-611.
9. Bogenhagen DF, Wang Y, Shen EL, Kobayashi R. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics.* 2003; **2** (11): 1205-16.
10. Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem.* 2006; **281** (35): 25791-802.
11. Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet.* 2005; **6** (11): 815-25.
12. 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.* 1981; **290** (5806): 457-65.
13. Herrmann JM, Neupert W. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol.* 2000; **3** (2): 210-4.
14. Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* 2000; **16** (11): 500-5.

15. Hauswirth WW, Laipis PJ. Transmission Genetics of Mamalian Mitochondria: A Molecular Model and Experimental Evidence. In *E Quagliariell (ed), achievements and perspectives of Mitochondrial Research. Amsterdam: Elsevier. 1985; 49.*
16. Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.*2002; **347** (8): 576-80.
17. Kraytsberg Y, Schwartz M, Brown TA, Ebralidse K, Kunz WS, Clayton DA, Vissing J, Khrapko K. Recombination of human mitochondrial DNA. *Science.* 2004; **304** (5673): 981
18. Filosto M. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann. Neurol.*2003; **54**: 524-526.
19. Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL, Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Zeviani M, Briem E, Carrara F, Turnbull DM. Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol.* 2003; **54** (4): 521-4.
20. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005; **6** (5): 389-402.
21. Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet.* 2003; **72** (2): 333-9.
22. Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; **76** (4): 1967-71.
23. Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev.* 1997; **77** (2): 425-64.
24. Stoneking M, Sodyall H. Human evolution and the mitochondrial genome. *Curr Opin Genet.* 1996; **6**: 731-736
25. 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.* 1962; **41**: 1776-804.
26. DiMauro S. The many faces of mitochondrial diseases. *Mitochondrion.* 2004; **4** (5-6): 799-807.
27. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 1988; **331** (6158): 717-9.

28. 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*. 1988; **242** (4884): 1427-30.
29. Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature*. 1989; **339** (6222): 309-11.
30. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, Munnich A, Rötig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*. 1995; **11** (2): 144-9.
31. Shanke S, DiMauro S. Mitochondrial myopathies: Biochemical myopathies: Biochemical aspects. *Curr Top Bioenerg*. 1994; **17**: 21-58
32. DiMauro S. Mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta*. 2004; **1659** (2-3): 107-14.
33. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005; **39**: 359-407.
34. DiMauro S, Hirano M, Schon EA. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve*. 2006; **34** (3): 265-83.
35. Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet*. 2006; **368** (9529): 70-82.
36. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol*. 2008; **63** (1): 35-9
37. Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol*. 2001; **49** (3): 377-83.
38. Skladal D, Sudmeier C, Konstantopoulou V, Stöckler-Ipsiroglu S, Plecko-Startinig B, Bernert G, Zeman J, Sperl W. The clinical spectrum of mitochondrial disease in 75 pediatric patients. *Clin Pediatr (Phila)*. 2003; **42** (8): 703-10.
39. Vilkki J, Ott J, Savontaus ML, Aula P, Nikoskelainen EK. Optic atrophy in Leber hereditary optic neuropathy is probably determined by an Xchromosomal gene closely linked to DXS7. *Am J Hum Genet*. 1991; **48** (3): 486-91.
40. DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, editors. The molecular and genetic basis of neurological disease. *Boston: Butterworth-Heinemann* 1997; 389-446.

41. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 1990; **46** (3): 428-33.
42. Schon EA, Santra S, Pallotti F, Girvin ME. Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; **12** (6): 441-8.
43. Baracca A, Barogi S, Carelli V, Lenaz G, Solaini G. Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem.* 2000; **275** (6): 4177-82.
44. Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, 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.* 2004; **13** (8): 869-79.
45. Sgarbi G, Baracca A, Lenaz G, Valentino LM, Carelli V, Solaini G. Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA. *Biochem J.* 2006; **395** (3): 493-500.
46. Vazquez-Memije ME, Shanske S, Santorelli FM, Kranz-Eble P, DeVivo DC, DiMauro S. Comparative biochemical studies of ATPases in cells from patients with the T8993G or T8993C mitochondrial DNA mutations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1998; **21**: 829-836.
47. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 1990; **348** (6302): 651-3.
48. 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 U S A.* 1992; **89** (10): 4221-5.
49. King MP, Koga Y, Davidson M, Schon 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 strokelike episodes. *Mol Cell Biol.* 1992; **12** (2): 480-90.
50. 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.* 2000; **275** (25): 19198-209.

51. Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S, Watanabe K. Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs (Leu) (UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem.* 2000; **275** (6): 4251-7.
52. Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, Suzuki T. Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101** (42): 15070-5.
53. Yoneda M, Tanaka M, Nishikimi M, Suzuki H, Tanaka K, Nishizawa M, Atsumi T, Ohama E, Horai S, Ikuta F, et al. Pleiotropic molecular defects in energy-transducing complexes in mitochondrial encephalomyopathy (MELAS). *J Neurol Sci.* 1989; **92** (2-3): 143-58.
54. Zhang J, Yoneda M, Naruse K, Borgeld HJ, Gong JS, Obata S, Tanaka M, Yagi K. Peroxide production and apoptosis in cultured cells carrying mtDNA mutation causing encephalomyopathy. *Biochem Mol Biol Int.* 1998; **46**(1): 71-9.
55. Rusanen H, Majamaa K, Hassinen IE. Increased activities of antioxidant enzymes and decreased ATP concentration in cultured myoblasts with the 3243A-->G mutation in mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta.* 2000; **1500** (1): 10-6.
56. Sandhu JK, Sodja C, McRae K, Li Y, Rippstein P, Wei YH, Lach B, Lee F, Bucurescu S, Harper ME, Sikorska M. Effects of nitric oxide donors on cybrids harbouring the mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) A3243G mitochondrial DNA mutation. *Biochem J.* 2005; **391** (Pt 2): 191-202.
57. James AM, Wei YH, Pang CY, Murphy MP. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J.* 1996; **318** (Pt 2): 401-7.
58. Moudy AM, Handran SD, Goldberg MP, Ruffin N, Karl I, Kranz-Eble P, DeVivo DC, Rothman SM. Abnormal calcium homeostasis and mitochondrial polarization in a human encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; **92** (3): 729-33.
59. 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.* 1990; **61** (6): 931-7.
60. Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, DiMauro S. A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet.* 1992;**51** (6): 1213-7.

61. Ozawa M, Nishino I, Horai S, Nonaka I, Goto YI. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: a G-to-A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tRNA(Lys) in two families. *Muscle Nerve*. 1997; **20** (3): 271-8.
62. Chomyn A, Meola G, Bresolin N, Lai ST, Scarlato G, Attardi G. In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol*. 1991; **11** (4): 2236-44.
63. Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet*. 1995; **10** (1): 47-55.
64. Masucci JP, Davidson M, Koga Y, Schon EA, King MP. In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: two genotypes produce similar phenotypes. *Mol Cell Biol*. 1995; **15** (5): 2872-81.
65. Silvestri G, Ciafaloni E, Santorelli FM, Shanske S, Servidei S, Graf WD, Sumi M, DiMauro S. Clinical features associated with the A->G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology*. 1993; **43** (6): 1200-6.
66. Holme E, Larsson NG, Oldfors A, Tulinius M, Sahlin P, Stenman G. Multiple symmetric lipomas with high levels of mtDNA with the tRNA(Lys) A->G(8344) mutation as the only manifestation of disease in a carrier of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet*. 1993; **52** (3): 551-6.
67. James AM, Sheard PW, Wei YH, Murphy MP. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem*. 1999; **259** (1-2): 462-9.
68. 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*. 2003; **54** (4): 527-30.
69. Ugalde C, Triepels RH, Coenen MJ, van den Heuvel LP, Smeets R, Uusimaa J, Briones P, Campistol J, Majamaa K, Smeitink JA, Nijtmans LG. Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Ann Neurol*. 2003; **54** (5): 665-9.
70. Gonzalo R, Garcia-Arumi E, Llige D, Marti R, Solano A, Montoya J, Arenas J, Andreu AL. Free radicals-mediated damage in transmitochondrial cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS Lett*. 2005; **579** (30): 6909-13.

71. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1999; **341**(14):1037-44.
72. Dumoulin R, Sagnol I, Ferlin T, Bozon D, Stepien G, Mousson B. A novel gly290asp mitochondrial cytochrome b mutation linked to a complex III deficiency in progressive exercise intolerance. *Mol Cell Probes*. 1996; **10** (5): 389-91.
73. Keightley JA, Anitori R, Burton MD, Quan F, Buist NR, Kennaway NG. Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *Am J Hum Genet*. 2000; **67**(6): 1400-10.
74. Andreu AL, Tanji K, Bruno C, Hadjigeorgiou GM, Sue CM, Jay C, Ohnishi T, Shanske S, Bonilla E, DiMauro S. Exercise intolerance due to a nonsense mutation in the mtDNA ND4 gene. *Ann Neurol*. 1999; **45** (6): 820-3.
75. 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*. 1998; **51** (5): 1444-7.
76. Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet*. 2000; **355** (9200): 299-304.
77. DiMauro S, Bonilla E, Davidson M, Hirano M, Schon EA. Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta*. 1998; **1366** (1-2): 199-210.
78. Poulton J, Deadman ME, Gardiner RM. Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. *Lancet*. 1989; **1** (8632): 236-40.
79. Kajander OA, Rovio AT, Majamaa K, Poulton J, Spelbrink JN, Holt IJ, Karhunen PJ, Jacobs HT. Human mtDNA sublimons resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states. *Hum Mol Genet*. 2000; **9** (19): 2821-35.
80. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA, Mootha VK. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet*. 2006; **38** (5): 576-82.
81. Xiaoyu Z, Xuerui P, Min-Xin G, Qingfeng Y. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2009: 179–187.
82. Ogilvie I, Kennaway NG, Shoubridge EA. A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest*. 2005; **115** (10): 2784-92.

83. 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.* 2001; **29** (3): 337-41.
84. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet.* 2001; **29** (3): 342-4.
85. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science.* 1999 ; **283** (5402): 689-92.
86. Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, DiMauro S, Rötig A, Gasparini P, Ferrero I, Mootha VK, Tiranti V, Zeviani M. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2006; **38** (5): 570-5.
87. Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, Pagnamenta A, Eshhar S, Saada A. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet.* 2005; **76** (6): 1081-6.
88. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chrétien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A, Rötig A. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2007; **39** (6): 776-80.
89. Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, Mogensen B, Duno M, Shoubridge EA, Wibrand F. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet.* 2007; **81**(2): 383-7.
90. Longley MJ, Graziewicz MA, Bienstock RJ, Copeland WC. Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma. *Gene.* 2005; **354**: 125-31.
91. Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet.* 2001; **28** (3): 211-2.
92. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet.* 2001; **28** (3): 223-31.

93. Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttälä A, Zeviani M, Comi GP, Keränen S, Peltonen L, Suomalainen A. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*. 2000; **289** (5480): 782-5.
94. Graziewicz MA, Longley MJ, Bienstock RJ, Zeviani M, Copeland WC. Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; **11** (8): 770-6.
95. Chan SS, Longley MJ, Copeland WC. The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit. *J Biol Chem*. 2005; **280** (36): 31341-6.
96. Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*. 2004; **364** (9437): 875-82.
97. Pagnamenta AT, Taanman JW, Wilson CJ, Anderson NE, Marotta R, Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Taylor RW, Laskowski A, Thorburn DR, Rahman S. Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma. *Hum Reprod*. 2006; **21** (10): 2467-73.
98. Winterthun S, Ferrari G, He L, Taylor RW, Zeviani M, Turnbull DM, Engelsen BA, Moen G, Bindoff LA. Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology*. 2005; **64** (7): 1204-8.
99. Davidzon G, Greene P, Mancuso M, Klos KJ, Ahlskog JE, Hirano M, DiMauro S. Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Ann Neurol*. 2006; **59** (5): 859-62.
100. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*. 2004; **55** (5): 706-12.
101. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 2004; **36** (5): 449-51.
102. Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*. 2005; **170** (7): 1067-78.

103. Larsson NG, Rustin P. Animal models for respiratory chain disease. *Trends Mol Med*. 2001; **7** (12): 578-81.
104. 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*. 2000; **26** (2): 176-81.
105. Levy SE, Waymire KG, Kim YL, MacGregor GR, Wallace DC. Transfer of chloramphenicol-resistant mitochondrial DNA into the chimeric mouse. *Transgenic Res*. 1999; **8** (2): 137-45.
106. Nakada K, Hayashi J. Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Exp Anim*. 2011; **60** (5): 421-31.
107. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. 1989; **246** (4929): 500-3.
108. Pallotti F, Baracca A, Hernandez-Rosa E, Walker WF, Solaini G, Lenaz G, Melzi D'Eril GV, Dimauro S, Schon EA, Davidson MM. Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J*. 2004; **384** (Pt 2): 287-93.
109. Vives-Bauza C, Gonzalo R, Manfredi G, Garcia-Arumi E, Andreu AL. Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. *Neurosci Lett*. 2006; **391** (3): 136-41.
110. Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ. Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 ; **92** (14): 6562-6.
111. D'Aurelio M, Gajewski CD, Lin MT, Mauck WM, Shao LZ, Lenaz G, Moraes CT, Manfredi G. Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Hum Mol Genet*. 2004; **13** (24): 3171-9.
112. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol*. 1992; **48**: 122-126.
113. Crimi M, Bordoni A, Menozzi G, Riva L, Fortunato F, Galbiati S, Del Bo R, Pozzoli U, Bresolin N, Comi GP. Skeletal muscle gene expression profiling in mitochondrial disorders. *FASEB J*. 2005; **57** (12): 811-8.

114. Cortopassi G, Danielson S, Alemi M, Zhan SS, Tong W, Carelli V, Martinuzzi A, Marzuki S, Majamaa K, Wong A. Mitochondrial disease activates transcripts of the unfolded protein response and cell cycle and inhibits vesicular secretion and oligodendrocyte-specific transcripts. *Mitochondrion*. 2006; **6** (4): 161-75.
115. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*. 2004 ;**14** (1):20-8.
116. Watson LM, Chan AK, Berry LR, Li J, Sood SK, Dickhout JG, Xu L, Werstuck GH, Bajzar L, Klamut HJ, Austin RC. Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity. *J Biol Chem*. 2003; **278** (19): 17438-47.
117. Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, Briem E, Lamantea E, Carrara F, Moroni I, Farina L, Spada M, Donati MA, Uziel G, Zeviani M. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2004; **1659** (2-3): 136-47.
118. Kärppä M, Syrjälä P, Tolonen U, Majamaa K. Peripheral neuropathy in patients with the 3243A>G mutation in mitochondrial DNA. *J Neurol*. 2003; **250** (2): 216-21.
119. Mizusawa H, Ohkoshi N, Watanabe M, Kanazawa I. Peripheral neuropathy of mitochondrial myopathies. *Rev Neurol*. 1991; **147** (6-7): 501-7.
120. Bedlack RS, Vu T, Hammans S, Sparr SA, Myers B, Morgenlander J, Hirano M. MNGIE neuropathy: five cases mimicking chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve*. 2004; **29** (3): 364-8.
121. Uusimaa J, Finnilä S, Vainionpää L, Kärppä M, Herva R, Rantala H, Hassinen IE, Majamaa K. A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase II gene in a child with Alpers-Huttenlocher-like disease. *Pediatrics*. 2003; **111** (3): e262-8.
122. Fujita Y, Ito M, Nozawa Y, Yoneda M, Oshida Y, Tanaka M. CHOP (C/EBP homologous protein) and ASNS (asparagine synthetase) induction in cybrid cells harboring MELAS and NARP mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion*. 2007; **7** (1-2): 80-8.
123. Morris SM Jr, Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D. Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene*. 1997; **193** (2): 157-61.
124. Colleluori DM, Morris SM Jr, Ash DE. Expression, purification, and characterization of human type II arginase. *Arch Biochem Biophys*. 2001; **389** (1): 135-43.

125. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2001; **64** (4): 365-91.
126. Koga Y, Ishibashi M, Ueki I, Yatsuga S, Fukiyama R, Akita Y, Matsuishi T. Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS. *Neurology.* 2002; **58** (5): 827-8.
127. Danielson SR, Carelli V, Tan G, Martinuzzi A, Schapira AH, Savontaus ML, Cortopassi GA. Isolation of transcriptomal changes attributable to LHON mutations and the cybridization process. *Brain.* 2005; **128** (Pt 5): 1026-37.
128. Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C, Cook TD, Hariharan N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol.* 2004; **56** (2): 221-7.
129. Danielson SR, Wong A, Carelli V, Martinuzzi A, Schapira AH, Cortopassi GA. Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-Induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2002; **277** (8): 5810-5.
130. Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem.* ; **278** (6): 4145-50.
131. Abu-Amero KK, Jaber M, Hellani A, Bosley TM. Genome-wide expression profile of LHON patients with the 11778 mutation. *Br J Ophthalmol.* 2010; **94** (2): 256-9.
132. Kaufmann P, Koga Y, Shanske S, Hirano M, DiMauro S, King MP, Schon EA. Mitochondrial DNA and RNA processing in MELAS. *Ann Neurol.* 1996; **40** (2):172-80.
133. Sciacco M, Fagiolari G, Lamperti C, Messina S, Bazzi P, Napoli L, Chiveri L, Prella A, Comi GP, Bresolin N, Scarlato G, Moggio M. Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology.* 2001; **56** (8): 1070-4.
134. Mirabella M, Di Giovanni S, Silvestri G, Tonali P, Servidei S. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain.* 2000; **123** (Pt 1): 93-104.
135. King MP, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 1996; **264**: 304-13.

136. Hao H, Morrison LE, Moraes CT. Suppression of a mitochondrial tRNA gene mutation phenotype associated with changes in the nuclear background. *Hum Mol Genet.* 1999; **8** (6): 1117-24.
137. Bayona-Bafaluy MP, Manfredi G, Moraes CT. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. *Nucleic Acids Res.* 2003; **31** (16): e98.
138. Matsumoto SS, Raivio KO, Seegmiller JE. Adenine nucleotide degradation during energy depletion in human lymphoblasts. Adenosine accumulation and adenylate energy charge correlation. *J Biol Chem.* 1979; **254** (18): 8956-62.
139. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 1995; **260**: 406-17.
140. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, and Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003; **4**: 249-264.
141. Smyth, GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004.
142. Falcon S, Gentleman R 2007, Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics.* Jan 15; **23**(2):257-8.
143. Gentleman V, Carey W, Huber R, Irizarry S. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor.* Dudoit, editors. *Springer-Verlag, New-York, USA.* 2005.
144. Reinecke F, Smeitink JA, van der Westhuizen FH. OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2009; **1792**(12):1113-21.
145. Wenz T, Wang X, Marini M, Moraes CT. A metabolic shift induced by a PPAR panagonist markedly reduces the effects of pathogenic mitochondrial tRNA mutations. *J Cell Mol Med.* 2011; **15** (11):2317-25.
146. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 2011; **13** (3): 184-90.
147. Marazziti D, Di Pietro C, Golini E, Mandillo S, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP. Induction of macroautophagy by overexpression of the Parkinson's disease-associated GPR37 receptor. *FASEB J.* 2009; **23** (6): 1978-87.

148. Liu G, Guo H, Guo C, Zhao S, Gong D, Zhao Y. Involvement of IRE1 α signaling in the hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull.* 2011; **84** (1): 94-102.
149. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003; **17** (15): 1829-34.
150. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.* 2012; **32** (1): 2-11.
151. Jaber N, Dou Z, Chen JS, Catanzaro J, Jiang YP, Ballou LM, Selinger E, Ouyang X, Lin RZ, Zhang J, Zong WX. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; **109** (6): 2003-8.
152. Chen CY, Chen HF, Gi SJ, Chi TH, Cheng CK, Hsu CF, Ma YS, Wei YH, Liu CS, Hsieh M. Decreased heat shock protein 27 expression and altered autophagy in human cells harboring A8344G mitochondrial DNA mutation. *Mitochondrion.* 2011; **11** (5): 739-49.
153. Lin VC, Tsai YC, Lin JN, Fan LL, Pan MH, Ho CT, Wu JY, Way TD. Activation of AMPK by pterostilbene suppresses lipogenesis and cell-cycle progression in p53 positive and negative human prostate cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2012; **60** (25): 6399-407.
154. Lane MD, Wolfgang M, Cha SH, Dai Y. Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA. *Int J Obes (Lond).* 2008; **32** Suppl 4: S49-54.
155. Cotán D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Ávila M, Rodríguez-Hernández A, Gómez Izquierdo L, De la Mata M, De Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Jackson S, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J.* 2011; **25** (8): 2669-87.
156. Delage B, Fennell DA, Nicholson L, McNeish I, Lemoine NR, Crook T, Szlosarek PW. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer.* 2010; **126** (12): 2762-72.
157. Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Tanabe Y, Fujimoto S, Matsuishi T. L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology.* 2005; **64** (4): 710-2.
158. Dal-Cim T, Molz S, Egea J, Parada E, Romero A, Budni J, Martín de Saavedra MD, Barrio LD, Tasca CI, López MG. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *Neurochem Int.* 2012; **61** (3): 397-404.

159. Miyake Z, Takekawa M, Ge Q, Saito H. Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol Cell Biol.* 2007; **27** (7): 2765-76.
160. Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell.* 1998; **95** (4): 521-30.
161. Van Noort JM. Stress proteins in CNS inflammation. *J Pathol.* 2008; **214** (2): 267-75.
162. Noguchi K, Kitanaka C, Yamana H, Kokubu A, Mochizuki T, Kuchino Y. Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1999; **274** (46): 32580-7.
163. Vives-Bauza C, Gonzalo R, Manfredi G, Garcia-Arumi E, Andreu AL. Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. *Neurosci Lett.* 2006; **391** (3):136-41.
164. Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J.* 2002; **366** (Pt 1):45-55.
165. Raza H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J.* 2011; **278** (22): 4243-51.
166. Cheng JZ, Singhal SS, Sharma A, Saini M, Yang Y, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC. Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2001; **392** (2): 197-207.
167. Arnould T, Vankoningsloo S, Renard P, Houbion A, Ninane N, Demazy C, Remacle J, Raes M. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *EMBO J.* 2002; **21** (1-2): 53-63.
168. Krönke G, Bochkov VN, Huber J, Gruber F, Blüml S, Fürnkranz A, Kadl A, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem.* 2003; **278** (51): 51006-14.
169. Bedogni B, Pani G, Colavitti R, Riccio A, Borrello S, Murphy M, Smith R, Eboli ML, Galeotti T. Redox regulation of cAMP-responsive element-binding protein and induction of manganous superoxide dismutase in nerve growth factor-dependent cell survival. *J Biol Chem.* 2003; **278** (19): 16510-9.

170. D'Aurelio M, Vives-Bauza C, Davidson MM, Manfredi G. Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells. *Hum Mol Genet.* 2010; **19** (2):374-86.

171. Barogi S, Baracca A, Parenti Castelli G, Bovina C, Formiggini G, Marchetti M, Solaini G, Lenaz G. Lack of major changes in ATPase activity in mitochondria from liver, heart, and skeletal muscle of rats upon ageing. *Mech Ageing Dev.*1995; **84** (2): 139-50.

172. Peng D, Belkhiri A, Hu T, Chaturvedi R, Asim M, Wilson KT, Zaika A, El-Rifai W. Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells. *Gut.* 2012; **61** (9): 1250-60.

