



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias, Universidad de la República Uruguay

Desarrollo de métodos bioquímicos de diagnóstico de enfermedades mitocondriales humanas OXPHOS

Ing. Martina Alonso Tomasetti

Tutoras: Dra. Celia Quijano y Dra. Laura Castro

Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina,
Universidad de la República, Uruguay

Montevideo, Noviembre 2020

Índice

Resumen.....	5
1. Introducción	7
1.1 Mitocondria.....	7
1.2 Enfermedades mitocondriales humanas.....	12
1.3 Diagnóstico de enfermedades mitocondriales	15
1.3.1 Evaluación de la función mitocondrial mediante medidas de consumo de oxígeno	16
1.3.2 Factor de crecimiento de fibroblastos 21 como biomarcador de disfunción mitocondrial a nivel de músculo esquelético	23
1.3.3 Coenzima Q ₁₀	25
1.3.4 Análisis del ADN mediante secuenciación de nueva generación	26
1.4 Diagnóstico de enfermedades mitocondriales en Uruguay	27
2. Hipótesis.....	29
3. Objetivos	30
2.1 Objetivo general.....	30
2.2 Objetivos específicos	30
4. Materiales y métodos	31
3.1 Materiales.....	31
3.2 Participantes.....	31
3.3 Obtención de PBMCs y plaquetas a partir de una misma muestra de sangre.....	32
3.4 Determinación de parámetros respiratorios indicativos de la función mitocondrial en PBMCs y plaquetas	34
3.5 Extracción de ADN	35
3.6 Determinación de ADNmt y ADNn	36
3.7 Determinación de niveles de FGF-21	37
3.8 Detección de CoQ ₁₀	38
3.9 Diagnóstico molecular	39
3.10 Diagnóstico clínico	39
3.11 Métodos estadísticos	40
5. Resultados y discusión	43
4.1 Evaluación del consumo de oxígeno mitocondrial en PBMCs y plaquetas de un control	43
4.2 Puesta a punto de la evaluación del consumo de oxígeno mitocondrial en PBMCs	46
4.3 Datos de participantes y clasificación de pacientes	51

4.4 Función mitocondrial en PBMCs y plaquetas de individuos control y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada	54
4.5 ADNmt y parámetros respiratorios en PBMCs de individuos control y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada	60
4.5.1 Número de copias de ADNmt en PBMCs	60
4.5.2 Parámetros respiratorios normalizados por el número de copias de ADNmt	67
4.5.3 Cambios en el número de copias de ADNmt de PBMCs con la edad	71
4.6 Determinación de FGF-21	73
4.7 Detección de CoQ ₁₀	77
4.8 Evaluación de pacientes sin diagnóstico molecular concluyente	78
6. Conclusiones	83
7. Perspectivas	84
8. Agradecimientos.....	85
9. Referencias.....	86

Resumen

Las enfermedades mitocondriales humanas OXPHOS (del inglés, *oxidative phosphorylation*) son un grupo de enfermedades heterogéneas causadas por fallas en la función mitocondrial, más precisamente en la fosforilación oxidativa, debidas a mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) o nuclear (ADNn). El diagnóstico de la enfermedad mitocondrial es difícil ya que mutaciones en múltiples genes pueden afectar la función mitocondrial, existe una variabilidad clínica considerable y una pobre correlación entre genotipo y fenotipo. Por lo tanto, el diagnóstico requiere de un abordaje interdisciplinario, incluyendo estudios genéticos y bioquímicos de la función mitocondrial. Actualmente, muchos de estos análisis se realizan en biopsias de músculo esquelético de pacientes.

Nuestro trabajo tuvo como objetivo central desarrollar métodos bioquímicos para la evaluación de la función mitocondrial en células obtenidas de sangre periférica, basados en la medida de consumo de oxígeno. Así como generar parámetros indicativos de la función normal o disfunción mitocondrial, que puedan ser aplicados al diagnóstico de enfermedades mitocondriales humanas. Para esto, se obtuvieron muestras de sangre con el consentimiento informado, de voluntarios adultos (de 25 a 61 años) y jóvenes (de 5 a 20 años) sin patología metabólica conocida y de pacientes con diagnóstico clínico y molecular de enfermedad mitocondrial. A partir de las muestras, se aislaron células mononucleares (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) y plaquetas en las cuales se evaluó el consumo de oxígeno y se obtuvieron parámetros respiratorios indicativos de la función mitocondrial.

Se observó una disminución significativa de algunos parámetros respiratorios de plaquetas, normalizados por número de células, en los pacientes con respecto a los controles (adultos y jóvenes). Por otra parte, encontramos una correlación negativa entre la edad y los parámetros respiratorios de PBMCs de individuos control. Considerando la edad media de los pacientes (13 años) y la existencia de esta correlación, se tomó como grupo control a los jóvenes para la comparación de parámetros respiratorios de PBMCs. Aun así, no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros respiratorios de las PBMCs, normalizados por número de células, de controles jóvenes y pacientes. Teniendo en cuenta posibles mecanismos compensatorios, se cuantificó la relación ADNmt/ADNn en PBMCs mediante PCR digital en gotas (ddPCR, del inglés *droplet digital PCR*), encontrándose un aumento significativo de ADNmt/ADNn en los pacientes. Además, se encontró una correlación positiva entre la edad y ADNmt/ADNn. Los parámetros respiratorios previamente calculados fueron entonces

normalizados por número de copias de ADNmt, y revelaron así una disminución significativa de la respiración mitocondrial en los pacientes con relación a los individuos control.

A su vez, se determinaron los niveles plasmáticos del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21, del inglés *fibroblast growth factor 21*), un biomarcador producido a nivel de músculo esquelético. En este caso se encontró un aumento significativo de los niveles en pacientes con respecto a los individuos control. Por último, se elaboraron curvas ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*) con los resultados obtenidos. Las mismas mostraron altos valores de especificidad para los parámetros respiratorios de PBMCs normalizados por ADNmt y para FGF-21. En suma, en este estudio se generaron herramientas prometedoras para la evaluación de la función mitocondrial que podrían ser útiles para el diagnóstico de los pacientes con enfermedad mitocondrial, reduciendo la necesidad de un procedimiento invasivo, como la biopsia.

Palabras clave:

bioenergética; mitocondria; enfermedades mitocondriales; PBMC; plaquetas; velocidad de consumo de oxígeno; ADNmt/ADNn; ADNmt; ddPCR; FGF-21; biomarcador

1. Introducción

1.1 Mitocondria

Las mitocondrias son organelos celulares conformados por una membrana externa y una interna separadas por un espacio intermembrana. La membrana externa mitocondrial contiene porinas, que median el intercambio de pequeñas moléculas entre las mitocondrias y el resto de la célula (Kudryavtseva et al., 2015), así como proteínas necesarias para los procesos de fusión y fisión del organelo y para su vinculación con otros componentes celulares (Kudryavtseva et al., 2016; Y. J. Liu et al., 2020; Osellame et al., 2012). La membrana mitocondrial interna encierra la matriz y tiene numerosas invaginaciones llamadas crestas (Figura 1). El número de crestas por mitocondria, así como el número de mitocondrias por célula, está relacionado con el requerimiento de energía para las funciones vitales de cada tipo de célula (Kudryavtseva et al., 2016). La membrana interna es mucho menos permeable que la membrana externa, y las moléculas que deben atravesarla, incluso pequeños iones y metabolitos, necesitan la ayuda de proteínas transportadoras. De hecho, la membrana mitocondrial interna es una de las bicapas lipídicas más ricas en proteínas de los sistemas biológicos (Vogel et al., 2006). Aquí se encuentran proteínas involucradas en la fusión mitocondrial (Kudryavtseva et al., 2016; Osellame et al., 2012) y diversos complejos proteicos multisubunitarios que cumplen procesos fundamentales para la célula (Osellame et al., 2012; Vogel et al., 2006). Los complejos más abundantes son los implicados en la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Además, en esta membrana también tienen lugar varios otros procesos, como la translocación de proteínas, el intercambio de metabolitos, el ensamblaje de complejos de proteínas, la biogénesis de centros hierro-azufre y la degradación de proteínas (Vogel et al., 2006).

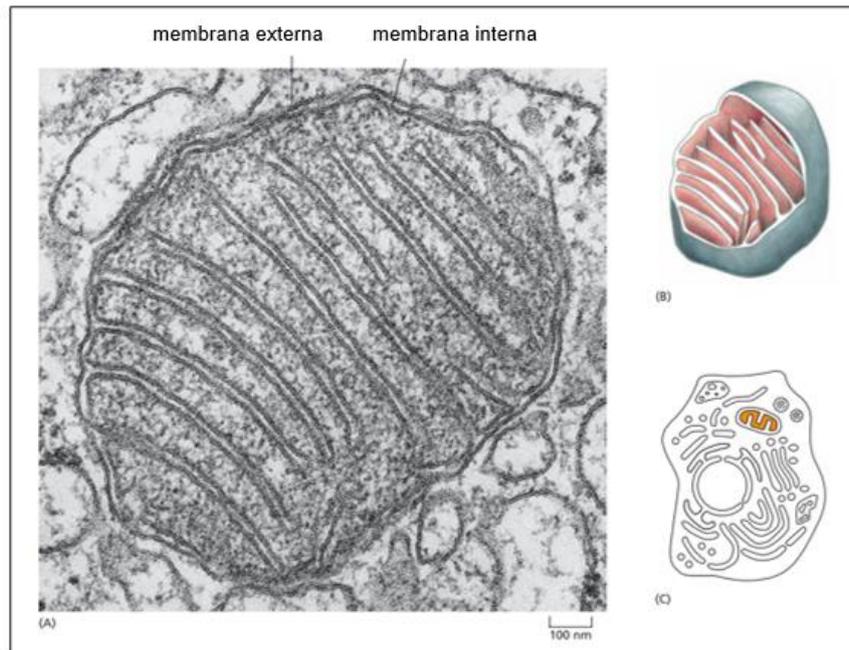


Figura 1. Estructura de las mitocondrias. (A) Micrografía electrónica de sección transversal de una mitocondria que muestra el extenso pliegue de la membrana interna formando crestas. (B) Representación tridimensional de una mitocondria que presenta la membrana externa (gris) y la membrana interna (rosa). La membrana interna contiene la mayoría de las proteínas responsables de la fosforilación oxidativa, una de las principales funciones de la mitocondria, y está altamente plegada para proveer una amplia área de superficie para esta actividad. (C) Representación esquemática de una célula que muestra la mitocondria (naranja). Extraído y modificado de Alberts et al., 2014.

El ADNmt está presente desde varios cientos a miles de copias por célula, variando ampliamente entre los tipos de células y tejidos (O'Hara et al., 2019; Scholle et al., 2018; Xing et al., 2008), y cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias. El número de copias de ADNmt por célula está en el rango de 220 - 850 en PBMCs, 320 - 1100 en espermatozoides, 1100 - 2800 en células musculares, 1200 - 10800 en neuronas y hasta 25000 en células hepáticas (Xing et al., 2008). El genoma mitocondrial es una molécula circular superenrollada de doble hebra de aproximadamente 16569 pb, compuesta por una hebra ligera y otra pesada (según la proporción de nucleótidos de mayor peso molecular) (Chocron et al., 2019) que codifica 13 subunidades pertenecientes a los complejos del sistema de fosforilación oxidativa y 24 moléculas de ARN que se requieren para la síntesis de proteínas intramitocondriales (Gorman et al., 2016) (22 ARN de transferencia y dos ribosomales) (Schapira, 2006) (Figura 2). La cadena pesada contiene las 2 secuencias de ARNr, 14 de los 22 ARNt mitocondriales y todos los genes que codifican proteínas con la excepción de ND6 (Figura 2). También hay una región no codificante de aproximadamente 1 kb que contiene

elementos reguladores para el inicio y la terminación de la transcripción de ambas cadenas (Chocron et al., 2019). El bucle D (bucle de desplazamiento) o región de control está dentro de esta región no codificante, controla la transcripción y traducción del ADNmt (Chocron et al., 2019; Gorman et al., 2016) y contiene el origen de replicación de la hebra pesada (OriH), donde se inicia la replicación (Figura 2). También existe un segundo origen de replicación en la hebra ligera (OriL) (Chocron et al., 2019) (Figura 2). Esta hebra codifica una subunidad (ND6) y 8 ARNt. Aunque el ADNmt humano codifica la maquinaria básica para la síntesis de las proteínas que codifica, sigue siendo totalmente dependiente del núcleo para la provisión de enzimas para la replicación, reparación, transcripción y traducción (Schapira, 2006).

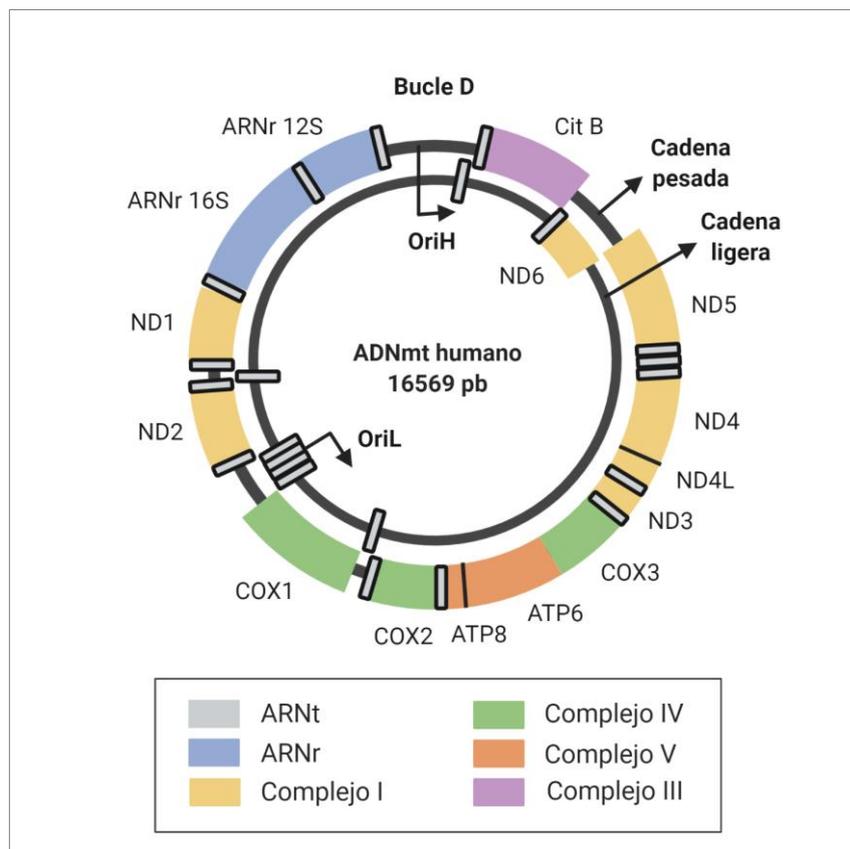


Figura 2. ADNmt humano. El ADNmt humano es una molécula circular de doble hebra (una cadena pesada y una cadena ligera), constituido por 165659 pb que codifican 13 subunidades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, 2 ARNr y 22 ARNt. La figura fue creada con BioRender.com

Las mitocondrias tienen un papel crucial en la bioenergética celular eucariota, la generación de adenosín trifosfato (ATP), molécula que provee energía necesaria para las células

(Pelletier et al., 2014; Schapira, 2012). Todas las vías catabólicas que producen energía convergen en la mitocondria. El piruvato producido por la glucólisis (principal vía catabólica de los hidratos de carbono) se transporta desde el citosol a la matriz mitocondrial. Allí, se descarboxila rindiendo CO_2 , dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADH) y acetil-CoA, en una reacción catalizada por un complejo de tres enzimas, llamado complejo piruvato deshidrogenasa. Al igual que el piruvato derivado de la glucólisis, los ácidos grasos derivados de las grasas y aceites también se convierten en acetil-CoA en la matriz mitocondrial, en la ruta conocida como β -oxidación. En este proceso también se produce NADH y dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH_2). Además del piruvato y los ácidos grasos, algunos aminoácidos también se transportan desde el citosol a la matriz mitocondrial, donde se convierten en acetil CoA o en intermediarios del ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico). En la matriz mitocondrial el grupo acetilo del acetil-CoA se transfiere a una molécula de oxalacetato para formar citrato, así entra en el ciclo de Krebs donde se oxida a CO_2 . Además, por cada ciclo se producen tres moléculas de NADH, una molécula de FADH_2 a partir de FAD y una molécula de guanosina trifosfato (GTP) a partir de guanosina difosfato (GDP). El GTP puede transferir su grupo fosfato terminal al ADP y produce una molécula de ATP en cada ciclo. El NADH y FADH_2 son moléculas transportadoras de electrones (Alberts et al., 2014) que entregan los electrones a la cadena respiratoria. Los electrones son transferidos al oxígeno por los complejos de transporte electrónico, el citocromo c y la coenzima Q_{10} (CoQ_{10}) en este proceso se libera energía que se utiliza posteriormente para producir ATP (Acín-Pérez et al., 2008). Los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) transfieren los electrones al complejo III (coenzima Q-citocromo c reductasa) a través de la CoQ_{10} . Finalmente, el complejo IV (citocromo c oxidasa) recibe electrones del complejo III a través del citocromo c. En el complejo IV los electrones reducen el oxígeno molecular a agua (Sun et al., 2016). El flujo de electrones se acopla al bombeo de protones (H^+) a través de la membrana mitocondrial interna (desde la matriz al espacio intermembrana), generando un gradiente de protones, que luego se disipa a través de la ATP sintasa (complejo V conformado por F_0 y F_1), aportando la energía necesaria para la fosforilación del adenosin difosfato (ADP) a ATP (Lehninger et al., 2013) (Figura 3). La translocasa de ADP/ATP mitocondrial es una de las proteínas más abundantes de la membrana interna mitocondrial encargada de exportar el ATP sintetizado fuera de la mitocondria e importar el ADP del citosol de regreso a la matriz mitocondrial para ser utilizado nuevamente en la síntesis de ATP (Kunji et al., 2016).

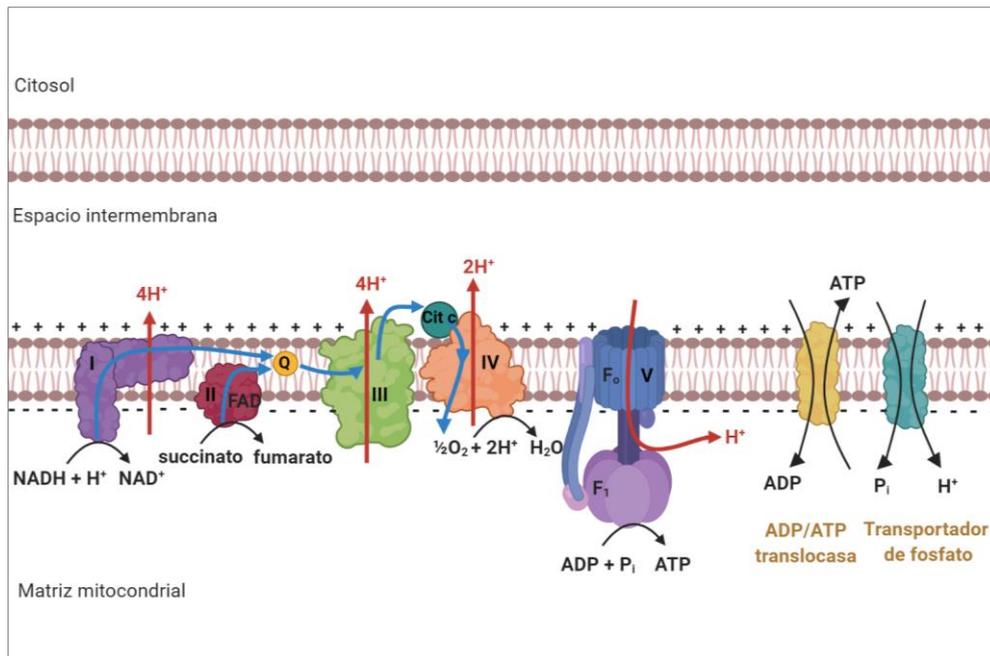


Figura 3. Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. El flujo de los electrones a través de los complejos (I-IV) de la cadena de transporte electrónico se acopla a la transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial interna, produciendo un gradiente electroquímico. Los protones pueden reingresar a la matriz a través del componente F_o del complejo V (ATP sintasa). La fuerza protón motriz que conduce a los protones de regreso a la matriz provee la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , catalizada por el componente F_1 del complejo V. La ADP/ATP translocasa exporta el ATP recién sintetizado al citosol para su uso e importa el ADP del citosol de regreso a la mitocondria. El transportador de fosfato cotransporta el fosfato inorgánico (P_i) junto con un protón (H^+). La figura fue creada con BioRender.com

Además de cumplir un rol en la oxidación de biomoléculas (piruvato, ácidos grasos, acetil-CoA) y la síntesis de ATP, las mitocondrias tienen otras funciones, que incluyen la biosíntesis de aminoácidos, grupos hemo, centros hierro-azufre y fosfolípidos para la biogénesis de las membranas. También actúan en la señalización por calcio y oxidantes, el ensamblaje del inflammasoma y juegan un papel muy importante en la muerte celular apoptótica y necrótica (Dard et al., 2020). Sin embargo, en este trabajo utilizaremos el término función mitocondrial para referirnos a la actividad de la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa.

La función mitocondrial está regulada tanto a nivel de la actividad de los complejos respiratorios, como por la asociación de estos en supercomplejos, y los procesos de biogénesis y autofagia mitocondrial (mitofagia) (Nunnari & Suomalainen, 2012). Además, las mitocondrias son organelos dinámicos sujetos a procesos de fisión y fusión que impactan en su forma y función (Mishra & Chan, 2016). La masa mitocondrial total dentro de una

célula está regulada principalmente por un equilibrio entre la biogénesis y la degradación por mitofagia. La mitofagia aumenta en condiciones de escasez de nutrientes o cuando las mitocondrias son disfuncionales, cumpliendo un rol clave en el “control de calidad del organelo” (Mishra & Chan, 2016).

1.2 Enfermedades mitocondriales humanas

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos genéticos que se caracterizan por defectos en la fosforilación oxidativa, causados por mutaciones en los genes del ADNn o el ADNmt que afectan la fosforilación oxidativa (Gorman et al., 2016; Schapira, 2012). Las enfermedades mitocondriales son el grupo más común de trastornos metabólicos hereditarios (Gorman et al., 2016), con una prevalencia estimada de aproximadamente 1:5000 (Dard et al., 2020). De todas las formas de enfermedades mitocondriales que dan inicio en la infancia (<16 años de edad) se ha estimado que la prevalencia varía de 5 a 15 casos por cada 100000 individuos. En adultos, la prevalencia de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt se estima en 9.6 casos cada 100000 individuos y la prevalencia de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNn es de 2.9 casos cada 100000 individuos. Las mutaciones de ADNmt parecen ser responsables del ~ 80% de las enfermedades mitocondriales en adultos, pero tan solo en el 20-25% de los casos de inicio en la infancia. La mayoría de las enfermedades mitocondriales de inicio en la infancia son causadas por mutaciones autosómicas recesivas en el ADNn (Gorman et al., 2016).

Las enfermedades mitocondriales pueden tener distintos patrones de herencia. Las mutaciones en genes nucleares pueden tener herencia autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X, mientras que para mutaciones de ADNmt la herencia es materna. También se han observado casos esporádicos raros debidos a mutaciones de *novo*. En pacientes con mutaciones en el ADNmt, la herencia y la presentación clínica se complican aún más por la presencia de múltiples genomas mitocondriales en una única célula, que a menudo puede conducir a una mezcla de genomas mutados y de tipo salvaje, llamada heteroplasma (Gorman et al., 2016). El nivel de heteroplasma o frecuencia de heteroplasma (HF, del inglés *heteroplasmy frequency*) es crucial para determinar el alcance de la disfunción (Gorman et al., 2016) y se requiere una carga de mutación crítica mínima para causar disfunción mitocondrial (Hirano et al., 2018). Este efecto umbral ha sido estudiado en

cíbridos, líneas celulares generadas combinando células humanas carentes de ADNmt (ρ^0) con mitocondrias portadoras de ADNmt mutado (Wallace, 1986). También en un modelo de *Drosophila*, mediante la manipulación de un gen ribosómico mitocondrial. En estos insectos se han observado diferentes manifestaciones fenotípicas patológicas dependiendo de la dosis de mutación (Chocron et al., 2019). Las mutaciones patógenas deben alcanzar al menos entre un 60 y 90% de la heteroplasmia para tener un efecto perjudicial sobre la función mitocondrial. Más precisamente, el valor umbral es de alrededor del 60% para las deleciones del mtDNA y alrededor del 90% para otras mutaciones del mtDNA (Rossignol et al., 2003). Los tejidos con los niveles más altos de heteroplasmia suelen ser el cerebro, corazón, retina, y cóclea (Davis et al., 2018). Además de este efecto umbral que afecta el fenotipo, varios trabajos reportan que es posible inhibir significativamente la actividad de un complejo de la cadena respiratoria, hasta cierto valor, sin afectar la respiración mitocondrial o la producción de energía (umbral bioquímico). A su vez, se reveló un umbral de traducción mediante el análisis cuantitativo de los efectos de varias mutaciones en el ADNmt sobre la tasa de síntesis de proteínas mitocondriales (Rossignol et al., 2003).

Hasta el momento, han sido identificadas más de 300 mutaciones y rearrreglos diferentes en el ADNmt causantes de enfermedad mitocondrial (Davis et al., 2018; E. A. Schon et al., 2012). Las mutaciones en el ADNmt generalmente, pero no siempre, inducen defectos en la función de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP (Schapira, 2012). Por otra parte, en lo que respecta al ADNn, el número de mutaciones que derivan en enfermedades mitocondriales está en constante aumento, habiéndose identificado más de 250 (Davis et al., 2018). Más de 1500 genes nucleares codifican proteínas mitocondriales, que no solo están involucradas en la fosforilación oxidativa sino también en la transcripción y replicación del ADNmt. Las mutaciones en genes nucleares esenciales para el mantenimiento del ADNmt pueden causar a su vez mutaciones puntuales, deleciones múltiples o depleción del ADNmt (Dard et al., 2020). Estas mutaciones pueden afectar no solo la estructura y contenido del ADNmt, sino también el ensamble y mantenimiento de los complejos de la cadena respiratoria, causando defectos en la fosforilación oxidativa. Además, se han descrito mutaciones en genes nucleares que codifican subunidades de la cadena respiratoria que tienden a presentarse temprano en la infancia y generalmente son fatales. Algunas mutaciones se asocian con fenotipos específicos, por ejemplo, las mutaciones en los genes *PRKN* y *PINK1* con la enfermedad de Parkinson, en *MFN2* con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A y en *FXN* con la ataxia de Friedreich (Schapira, 2012).

Los trastornos mitocondriales afectan principalmente a tejidos que son altamente dependientes del metabolismo oxidativo (Pfeffer et al., 2012). Estos tejidos incluyen el sistema nervioso central, nervios periféricos, ojo, músculo esquelético y cardíaco y órganos endocrinos (Davis et al., 2018; Pfeffer et al., 2012). Estas enfermedades pueden presentarse a cualquier edad, tener un amplio espectro de manifestaciones clínicas, ser graduales en su inicio y tener una alta morbilidad y mortalidad. Además, pueden afectar muchos tejidos diferentes, involucrando sistemas individuales o múltiples. Esto lleva a presentaciones muy variables, lo que dificulta el diagnóstico de enfermedades mitocondriales. (Davis et al., 2018).

En cuanto a la caracterización de la enfermedad, muchos individuos presentan un grupo de características clínicas que se clasifican en un síndrome clínico, como el síndrome de Kearns-Sayre (KSS), oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO) (Moraes et al., 1989), encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de apoplejía (MELAS) (Hirano et al., 1992), epilepsia mioclónica con fibras rojas irregulares (MERRF) (Hammans et al., 1993), debilidad neurogénica con ataxia y retinitis pigmentosa (NARP) (Holt et al., 1990), o síndrome de Leigh (LS) (Ciafaloni et al., 1993). Sin embargo, existe una variabilidad clínica considerable y muchos individuos afectados no encajan en una categoría en particular. Por ejemplo, mutaciones del gen de la ADN polimerasa gamma mitocondrial (POLG, del inglés polymerase gamma) causan múltiples deleciones o depleciones del ANDmt solo o en combinación (Schapira, 2012).

Por otro lado, la disfunción mitocondrial se ha identificado en otros trastornos donde no se han observado mutaciones que afecten directamente proteínas mitocondriales, sino que son secundarias a defectos producidos por la enfermedad, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. Aún queda por definir si tales anomalías mitocondriales contribuyen a la patogénesis de estas enfermedades (Schapira, 2012).

Por lo que, las enfermedades mitocondriales pueden asociarse a varias causas genéticas que afectan al genoma y no están restringidas a los defectos de la cadena respiratoria (Schapira, 2012). La clasificación de la enfermedad mitocondrial resulta difícil y la situación se vuelve aún más compleja por la pobre correlación entre genotipo y fenotipo. Intentos tempranos para tratar trastornos mitocondriales primarios utilizan suplementos, vitaminas, sustratos o transportadores de electrones, por ejemplo, la coenzima Q₁₀ (Morgan-hughes et al., 1995;

Pfeffer et al., 2012). Sin embargo, a parte de la terapia de apoyo, no existen tratamientos efectivos para la gran mayoría de las enfermedades mitocondriales (Dard et al., 2020) y muchos de los fármacos son de carácter experimental (Chinnery, 2014).

1.3 Diagnóstico de enfermedades mitocondriales

Debido a la complejidad de las enfermedades mitocondriales, el diseño de un algoritmo de diagnóstico que abarque todas estas enfermedades es difícil (Dard et al., 2020). Estos trastornos todavía carecen de biomarcadores suficientemente sensibles y específicos y la mayoría de los especialistas en medicina mitocondrial utilizan un conjunto de pautas establecidas internamente basadas en conceptos teóricos, recomendaciones publicadas, experiencia personal y anecdótica. Además, la mayoría de los criterios de diagnóstico utilizados se desarrollaron antes de la reciente expansión de los métodos de secuenciación génica que permiten identificar la presencia de mutaciones y delinear con precisión la etiología de la enfermedad en cada caso. La gran variabilidad en los enfoques de diagnóstico, la interpretación de los resultados y las pruebas utilizadas; así como en los regímenes de tratamiento y atención preventiva de los pacientes, condujo a la Sociedad de Medicina Mitocondrial (Mitochondrial Medicine Society) a la elaboración de consensos para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes (Parikh et al., 2015, 2017).

Como se mencionó anteriormente, hay situaciones en las que el cuadro clínico configura un fenotipo reconocible de causa mitocondrial (ej. síndrome de MELAS o MERRF). Pero en muchos casos y en especial en edad pediátrica, la orientación clínica es mucho más difícil. Esta situación llevó a que Morava y col. desarrollaran criterios relativamente sencillos para estimar la probabilidad de que un paciente presente una enfermedad mitocondrial y decidir si llevar a cabo una biopsia muscular, considerada el “estándar de oro” para el diagnóstico (Morava et al., 2006). El criterio de diagnóstico mitocondrial (MDC, del inglés *mitochondrial diagnosis criteria*) elaborado originalmente por Wolf y col (Wolf et al., 2002) y simplificado por Morava y col. (Morava et al., 2006) es un sistema de puntuación o *score* que considera los síntomas y signos clínicos, los estudios metabólicos, imagenológicos e histológicos del paciente. Incluyendo los síntomas musculares (máximo 2 puntos), las anomalías del sistema nervioso central (máximo 2 puntos), la participación de múltiples sistemas (máximo 3 puntos), las anomalías metabólicas y neuroimagenológicas (máximo 4 puntos). Las anomalías

histológicas pueden aumentar la puntuación en 4 puntos. Una puntuación de 5 a 7 es compatible con un “probable trastorno mitocondrial”; una puntuación de 8 a 12 confirma el diagnóstico de “trastorno mitocondrial definido” (Morava et al., 2006). En el 2017, Witters y col. realizaron una revisión de los criterios antes mencionados considerando los avances en los métodos de diagnóstico genético. En este estudio concluyen que los criterios siguen siendo útiles para el diagnóstico clínico de enfermedad mitocondrial, pero recomiendan que se realicen estudios genéticos, ya sea secuenciación de ADNmt o ADNn en sangre, antes de realizar estudios en biopsia muscular (Witters et al., 2017).

El consenso elaborado por la Sociedad de Medicina Mitocondrial recomienda la evaluación de biomarcadores en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo que incluyen medidas de lactato, piruvato, aminoácidos, acilcarnitinas y ácidos orgánicos. También, se incluyen análisis de heteroplasmia, ADNmt y ADNn en sangre, orina, o en alguno de los tejidos afectados, dependiendo de los síntomas y disponibilidad de la muestra. Además, medidas de evaluación histológica del tejido, actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria en biopsias de tejido muscular o hepático; evaluación de la cadena de transporte de electrones en tejido muscular o en fibroblastos de piel mediante medidas de consumo de oxígeno; microscopía electrónica de tejido muscular o hepático; medidas de coenzima Q₁₀ en tejidos y estudios de neuroimagenología por técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (Haas et al., 2008; Parikh et al., 2015). Aunque aún necesitan validación, recientemente se han identificado en sangre algunos biomarcadores promisorios de enfermedad mitocondrial: el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) y el factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF-15). Varios de estos métodos se explican en detalle más adelante en el texto.

1.3.1 Evaluación de la función mitocondrial mediante medidas de consumo de oxígeno

Actualmente los análisis de la función mitocondrial se realizan principalmente en muestras obtenidas mediante métodos invasivos, como biopsias de piel y/o músculo (Chinnery, 2014). Sin embargo, recientemente se han desarrollado métodos para evaluar la respiración mitocondrial de células obtenidas de sangre y, aunque esta metodología aún no se ha validado para el diagnóstico, resulta muy prometedora. Existe creciente evidencia que respalda el uso

de la función mitocondrial de células sanguíneas periféricas como un biomarcador de enfermedad. Además, se ha visto que el grado de disfunción mitocondrial en las células sanguíneas periféricas puede estar asociado con el daño tisular o la gravedad de la enfermedad (Braganza & Annarapu, 2020). Por otra parte, al ser mínimamente invasivos, estos métodos podrían utilizarse para el seguimiento del paciente y la evaluación de eficacia de la farmacología utilizada como tratamiento.

Existen muchos métodos para medir la función mitocondrial y uno de los más utilizados es la medida de velocidad de consumo de oxígeno (también conocida como respiración mitocondrial) (Brand & Nicholls, 2011). Este enfoque se basa en el principio bioquímico de la fosforilación oxidativa de que el transporte de electrones en la cadena respiratoria (cuyo paso final es la reducción del oxígeno molecular a agua) está acoplado a la fosforilación de ADP, mediante la generación y utilización del gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Z. Li & Graham, 2012). Actualmente se utilizan tres métodos diferentes para medir el consumo de oxígeno mitocondrial: medidas polarográficas, medidas de apagamiento de fluorescencia, y de resonancia paramagnética electrónica (EPR, del inglés *Electron Paramagnetic Resonance*).

La técnica de EPR permite la monitorización continua de oxígeno en células y tejidos cuando se combina con sondas paramagnéticas sensibles al oxígeno (Pelletier et al., 2014). Estas pueden ser sondas solubles o unidas a partículas, que interactúan físicamente con el oxígeno sin consumirlo (Vikram et al., 2008). La técnica se basa en el carácter paramagnético del oxígeno molecular. La interacción del oxígeno con la sonda conduce a un ensanchamiento del pico de EPR de la sonda y los anchos de línea de los espectros se correlacionan con la concentración de oxígeno o la presión parcial de oxígeno (Presley et al., 2006). Aunque esta técnica es relativamente fácil, es bastante cara y no permite la medición de múltiples muestras en simultáneo (Pelletier et al., 2014).

Por otra parte, los electrodos miden el contenido de oxígeno soluble en un sistema cerrado por polarografía (Pelletier et al., 2014). El electrodo de Clark, muy utilizado para determinar la velocidad de consumo de oxígeno, es un sensor amperométrico que mide la producción de una corriente cuando se aplica un voltaje entre dos electrodos. El electrodo utiliza la capacidad de las moléculas de oxígeno para reaccionar químicamente con agua en presencia de electrones para producir iones hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Esta reacción redox, genera una pequeña corriente y requiere una fuente de voltaje de polarización constante aplicada externamente. El

oxígeno reacciona con el agua y se reduce en la superficie de un cátodo de metal noble (por ejemplo, platino u oro) generando iones $\cdot\text{OH}$. Estos últimos, migran y reaccionan con un ánodo de referencia Ag/AgCl, provocando una reacción de oxidación en dos pasos. En esta reacción de oxidación, la plata del electrodo se oxida primero a iones de plata y los electrones se liberan al ánodo. Estos iones de plata se combinan inmediatamente con iones de cloruro para formar cloruro de plata que precipita en la superficie del ánodo. La corriente que fluye entre el ánodo y el cátodo en el circuito externo producido por esta reacción es directamente proporcional al número de moléculas de oxígeno que se reducen en la superficie del cátodo. Los electrodos de la celda polarográfica se sumergen en una solución electrolítica de cloruro de potasio y están rodeados por una membrana de polipropileno o teflón permeable al oxígeno que permite que los gases difundan lentamente hacia el electrodo. Por tanto, midiendo el cambio de corriente entre el cátodo y el ánodo, se puede determinar la cantidad de oxígeno disuelto (Mendelson, 2011). Los electrodos de Clark se utilizan para la medida de la velocidad de consumo de oxígeno en células en suspensión (Brand & Nicholls, 2011), en mitocondrias aisladas y en biopsias o trozos de tejido (Pelletier et al., 2014), pero presentan limitaciones para células adherentes que crecen en cubreobjetos o placas (Brand & Nicholls, 2011). Otra limitación de los electrodos de Clark es la baja sensibilidad que limita las medidas a muestras que puedan ser obtenidas con un alto rendimiento. Sin embargo, la introducción de la respirometría de alta resolución (por la compañía Oroboros), basada en electrodos de alta sensibilidad, minimización de la difusión de oxígeno, control de temperatura y softwares avanzados ha permitido medir la velocidad de consumo de oxígeno con mayor sensibilidad y precisión utilizando una cantidad de muestra relativamente pequeña (Braganza & Annarapu, 2020; Pelletier et al., 2014).

Por otro lado, los métodos de detección de oxígeno por apagamiento o *quenching* de fluorescencia se basan en la capacidad del oxígeno de apagar el estado excitado de las sondas (Pelletier et al., 2014). El apagamiento de la fluorescencia por el oxígeno molecular suele ser un mecanismo de difusión controlada (Arik et al., 2005) en el que prácticamente cada colisión entre el oxígeno y el fluoróforo excitado es eficaz para el apagamiento (Lakowicz & Weber, 1973). En estos ensayos el consumo de oxígeno por parte de las células o mitocondrias aisladas conduce a un aumento en la señal de la sonda (Pelletier et al., 2014). El fenómeno de apagamiento cumple con la ecuación de Stern-Volmer donde F_0 es la intensidad de fluorescencia máxima emitida por la sonda en ausencia del apagador o *quencher* (Q), F es

la fluorescencia en presencia de Q, K_{sv} es la constante de Stern-Volmer y $[Q]$ es la concentración de Q presente en el ensayo (Gerencser et al., 2009).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q]$$

El analizador de flujo extracelular Seahorse XFe (de la compañía Agilent) mide los cambios en la concentración de oxígeno, en el medio que rodea las células adheridas a una placa (Brand & Nicholls, 2011; M. Wu et al., 2007). El equipo también puede evaluar mitocondrias aisladas, sinaptosomas, cultivos en tres dimensiones y rodajas de tejido (Gerencser et al., 2009). Las medidas se llevan a cabo por medio de una sonda fluorescente que se apaga en presencia de oxígeno. Dentro de sus ventajas se encuentra ser el único sistema que permite la medición simultánea de varias muestras diferentes en una sola corrida (24 o 96 dependiendo del equipo) y que requiere una cantidad pequeña de muestra (menor a la de los métodos polarográficos recién mencionados) (Braganza & Annarapu, 2020). Durante el ensayo, el analizador usa un pistón que acerca la sonda generando una microcámara por encima de la muestra, y permite monitorear el consumo de oxígeno en un pequeño volumen (Brand & Nicholls, 2011). El sensor portador de la sonda se acopla a una fibra óptica que genera luz con la longitud de onda de excitación de la sonda (532 nm) y transmite la fluorescencia emitida (650 nm) a un conjunto de fotodetectores. El consumo de oxígeno provoca cambios en la tensión del oxígeno dentro de la microcámara transitoria en cada uno de los pocillos y cuando la concentración de oxígeno desciende (M. Wu et al., 2007) el pistón se utiliza para mezclar, permitiendo que el medio se reequilibre. El equipo permite la adición de hasta cuatro compuestos durante el experimento (Brand & Nicholls, 2011).

Otra de las ventajas de este equipo, es que permite medir simultáneamente el pH en el medio extracelular mediante una sonda fluorescente sensible a la concentración de protones (H^+). El catabolismo de la glucosa, que conduce a la generación de ATP, puede ocurrir por diferentes vías que incluyen la oxidación total de la glucosa a dióxido de carbono (CO_2) o la conversión de glucosa en lactato (Pelletier et al., 2014). Ambas vías producen ácidos (ácido carbónico y ácido láctico) que conducen a la acidificación del medio extracelular. Midiendo la tasa de acidificación extracelular en presencia de inhibidores puede determinarse la proporción de glucosa que se degrada por cada vía (Pelletier et al., 2014; M. Wu et al., 2007).

La evaluación de la función mitocondrial en células enteras, independientemente del método o instrumento elegido, se realiza mediante la adición secuencial de un inhibidor de la ATP sintasa (ej. oligomicina), un desacoplante de la fosforilación oxidativa (ej. carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona, FCCP) e inhibidores de los complejos respiratorios (ej. rotenona inhibidor del complejo I y antimicina A, inhibidor del complejo III) (Z. Li & Graham, 2012; Pelletier et al., 2014). Esta prueba revela parámetros respiratorios claves: respiración basal, ATP dependiente, ATP independiente (fuga de protones), máxima, no mitocondrial y capacidad de reserva (Brand & Nicholls, 2011). En la Figura 4 se muestra un perfil típico de velocidad de consumo de oxígeno obtenido con el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent) y los correspondientes parámetros respiratorios.

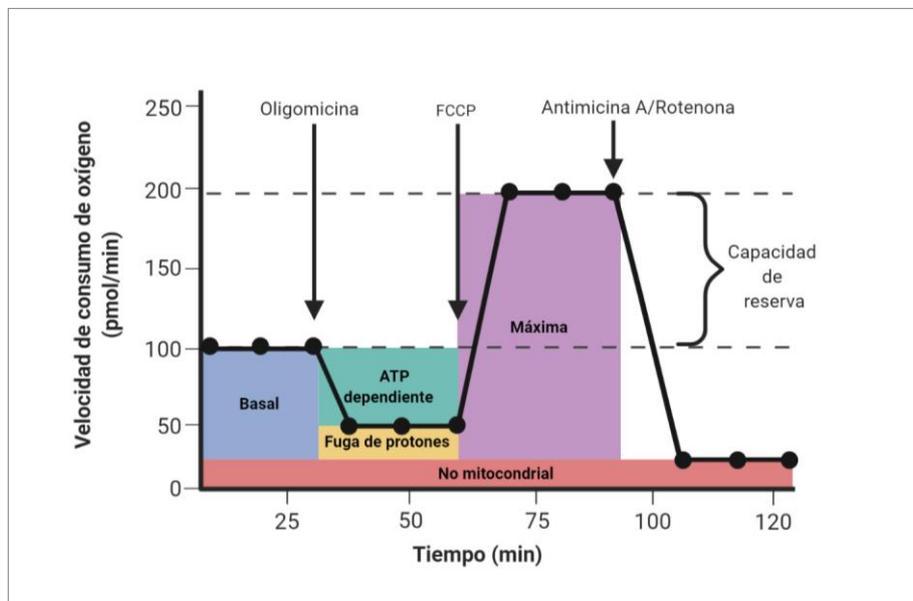


Figura 4. Velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial y obtención de parámetros respiratorios. El gráfico muestra la velocidad de consumo de oxígeno obtenida utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent) y detalla los parámetros respiratorios (respiración basal, ATP dependiente e independiente (fuga de protones), máxima, no mitocondrial y capacidad de reserva) obtenidos con el agregado secuencial de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa), FCCP (desacoplante mitocondrial) y rotenona + antimicina A (inhibidores del complejo I y III). La figura fue creada con BioRender.com

La respiración no mitocondrial se obtiene con la administración de compuestos que inhiben por completo la cadena de transporte de electrones (ej. rotenona y antimicina A) y, por lo tanto, el consumo de oxígeno debido a la respiración mitocondrial (Figura 4). Este parámetro representa el consumo de oxígeno correspondiente a procesos celulares distintos de la

respiración mitocondrial y puede deberse a la actividad de las enzimas lipoxigenasa, ciclooxygenasa, xantina oxidasa o NAD(P)H oxidasas (Braganza & Annarapu, 2020). La mayoría de las células tienen un consumo de oxígeno no mitocondrial bajo, pero significativo. Se asume que la respiración no mitocondrial es constante y se resta a todos los demás parámetros respiratorios (Brand & Nicholls, 2011), quedando representado de esta forma solo el consumo de oxígeno mitocondrial.

La respiración basal representa la tasa de respiración basal de las células en ausencia de moduladores añadidos (Braganza & Annarapu, 2020) (Figura 4). Suele estar fuertemente controlada por el recambio de ATP y, en parte, por la oxidación del sustrato y la fuga de protones. Por lo tanto, se altera en respuesta a la demanda de ATP (Brand & Nicholls, 2011).

La respiración ATP independiente (o fuga de protones) se mide después de la adición de oligomicina (Figura 4). La inhibición de la translocación de protones a través de la ATP sintasa (complejo V) por la oligomicina aumenta el potencial de membrana, y esto disminuye el transporte de electrones a través de los complejos I-IV (Braganza & Annarapu, 2020). Algunos protones se filtran a través de la membrana interna mitocondrial, disipando constantemente el potencial de membrana y estimulando la actividad de la cadena respiratoria. Esta respiración no está acoplada a la producción de ATP por la ATP sintasa y por eso persiste en presencia de oligomicina (Divakaruni et al., 2014). Este parámetro es relativamente insensible a los cambios en la oxidación del sustrato y completamente insensible a los cambios en los niveles de ADP, debidos al consumo de ATP (Brand & Nicholls, 2011). Mientras que responde a eventos, moléculas o proteínas que afectan el transporte de H^+ u otros iones a través de la membrana mitocondrial interna. Por ejemplo daño de la membrana mitocondrial interna o mayor actividad de las proteínas desacoplates (UCP, del inglés *uncoupling proteins*) (Braganza & Annarapu, 2020). Alternativamente, un cambio modesto en la tasa de fuga puede indicar un cambio en el potencial de membrana causado por la alteración en la oxidación del sustrato. Dado que la oligomicina desplaza toda la producción de ATP celular a la glucólisis, se requiere que la glucólisis se acelere quizás 10 veces para mantener la producción de ATP. Aunque la mayoría de las células tienen suficiente capacidad glucolítica para permitir esto, en algunas células la oligomicina conduce a una falta de ATP. Esto provoca una caída en la glucólisis, ya que dos reacciones de la vía requieren ATP, y también en la activación de ácidos grasos para su oxidación. Esto conduce a

una caída en el suministro de sustratos para la cadena respiratoria (NADH y FADH₂) y a una disminución progresiva de la respiración (Brand & Nicholls, 2011).

Por otra parte, al restar la respiración ATP independiente de la respiración basal se obtiene la respiración ATP dependiente (Braganza & Annarapu, 2020) (Figura 4), que informa sobre la tasa de síntesis de ATP por la ATP sintasa mitocondrial (complejo V) (Brand & Nicholls, 2011).

La tasa máxima de respiración se obtiene luego de la adición de un desacoplante como el FCCP que disipa el potencial al transportar protones a través de la membrana interna mitocondrial (Figura 4). Esta molécula desacopla el transporte de electrones por los complejos I-IV de la síntesis de ATP en el complejo V (Braganza & Annarapu, 2020). Es fundamental titular las concentraciones del desacoplante en cada nueva línea celular o tejido a evaluar y en cada condición, agregando solo lo suficiente para alcanzar la respiración máxima. Ya que el exceso de desacoplante puede afectar el transporte de electrones. En las células, la tasa máxima de consumo de oxígeno informa sobre la actividad máxima de transporte de electrones y oxidación del sustrato que pueden alcanzar las células en las condiciones del ensayo (Brand & Nicholls, 2011). Una disminución en la respiración máxima puede indicar una caída en la cantidad o actividad de los complejos o limitaciones en la disponibilidad del sustrato (Braganza & Annarapu, 2020). Estos eventos pueden a su vez estar asociados a mutaciones o daños en los componentes de la cadena respiratoria, o alteraciones en la biogénesis, mitofagia y/o dinámica mitocondrial.

La diferencia entre la respiración basal y la respiración máxima nos proporciona otro parámetro de interés, la capacidad de reserva, que representa el grado en que la célula puede aumentar la respiración mitocondrial para responder a un aumento en la demanda energética (Braganza & Annarapu, 2020) y/o cuán preparada está para responder a eventos que puedan dañar a la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 4). La caída en la capacidad de reserva indica una disfunción mitocondrial, que puede no ser evidente en condiciones basales cuando la velocidad está fuertemente controlada por el recambio de ATP, manifestándose sólo cuando aumenta la demanda de ATP. Conceptualmente, la capacidad de reserva tiene la ventaja de indicar qué tan cerca de su límite bioenergético (capacidad máxima de sintetizar ATP) está operando una célula (Brand & Nicholls, 2011).

1.3.2 Factor de crecimiento de fibroblastos 21 como biomarcador de disfunción mitocondrial a nivel de músculo esquelético

El FGF-21 es una citoquina, perteneciente a la familia FGF. La familia FGF contiene 22 miembros y FGF-21 es miembro de la subfamilia FGF19/21/23. Este factor carece del dominio de unión a heparina, presente en la mayoría de las proteínas FGF, lo que permite su secreción (Suomalainen, 2013). Aunque la mayoría de los miembros de la familia FGF actúan de manera parácrina como factores de crecimiento o diferenciación, FGF-21 actúa de manera endócrina regulando el metabolismo en células diana distantes (Hotta et al., 2009).

En humanos, el FGF-21 se expresa principalmente a nivel hepático, pero también se encuentra en adipocitos y células del páncreas. El hígado es la principal fuente de FGF-21 circulante en sangre y los niveles de este factor aumentan en respuesta al ayuno, dietas cetogénicas o carentes en algunos aminoácidos. El FGF-21 actúa sobre receptores específicos unidos al coreceptor β -klotho, en varios tejidos, desencadenando cambios en el metabolismo de glúcidos y lípidos en el hígado, tejido adiposo, corazón y cerebro (Fisher & Maratos-Flier, 2016).

Por otra parte, algunos investigadores sostienen que el FGF-21 también se sintetiza y secreta en los miocitos, cuando la función mitocondrial se encuentra alterada (Fisher & Maratos-Flier, 2016). En modelos celulares y animales con mutaciones en el ADNmt, expresión de proteínas desacoplantes, exposición a inhibidores y desacoplantes que afectan la fosforilación oxidativa, se observa un aumento en la expresión y secreción de FGF-21 (Keipert et al., 2014; Lehtonen et al., 2016; Suomalainen & Battersby, 2018; Tynismaa et al., 2010). Se ha planteado que el aumento en los niveles de este factor puede dar como resultado una movilización crónica de lípidos del tejido adiposo, cetogénesis en el hígado y trastornos metabólicos que afectarían a todo el organismo (Figura 5) (Nunnari & Suomalainen, 2012; Suomalainen & Battersby, 2018).

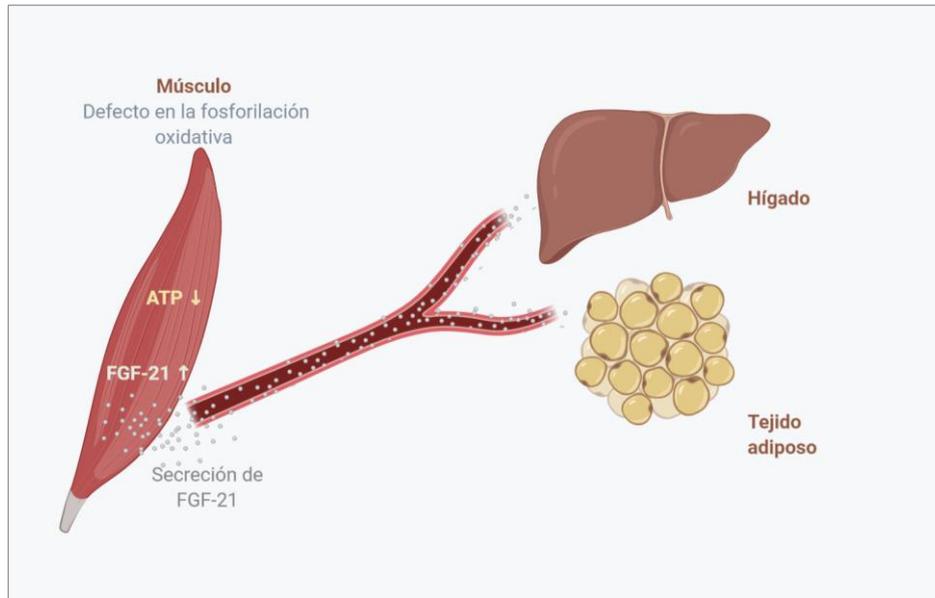


Figura 5. Síntesis de FGF-21 en el músculo de pacientes con enfermedad mitocondrial y su posible impacto en el organismo. El músculo esquelético interpreta el defecto mitocondrial como una respuesta de inanición. Las fibras musculares defectuosas secretan FGF-21 a la circulación sanguínea y puede actuar en el tejido adiposo, el hígado y otros tejidos; induciendo cetogénesis en el hígado y movilizando los lípidos almacenados en el tejido adiposo. El esquema fue generado con BioRender.com a partir de Nunnari & Suomalainen, 2012.

Los niveles de FGF-21 sérico aumentan en pacientes adultos y niños con enfermedades mitocondriales que se manifiestan en el músculo esquelético (Lehtonen et al., 2016; Morovat et al., 2017; Scholle et al., 2018; Suomalainen, 2013). La concentración sérica de FGF-21 refleja la gravedad de la enfermedad en el músculo esquelético (Suomalainen, 2013). Por esto se lo considera como un prometedor biomarcador sérico de enfermedad mitocondrial, para las deficiencias de la cadena respiratoria que se manifiestan a nivel muscular (Suomalainen, 2013; Suomalainen et al., 2011). Algunos estudios han sugerido que puede ofrecer un poder de diagnóstico mucho mejor que los marcadores séricos convencionales, como el lactato, la relación lactato:piruvato, el piruvato o la creatina quinasa (Morovat et al., 2017). De todas formas, el marcador debe ser utilizado en conjunto con otros ensayos al momento de realizar el diagnóstico, ya que algunos estudios en humanos muestran que los niveles de FGF-21 también se encuentran elevados en individuos obesos y con síndrome metabólico o diabetes tipo 2 (Badman et al., 2009).

Otro marcador de enfermedad mitocondrial recientemente identificado es GDF15. Al igual que FGF-21, GDF15 es secretado por el músculo en respuesta a una disfunción mitocondrial. Los niveles del factor aumentan en sangre en pacientes con enfermedad mitocondrial y pueden

tener efectos en múltiples tejidos (Lehtonen et al., 2016; Scholle et al., 2018; Suomalainen & Battersby, 2018) .

1.3.3 Coenzima Q₁₀

La coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) es una pequeña molécula lipofílica que consta de un núcleo de benzoquinona y una cadena lateral isoprenoide. Es sintetizada por todas las células excepto los glóbulos rojos, y comparte una vía biosintética común con el colesterol (Neergheen et al., 2017). La CoQ₁₀ actúa en la cadena respiratoria mitocondrial como el transportador de electrones de los complejos I y II al complejo III (Figura 3) (Yubero et al., 2017).

La deficiencia de CoQ₁₀ puede deberse a mutaciones que afectan a enzimas de la vía de síntesis de CoQ₁₀ (deficiencia primaria), o como resultado de una mutación en un gen que no está directamente involucrado en la síntesis de CoQ₁₀ (deficiencia secundaria) (Neergheen et al., 2017). Los defectos en la síntesis de CoQ₁₀ conducen a una variedad de enfermedades mitocondriales potencialmente tratables. Bajos niveles de CoQ₁₀ se pueden encontrar como un defecto secundario en otros trastornos (Parikh et al., 2015). Se han reportado deficiencias de CoQ₁₀ en pacientes con una variedad de trastornos de la cadena respiratoria, originados por mutaciones en el ADNmt, como el Síndrome de Kearns Sayre, o en el ADNn, como el síndrome de depleción del ADNmt. La causa de la deficiencia de CoQ₁₀ en los trastornos de la cadena respiratoria mitocondrial aún no se ha dilucidado por completo, pero puede resultar de la degradación de CoQ₁₀ como consecuencia de un aumento del estrés oxidativo. Además, las enzimas involucradas en la síntesis de CoQ₁₀ forman un complejo multienzimático asociado a la cadena respiratoria, que podría verse afectado por una cadena respiratoria defectuosa (Neergheen et al., 2017).

De hecho, el tratamiento con suplementos de CoQ₁₀ puede resultar en una mejoría clínica en la deficiencia de CoQ₁₀ y, por lo tanto, la determinación de los niveles de CoQ₁₀ es de gran importancia para permitir el inicio rápido del tratamiento (Yubero et al., 2017). La deficiencia primaria de CoQ₁₀ es única entre los trastornos de la cadena respiratoria que es potencialmente tratable si la suplementación oral se comienza con dosis altas de CoQ₁₀ durante las primeras etapas de la enfermedad y se reporta una mejoría clínica (Neergheen et al., 2017). En la actualidad, no existen protocolos terapéuticos estandarizados para el

tratamiento de pacientes con trastornos en la fosforilación oxidativa. Sin embargo, una vez diagnosticados, los pacientes generalmente reciben un "cóctel mitocondrial" que contiene antioxidantes y cofactores para los diversos componentes de la cadena respiratoria. El "cóctel" puede consistir en antioxidantes como la vitamina E y C, el precursor de flavoproteína riboflavina y el monohidrato de creatina para ayudar en la generación de ATP. La CoQ₁₀ es a menudo un componente de este "cóctel" porque además de servir como un antioxidante puede servir para restaurar el flujo de electrones en la cadena. (Neergheen et al., 2017).

Los niveles de CoQ₁₀ se pueden medir directamente en músculo, linfocitos y fibroblastos, aunque se considera que los niveles obtenidos en músculo son los más sensibles para diagnosticar la deficiencia primaria de CoQ₁₀ (Parikh et al., 2015). El método bioquímico utilizado para el diagnóstico de la deficiencia de CoQ₁₀ es el análisis de la concentración de CoQ₁₀ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa con detección ultravioleta, electroquímica o por espectrometría de masas en tándem (Arias et al., 2012; Yubero et al., 2017).

1.3.4 Análisis del ADN mediante secuenciación de nueva generación

Los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *next generation sequencing*) consisten en la secuenciación masiva en paralelo de múltiples fragmentos de ADN. Cada una de las bases del genoma se secuencia varias veces. Por medio de análisis bioinformáticos, basándose en genomas de referencia, la información obtenida se ensambla en una sola secuencia completa (Behjati & Tarpey, 2013; K. R. Schon et al., 2020). Estos métodos han permitido un mejor estudio de la etiología de las enfermedades mitocondriales, mediante la secuenciación completa del ADNmt, de paneles de genes codificados por el ADNn, la secuenciación completa del exoma (WES, del inglés *whole exome sequencing*) y/o del genoma (WGS, del inglés *whole genome sequencing*) (Carroll et al., 2014; Dard et al., 2020; Watson et al., 2020).

El uso de NGS para secuenciar el ADNmt ha permitido identificar muchas variantes del ADNmt y proporciona una evaluación precisa y sensible del nivel de heteroplasmia (Dard et al., 2020).

Por otra parte, también se acostumbra a secuenciar paneles de genes nucleares que codifican componentes de la cadena respiratoria y genes asociados a enfermedades conocidas. Además, se han utilizado paneles más grandes, como el MitoExome (1034 genes de ADNn y 37 genes de ADNmt) (Plutino et al., 2018), que se encuentran en MitoCarta (Dard et al., 2020). MitoCarta es un inventario de 1158 genes humanos y de ratón que codifican proteínas, para las cuales hay evidencia que respalda la localización mitocondrial (Calvo et al., 2016).

En las enfermedades mitocondriales, WES ha mejorado el diagnóstico en pacientes con mutaciones en genes nucleares. Estos análisis pueden realizarse en sangre y se puede evitar por completo la biopsia de piel o músculo. Esto ha llevado a que en muchos centros el diagnóstico comience con estudios genéticos de WES o WGS. En muchos casos los estudios identifican una variante patogénica conocida en un gen responsable de causar la enfermedad. Sin embargo, existen otros resultados posibles que incluyen la identificación de una nueva variante en un gen patogénico conocido; de una nueva variante en una proteína mitocondrial conocida de función conocida, que no se ha asociado previamente a la enfermedad y de una variante en una proteína de función desconocida o indeterminada (Behjati & Tarpey, 2013; K. R. Schon et al., 2020). Para los casos en que se encuentran variantes de significado incierto (VUS, del inglés *variant of uncertain significance*) la validación funcional de la patogenicidad es esencial (Dard et al., 2020).

Pese a los avances en NGS muchas instituciones siguen utilizando otros métodos. La secuenciación de Sanger se utiliza principalmente para evaluar la presencia de mutaciones conocidas, así como para validar mutaciones encontradas por NGS (Dard et al., 2020). También se han publicado muchos ensayos de qPCR que analizan mutaciones patogénicas puntuales de ADNmt y deleciones (Bai & Wong, 2005; Harbottle & Birch-machin, 2006; Krishnan et al., 2007; Phillips et al., 2014; Poe et al., 2008; Szuhai et al., 2001).

1.4 Diagnóstico de enfermedades mitocondriales en Uruguay

En el Uruguay, el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales se lleva a cabo, en la mayoría de los casos, en el Centro de Referencia Nacional de Defectos Congénitos y Enfermedades Raras (CRENADECER) del Banco de Previsión Social (BPS) y en la Cátedra de Neuropediatria de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República (UdelaR). El

grupo de Genética Clínica de la Facultad de Medicina de la UdelaR, también colabora en esta tarea. Estos son los ámbitos de referencia en nuestro país donde actualmente, se realiza el diagnóstico clínico, estudios bioquímicos básicos en sangre y orina, y estudios neuroimagenológicos que ayudan a plantear la posibilidad de una enfermedad mitocondrial.

El CRENADECER creado por el Banco de Previsión Social (BPS), es un centro que tiene por objetivos: 1) contribuir a mejorar la calidad de vida de las personas con defectos congénitos y enfermedades raras, a través de un sistema de referencia nacional para su prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación integral. 2) Disminuir la mortalidad infantil causada por defectos congénitos y enfermedades raras mediante el diagnóstico precoz y tratamiento de la mujer embarazada. 3) Generar un diagnóstico precoz y oportuno a través del *screening* del Sistema de Pesquisa Neonatal. 4) Mejorar la calidad de vida del paciente portador de un defecto congénito o enfermedad rara, a través de la atención integral con equipos multidisciplinarios (*Crenadecer*, s.f.). En esta tesis participaron dos unidades del CRENADECER: la policlínica de Errores Innatos del Metabolismo (EIM) y la Unidad de Laboratorio de Pesquisa neonatal (LPNN). Aspiramos a transferir los métodos desarrollados en esta tesis al CRENADECER para mejorar el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales en este centro.

2. Hipótesis

1. La determinación de los distintos parámetros respiratorios en células obtenidas de la sangre, nos permitirá determinar si la función mitocondrial se encuentra o no afectada en otros tejidos y servirá como herramienta para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales.
2. Por otra parte, determinar la masa y forma de las mitocondrias en células obtenidas de la sangre podría constituir otro elemento para el diagnóstico, ya que estos elementos se encuentran vinculados directamente con la función mitocondrial.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar métodos bioquímicos estandarizados para la evaluación de la función mitocondrial en células obtenidas de sangre periférica, basados en la medida de consumo de oxígeno. Generar parámetros indicativos de la función normal o disfunción mitocondrial, que puedan ser aplicados al diagnóstico de enfermedades mitocondriales humanas.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el consumo de oxígeno mitocondrial en células mononucleares y plaquetas.
2. Evaluar la masa y forma mitocondrial en células mononucleares.
3. Relacionar los parámetros respiratorios y de masa y forma mitocondrial con la presencia de mutaciones y con otros marcadores de enfermedad mitocondrial.

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales

Para el aislamiento de PBMCs se utilizó medio Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies Inc) para generar un gradiente de densidad. La extracción de ADN se realizó con el kit de extracción QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) y los cebadores para la amplificación de ADNn y ADNmt fueron provistos por Thermo Fisher Scientific. Todos los reactivos utilizados para los ensayos de ddPCR fueron adquiridos de Bio-Rad. Para la determinación de los niveles de FGF-21 en plasma se utilizó el kit de ELISA para FGF-21 Humano Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems). El resto de los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

4.2 Participantes

Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad mitocondrial del CRENADECER (n=19) y del Centro Hospitalario Pereira Rossell (n=2). El grupo de pacientes estuvo conformado por 13 mujeres y 8 hombres. La edad mediana fue de 13 años (rango de 4 meses a 47 años). Para la selección de los pacientes se establecieron criterios de inclusión y exclusión que fueron discutidos con el equipo clínico y se incluyeron en el protocolo de Facultad de Medicina. En el caso de los pacientes, se incluyeron pacientes de ambos sexos en edad pediátrica y adultos con alguna de estas características: fenotipo clínico de patología mitocondrial primaria, encefalopatía con aumento de lactato en plasma o en LCR o pico de lactato en la RNM con espectroscopia encefálica, miopatía con aumento de lactato en sangre. El paciente, sus padres o tutores legales, debieron estar de acuerdo con la supresión de la medicación que pueda afectar el sangrado o las plaquetas y la función mitocondrial una semana previa a la toma de muestras para el estudio. En este trabajo no fueron incluidos: pacientes con cuadro clínico que no fuese consistente con una enfermedad mitocondrial primaria según evaluación de las investigadoras clínicas; pacientes que no tengan aumento de ácido láctico en sangre, en LCR ni en el parénquima encefálico evidenciado por RNM con espectroscopia; mujeres embarazadas.

Por otra parte, se obtuvieron muestras de sangre de donantes voluntarios adultos sin patología metabólica conocida (controles) del Departamento de Medicina Transfusional del Hospital de

Clínicas “Dr. Manuel Quintela” y de Facultad de Medicina (n=25) y de individuos jóvenes sin patología metabólica conocida (n=25) del CRENADECER. Se reclutó a un total de 31 mujeres y 19 hombres controles. La edad mediana de los sujetos control fue de 20 años (rango de 5 a 61 años). El grupo de sujetos jóvenes control dentro de este grupo tenía una edad mediana de 14 años (rango de 5 a 20 años). En el caso de los controles se incluyeron voluntarios adultos y pediátricos de ambos sexos. No se incluyeron lactantes, individuos con patologías metabólicas, individuos con enfermedades sistémicas ni individuos con enfermedades neurológicas.

Todas las muestras de los pacientes fueron obtenidas temprano en la mañana. Se solicitó a los donantes que no hubieran ingerido alimentos sólidos ni lácteos 8 horas antes de la toma, que se abstuvieran de tomar algunos medicamentos (aspirina, antiinflamatorios no esteroideos, CoQ₁₀, riboflavina, dicloroacetato, tiamina, idebenona, vitamina C y vitamina E) durante la semana anterior y de actividades fatigantes durante al menos 36 horas antes de la toma de muestra. En el caso de los donantes menores de edad sin patología metabólica conocida, las muestras de sangre fueron extraídas de una toma llevada a cabo a raíz de otra intervención.

Cabe resaltar que antes de iniciar los procedimientos, los voluntarios, padres o tutores legales firmaron un consentimiento informado. Además, se les pidió el asentimiento a los niños mayores de 8 años. Todos los procedimientos, asentimientos y consentimientos informados fueron aprobados por los comités de ética de Facultad de Medicina, del BPS, y por la Comisión Nacional de Ética para la Investigación. El protocolo fue registrado en el Ministerio de Salud Pública de Uruguay.

4.3 Obtención de PBMCs y plaquetas a partir de una misma muestra de sangre

Las muestras de sangre (6 mL) se colectaron en tubos con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer[®] K2EDTA 5.4 mg), se dejaron reposar durante 2 h y se centrifugaron a 200 g por 10 min en una centrífuga (ThermoScientific[™] Sorvall[™] ST 16 Centrifuge Series), con baja aceleración y sin freno, a temperatura ambiente. La fase superior (plasma) se recuperó para la obtención de plaquetas y la fase inferior (leucocitos y eritrocitos) para la obtención de PBMCs (Figura 6).

Para la extracción de plaquetas, el plasma se centrifugó a 900 g por 10 min, con baja aceleración y sin freno, a temperatura ambiente. El sobrenadante correspondiente al plasma

pobre en plaquetas (PPP) fue recuperado y almacenado a -20°C para análisis posteriores. El precipitado, rico en plaquetas, fue resuspendido con 5 mL de amortiguador Tirodes sin Ca^{2+} con ácido cítrico dextrosa (ACD) (9:1 v/v) y prostaglandina I_2 (PGI_2) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y centrifugado a 900 g durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en 1 mL de buffer Tirodes PGI_2 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 6). La concentración de las plaquetas fue determinada utilizando un contador celular automatizado (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter) (Figura 6).

Para la obtención de PBMCs, la fracción inferior, obtenida en la primera centrifugación de la sangre, fue completada con medio RPMI sin suero (RPMI 10 g/L, Hepes 2.83 g/L, piruvato de sodio 0.11 g/L, glucosa 2.5 g/L, bicarbonato de sodio 1.5 g/L, penicilina 0.1 g/L, estreptomycin 0.1 g/L) hasta completar los 6 mL y diluida al medio con PBS bajo en sales (NaCl 150 mM, KPi 10 mM pH 7.4). Las PBMCs fueron obtenidas por diferencia de densidad utilizando Lymphoprep™, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Böyum, 1968). Brevemente, se colocaron 10 mL de sangre diluida en un tubo conteniendo 10 mL de Lymphoprep™. Se centrifugó a 800 g por 30 min, con baja aceleración y sin freno, y se recuperó la fase correspondiente a las PBMCs. A partir de aquí se realizaron de 2 a 3 lavados, completando el volumen hasta 15 mL con PBS y centrifugando a 250 g por 10 min (Figura 6). Por último, el pellet fue resuspendido en 500 μL de medio Seahorse (DMEM 8.3 g/L, NaCl 1.85 g/l, glucosa 5 mM, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM, Hepes 5 mM; pH 7.4) y una alícuota fue extraída para el conteo de células en el contador celular automatizado, previamente mencionado (Figura 6).

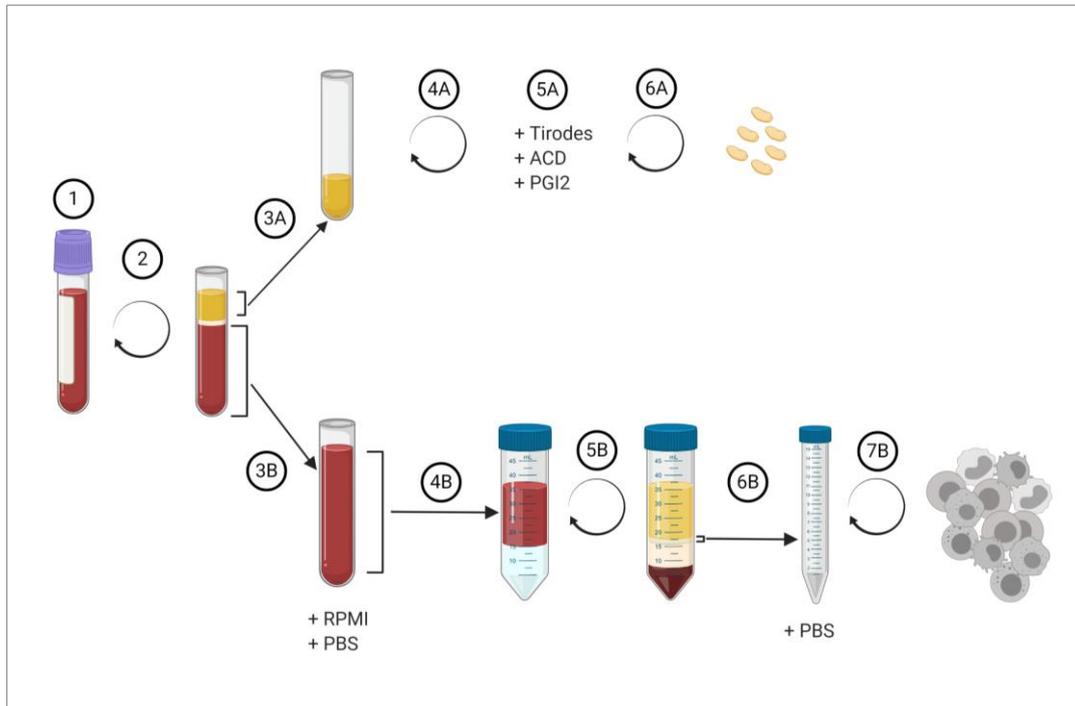


Figura 6. Obtención de PBMCs y plaquetas a partir de una misma muestra de sangre. (1) Se colectaron 6 mL de sangre de cada individuo, se dejó reposar 2 h y (2) se centrifugó a 200 g por 10 min. (3A) La fase superior se recuperó para la obtención de plaquetas y (3B) la fase inferior para la obtención de PBMCs. Para la extracción de plaquetas, (4A) el plasma se centrifugó a 900 g por 10 min. (5A) El precipitado rico en plaquetas fue resuspendido con amortiguador Tirodes sin Ca^{2+} con ACD y PGI2 y (6A) centrifugado a 900 g durante 10 min. Por último, el *pellet* de plaquetas fue resuspendido en buffer Tirodes y PGI2. (3B) Para la obtención de PBMCs se utilizó la fracción inferior, obtenida en la primera centrifugación de la sangre. A esta se le agregó medio RPMI sin suero hasta completar los 6 mL y fue diluida al medio con PBS bajo en sales. (4B) Las PBMCs fueron obtenidas por diferencia de densidad utilizando Lymphoprep™. (5B) Se centrifugó a 800 g por 30 min y (6B) se recuperó la fase correspondiente a las PBMCs. (7B). A partir de aquí se realizaron lavados con PBS, centrifugando a 250 g por 10 min. Por último, el *pellet* de PBMCs fue resuspendido en medio Seahorse. El esquema fue creado con BioRender.com

4.4 Determinación de parámetros respiratorios indicativos de la función mitocondrial en PBMCs y plaquetas

Se evaluó la función mitocondrial por medio de estudios de consumo de oxígeno en el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent). Se sembraron 2.5×10^7 plaquetas por pocillo en 100 μL de medio Seahorse en placas de cultivo celular XFe24 V7 (Agilent) y se centrifugaron a 300 g durante 10 min (Kramer et al., 2014). Las PBMCs se sembraron a 5×10^5 células/pocillo en 100 μL de medio Seahorse en placas de cultivo celular XFe24 V7 (Agilent) tratadas previamente con 100 μL de poli-D-lisina 0.1 mg/mL (Hartman et al., 2014) y se incubaron durante 30 min a 37°C para permitir que las células se adhirieran a la placa. Se

añadieron 500 μL medio Seahorse a cada pocillo, las placas se mantuvieron a 37°C durante aproximadamente 1 hora y se colocaron en el analizador de flujo extracelular.

Las medidas de velocidad de consumo de oxígeno se realizaron antes y después del agregado secuencial de inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa: oligomicina $2.5 \mu\text{M}$ (inhibidor de la ATP sintasa), FCCP (desacoplante) y antimicina A $2.5 \mu\text{M}$ y rotenona $2.5 \mu\text{M}$ (inhibidores del complejo III y I, respectivamente) (Reily et al., 2013). La velocidad de consumo de oxígeno de plaquetas y PBMCs se normalizó considerando el número de células sembrado en el pocillo, alternativamente se normalizó la respiración de las PBMCs considerando las copias de ADNmt. La tasa de consumo de oxígeno no mitocondrial (obtenida después de la adición de antimicina A y rotenona) se restó a todas las tasas obtenidas y se determinaron los parámetros respiratorios: respiración basal (línea de base de la velocidad de consumo de oxígeno); ATP independiente (velocidad de consumo de oxígeno después de la adición de oligomicina); ATP dependiente (basal - ATP independiente); máxima (velocidad de consumo de oxígeno después de la titulación con FCCP); capacidad respiratoria de reserva (máxima - basal) (Figura 4) (Brand & Nicholls, 2011).

Durante la puesta a punto de los ensayos de función mitocondrial en PBMCs, se realizaron ensayos con distintas concentraciones de oligomicina y la concentración de FCCP fue titulada para obtener la máxima respiración (J. Wu et al., 2009). También se probaron distintas cantidades de células y se evaluó la reproducibilidad entre cartuchos. El ensayo de función mitocondrial de plaquetas fue puesto a punto previamente por el Lic. Santiago Mansilla con la orientación de la Dra. Laura Castro.

4.5 Extracción de ADN

Se realizaron extracciones de ADN a partir de muestras de PBMCs de controles y pacientes utilizando QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron cuantificadas con el fluorímetro Qubit[™] 4 (Invitrogen) y almacenadas a -20°C .

4.6 Determinación de ADNmt y ADNn

Los ensayos fueron realizados en el Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria, UdelaR con la colaboración de la Mag. Laureana De Brun y el Dr. Rodrigo Puentes. A partir de las extracciones de ADN de PBMCs se determinó el número de copias/ μL de ADNmt y ADNn mediante ddPCR utilizando el sistema QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-rad). Se utilizaron cebadores dirigidos a dos regiones: 1) región del gen nuclear $\beta 2\text{M}$ (locus de una sola copia) y 2) región del arco menor del ADNmt (mtMinArc), donde las deleciones son raras (Tabla 1, Figura 2). El fragmento mtMinArc que se amplificó está ubicado en el bucle D del genoma mitocondrial donde no han sido reportadas deleciones (Phillips et al., 2014).

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores

Nombre	Sitio de unión	Secuencia (5'-3')
FmtMinArc ^a	mt 16528 – 16548	CTAAATAGCCCACACGTTCCC
RmtMinArc ^a	mt 23 – 42	AGAGCTCCCGTGAGTGGTTA
F $\beta 2\text{M}$ ^b	Chr15 15798932 – 15798958	GCTGGGTAGCTCTAAACAATGTATTCA
R $\beta 2\text{M}$ ^b	Chr15 15798999 – 15799026	CCATGTACTAACAAATGTCTAAAATGGT

^a Secuencia de referencia de NCBI: NC_012920.1

^b Secuencia de referencia de NCBI: NT_010194.17

Durante la puesta a punto de la técnica, fueron probadas distintas concentraciones de reactivo y, además, se determinó el rango de concentración de ADN inicial que puede ser correctamente cuantificado por la técnica. Se realizaron reacciones de amplificación individuales con un volumen final de 22 μL conteniendo: 8.8 μL QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix 2X (Bio-Rad), cada cebador mitocondrial a 250 nM, cebador nuclear a 250 nM, 11 μL de agua miliQ y 1.1 μL de ADN (0.5-1 ng/ μL para la amplificación de genes mitocondriales y > 60 ng/ μL para la amplificación del gen nuclear).

Las muestras se cargaron en cartuchos (DG8 QX100/QX200, Bio-Rad) de 8 pocillos y se generaron gotas mediante la emulsión con solución de aceite (QX200™ Droplet generation oil for EvaGreen, Bio-Rad) y utilizando el generador de gotas (QX200™ Droplet Generator,

Bio-Rad). La mezcla de reacción se separa en 15000-25000 gotas, por lo que miles de reacciones de amplificación se producen simultáneamente, reduciendo sustancialmente la inexactitud (Sofronova et al., 2016). Las gotas fueron transferidas a una placa de 96 pocillos (ddPCR™ 96-Well Plates, Bio-Rad) que luego fue sellada en el sellador de placas (PX1 PCR, Bio-Rad). Posteriormente, se llevó a cabo la PCR en punto final usando el termociclador C1000 Touch™ de Bio-Rad con el siguiente programa de ciclado: 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos (cada ciclo a 95°C por 30 s y 60°C por 1 min), 4°C por 5 min y 90°C por 5 min.

Finalmente, la fluorescencia de las gotas se midió en el lector (QX200™ Droplet Reader, Bio-Rad), que trabaja con el principio de citometría de flujo (Sofronova et al., 2016). Los datos fueron analizados usando QuantaSoft™ Software, que determina el número de gotas que fueron positivas y negativas en cada muestra. La probabilidad de que una gotita contenga cero o un número determinado de moléculas de ADN sigue una distribución de Poisson. Por ende, el software utiliza esta misma distribución para calcular la concentración absoluta de copias de ADN, en unidades de copias/μL (Brian Li et al., 2018).

Se obtuvo el número de copias/μL de ADNmt y ADNn y se determinó la relación entre estos valores (ADNmt/ADNn). El número de copias de ADNmt por célula se obtuvo considerando la relación ADNmt/ADNn (Phillips et al., 2014) y que hay dos copias por célula del gen β2M:

$$\text{copias de ADNmt/célula} = \frac{2 * \text{copias de ADNmt}}{\text{copias de ADNn}}$$

4.7 Determinación de niveles de FGF-21

Se determinaron los niveles de FGF-21 en muestras de plasma pobre en plaquetas de cada paciente y control, utilizando un kit para FGF-21 humano (Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placa (Varioskan™ LUX multimode microplate reader, Thermo Scientific™). La curva de calibración se realizó con diluciones (1:2) seriadas de un estándar de FGF-21 de concentración conocida incluido en el kit (20000 pg/mL). La curva fue ajustada utilizando el

algoritmo 4PL (logística de cuatro parámetros) sigmoideal. Los valores de absorbancia de las muestras fueron utilizados para determinar la concentración de FGF-21. Se asumió que las muestras de concentración menor al valor mínimo de la curva (31.3 pg/mL) carecían de FGF-21.

4.8 Detección de CoQ₁₀

Se realizó la detección de estándares comerciales de CoQ₉ 0.1 mg/mL (estándar interno) y CoQ₁₀ 0.1 mg/mL mediante HPLC-UV (Agilent Technologies 1200 Series). Se utilizó una columna de fase reversa Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm) y un método isocrático. Durante la puesta a punto, con la finalidad de aumentar la resolución de los picos, se probaron fases móviles con distintos porcentajes de isopropanol, metanol y ácido fórmico (Buján et al., 2014). La fase móvil final utilizada fue la siguiente: 60% de isopropanol, 35% de metanol y 5% de ácido fórmico. Además, se probaron dos volúmenes de inyección: 20 y 10 μL; eligiendo finalmente 10 μL. Se utilizó 1 mL/min como velocidad de flujo y la detección fue realizada midiendo la absorción de luz UV a 275 nm (Boitier et al., 1998).

A su vez, se realizó la extracción de CoQ₁₀ a partir de PBMCs utilizando dos métodos. En el primero, la extracción se hizo con metanol a -20°C (8:1, v/v, 800 μL de metanol y 100 μL de suspensión de PBMCs) (Arias et al., 2012). Se llevó a -20°C durante 40 min y se centrifugó a 12000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un vial de HPLC y se realizó una inyección de 10, 20 y 80 μL. La detección se realizó bajo las condiciones mencionadas.

Utilizando este mismo método de extracción, se probó también aumentar el volumen de suspensión celular a 400 μL y concentrar la muestra luego de la extracción mediante vacío (presión 5 mtorr, 45°C) o bajo corriente de N₂. La muestra fue resuspendida en 150 μL de metanol y transferida a un vial de HPLC. Se inyectó 80 μL y la detección se realizó bajo las condiciones mencionadas.

Para el segundo método de extracción se utilizó 580 μL de propanol y 400 μL de suspensión celular (Zhang et al., 2018). La muestra fue mezclada con un vortex por 10 s, centrifugada a 10000 rpm por 2 min (Mosca et al., 2002), secada bajo corriente de N₂ y reconstituida con 300 μL (Zhang et al., 2018). Se inyectó 80 μL y se utilizaron condiciones mencionadas para la detección.

Utilizando ambos métodos se realizaron otras pruebas como el agregado de 10 µL de estándar de CoQ₉ (1 mg/mL) a la suspensión celular previo a la extracción. También, se usó 102.5 µL benzoquinona (2 mg/mL) (Mosca et al., 2002) para oxidar totalmente a la CoQ₁₀, ya que la forma oxidada absorbe más que la forma reducida a 275 nm. La oxidación incompleta durante el procedimiento conduciría a una subestimación de la CoQ₁₀ total (Mosca et al., 2002).

4.9 Diagnóstico molecular

Los análisis de mutaciones fueron realizados en distintos laboratorios: Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay y Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay; Genodiagnosis y Genlives, Montevideo, Uruguay; Laboratorio Genomas & Enfermedad, Universidad de Santiago de Compostela, España; Hospital 12 de Octubre, Madrid, España; y Baylor Medical Genetics Laboratories, Houston, Texas, EE.UU.

En Uruguay, la secuenciación del ADNmt y los análisis bioinformáticos se llevaron a cabo en el Institut Pasteur Montevideo. Los últimos fueron realizados por el Dr. Hugo Naya y la Dra. Lucía Spangerberg de la Unidad de Bioinformática y la discusión e informe de las variantes relevantes se realizó en conjunto con el Dr. Víctor Raggio.

4.10 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de los pacientes del CRENADECER fue llevado a cabo por las Dras. Aída Lemes y Cristina Zabala y el Dr. Alfredo Cerisola; y el diagnóstico clínico de los pacientes del Centro Hospitalario Pereira Rossell fue realizado por el Dr. Víctor Raggio.

Se utilizó el sistema MDC de puntuación generado por Morava y col., al que nosotros citaremos en el texto como *score* clínico. Un *score* de 1 se corresponde a un trastorno mitocondrial poco probable; un *score* de 2 a 4 a un posible trastorno mitocondrial; un *score* de 5 a 7 a un probable trastorno mitocondrial; y un *score* de 8 a 12 a un trastorno mitocondrial definido (Morava et al., 2006).

4.11 Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 7.0. En todos los casos se verificó que se cumplieran los supuestos para realizar el análisis estadístico de elección. Se investigó la normalidad de las distribuciones con la prueba de D'Agostino & Pearson. Los resultados de los controles y pacientes fueron comparados mediante prueba t de Student (si la distribución era normal) o de Mann Whitney (si la distribución no era normal). $P < 0.05$ se consideró significativo para todos los casos (Nguyen et al., 2017) y las distintas significancias estadísticas fueron señaladas con asteriscos en los gráficos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Las correlaciones se determinaron con el coeficiente de correlación de Spearman (r) y por medio de análisis de regresión lineal con un IC del 95 %. Brevemente, la correlación representa la fuerza de la asociación lineal putativa entre las variables. Este coeficiente toma un valor en el rango de -1 a $+1$. Un r de cero indica que no existe una relación lineal entre dos variables continuas, y un r de -1 o $+1$ indica una relación lineal perfecta. Si r es un número positivo, las variables están directamente relacionadas. Si, por el contrario, r es un número negativo, las variables están inversamente relacionadas (Mukaka, 2013). Para la interpretación de estos valores nos basamos en la regla propuesta por Hinkle y col (Tabla 2) (Hinkle et al., 2003).

Tabla 2. Regla empírica para interpretar el tamaño de un coeficiente de correlación (Hinkle et al., 2003)

Tamaño de la correlación	Interpretación
0.90 a 1.00 (-0.90 a -1.00)	Correlación positiva (negativa) muy alta
0.70 a 0.90 (-0.70 a -0.90)	Correlación positiva (negativa) alta
0.50 a 0.70 (-0.50 a -0.70)	Correlación positiva (negativa) moderada
0.30 a 0.50 (-0.30 a -0.50)	Correlación positiva (negativa) baja
0.00 a 0.30 (0.00 a -0.30)	Correlación insignificante

La capacidad de los distintos parámetros respiratorios y niveles de FGF-21 para diferenciar un individuo “enfermo” de uno “no enfermo” se evaluó por medio de curvas ROC (Hajian-Tilaki, 2013). Las curvas se realizaron con el software GraphPad Prism 7.0 considerando los valores del grupo control y del grupo pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada. Dicho análisis arrojó distintos valores como el área bajo la curva, sensibilidad, especificidad, LR e intervalos de confianza del 95%. El área bajo la curva se emplea como un índice de la

exactitud de la prueba para diferenciar entre “enfermo” y “sano”. La exactitud máxima correspondería a un valor de 1 y la mínima a uno de 0.5 (Hajian-Tilaki, 2013). Por otra parte, los valores de sensibilidad y especificidad para cada método, calculados automáticamente por el Software, se basaron en las siguientes ecuaciones tomando en cuenta el número de verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos negativos (FN) y Falsos positivos (FP) (Hajian-Tilaki, 2013):

$$\text{Fracción de Verdaderos Positivos} = \text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Fracción de Verdaderos Negativos} = \text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$\text{Fracción de Falsos Positivos} = 1 - \text{especificidad} = \frac{FP}{VN + FP}$$

$$\text{Fracción de Falsos Negativos} = 1 - \text{sensibilidad} = \frac{FN}{VP + FN}$$

Resultado	Enfermedad	
	Presente	Ausente
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN
Total	Pacientes con enfermedad = VP + FN	Pacientes sin enfermedad = FP + VN

También se obtuvo la razón de verosimilitud (LR, del inglés likelihood ratio) que no es más que la razón entre la posibilidad de observar un resultado en los pacientes con la enfermedad versus la posibilidad de ese resultado en pacientes sin la patología (Fuente-alba & Villagra, 2017):

$$LR+ = \frac{\text{sensibilidad}}{1 - \text{especificidad}}$$

Para cada método se eligió un punto de corte para el diagnóstico, tomando en cuenta el mejor par sensibilidad/especificidad y un valor LR alto.

En cuanto al número de individuos a evaluar (n), basándonos en bibliografía, (Nguyen et al., 2017) y en colaboración con la Dra. Mariela Garau (Departamento de Métodos Cuantitativos de la Facultad de Medicina, UdelaR) se calculó un n de 16 para estimar la media de la capacidad reserva en plaquetas con una imprecisión del 10 % y una confianza de 95 %. Este n sería suficiente para la estimación de la media de la respiración basal, respiración independiente de la síntesis de ATP y respiración máxima en las mismas condiciones. Por otro lado, la estimación de los parámetros en PBMCs con una imprecisión del 10 % y una confianza del 95 % demandaría un n de 25. Sería ideal contar con el mismo n para la población con enfermedad mitocondrial, pero no fue posible contar con este número de pacientes con diagnóstico molecular confirmado. Cabe destacar que se utilizó este cálculo basado en las medidas de la velocidad de consumo de oxígeno normalizado por el número de células y no por copias de ADNmt.

5. Resultados y discusión

5.1 Evaluación del consumo de oxígeno mitocondrial en PBMCs y plaquetas de un control

Una de las formas de estudiar la función mitocondrial es evaluando la velocidad de consumo de oxígeno en células intactas con el agregado de inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. Estas medidas de consumo de oxígeno nos permiten determinar distintos parámetros respiratorios de interés. Las células seleccionadas para estos ensayos fueron PBMCs y plaquetas, obtenidas de sangre periférica, ya que se ha visto que pueden actuar como marcadores de disfunción mitocondrial en distintas condiciones patológicas (Chacko et al., 2013). La velocidad de consumo de oxígeno de PBMCs y plaquetas se estudió utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent).

En la Figura 7 se muestran perfiles típicos de velocidad de consumo de oxígeno obtenidos durante los ensayos de células obtenidas de un individuo control. La antimicina A y rotenona son inhibidores del complejo III y I respectivamente. Éstos fueron agregados para inhibir la cadena de transporte de electrones y discriminar la respiración mitocondrial de la no mitocondrial (Brand & Nicholls, 2011).

Inicialmente se midió la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de agregados. Al restarle la respiración no mitocondrial a este valor, obtuvimos el parámetro respiratorio conocido como consumo de oxígeno basal o respiración basal. Como se puede observar en la Figura 7, la diferencia que existe entre la respiración basal de las plaquetas y PBMCs es notoria. En este caso, la respiración basal de los PBMCs es aproximadamente 10 veces mayor a la de las plaquetas. Esto se puede explicar por las diferencias en el número de mitocondrias por célula. Las plaquetas sanas contienen entre 5 y 8 mitocondrias (Melchinger et al., 2019), un número extremadamente pequeño en comparación al de la mayoría de las células nucleadas humanas como las PBMCs, que contienen de cientos a miles de mitocondrias (Melchinger et al., 2019).

Luego, con el agregado de oligomicina, un inhibidor del complejo V (ATP sintasa), se observa una caída en la velocidad de consumo de oxígeno en ambos tipos celulares. En esta etapa, obtenemos la respiración independiente de la síntesis de ATP y la respiración

dependiente de la síntesis de ATP (Brand & Nicholls, 2011). Como se puede observar en la Figura 7, en las plaquetas y las PBMCs la respiración ATP independiente, constituyó un 20% y un 45% de la respiración basal, respectivamente. Mientras que la proporción de la respiración basal que se utiliza para la síntesis de ATP es mucho mayor en las plaquetas (80%) que en las PBMCs (55%). Esto es consistente con estudios previos que muestran que la respiración plaquetaria está altamente acoplada a la producción de ATP (Garcia-souza & Oliveira, 2014). Se ha mostrado que la respiración dependiente de la síntesis de ATP representa entre el 50 - 67% del consumo basal de oxígeno en las plaquetas (Garcia-souza & Oliveira, 2014; Melchinger et al., 2019). Las plaquetas son muy activas metabólicamente (Alfatni et al., 2020; Melchinger et al., 2019) y requieren niveles altos de ATP para el funcionamiento de los canales iónicos que mantienen el equilibrio iónico intracelular, esencial para prevenir la activación plaquetaria en condiciones basales (Alfatni et al., 2020). La fosforilación oxidativa mitocondrial brinda entre el 30-40% del ATP de las plaquetas (Melchinger et al., 2019). Los parámetros respiratorios obtenidos para los PBMCs se encuentran dentro de los valores reportados en literatura (Czajka et al., 2015; Nicholas et al., 2017; Spangenberg et al., 2018).

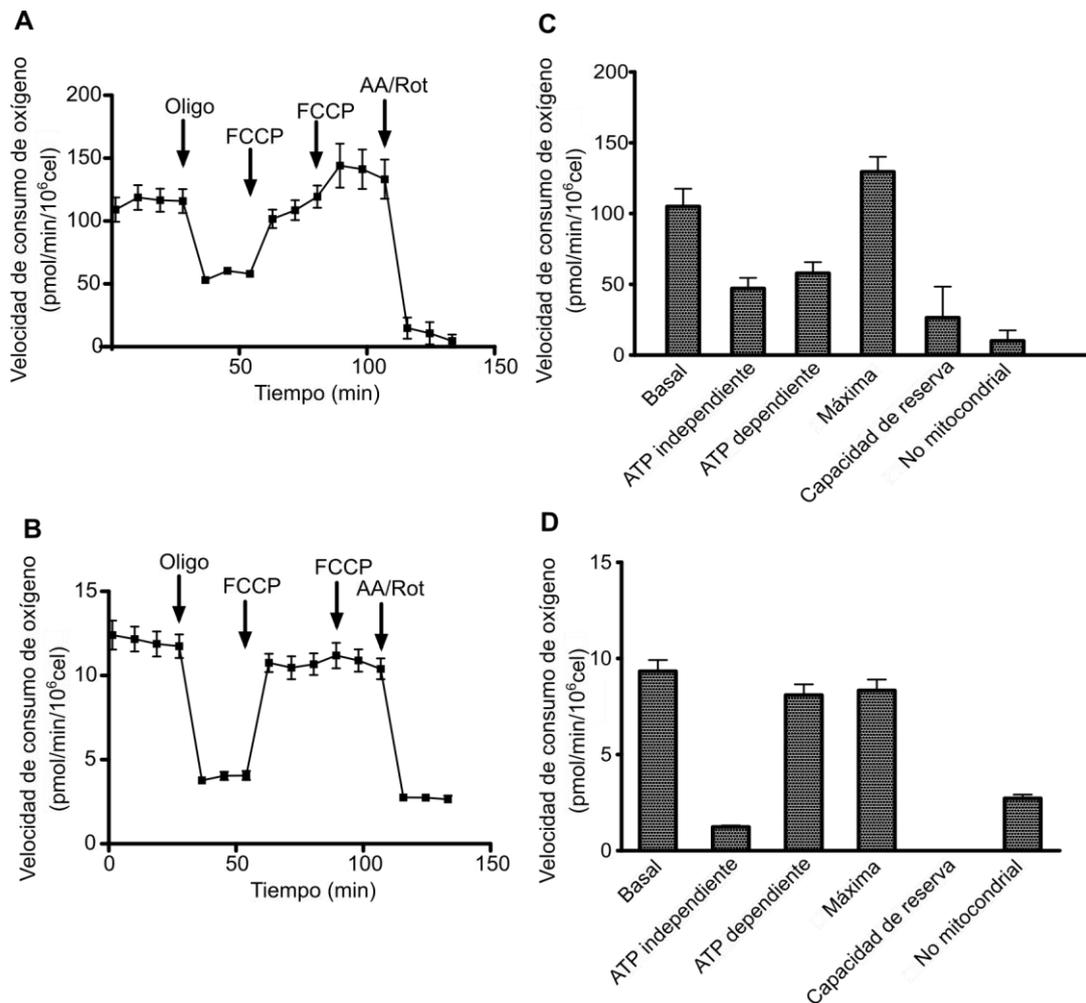


Figura 7. Velocidad de consumo oxígeno y parámetros respiratorios de PBMCs y plaquetas. Se midió la velocidad de consumo de oxígeno en células sanguíneas obtenidas de un individuo del grupo control utilizando un analizador de flujo extracelular (Seahorse XFe24, Agilent). Las medidas se realizaron en A) PBMCs (5×10^5 cel/pocillo) y B) plaquetas (2.5×10^7 cel/pocillo) antes y después del agregado secuencial de oligomicina (Oligo; concentración final $2.5 \mu\text{M}$), FCCP (concentraciones finales de 1 y $3 \mu\text{M}$ para PBMCs y concentraciones finales de 0.5 y $1 \mu\text{M}$ para plaquetas). A partir de los gráficos (A) y (B), se determinaron los parámetros respiratorios de C) PBMCs y D) plaquetas. Todos los datos fueron normalizados por número de células. Los resultados son el promedio \pm SD de los replicados técnicos obtenidos ($n=5$).

Posteriormente, se adicionó el desacoplante FCCP, para disipar el gradiente de protones de la membrana mitocondrial interna, permitiendo a la cadena de transporte de electrones funcionar a su máxima velocidad. En este paso, obtenemos la respiración máxima y la capacidad de reserva (diferencia entre la respiración máxima y basal) (Brand & Nicholls, 2011). Como se puede observar en la Figura 7, el agregado de FCCP condujo a un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno en las PBMCs, que sobrepasó los valores de consumo basal. Por el contrario, en las plaquetas la adición de FCCP produjo un aumento en el consumo de oxígeno que no superó los valores basales. En lo que refiere a la capacidad de

reserva, se ha reportado que generalmente es de aproximadamente el 20% del valor basal en las plaquetas (Riou et al., 2020) ya que funcionan casi a la máxima velocidad en condiciones basales (Chacko et al., 2013). Mientras que se plantea que la capacidad de reserva es más alta en PBMCs, superando el 20 % (39% para los monocitos, 34% para los linfocitos) (Riou et al., 2020). De acuerdo con lo visto por otros, en nuestro caso la capacidad de reserva fue mayor en las PBMCs (25 % del valor basal) que en las plaquetas donde esta fue nula.

En suma, a partir de este análisis surge que las plaquetas, en comparación a las PBMCs, tienen una respiración ATP dependiente más alta y capacidad de reserva más baja, o nula como fue en este caso. Estas diferencias en el consumo de oxígeno mitocondrial dejan en evidencia diferencias metabólicas en la generación de energía entre estas células.

5.2 Puesta a punto de la evaluación del consumo de oxígeno mitocondrial en PBMCs

Se puso a punto la medida de función mitocondrial evaluando la velocidad de consumo de oxígeno en PBMCs obtenidos de muestras de sangre periférica de individuos control. Se realizaron ensayos con distinto número de células y distintas concentraciones de reactivos. Además, se evaluó la reproducibilidad entre cartuchos.

Para comenzar, se hicieron titulaciones con oligomicina para encontrar la concentración óptima que inhibe a la ATP sintasa; y con FCCP para obtener la respiración máxima. Los ensayos se realizaron con 5×10^5 cel/pocillo. En la Figura 8 se muestran los resultados de velocidad de consumo de oxígeno para las distintas concentraciones de los reactivos. Como se observa en la Figura 8A una concentración de 2.5 μM de oligomicina logró inhibir completamente a la ATP sintasa y redujo el consumo de oxígeno mitocondrial. Concentraciones menores utilizadas no afectaron la respiración mitocondrial. Por otro lado, fue necesaria una concentración final de 3 μM de FCCP para lograr la respiración máxima. A concentraciones mayores del desacoplante, la respiración cae y es menor a la velocidad máxima.

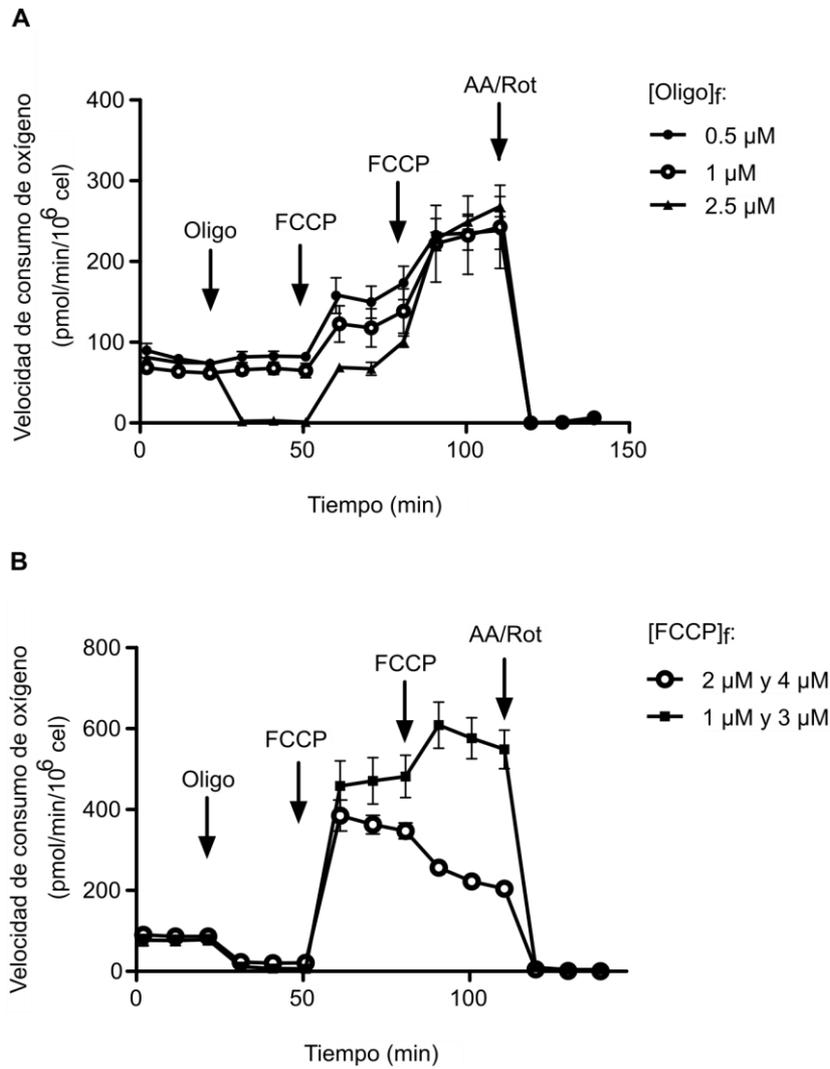


Figura 8. Titulación de reactivos para evaluar consumo de oxígeno en PBMCs. La concentración de oligomicina (A) y FCCP (B) fue titulada para optimizar los ensayos de respiración mitocondrial. Se midió la velocidad de consumo de oxígeno en PBMCs (5×10^5 cel/pocillo) antes y después del agregado de: A) oligomicina (Oligo; concentración final 0.5, 1 o 2.5 μM), FCCP (concentración final 1 y 3 μM) y antimicina/rotenona (concentración final AA/Rot; 2.5 μM /2.5 μM). B) Oligomicina (Oligo; concentración final 2.5 μM), FCCP (concentración final 1 y 3 μM o 2 y 4 μM) y antimicina/rotenona (concentración final AA/Rot, 2.5 μM /2.5 μM). Los resultados para cada condición son el promedio \pm SD de los replicados técnicos obtenidos (n=5).

Siguiendo con la puesta a punto, se evaluó la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial sembrando distinto número de PBMCs (3×10^5 , 5×10^5 , 7×10^5 y 9×10^5 cel/pocillo). En la Figura 9 se muestran las gráficas de velocidad de consumo de oxígeno para cada condición y, en la Figura 10, los parámetros respiratorios mitocondriales derivados de las mismas en función del número de células.

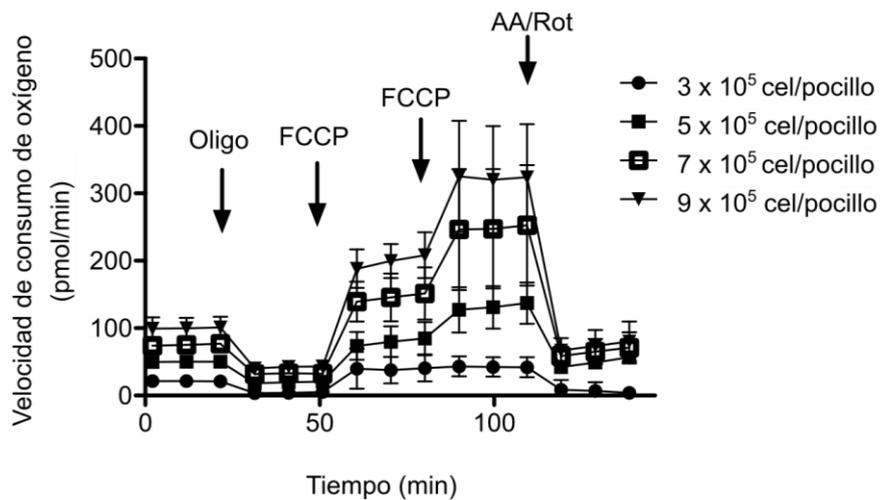


Figura 9. Optimización del número de PBMCs por pocillo para la evaluación del consumo de oxígeno. Se evaluó la velocidad de consumo de oxígeno de 3×10^5 , 5×10^5 , 7×10^5 y 9×10^5 cel/pocillo tal como se indicó en Figura 7. Los resultados para cada condición son el promedio \pm SD de los replicados técnicos obtenidos (n=5).

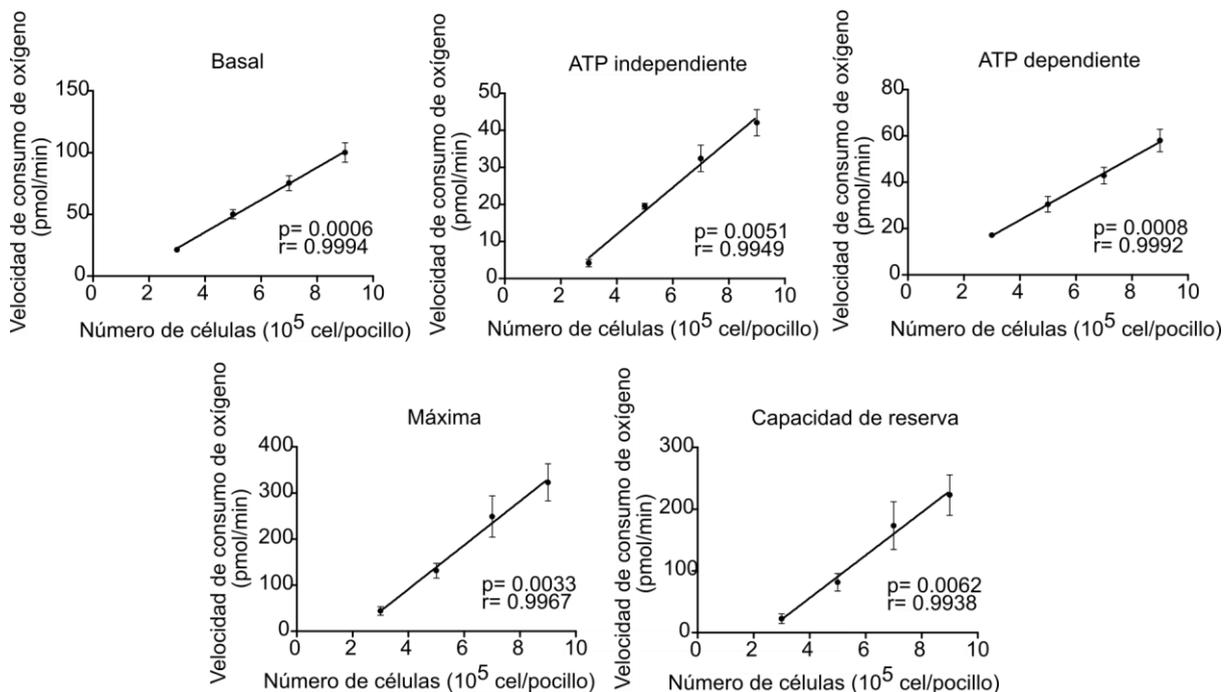


Figura 10. Correlación entre el número de PBMCs y los parámetros respiratorios. A partir de las gráficas que se muestran en la Figura 9, se determinaron los parámetros respiratorios mitocondriales y se analizó la correlación de estos con el número de células en el pocillo. Se utilizó una prueba de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95%. Se muestra el valor de p y el coeficiente de Spearman (r) para cada gráfico. Los resultados para cada condición son el promedio \pm SD de los replicados técnicos obtenidos (n=5).

Como se puede observar en la Figura 9, en todas las condiciones evaluadas se observó la respuesta esperada frente al agregado de los inhibidores y desacoplantes utilizados. Además, se evidenció una correlación positiva muy alta (los valores de r son próximos a 1) entre los parámetros respiratorios mitocondriales y el número de PBMCs (Figura 10). La positividad de la correlación indica que ambas variables están directamente relacionadas.

En función de estos resultados, decidimos trabajar con 5×10^5 cel/pocillo, ya que consideramos que en estas condiciones podríamos apreciar variaciones (aumento o disminución) de la función mitocondrial, entre los individuos a evaluar.

En la literatura se reportan distintas concentraciones finales de oligomicina, FCCP y número de PBMCs por pocillo para los ensayos en el Seahorse XFe24. El número de células se encuentra en el rango de $2.5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cel/pocillo y se utilizan concentraciones de oligomicina de $0.5 - 5 \mu\text{M}$ y de FCCP de $1 - 3 \mu\text{M}$ (Hartman et al., 2014; Jones et al., 2015; Nicholas et al., 2017; Rose et al., 2020; Tomas et al., 2017). En conclusión, podríamos decir, que las condiciones puestas a punto durante este trabajo (número de células por pocillo, la concentración de oligomicina y FCCP) son similares a las utilizadas por otros autores en reportes anteriores.

Luego, se evaluó la reproducibilidad de las medidas entre cartuchos del Seahorse XFe24 (Agilent). Se evaluó el consumo de oxígeno de PBMCs de un mismo individuo, utilizando dos cartuchos diferentes en el mismo día (Figura 11A). A partir de estos datos se calcularon los parámetros respiratorios correspondientes (Figura 11B). No se encontraron diferencias significativas entre ambos cartuchos para ningún parámetro, indicando una muy buena reproducibilidad.

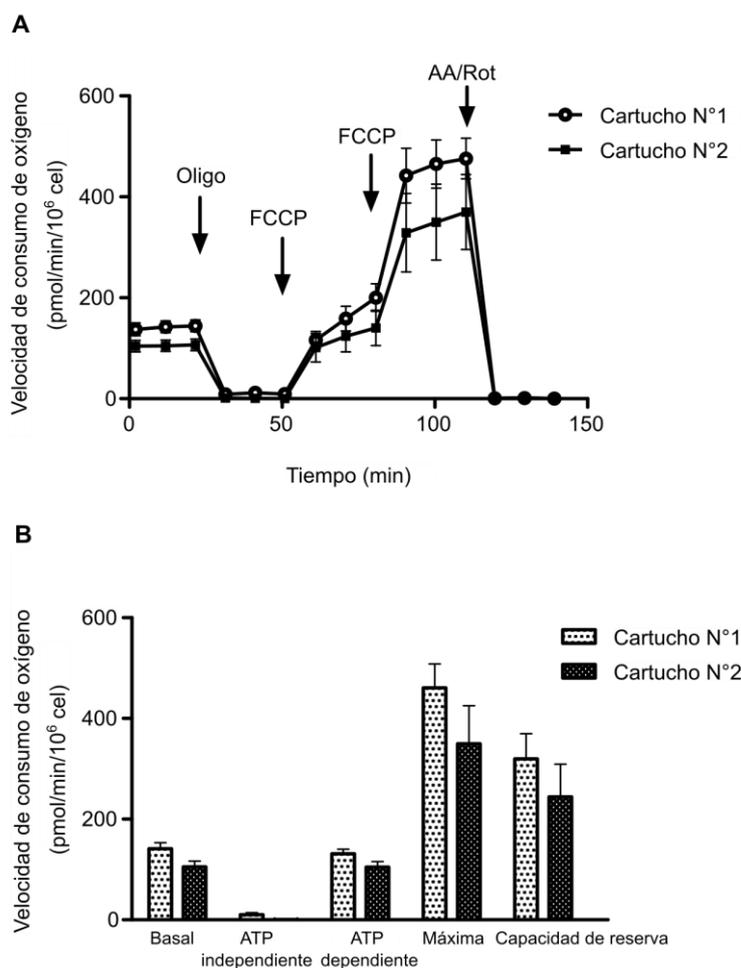


Figura 11. Reproducibilidad entre cartuchos. Se evaluó la reproducibilidad de las medidas obtenidas utilizando dos cartuchos Seahorse XFe24 diferentes. A) Se evaluó la velocidad de consumo de oxígeno de PBMCs (5×10^5 cel/pocillo) antes y después del agregado secuencial de oligomicina (Oligo, concentración final $2.5 \mu\text{M}$), FCCP (concentraciones finales de 1 y $3 \mu\text{M}$) y antimicina/rotenona (concentración final AA/Rot, $2.5 \mu\text{M}/2.5 \mu\text{M}$). B) A partir de los gráficos en (A), se determinaron los parámetros respiratorios mitocondriales. No se encontraron diferencias significativas entre ambos cartuchos para ningún parámetro aplicando la prueba U de Mann Whitney. Todos los datos fueron normalizados por número de células. Los resultados son el promedio \pm SD de los replicados técnicos ($n=5$).

Por otro lado, se determinaron los coeficientes de variación (CV) entre los pocillos de cada cartucho para cada parámetro (Sjövall et al., 2013). El CV se calculó como el cociente entre la desviación estándar (SD) y el promedio del parámetro respiratorio (Kremer et al., 2018). En nuestro caso, los parámetros con menor variabilidad fueron la respiración dependiente de ATP y la respiración basal, mientras que la respiración ATP independiente presentó el CV más alto indicando una mayor variabilidad de estos datos (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficientes de variación para cada parámetro respiratorio

Cartucho N°1	Promedio (pmol/min/10⁶cel)	SD (pmol/min/10⁶cel)	CV
Respiración basal	141	29	0.21
Respiración ATP independiente	10	11	1.1
Respiración ATP dependiente	131	21	0.16
Respiración máxima	461	116	0.25
Capacidad de reserva	320	123	0.39
Respiración no mitocondrial	71	16	0.22

Cartucho N°2	Promedio (pmol/min/10⁶cel)	SD (pmol/min/10⁶cel)	CV
Respiración basal	105	28	0.27
Respiración ATP independiente	0.6	1	1.88
Respiración ATP dependiente	105	27	0.26
Respiración máxima	350	185	0.53
Capacidad de reserva	244	160	0.65
Respiración no mitocondrial	73	15	0.21

5.3 Datos de participantes y clasificación de pacientes

Las muestras de sangre de los individuos control fueron obtenidas de donantes de sangre del Departamento de Medicina Transfusional del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela”, de docentes de la Facultad de Medicina y de jóvenes y menores de edad del Centro de Referencia Nacional de Defectos Congénitos y Enfermedades Raras (CRENADECER) del Banco de Previsión Social (BPS). En el caso de los menores de edad la muestra de sangre se obtuvo a partir de la sangre extraída para otros estudios coordinados por el médico tratante. Las muestras de sangre de los pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad mitocondrial fueron obtenidas en el CRENADECER y en el Centro Hospitalario Pereira Rossell. En la Tabla 4 se muestran los datos edad y sexo de los grupos controles y pacientes analizados. También se indica si individuos consumían algún tipo de medicación, diferente a la que se le había solicitado de abstenerse.

El diagnóstico clínico de los pacientes del CRENADECER fue llevado a cabo por las Dras. Aída Lemes y Cristina Zabala y el Dr. Alfredo Cerisola; y el de los pacientes del Centro Hospitalario Pereira Rossell fue realizado por el Dr. Víctor Raggio. A cada paciente se adjudicó un *score* clínico según los criterios establecidos en el trabajo de Morava y col. (Morava et al., 2006). Debemos mencionar que en la mayoría de los casos no se contaba con todos los estudios establecidos en los criterios, por lo cual consideramos que los pacientes en general tienen un puntaje o *score* clínico mínimo.

Por otra parte, para el diagnóstico molecular se realizó el análisis de las secuencias para la identificación de mutaciones en el ADNmt y/o el exoma de los pacientes, responsables de la enfermedad. Se encontraron mutaciones patogénicas en el ADNmt o ADNn en 9 de los 21 pacientes evaluados, que confirmaron la existencia de una enfermedad mitocondrial. En la Tabla 5, se muestran los genes afectados, las mutaciones y, para las variantes de ADNmt, la frecuencia de heteroplasmia (HF). Los componentes afectados se obtuvieron de la base de datos Uniprot (The UniProt Consortium, 2019) y el registro genético del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Los valores de *score* clínico se determinaron en base a los Criterios de Diagnóstico Mitocondrial como se describe en Morava et al., 2006. Se muestran las determinaciones del diagnóstico, la edad de aparición de la enfermedad y la edad de muestreo (para tasa de consumo de oxígeno, número de copias de mtDNA y FGF-21).

Tabla 4. Datos de grupos control y paciente

	Controles (adultos y jóvenes)	Controles (jóvenes)	Pacientes (todos)
	n=50	n=25	n=21
Edad, mediana (rango)	20 (5 – 61 años)	14 (5 – 20 años)	13 (4 meses - 47 años)
Mujer, n (%)	31 (62)	17 (68)	13 (62)
Hombre, n (%)	19 (38)	8 (32)	8 (38)
Consumen medicación¹, n	12	5	0

¹ Medicamentos consumidos por algunos controles: T4, valproato, alopurinol, risperidona, topiramato, incontina, levetiracetam, fluoxetina, omeprazol, paroxetina, progestogeno.

Tabla 5. Resumen de datos clínicos y moleculares de pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada

Paciente (código)	Mutación	HF	Genoma mutado	Componente afectado	Score clínico	Diagnóstico	Edad de inicio	Edad en el muestreo
#1	SLC25A4 exon 2: c.239G > A (p.R80H) ¹	-	Nuclear	Translocasa mitocondrial ADP/ATP	12	Miopatía mitocondrial	neonato	9 años
#2	MT-ND6 m.14459G > A ²	1	Mitocondrial	NADH deshidrogenasa (Complejo I)	7	Síndrome de Leigh	5 años	20 años
#3	MT-TK m.8344A > G ²	0.91	Mitocondrial	ARNt lisina	8	Síndrome de Leigh	5 años	15 años
#4	MT-ATP6 m.8993T > G ³	0.87-0.92	Mitocondrial	ATP sintasa (Complejo V) subunidad a	8	Síndrome de Leigh	8 meses	13 años
#5	MT-ATP6 m.8993 T > G ³	0.87-0.92	Mitocondrial	ATP sintasa (Complejo V) subunidad a	5	Síndrome de Leigh	6 meses	13 años
#6	PDHA1 exon 10: c.969_970insA CTT(p.Q323fs) ₄	-	Nuclear	Piruvato deshidrogenasa (lipoamida) alfa 1	8	Deficiencia de PDH	neonato	8 meses
#7	MT-ND6 m.14465 G > A; MT-ND5 m.12662A > G; MT-TL1 m.3263C > T ⁵	0.93; 1; 1	Mitocondrial	NADH deshidrogenasa (Complejo I); ARNt leucina	5	Síndrome de Leigh	1 año	15 años
#8	EARS2 exon 3: c.322C > T (p.R108W), exon 1: c.1A > G (p.M1V) ⁴	-	Nuclear	Glutamil ARNt sintetasa 2 (mitocondrial)	7	LTBL	1 mes	4 meses
#9	MT-ATP6 m.8993T > G ²	0.99	Mitocondrial	ATP sintasa (Complejo V) subunidad a	6	MELAS	5 meses	1 año

Abreviaturas: LTBL, Leucoencefalopatía con afectación del tálamo y tronco encefálico y lactato elevado; MELAS, miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, episodios similares a accidentes cerebrovasculares; PDH, piruvato deshidrogenasa. Laboratorio o Institución responsable del análisis molecular:

¹ Laboratorio Genomas & Enfermedad, Universidad de Santiago de Compostela, España.

² Institut Pasteur de Montevideo y Depto. de Genética de la Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay.

³ Hospital 12 de Octubre, Madrid, España.

⁴ Genodiagnosis y Genlives, Montevideo, Uruguay.

⁵ Baylor Medical Genetics Laboratories, Houston, Texas, EEUU.

Por otro lado, 5 pacientes presentaron mutaciones en el ADNmt clasificadas como “variantes de significado incierto” (VUS, del inglés: *variant of uncertain significance*) (Tabla 7). Por último, en 7 de los pacientes evaluados no se identificaron aún mutaciones patogénicas responsables de la enfermedad (Tabla 8).

Una vez puesto a punto el método se procedió a evaluar la función mitocondrial de individuos sin patología metabólica conocida (controles jóvenes y adultos) y de todos los pacientes. Los resultados que mostramos a continuación corresponden a los pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada (n = 9), donde se cuenta con el diagnóstico clínico y molecular de la enfermedad.

5.4 Función mitocondrial en PBMCs y plaquetas de individuos control y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada

Se obtuvieron las plaquetas y PBMCs a partir de las muestras de sangre de individuos del grupo control (jóvenes y adultos) y de pacientes. Las células se adhirieron a placas de Seahorse XFe24 y se estudió la función mitocondrial a través de gráficos de velocidad de consumo de oxígeno, como los que se muestran en la Figura 7. Con los datos obtenidos, se determinaron y compararon los parámetros respiratorios de ambos grupos (Figuras 12 y 13).

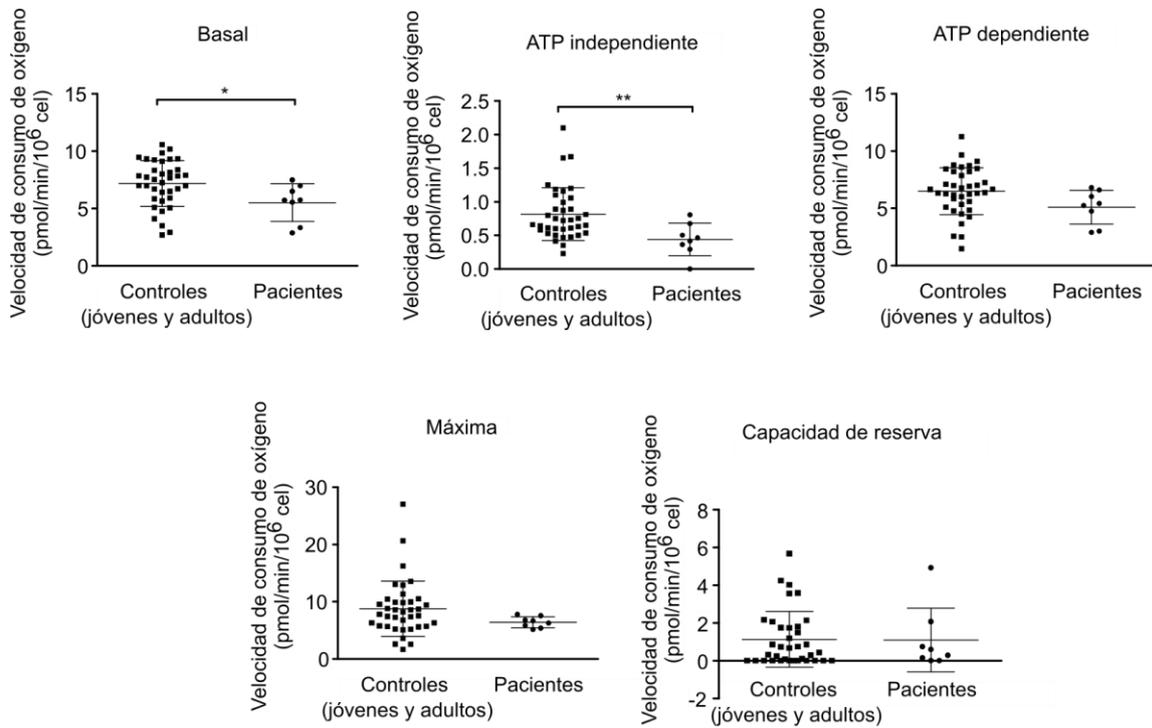


Figura 12. Parámetros respiratorios mitocondriales de plaquetas de controles y pacientes. Se midió la velocidad de consumo de oxígeno en plaquetas (2.5×10^6 cel/pocillo) y se determinaron los parámetros respiratorios de controles (jóvenes y adultos) y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada tal como se indicó en Figura 7. Todos los datos se normalizaron por número de células. Se muestran los promedios \pm SD de la población de controles ($n = 38$) y pacientes ($n = 8$). Se aplicó prueba U de Mann Whitney para la comparación entre controles y pacientes (significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

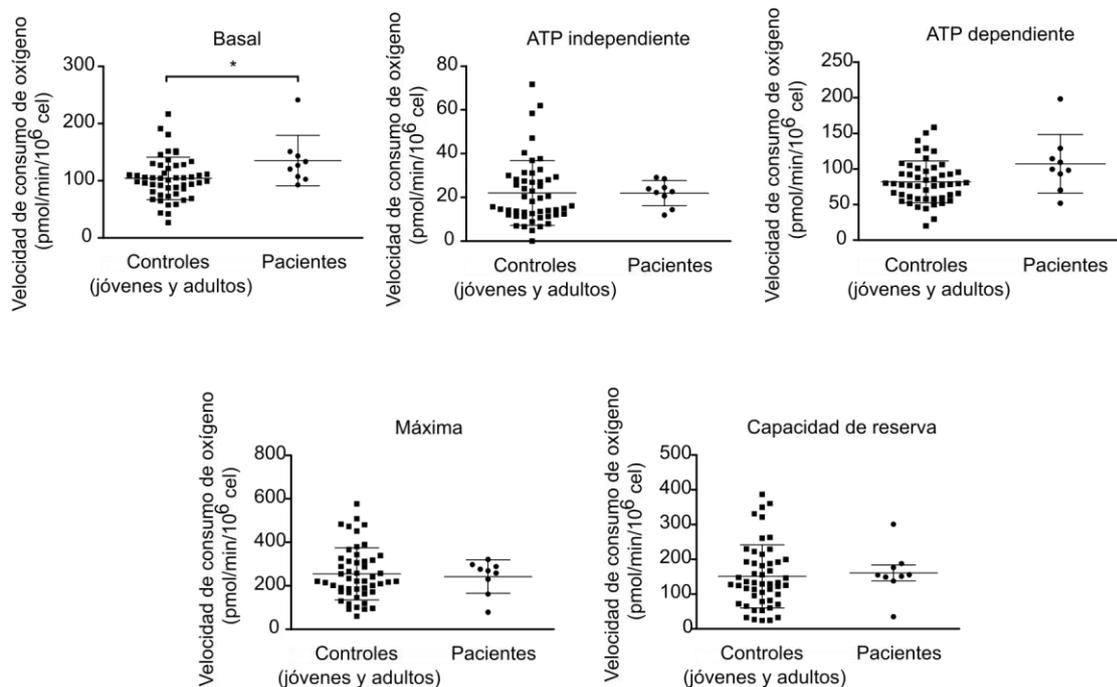


Figura 13. Parámetros respiratorios mitocondriales de PBMCs de controles y pacientes. Se midió la velocidad de consumo de oxígeno y se determinaron los parámetros respiratorios en PBMCs (5×10^5 cel/pocillo) de controles (jóvenes y adultos) y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada tal como se indicó en Figura 7. Todos los datos se normalizaron por número de células. Se muestran los promedios \pm SD de la población de control ($n = 50$) y pacientes ($n = 9$). Se aplicó prueba U de Mann Whitney para la comparación entre controles y pacientes $*p < 0.05$.

Como se puede ver, en el caso de las plaquetas, se observaron diferencias significativas en la respiración basal y ATP independiente, apreciándose una respiración mitocondrial menor en los pacientes que en los controles (Figura 12). Por otro lado, para las PBMCs se encontró una diferencia significativa solamente en la respiración basal (Figura 13), pero paradójicamente, los pacientes presentaron una mayor respiración mitocondrial promedio que la población control (jóvenes y adultos). Estos resultados fueron inesperados, ya que esperábamos encontrar una menor respiración mitocondrial en los pacientes que en los controles para los dos tipos celulares. Por lo tanto, continuamos con otros estudios para poder entender las posibles causas de estos resultados.

Algunos estudios afirmaban que la síntesis de ATP disminuye con la edad en distintos tejidos (Ojaimi et al., 1999; Short et al., 2005). Por otra parte, estudios transcriptómicos en monocitos humanos mostraban una disminución en la expresión de genes de la cadena de transporte de electrones con la edad (Reynolds et al., 2015). Por esto exploramos si la respiración mitocondrial de las plaquetas y los PMBCs estaba influenciada por la edad de los

individuos, evaluando la existencia de una correlación entre la edad y los parámetros respiratorios mitocondriales de los individuos control.

Como se muestra en la Figura 14, para las plaquetas no se observó correlación entre los parámetros respiratorios evaluados y la edad. Mientras que, para el caso de las PBMCs se pudo comprobar la existencia de una correlación negativa moderada entre la respiración máxima y la edad (Figura 15). Por otra parte, la respiración basal e independiente de ATP y la capacidad de reserva presentaron correlaciones negativas bajas con la edad (Figura 15). Estos resultados muestran que la respiración mitocondrial decae con la edad en las PBMCs.

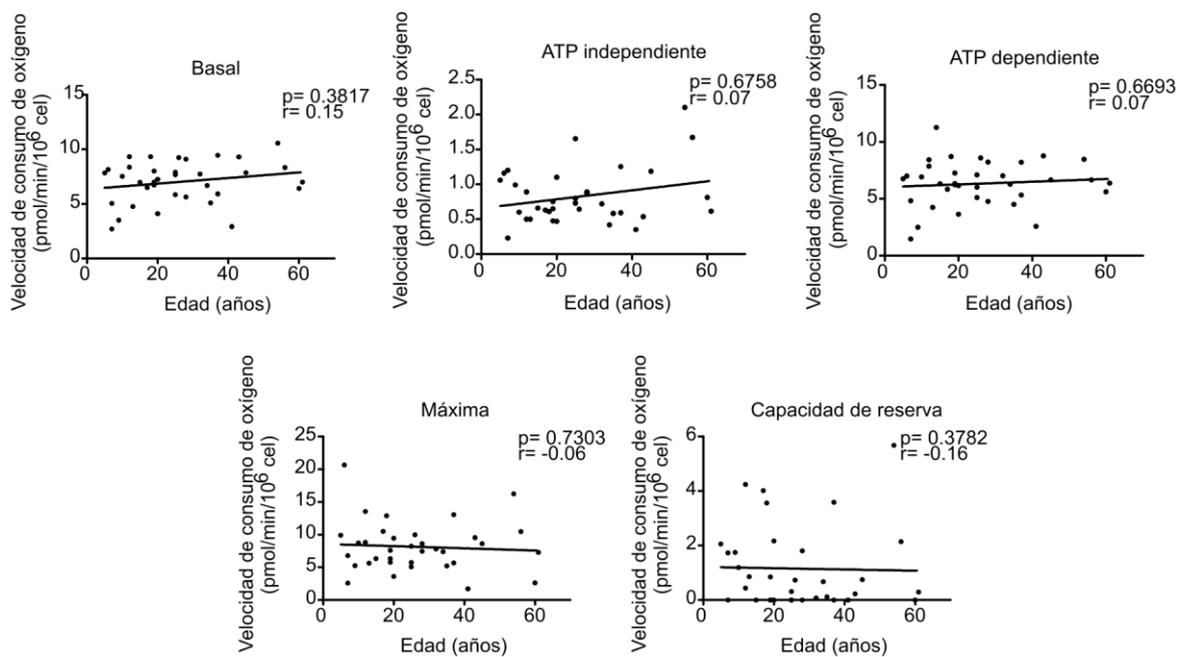


Figura 14. Correlación nula entre parámetros respiratorios mitocondriales de plaquetas y edad de individuos control. Se realizaron tests de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95% para evaluar el impacto de la edad de los individuos del grupo control (jóvenes y adultos) sobre los parámetros respiratorios de las plaquetas (n = 36). No se evidenció correlación entre los parámetros respiratorios evaluados en las plaquetas y la edad de los individuos.

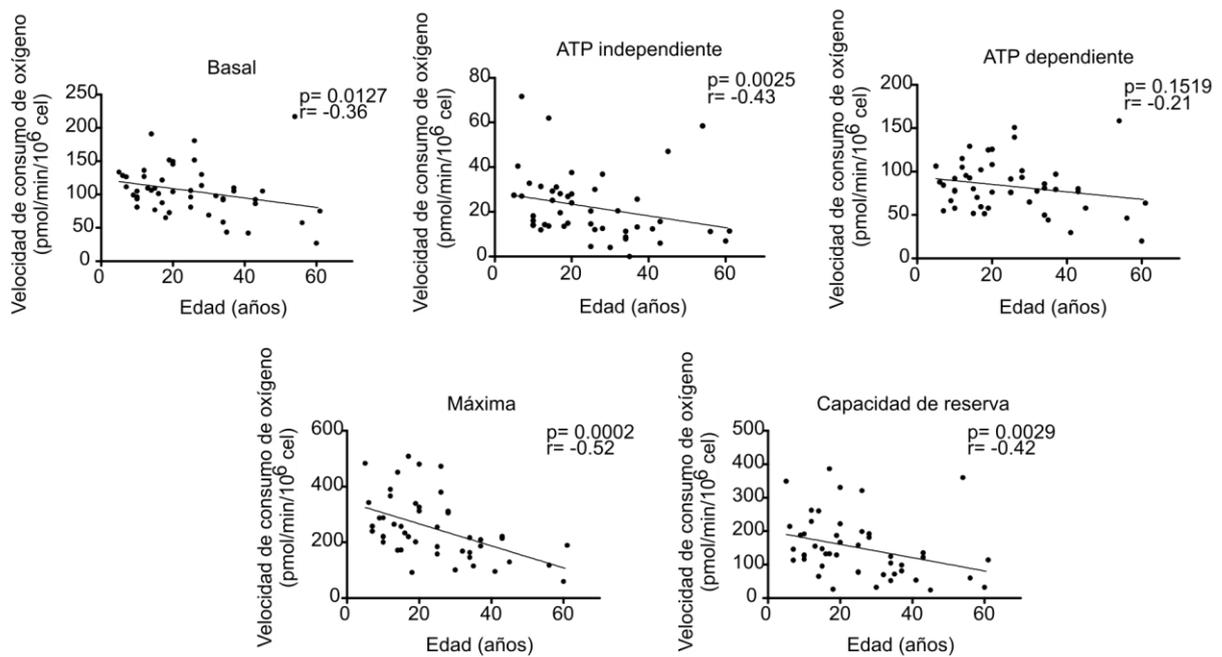


Figura 15. Correlación negativa entre parámetros respiratorios mitocondriales de PBMCs y edad de individuos control. Se realizaron tests de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95% para evaluar el impacto de la edad de los individuos del grupo control (jóvenes y adultos) sobre los parámetros respiratorios de las PBMCs ($n = 48$). Se encontró una correlación negativa con la edad para todos los parámetros respiratorios de las PBMCs evaluados y la edad de los individuos. Se muestra el valor de p y el coeficiente de Spearman (r) para cada gráfico.

Hasta el momento, los análisis habían sido realizados en muestras de controles jóvenes y adultos (rango: 5 a 61 años; mediana: 20 años). Tomando en cuenta la correlación que se observa entre la edad y los parámetros respiratorios de las PBMCs y las edades de los pacientes confirmados (rango: 4 meses a 20 años; mediana: 13 años), consideramos conveniente continuar con los análisis de respiración mitocondrial tomando como grupo control al conformado únicamente por jóvenes (rango: 5 a 20 años; mediana: 14 años).

Entonces, se compararon los parámetros respiratorios de los controles jóvenes con los de los pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada. Sin embargo, aún así, no se evidenciaron diferencias significativas entre los controles y pacientes para ninguno de los parámetros respiratorios evaluados en los PBMCs (Figura 16), aunque se perdió el resultado paradójico observado anteriormente (aumento de la respiración basal en pacientes).

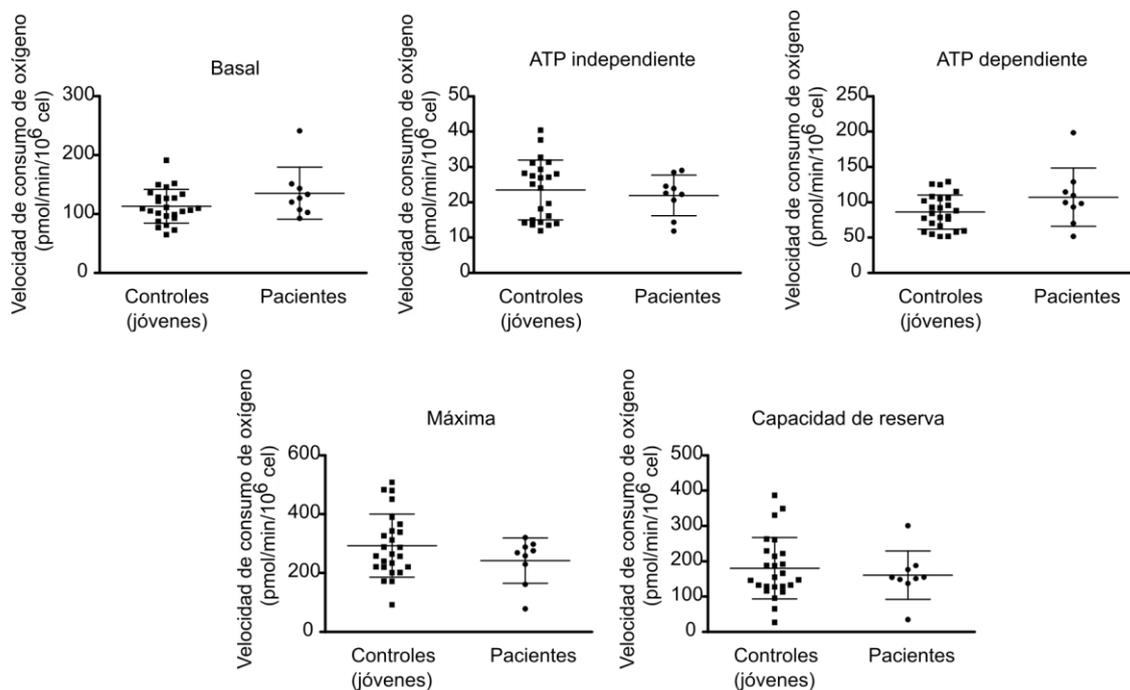


Figura 16. Parámetros respiratorios mitocondriales de PBMCs de controles jóvenes y pacientes. Se midió la velocidad de consumo de oxígeno en PBMCs (5×10^5 cel/pocillo) de controles jóvenes (6-21 años) y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada tal como se indicó en Figura 7. Todos los datos se normalizaron por número de células. Se muestran los promedios \pm SD de la población de controles jóvenes ($n = 25$) y pacientes ($n = 9$). Se aplicó prueba U de Mann Whitney para la comparación entre controles y pacientes. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguno de los parámetros evaluados.

Algunos estudios, de nuestro grupo y de otros investigadores, reportaban aumentos en la cantidad de proteínas mitocondriales en PBMCs de pacientes con mutaciones en el ADNmt (Blanco-Grau et al., 2013; Spangenberg et al., 2018). Así mismo, se ha reportado un aumento en el número de copias del ADNmt en células con mutaciones en el genoma mitocondrial (Blanco-Grau et al., 2013; Yen et al., 2002). En estos casos, un aumento en la biogénesis mitocondrial podría actuar como mecanismo compensatorio de la falla en la función de alguno de los componentes mitocondriales. De ser así, estos eventos compensatorios no nos permitirían evidenciar las diferencias en los parámetros respiratorios entre los grupos.

La biogénesis mitocondrial conduce a un aumento en la masa mitocondrial de las células y puede evaluarse por medio de distintas aproximaciones experimentales. Entre estas se encuentran: la microscopía confocal (Mittra & Lippincott-Schwartz, 2010), la citometría de flujo utilizando sondas fluorescentes (ej. MitoTracker green) (Doherty & Perl, 2017); la determinación del número de copias de ADNmt; las técnicas inmunoquímicas con anticuerpos

contra proteínas mitocondriales y la medida de actividad de enzimas mitocondriales constitutivas (ej. citrato sintasa) (Costanzini et al., 2019).

Por lo tanto, se procedió a cuantificar el número de copias de ADNmt en PBMCs de pacientes e individuos control. Si bien no se evaluó la masa y forma mitocondrial por microscopía confocal como se pretendía inicialmente, porque el microscopio confocal estuvo en reparación por largo tiempo, se utilizó la técnica de ddPCR para evaluar la masa mitocondrial a través del contenido de copias de ADNmt.

5.5 ADNmt y parámetros respiratorios en PBMCs de individuos control y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada

5.5.1 Número de copias de ADNmt en PBMCs

Hasta hace poco, el método más preciso para cuantificar el número de copias de ADNmt era el PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR) (Brian Li et al., 2018). La introducción de la técnica de ddPCR, demostró ventajas significativas sobre la qPCR para la determinación del número de copias (Wachsmuth et al., 2016). En primer lugar, permite una medida absoluta del número de moléculas de ADNmt (Campomenosi et al., 2016; Wachsmuth et al., 2016), no requiere de estándares de referencia, eliminando los posibles errores introducidos en la generación del estándar. La ddPCR también ofrece una mayor precisión y sensibilidad (Campomenosi et al., 2016; Brian Li et al., 2018), permitiendo la amplificación de cantidades extremadamente bajas de ADN (Sofronova et al., 2016).

Considerando estas ventajas, se decidió emplear la técnica de ddPCR para la cuantificación del número de copias de ADNmt de todas las muestras de PBMCs que habían sido utilizadas en los ensayos de evaluación de la respiración mitocondrial. Para este estudio se seleccionaron dos juegos de cebadores: 1) mtMinArc (amplifica una región del arco menor mitocondrial, donde no han sido reportadas deleciones) y 2) β 2M (amplifica una región del gen nuclear β 2M de baja variabilidad) (Phillips et al., 2014).

El número de copias de ADNmt por célula de todas las muestras fue determinado como el cociente entre el ADNmt y ADNn (Phillips et al., 2014) multiplicado por un factor de 2, ya que hay dos copias por célula del gen β 2M.

Antes de proceder a la cuantificación de todas las muestras de pacientes y controles, la técnica fue puesta a punto, optimizando la concentración de los cebadores y muestra de partida. Para entender los resultados arrojados por el Software, en la Figura 17 se muestra un perfil típico obtenido para un control luego de la puesta a punto.

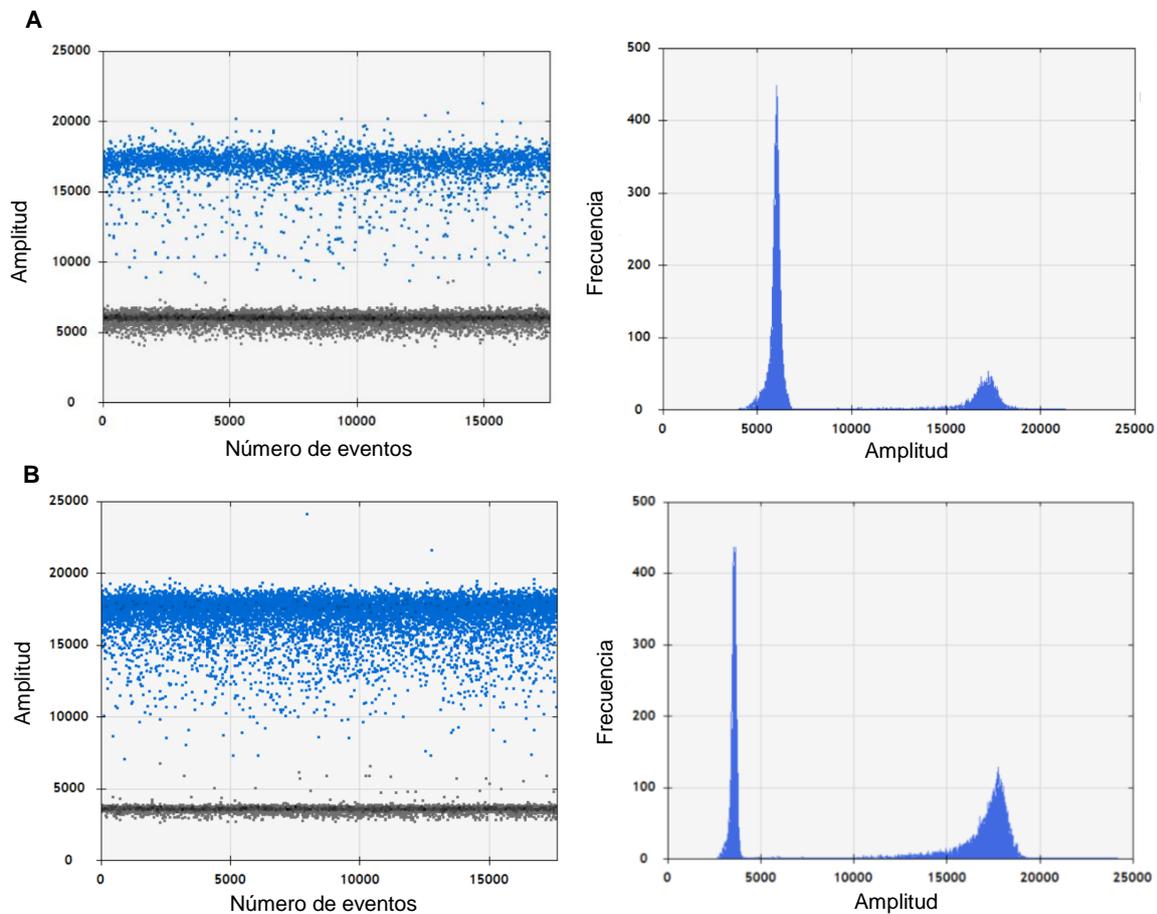


Figura 17. Gráficos utilizados para la determinación del número de copias de ADNmt y ADNn por ddPCR. Se muestra la amplitud o intensidad de la señal de fluorescencia en función del número de eventos (gotas) para una muestra control utilizando cebadores: A) $\beta 2M$ (genoma nuclear) y B) mtMinArc (genoma mitocondrial) y los respectivos histogramas a la derecha. Los puntos azules representan las gotas positivas y los puntos grises representan las gotas negativas.

La técnica ddPCR se basa en la partición de la muestra en miles de micro reacciones contenidas en gotas (Campomenosi et al., 2016). Después de la amplificación por PCR, cada gota contiene o no el ADN de interés, lo que permite estimar el número de moléculas en la reacción bajo el supuesto de una distribución de Poisson (Campomenosi et al., 2016). Las gotas positivas y negativas se cuentan al final del procedimiento de amplificación. El umbral

de fluorescencia para las gotas positivas fue determinado automáticamente por el software (QuantaSoft™) y se confirmó luego manualmente en comparación con un control negativo sin células. Los resultados se expresan como copias por microlitro de reacción.

En la Figura 17 A y B se muestran los gráficos de ddPCR para los cebadores β 2M (genoma nuclear) y B) mtMinArc (genoma mitocondrial), respectivamente. En estos gráficos, se representa la intensidad o amplitud de la señal de fluorescencia en función del número de gotas o eventos. Los puntos azules representan gotas cuyas amplitudes están por encima del umbral (positivas) y a cada una se les asigna un valor de 1, mientras que las gotas grises son aquellas cuyas amplitudes están por debajo del valor del umbral (negativas) y adquieren un valor de 0 (Trifunov et al., 2018). Por otra parte, se muestran los histogramas para cada gráfico. En estos se representa la amplitud o intensidad de fluorescencia en función de la frecuencia de las poblaciones de gotas positivas y negativas.

Durante la puesta a punto se ensayaron distintas concentraciones de cebadores y muestra de ADN inicial. En la Figura 18 se muestran los resultados para dos concentraciones distintas de cebadores β 2M (150 y 250 nM) utilizando como muestra de partida ADN de un control.

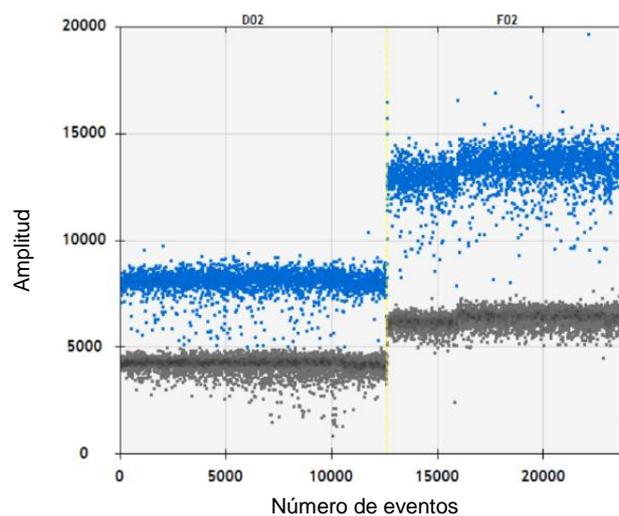


Figura 18. Optimización de la concentración de cebadores β 2M. Gráfico de ddPCR utilizando una concentración de cebador β 2M a 150 nM (D02) y 250 nM (F02).

Hubo una mejor separación de gotas positivas y negativas y mayor intensidad de fluorescencia utilizando la concentración de 250 nM. Una buena separación entre la intensidad de fluorescencia de gotas positivas y negativas es fundamental para una correcta

cuantificación del número de gotas en cada grupo. En vista de estos resultados, se decidió trabajar a concentraciones de 250 nM. Se obtuvieron los mismos resultados para los cebadores mtMinArc.

Por otro lado, se probaron distintas concentraciones de ADN a partir de una muestra control. Para una cuantificación óptima se recomienda que la muestra de partida no sea superior a los 60 ng/μL. Previamente, la muestra fue cuantificada con el fluorímetro QubitTM 4 y luego diluida 1:2 en serie.

En la Figura 19, se muestra el gráfico para cada concentración de ADN utilizando los cebadores β2M. Como se puede ver, comienza a haber una buena separación entre la intensidad de fluorescencia de gotas positivas y negativas a partir de la concentración 41.4 ng/μL y hasta la concentración 1.3 ng/μL. Cabe destacar que a concentración 82.7 ng/μL, si bien no hubo una buena separación en comparación al resto de las diluciones, la muestra pudo ser cuantificada correctamente.

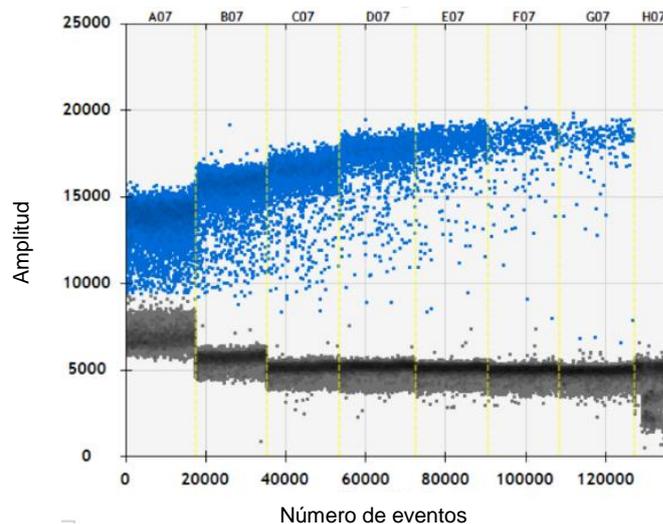


Figura 19. Optimización de la concentración de ADN inicial utilizando cebadores β2M. Gráfico de ddPCR para cada concentración de ADN: (A07) 82.7, (B07) 41.4, (C07) 20.7, (D07) 10.3, (E07) 5.2, (F07) 2.6, (G07) 1.3, (H07) 0 ng/μL.

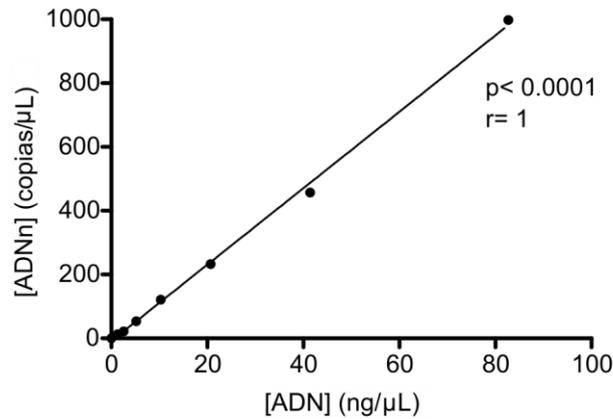


Figura 20. Correlación entre la concentración de ADN y el número de copias de ADNn. Se analizó la relación entre el número de copias de ADNn y la concentración de ADN (82.7, 41.4, 20.7, 10.3, 5.2, 2.6, 1.3, 0 ng/μL). Se utilizó una prueba de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95%, encontrándose una correlación positiva. En el gráfico se muestra el valor de p y el coeficiente de Spearman (r).

En la Figura 20 se demuestra que hay una relación directamente proporcional entre el número de copias de ADNn y la concentración de ADN utilizada en el ensayo.

Para determinar el número de copias de ADNmt con los cebadores mtMinArc se utilizaron estas mismas concentraciones de ADN, pero no se obtuvo separación entre gotas positivas y negativas. Por lo que, fue necesario hacer más diluciones de la muestra. En la Figura 21 se muestra el gráfico para cada concentración de ADN utilizando los cebadores mtMinArc.

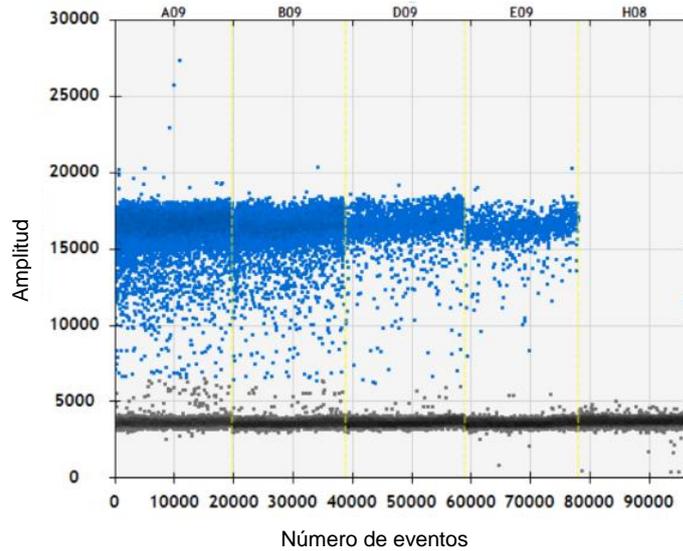


Figura 21. Optimización de la concentración de ADN inicial utilizando cebadores mtMinArc. Gráfico de ddPCR para cada concentración de ADN: (A09) 0.65, (B09) 0.32, (D09) 0.08, (E09) 0.04, (H08) 0 ng/ μ L.

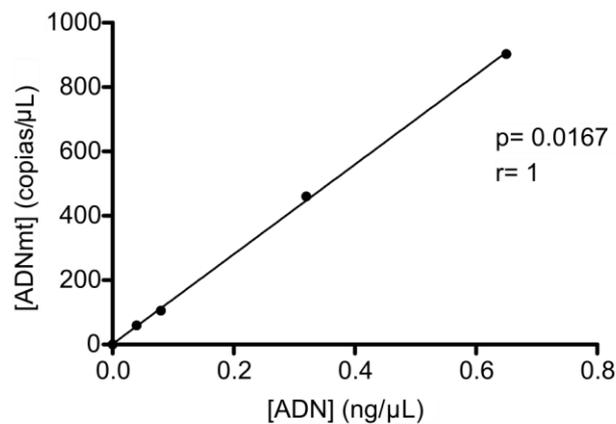


Figura 22. Correlación entre la concentración de ADN y el número de copias de ADNmt. Se analizó la relación entre el número de copias de ADNn y la concentración de ADN (0.65, 0.32, 0.08, 0.04, 0 ng/ μ L). Se utilizó una prueba de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95%, encontrándose una correlación positiva. En el gráfico se muestra el valor de p y el coeficiente de Spearman (r).

Como se puede ver hay una buena separación de gotas en todas las concentraciones ensayadas (Figura 21) y se demuestra que hay una relación directamente proporcional entre el número de copias de ADNmt y la concentración de ADN (Figura 22).

Una vez puesta a punto la técnica ddPCR para los dos juegos de cebadores, se comenzó con la cuantificación de ADNmt y ADNn de todas las muestras de pacientes y controles. Posteriormente, se determinó el número de copias de ADNmt por célula (Phillips et al., 2014) y se compararon los datos obtenidos para el grupo control (jóvenes) y para los pacientes (Figura 23).

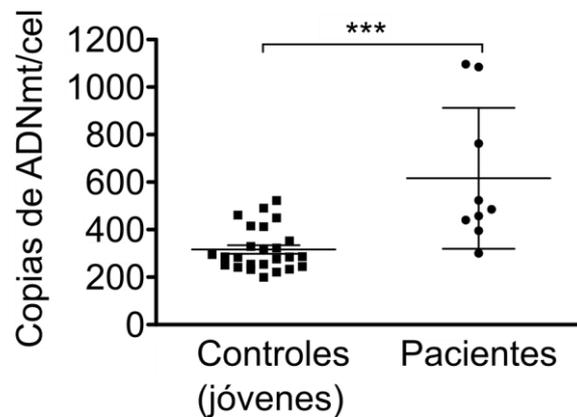


Figura 23. Cantidad de copias ADNmt por célula en controles jóvenes y pacientes. Se realizaron extracciones de ADN a partir de las PBMCs de controles jóvenes (5 - 20 años) y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada. Mediante la técnica de ddPCR, se determinó la cantidad de copias/ μ L de ADNmt y ADNn para cada muestra. En el gráfico se muestran los promedios \pm SD de la población control joven ($n = 25$) y pacientes ($n = 9$). Se aplicó test t de Student para la comparación entre ambos grupos; *** $p < 0.0001$.

Como se puede apreciar en la Figura 23, hay una diferencia significativa entre ambos grupos, siendo el número de copias de ADNmt por célula notoriamente mayor en las PBMCs de los pacientes que en las PBMCs de los individuos control jóvenes. Indicando que posiblemente, estemos frente a un fenómeno compensatorio que ocurre en respuesta a las mutaciones que afectan la actividad de proteínas mitocondriales.

A partir de estos datos, se realizó una curva ROC (Figura 24), con la cual se alcanzó una sensibilidad del 89 % (IC 95 %: 51.75 – 99.72) y una especificidad del 76 % (IC 95 %: 54.87 – 90.64). El área bajo la curva fue de 0.88 (IC 95 %: 0.77 – 1.00) y el LR^+ de 3.7. El punto de corte resultó en 374 copias de ADNmt, siendo diagnosticados como positivos todos aquellos pacientes con niveles superiores a este valor.

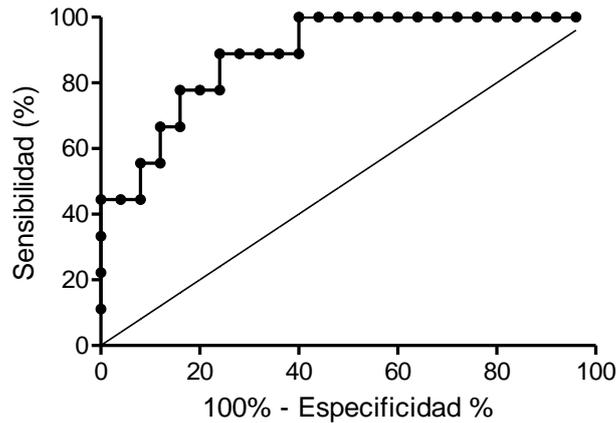


Figura 24. Curva ROC para copias de ADNmt. Se realizó una curva ROC para copias de ADNmt en PBMCs, considerando los datos de todos los controles jóvenes (n=25) y pacientes (n=9). El método muestra una sensibilidad de 89 % y una especificidad de 76 % con un punto de corte de 374 copias de ADNmt.

5.5.2 Parámetros respiratorios normalizados por el número de copias de ADNmt

En vista de estos resultados, se decidió analizar nuevamente los datos obtenidos en los ensayos de velocidad de consumo de oxígeno. Los parámetros respiratorios fueron normalizados considerando el número de copias de ADNmt por célula y se compararon los datos obtenidos para el grupo control (jóvenes) y para los pacientes (Figura 24).

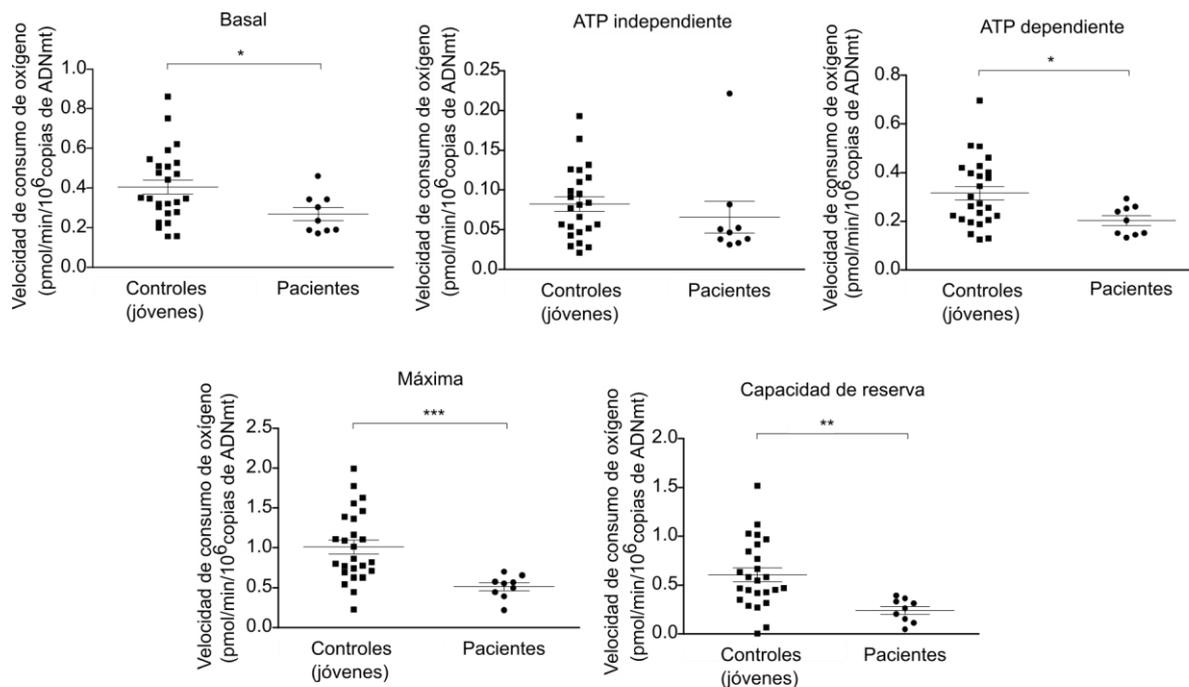


Figura 24. Parámetros respiratorios de PBMCs de controles jóvenes y pacientes, normalizados por el número de copias de ADNmt. Los parámetros respiratorios determinados previamente (Figura 14) fueron normalizados considerando el número de copias de ADNmt/célula. Se muestran los promedios \pm SD de la población de controles jóvenes ($n = 25$) y pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada ($n = 9$). Se aplicó prueba U de Mann Whitney para la comparación entre controles y pacientes, encontrándose diferencias significativas $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

Estos estudios permitieron evidenciar la existencia de una disminución significativa en la respiración basal, respiración ATP dependiente, respiración máxima y capacidad de reserva de los pacientes con relación a los controles jóvenes. Estos resultados demostraron que las mitocondrias de los pacientes presentan un nivel de respiración mitocondrial menor que las mitocondrias de los controles. También confirmaron la existencia de efectos compensatorios que no permitían evidenciar las diferencias en la función mitocondrial en las PBMCs de controles y pacientes al normalizar los parámetros respiratorios por el número de células.

Se destacan las diferencias observadas en la respiración máxima ($p < 0.001$) y en la capacidad de reserva ($p < 0.01$) donde los pacientes presentan valores significativamente menores que los controles. Para ser más precisos, el valor promedio de respiración máxima para los controles fue de $1.01 \text{ pmol/min/10}^6$ copias de ADNmt, prácticamente doblando el valor promedio de respiración máxima de los pacientes, que fue de $0.51 \text{ pmol/min/10}^6$ copias de

ADNmt. Por otra parte, el valor promedio de capacidad de reserva para los controles fue de 0.61 pmol/min/10⁶ copias de ADNmt, 2.5 veces mayor que el valor promedio para los pacientes, de 0.24 pmol/min/10⁶ copias de ADNmt. Se ha reportado que una disminución en la respiración máxima y la capacidad de reserva puede ser un indicador de una disfunción mitocondrial (Brand & Nicholls, 2011). La misma puede no ser aparente en condiciones basales cuando la velocidad está fuertemente controlada por el recambio de ATP, pero se manifiesta cuando la demanda de ATP aumenta y la oxidación del sustrato o la actividad de los complejos limita la tasa de respiración (Brand & Nicholls, 2011).

A continuación, se realizaron curvas ROC para los parámetros respiratorios de PBMCs, en los cuales se observaron diferencias significativas entre los controles y pacientes (Figura 25). Las curvas ROC se utilizan en epidemiología clínica para cuantificar la precisión con la que las pruebas de diagnóstico médico pueden discriminar entre dos estados de pacientes, "enfermos" y "no enfermos" (Hajian-Tilaki, 2013). Las magnitudes básicas en la evaluación de la prueba de diagnóstico son la "sensibilidad" y la "especificidad" (Bandos et al., 2018). La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como "enfermo" respecto a la condición que estudia la prueba, razón por la que también es denominada fracción de verdaderos positivos (FVP). La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como "no enfermo". Es igual al resultado de restar a uno la fracción de falsos positivos (FFP) (López & Pita, 2001). La sensibilidad y la especificidad dependen del valor umbral (o punto de corte) definido y la sensibilidad está inversamente relacionada con la especificidad. La curva ROC se obtiene graficando la sensibilidad en función de 1-especificidad, obtenida para los distintos puntos de corte (Hajian-Tilaki, 2013). Una curva ROC con capacidad de discriminar a un individuo "enfermo" de uno "no enfermo" se ubica en el cuadrante superior izquierdo. Por el contrario, una curva ROC que se encuentra en la línea diagonal, equidistante de ambos ejes, indica que la prueba de diagnóstico arroja resultados positivos o negativos que no se relacionan con la presencia o ausencia de la enfermedad (Hajian-Tilaki, 2013). El área bajo la curva ROC se puede emplear como un índice de la exactitud global de la prueba: la exactitud máxima correspondería a un valor de 1 y la mínima a uno de 0.5 (si fuera menor de 0.5 debería invertirse el criterio de positividad de la prueba) (López & Pita, 2001). Por otra parte, los índices sensibilidad y especificidad se pueden combinar en un solo índice como razón de verosimilitud (LR, del inglés *likelihood ratio*) (Hajian-Tilaki, 2013). LR se define como la razón entre la posibilidad de observar un resultado en los pacientes con la

enfermedad versus la posibilidad de ese resultado en pacientes sin la patología (Fuente-alba & Villagra, 2017).

El contenido de información total de una prueba de diagnóstico se puede resumir en su LR^+ o LR^- . En este trabajo nos basamos en los valores LR^+ , que no es más que la relación entre sensibilidad y 1-especificidad. El LR^+ tiene un rango de 0 a infinito. El peor de los casos es $LR^+= 0$. Esto sucede cuando la sensibilidad se acerca a 0. El mayor valor de LR^+ ocurre cuando la especificidad y sensibilidad tienden a estar cerca de 1. Por lo tanto, el valor más alto de LR^+ tiene un mayor valor de información para la prueba de diagnóstico (Hajian-Tilaki, 2013).

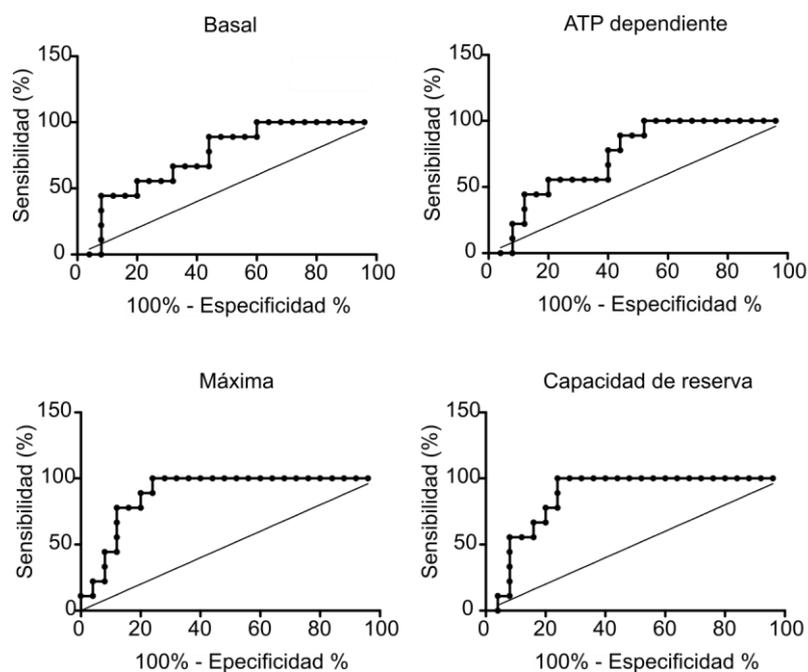


Figura 25. Curvas ROC para los parámetros respiratorios mitocondriales de PBMCs normalizados por copia de ADNmt. Se realizaron curvas ROC a partir de los parámetros respiratorios de PBMCs, normalizados por ADNmt, obtenidos para los controles jóvenes (n=25) y pacientes (n=9).

Las curvas ROC para los parámetros respiratorios mitocondriales arrojaron distintos valores de especificidad, sensibilidad y LR^+ que fueron considerados para decidir los puntos de corte para cada método. En la Tabla 6 se muestra la propuesta de puntos de corte para cada parámetro respiratorio, detallándose además el área bajo la curva, la sensibilidad, la especificidad y el LR^+ . Cabe resaltar que, en este caso, los valores menores al punto de corte serían indicativos de un diagnóstico positivo de enfermedad mitocondrial.

Tabla 6. Puntos de corte seleccionados para cada parámetro respiratorio

Parámetro respiratorio	Área bajo la curva	Punto de corte¹	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	LR⁺
Respiración basal	0.74 (IC 95 %: 0.57-0.92)	0.25	56 (IC 95 %: 21.20-86.30)	80 (IC 95 %: 59.30-93.17)	2.78
Respiración ATP dependiente	0.74 (IC 95 %: 0.57-0.91)	0.20	56 (IC 95 %: 21.20-86.30)	80 (IC 95 %: 59.30-93.17)	2.78
Respiración máxima	0.89 (IC 95 %: 0.78-1.00)	0.60	78 (IC 95 %: 39.99-97.19)	88 (IC 95 %: 68.78-97.19)	6.48
Capacidad de reserva	0.87 (IC 95 %: 0.75-0.99)	0.34	78 (IC 95 %: 13.70-78.80)	80 (IC 95 %: 73.97-99.02)	3.89

¹ Unidades: pmol/min/10⁶ copias de ADNmt.

De todos los parámetros, la respiración máxima demuestra ser la mejor herramienta para el diagnóstico. El área debajo de la curva es buena, el LR⁺ es suficientemente alto y se alcanza una sensibilidad de 78% y especificidad de 88%. Esto quiere decir, que se tiene un 88% de probabilidades de que un resultado negativo y un 78% de probabilidades de que un resultado positivo sea correctamente clasificado como tal.

Para mejorar la sensibilidad del método es fundamental agregar más datos a estas curvas. Esperamos poder incorporar más pacientes al estudio y generar curvas ROC más robustas para el diagnóstico.

5.5.3 Cambios en el número de copias de ADNmt de PBMCs con la edad

Por otra parte, se evaluó la posible relación entre el número de copias de ADNmt por célula y la edad de los individuos en el grupo control utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Como se observa en la Figura 26, existe una correlación positiva baja pero estadísticamente significativa que sugiere un aumento en la cantidad de copias de ADNmt en las PBMCs con la edad.

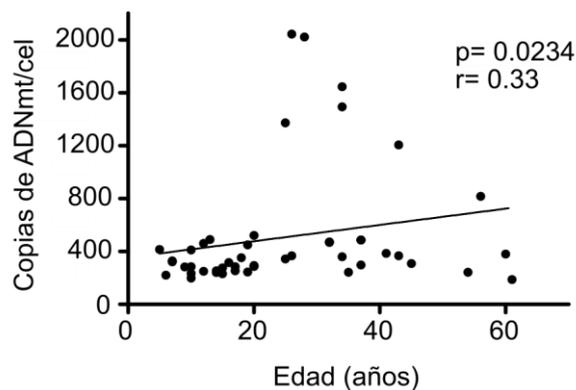


Figura 26. Correlación entre la cantidad de ADNmt por célula y edad en PBMC. Se analizó la relación entre el número de copias de ADNmt y la edad de individuos control (jóvenes y adultos, $n = 46$). Se utilizó una prueba de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95%, encontrándose una correlación positiva. En el gráfico se muestra el valor de p y el coeficiente de Spearman (r).

En la bibliografía, se encuentran diversos estudios sobre la correlación entre el número de copias de ADNmt y la edad, sin embargo, los resultados de estos no son concluyentes. Se han reportado tanto correlaciones nulas (Frahm et al., 2005; Miller et al., 2003; O'Hara et al., 2019), como positivas (Hosgood et al., 2010) y negativas (Mengel-From et al., 2015) e incluso asociaciones bifásicas (C.-S. Liu et al., 2003). La discrepancia entre los distintos estudios puede explicarse en parte por los tamaños de muestra limitados y la inclusión de sólo unos pocos participantes de edad avanzada, pero también por la posibilidad de que los resultados puedan ser distintos entre los distintos tipos de material biológico que se investigan. Además, las diferencias en las técnicas utilizadas para determinar el número de copias de ADNmt, y la eficiencia de recuperación del ADNmt durante el proceso de extracción de ADN, podrían afectar la medida (Mengel-From et al., 2015).

Luego, se estudió la correlación entre los parámetros respiratorios normalizados por copia de ADNmt y la edad para todo el grupo control (Figura 27). Se encontraron correlaciones negativas bajas, pero estadísticamente significativas con la edad para todos los parámetros respiratorios evaluados, tal como se había observado para los parámetros normalizados por número de células (Figura 15).

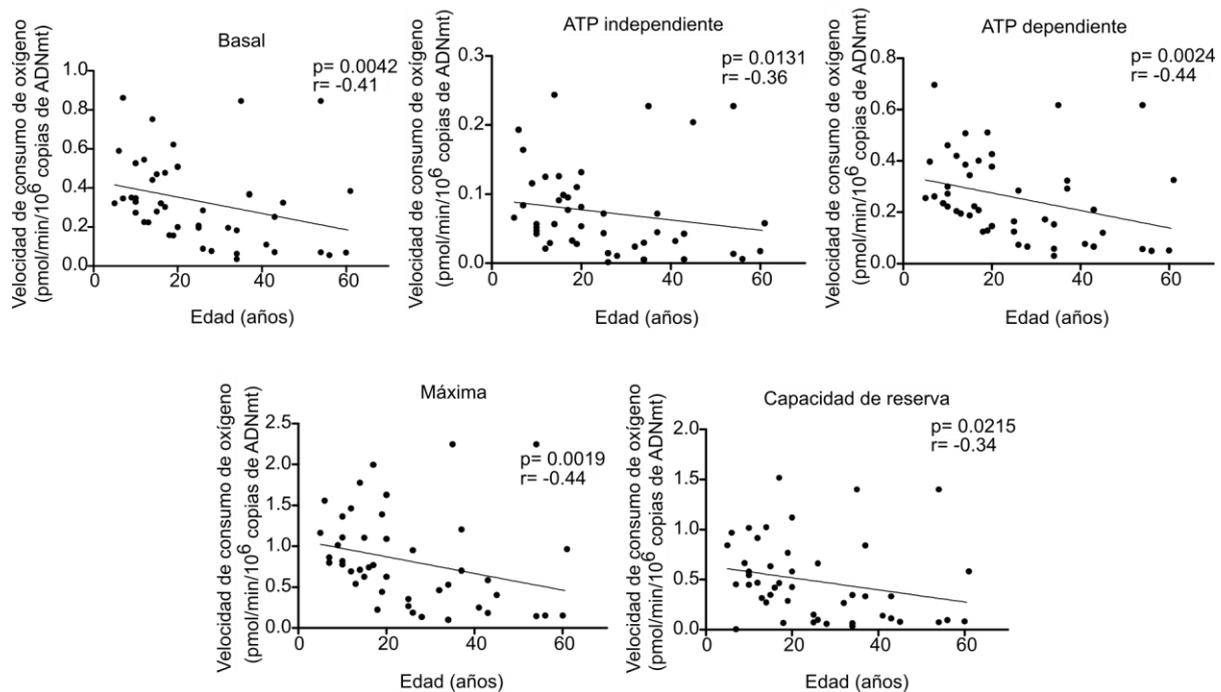


Figura 27. Correlación entre parámetros respiratorios mitocondriales de PBMCs normalizados por copias de ADNmt y la edad de individuos control. Se realizaron tests de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95% para evaluar el impacto de la edad de los individuos del grupo control sobre los parámetros respiratorios de las PBMCs ($n = 48$). Se encontró una correlación negativa con la edad para todos los parámetros respiratorios de las PBMCs evaluados y la edad de los individuos. Se muestra el valor de p y el coeficiente de Spearman (r) para cada gráfico.

5.6 Determinación de FGF-21

Se ha reportado que los pacientes con mutaciones en genes que afectan la función mitocondrial y compromiso del músculo esquelético tienen una secreción aumentada de FGF-21 por el músculo que resulta en un aumento en los niveles este factor en sangre. Esto ha llevado a proponer que el FGF-21 puede ser considerado como un biomarcador de la disfunción mitocondrial del músculo esquelético (Scholle et al., 2018; Suomalainen, 2013; Suomalainen et al., 2011). Por esta razón determinamos los niveles de este factor en el plasma de individuos control y pacientes.

Se realizó la cuantificación de FGF-21 en muestras de plasma pobre en plaquetas utilizando la técnica de ELISA. La concentración de FGF-21 en ambos grupos se muestra en la Figura 28; donde se aprecia un aumento significativo en los niveles del marcador en los pacientes con respecto a los controles.

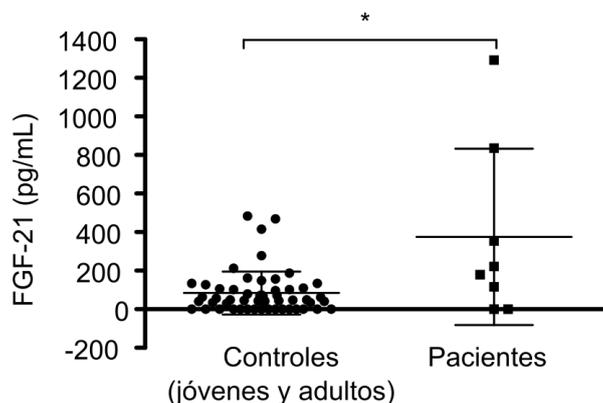


Figura 28. Concentraciones de FGF-21 en plasma de controles y pacientes. Se determinaron los niveles de FGF-21 mediante ELISA en el plasma pobre en plaquetas. Se muestran los promedios \pm SD de la población control (n = 53) y pacientes (n = 8). Para comparar ambos grupos, se utilizó la prueba U de Mann Whitney, encontrándose una diferencia significativa (*p < 0.05).

A partir de estos datos, se realizó una curva ROC (Figura 29), con la cual se alcanzó una sensibilidad del 63% (IC 95 %: 24.49-91.48) y una especificidad del 89% (IC 95 %: 76.97-95.73). El área bajo la curva fue de 0.73 (IC 95 %: 0.49-0.97) y el LR⁺ de 5.52. El punto de corte resultó en 171 pg/mL, siendo diagnosticados como positivos todos aquellos pacientes con niveles superiores a este valor. De todas formas, como se mencionó anteriormente, es necesario incorporar más individuos para mejorar la sensibilidad y especificidad del método.

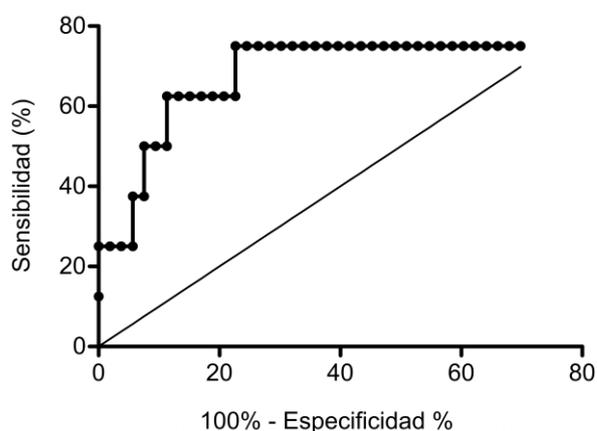


Figura 29. Curva ROC para FGF-21. Se realizó una curva ROC para FGF-21 detectado en plasma pobre en plaquetas, considerando los datos de todos los controles (n=53) y pacientes (n=8). El método muestra una sensibilidad de 63 % y una especificidad de 89% con un punto de corte de 171 pg/mL.

En la bibliografía, se han propuesto distintos puntos de corte para FGF-21, entre 200 y 350 pg/mL. Precisamente, 200 pg/mL (Suomalainen et al., 2011), 300 pg/mL (Montero et al., 2016), 331 pg/mL (Lehtonen et al., 2016), 350 pg/mL (Davis et al., 2013). Nuestro punto de corte (171 pg/mL) se aproxima bastante al punto de corte reportado por Suomalainen y col (200 pg/mL) (Suomalainen et al., 2011) .

Morovat y col demostraron que los pacientes con defectos en el mantenimiento del ADNmt y reordenamientos del ADNmt tenían la mediana más alta de FGF-21. Mientras que, los pacientes que tenían mutaciones puntuales del ADNmt o mutaciones en otros genes autosómicos y aquellos con enfermedad mitocondrial parcialmente caracterizada tenían niveles más bajos de FGF-21 (Morovat et al., 2017).

Suomalainen y col reportaron concentraciones medias de FGF-21 en suero y plasma de 76 pg/mL en controles sanos, 820 pg/mL en adultos y 1983 pg/mL en pacientes infantiles con deficiencias de la cadena respiratoria que afectan a los músculos (por ejemplo, deficiencias en los complejos I, III o IV, hepatoencefalopatía de Alpers o deficiencia infantil de COX). Demostraron, que las concentraciones de FGF-21 eran altas en pacientes con trastornos mitocondriales que afectaban al músculo esquelético, pero no en los controles con enfermedad neurológica no mitocondrial, incluidos aquellos con distrofias. La mayoría de los niños con otros trastornos musculares no mitocondriales tenían concentraciones normales de FGF-21 (Suomalainen et al., 2011).

Lehtonen y col informaron que FGF-21 en suero aumenta constantemente en la miopatía mitocondrial primaria, especialmente en pacientes con defectos en la traducción mitocondrial o deleciones del ADNmt (675 y 347 pg/mL, respectivamente; controles: 66 pg/mL). Por otra parte aseguran que los niveles de FGF-21 pueden permanecer bajos en aquellas manifestaciones clínicas que sean compatibles con el síndrome de Leigh o la atrofia óptica hereditaria de Leber, típicamente asociadas con defectos estructurales o de ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria (Lehtonen et al., 2016).

Davis y col demostraron que pacientes con enfermedad mitocondrial con debilidad en uno o más grupos de músculos proximales (cuello y extremidades anteriores), tenían una concentración sérica media de FGF-21 significativamente más alta (744 pg/mL) en comparación con pacientes con enfermedad mitocondrial sin debilidad muscular (437 pg/mL). Además, la concentración sérica media de FGF-21 para los pacientes con enfermedad mitocondrial que no mostraban debilidad muscular proximal (437 pg/mL) fue

significativamente mayor del grupo control de enfermedad neuromuscular no mitocondrial (222 pg/mL) (Davis et al., 2013).

En nuestro caso la media para los controles fue de 84 ± 111 pg/mL y para los pacientes 375 ± 457 pg/mL). Dentro del grupo de nuestros pacientes, los valores más altos obtenidos y que superan nuestro punto de corte fueron de 1292 (paciente #3), 836 (paciente #1), 354 (paciente #8) y 222 pg/mL (paciente #7). Cabe resaltar que los pacientes #1, #3 y #7 presentan compromiso muscular. Los cuatro pacientes restantes, tuvieron valores menores a 200 pg/mL. Por lo que, estos últimos no pudieron ser diagnosticados como “enfermos” según esta técnica.

Por otro lado, no se encontró correlación de los niveles de FGF-21 con la edad (Figura 30), ni con los parámetros respiratorios evaluados (Figura 31).

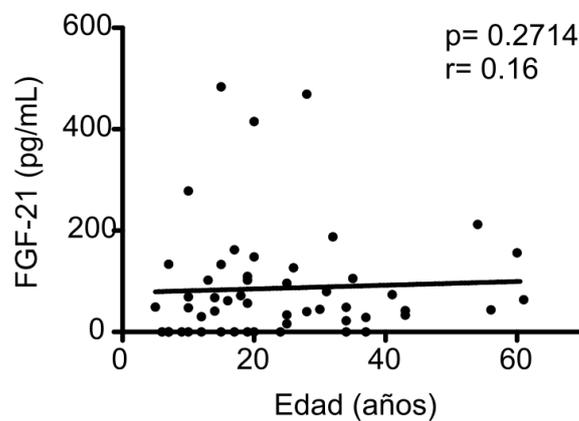


Figura 30. Correlación nula entre FGF-21 de muestras de plasma y la edad. Se evaluó la relación entre la edad y los niveles de FGF-21 de individuos control (jóvenes y adultos, $n = 46$). Se utilizó una prueba de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95%. No se observó correlación.

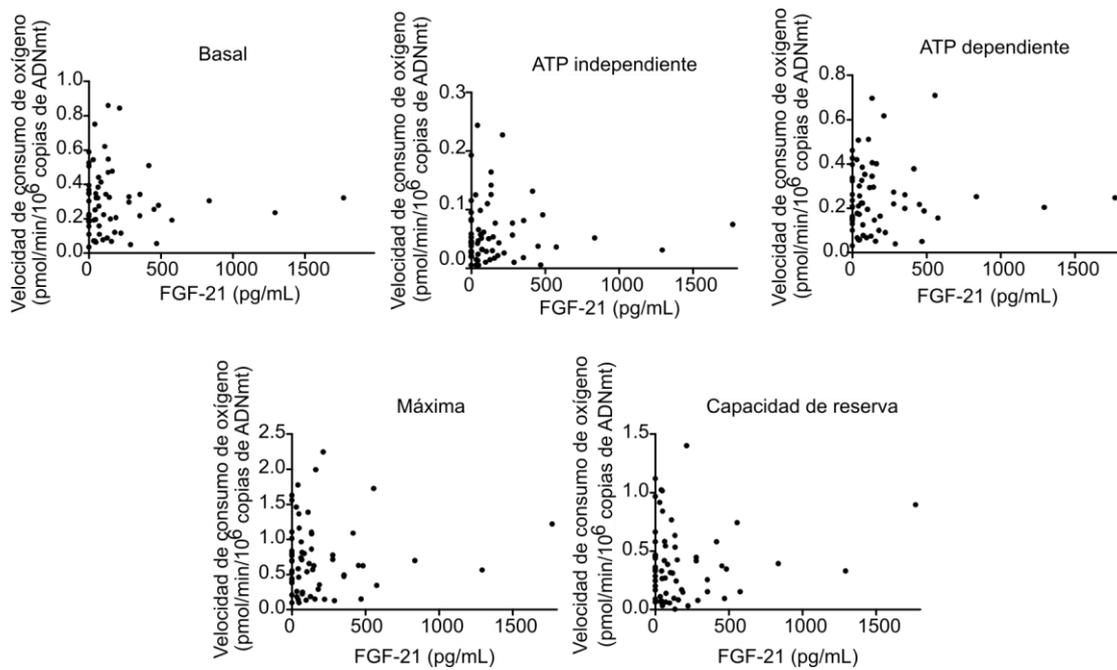


Figura 31. Correlación nula entre parámetros respiratorios de PBMCs y FGF-21. Se evaluó la relación entre FGF-21 y los parámetros respiratorios normalizados por ADNmt de individuos control (jóvenes y adultos, n = 46) y pacientes (8). Se utilizó una prueba de correlación no paramétrica (Spearman), bilateral con un intervalo de confianza del 95%. No se observó correlación.

5.7 Detección de CoQ₁₀

Con el objetivo de determinar los niveles de CoQ₁₀ en PBMCs de los individuos control y los pacientes, se puso a punto la detección de estándares comerciales de CoQ₁₀ y CoQ₉ por HPLC-UV. La CoQ₉ fue evaluada para utilizar como estándar interno, ya que rara vez se encuentra en cantidades medibles en plasma o células humanas (Tang et al., 2001). Para la cromatografía se utilizó una columna de fase reversa con cadenas alquílicas de 18 carbonos (C18) que retienen moléculas hidrofóbicas. En la Figura 32 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para CoQ₉ y CoQ₁₀, donde se observa que presentan tiempos de retención de 10.8 y 15.8 min respectivamente.

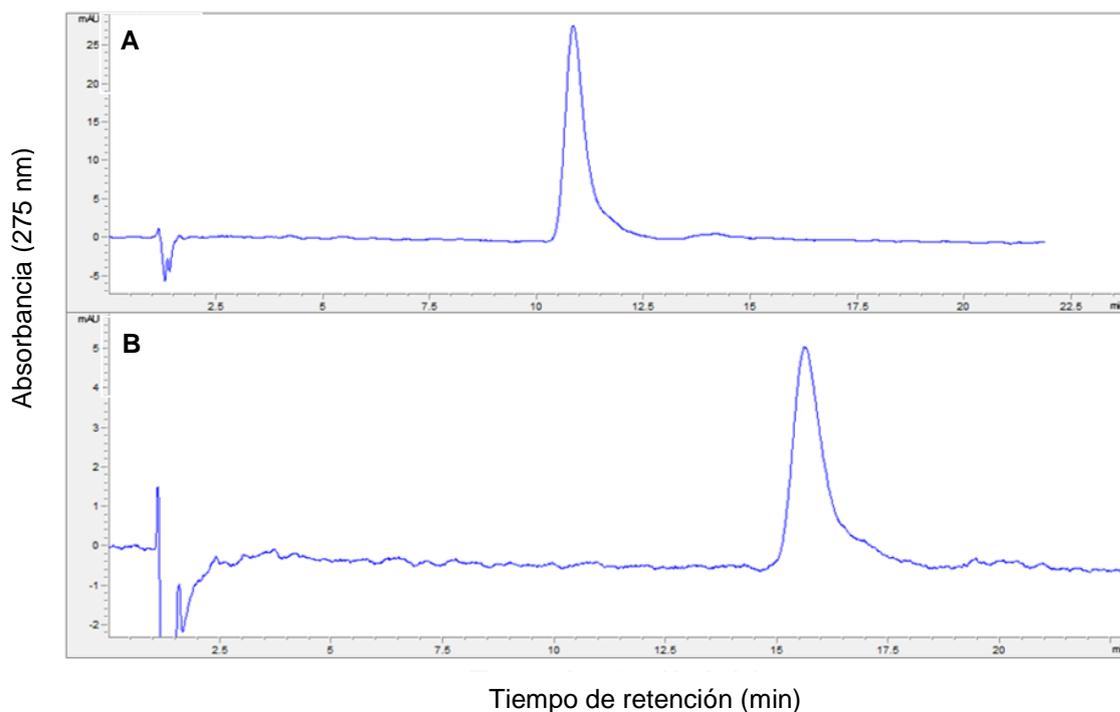


Figura 32. Perfil cromatográfico obtenido mediante HPLC-UV. Se puso a punto la detección de los estándares de A) CoQ₉ (20 μ L, 0.1 mg/mL) y B) CoQ₁₀ (20 μ L, 0.1 mg/mL) por HPLC-UV a 275 nm. El tiempo de retención para la CoQ₉ fue de 10.8 min y para la CoQ₁₀ de 15.8 min.

Como era de esperarse el tiempo de retención de la CoQ₁₀ fue mayor que el de la CoQ₉, ya que posee una subunidad de isoprenilo más que la CoQ₉, y es por tanto más hidrofóbica.

Luego intentamos medir los niveles de CoQ₁₀ en los PBMCs. Para esto utilizamos dos protocolos distintos de extracción de compuestos orgánicos, sin embargo, no se logró detectar CoQ₁₀ por HPLC-UV en estas muestras. También se se agregó un paso de oxidación de la CoQ₁₀ para aumentar la sensibilidad del método, ya que la forma oxidada absorbe más que la reducida, pero de cualquier forma no logramos detectar CoQ₁₀ en las muestras. Tampoco logramos medir el estándar interno CoQ₉ agregado a las células. Esto nos llevó a pensar que los componentes celulares pueden afectar el proceso de extracción de la CoQ₁₀ y CoQ₉ a partir de la muestra, por lo que será necesario probar otros métodos, en el futuro.

5.8 Evaluación de pacientes sin diagnóstico molecular concluyente

Como se mencionó anteriormente, para el diagnóstico molecular se realizó el análisis de las secuencias para la identificación de mutaciones en el ADNmt y/o el exoma (en algunos

casos) de los pacientes. De los 21 pacientes, con diagnóstico clínico de la enfermedad, evaluados 12 no presentaron un diagnóstico molecular concluyente. Más precisamente, 5 pacientes presentaron mutaciones en el ADNmt clasificadas como VUS (Tabla 7) y en los otros 7 pacientes no se identificaron por el momento mutaciones responsables de la enfermedad (Tabla 8). El análisis de las mutaciones se llevó a cabo con la aplicación web MutPred que clasifica las sustituciones de aminoácidos en proteínas humanas como patógenas o benignas (Biao Li et al., 2009). En las Tablas 7 y 8, se muestran los resultados moleculares, clínicos y bioquímicos obtenidos para estos pacientes.

Tabla 7. Resultados de pacientes con VUS

Paciente (código)	Mutación ¹	HF	Componente afectado	Consumo oxígeno basal ²	Consumo oxígeno máximo ²	Copias de ADNmt/cel ³	FGF-21 ⁴	Score clínico
#10	MT-ND1: 3447C	0.132	Complejo I	0.30	0.71	376	278	6
#13	MT-ND1: 3488A; MT-ND1: 3483C	0.115; 0.052	Complejo I	0.41	0.80	383	84	5
#14	MT-CO1: 6120G	>0.999	Complejo IV	0.32	1.22	305	1770	5
#15	MT-CO1: 6120G	>0.999	Complejo IV	0.98	1.73	213	557	0.5
#16	MT-CO3: 9829G	0.149	Complejo IV	0.55	1.08	234	134	8

¹ Todos los análisis fueron realizados en el Institut Pasteur de Montevideo y Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay.

² Unidades: pmol/min/10⁶ copias de ADNmt. Valor normal para respiración máxima > 0.60. Valor normal respiración basal >0.25.

³ Valor normal para copias de ADNmt/cel < 374.

⁴ Unidades: pg/mL. Valor normal para FGF-21 < 171.

Tabla 8. Resultados de pacientes sin diagnóstico molecular confirmado

Paciente (código)	Mutación ¹	HF	Componente afectado	Consumo oxígeno basal ²	Consumo oxígeno máximo ²	Copias de ADNmt/cel	FGF-21 (pg/mL)	Score clínico
#11	MT-ATP6: 9163A	0.997	Complejo V	0.18	0.43	369	0	7
#12	MT-ATP6: 8584A	1	Complejo V	0.05	0.13	1749	290	4
#17	MT-CO3: 9438A	1	Complejo IV	0.19	0.34	337	577	6
#18	Sin mutación en ADNmt	-	-	0.25	0.63	469	452	8
#19	MT-TG: 10044G	1	ARNt glicina	0.11	0.21	559	0	8
#20	Sin mutación en ADNmt	-	-	0.40	0.84	318	0	3
#21	Sin mutación en ADNmt, ni en gen nuclear <i>PANK2</i>	-	-	0.09	0.38	1123	86	12

¹ Todos los análisis fueron realizados en el Institut Pasteur de Montevideo y Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay.

² Unidades: pmol/min/10⁶ copias de ADNmt. Valor normal para respiración máxima > 0.60. Valor normal respiración basal >0.25.

³ Valor normal para copias de ADNmt/cel < 374.

⁴ Unidades: pg/mL. Valor normal para FGF-21 < 171.

A continuación, analizamos los resultados de los pacientes que presentan VUS (Tabla 7). El paciente #10 presentaba un *score* clínico de 6 que indicaría un probable trastorno mitocondrial y valores de FGF-21 y copias de ADNmt/cel superiores a nuestros puntos de corte, que indicarían que el paciente presenta la enfermedad. La secuenciación del ADNmt mostró que presentaba una mutación de alta patogenicidad, en una proteína del complejo I. Sin embargo, presentó un HF en sangre muy bajo y de acuerdo con esto los valores de respiración basal y máxima se encontraron por encima de los puntos de corte de nuestras

curvas ROC. Es posible que la variante encontrada sea responsable de la enfermedad y se encuentre con un mayor HF en el músculo que en sangre. Por lo tanto, el próximo paso sería realizar estudios en una biopsia de músculo, determinando nuevamente la presencia de esta variante u otras en el ADNmt, el HF y la función mitocondrial en el tejido para luego contrastarlo con los valores en sangre.

Las pacientes #14 y #15, hija y madre respectivamente, presentaron la misma mutación en el ADNmt en un sitio conservado que podría ser deletérea con un HF muy alto. Pero los valores de consumo de oxígeno basal y máximo se encontraron por encima del punto de corte. Además, la paciente #14 obtuvo un *score* clínico de apenas 0.5, indicando que sería muy poco probable un trastorno mitocondrial. Mientras que, el paciente #15 obtuvo un *score* clínico de 5, sugiriendo un probable trastorno mitocondrial. Estos datos no apoyan que la mutación presente en ambos individuos sea responsable de la enfermedad. Por otra parte, ambas tuvieron valores muy altos de FGF-21 que superan ampliamente nuestro punto de corte. En los próximos análisis, se debería de evaluar la presencia de mutaciones en el músculo.

Los pacientes #13 y #16 presentaron un *score* de 5 (probable trastorno mitocondrial) y 8 (trastorno mitocondrial definido), respectivamente. En el paciente #13 se detectaron dos mutaciones que afectan al Complejo I y en el paciente #16 se detectó una mutación que afectaría un sitio conservado de una subunidad del complejo IV. Estas tres mutaciones se encuentran en el ADNmt y probablemente sean deletéreas, sin embargo, se encuentran con un HF bajo en sangre. En ambos casos, la respiración basal y máxima de los PBMCs presentó valores por encima del punto de corte. Sería conveniente secuenciar el ADNmt y medir niveles y actividad del complejo I y IV, respectivamente, en tejidos afectados.

Con respecto a los pacientes en donde no se identificaron por el momento mutaciones patogénicas responsables de la enfermedad (Tabla 8). El paciente #11 presentó un *score* clínico de 7 que indica un probable trastorno mitocondrial y un valor de copias de ADNmt/cel superior a nuestro punto de corte; mientras que los valores de FGF-21 no se encontraron elevados en sangre. El consumo de oxígeno basal y máximo resultaron menores a los puntos de corte definidos. Sin embargo, el análisis del ADNmt mostró la presencia de una variante con un HF en sangre muy alto, pero de baja patogenicidad. Para intentar encontrar la mutación causante de la enfermedad se podría realizar el secuenciado del exoma (WES) en el ADN obtenido de la sangre.

El paciente #12 obtuvo un *score* de 4, asociado a un posible trastorno mitocondrial, mientras que el paciente #17 tuvo un *score* de 6 indicando probable trastorno mitocondrial. Ambos presentaron variantes mitocondriales probablemente benignas en homoplasmia (Complejo V y IV, respectivamente). Sin embargo, tuvieron consumos de oxígeno basal y máximo inferiores a los puntos de corte y valores de FGF-21 superiores al punto de corte. Además, el paciente #12 presentó un valor de copias de ADNmt/cel muy superior al punto de corte. Por otro lado, el paciente #19 también presentó una variante en el ADNmt probablemente benigna en un ARNt, sin embargo, obtuvo un *score* de 8 lo que indicaría un trastorno mitocondrial definido. Al igual que los dos pacientes anteriores, obtuvo valores de consumo de oxígeno basal y máximo inferiores a los puntos de corte. También presentó un valor de copias de ADNmt/cel superior a nuestro punto de corte. En estos tres casos sería conveniente secuenciar el exoma a partir del ADN obtenido de la sangre, para lograr evidenciar la mutación causante de la enfermedad en cada caso.

El paciente #18 presentó un *score* clínico de 8 (trastorno mitocondrial definido) y altos niveles de FGF-21 y copias de ADNmt/cel en comparación a los puntos de corte, sin embargo, no se logró identificar mutación en ADNmt en las células de la sangre. Sería conveniente secuenciar el exoma a partir de la muestra de sangre y probablemente en el músculo en busca de mutaciones.

El paciente #20 presentó un *score* clínico de 3 (posible trastorno mitocondrial) y no se detectó mutación en el ADNmt. Por otra parte, los consumos de oxígeno fueron superiores a los puntos de corte y presentó niveles indetectables de FGF-21. La evidencia obtenida en nuestros estudios no apoya la existencia de una enfermedad mitocondrial.

Por último, el paciente #21 obtuvo un *score* clínico de 12 (trastorno mitocondrial definido), un consumo de oxígeno basal y máximo inferior a los puntos de corte; y un valor de copias de ADNmt/cel muy superior al punto de corte. En este paciente no se detectaron mutaciones en el ADNmt. En este caso, como se mencionó anteriormente para otros pacientes, se debería de continuar el estudio con el secuenciado del exoma en sangre.

6. Conclusiones

En este trabajo, llevó a cabo la puesta a punto de la obtención de PBMCs y plaquetas a partir de una misma muestra de sangre periférica. También se puso a punto la evaluación de la función mitocondrial midiendo consumo de oxígeno en PBMCs. Además, se optimizó la técnica de ddPCR para la cuantificación de copias de ADNmt y ADNn partir de ADN extraído de PBMCs.

Al evaluar la respiración mitocondrial en PBMCs y plaquetas en individuos control y pacientes con diagnóstico clínico y molecular de enfermedad mitocondrial se observó una caída pequeña pero significativa de la respiración basal en las plaquetas de los pacientes con enfermedad mitocondrial normalizada por el número de células. Por otra parte, en PBMCs no se observaron diferencias en los parámetros respiratorios de los PBMCs al normalizar por el número de células. Pero se evidenció que los pacientes compensaban el déficit en la función de los componentes afectados por la mutación con un aumento en el número de copias de ADNmt. Por esto al normalizar los parámetros respiratorios por copia de ADNmt se pudo observar la caída en todos los parámetros respiratorios en las PBMCs de los pacientes, con relación a los individuos control de un rango etario similar. Además, en la población control se observó una disminución con la edad de todos los parámetros respiratorios de los PBMCs, normalizados tanto por número de células como por copias de ADNmt. Este efecto de la edad en la función mitocondrial no se encontró en las plaquetas.

Por otra parte, se determinaron los niveles plasmáticos de FGF-21 un biomarcador de enfermedad mitocondrial con compromiso muscular, constatando que los pacientes presentaban en promedio niveles más altos en comparación a los controles.

Se obtuvieron curvas ROC prometedoras para los parámetros respiratorios normalizados por copia de ADNmt de los PBMCs, en particular para la respiración máxima. Esto sugiere que el método puesto a punto podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales. De esta manera, la evaluación de la función mitocondrial en estas células obtenidas de la sangre reduciría la necesidad de procedimientos invasivos como la biopsia muscular.

7. Perspectivas

- Incorporar más pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada a nivel molecular a los análisis. Para confirmar el diagnóstico de los pacientes con VUS o sin diagnóstico se debería de estudiar la presencia de mutaciones en músculo o proceder a la secuenciación del exoma, dependiendo del caso.
- Evaluar posibles deleciones en pacientes VUS o sin diagnóstico molecular confirmado mediante ddPCR.
- Estudiar los mecanismos moleculares responsables del aumento en los niveles de ADNmt en los pacientes e investigar si existen otros mecanismos compensatorios extra mitocondriales para proveer ATP.
- Evaluar la masa mitocondrial por otras técnicas.
- Continuar con la puesta a punto de los métodos para estudiar los niveles de CoQ₁₀ en células de pacientes y controles. Se ha visto que en algunas enfermedades mitocondriales los niveles de esta coenzima se encuentran disminuidos. En este proyecto, se puso a punto la técnica de detección de estándares de CoQ₁₀ y CoQ₉ por medio de HPLC-UV, pero no se logró extraer la CoQ₁₀ de las muestras de PBMCs.
- Poner a punto la evaluación de la función mitocondrial midiendo consumo de oxígeno en fibroblastos de piel humana y biopsias musculares humanas. Esto nos permitirá contar con un mayor número de herramientas para el diagnóstico, que será útil cuando la heteroplasmia en sangre no sea un reflejo de lo que ocurre en los tejidos afectados. El protocolo y los consentimientos informados ya fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del CHPR.

8. Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigaciones Biomédicas de Facultad de Medicina y a las dos unidades del Centro de Referencia Nacional de Defectos Congénitos y Enfermedades Raras: la policlínica de Errores Innatos del Metabolismo y la Unidad de Laboratorio de Pesquisa neonatal por haber impulsado este proyecto.

A mis orientadoras, Celia y Laura, por todo su apoyo incondicional desde el día cero, por la confianza, por la paciencia, por su tiempo y dedicación, por todas las herramientas tan valiosas que me dieron. Gracias por abrirme las puertas y haberme hecho sentir tan cómoda. Gracias por el hermoso tiempo compartido.

A mis compañeros de laboratorio, por haberme recibido y tratado tan bien. Gracias por las horas tan lindas compartidas en el laboratorio. A Santiago, Jennyfer, Inés, Mauricio e Irene por sus aportes y gran ayuda.

A Aída, Cristina, Alfredo, Víctor, Lucía, Hugo y Mariela por sus contribuciones tan valiosas en este proyecto.

A los pacientes que fueron parte, sus padres y/o tutores por confiar en nosotros.

Al Departamento de Hemoterapia del Hospital de Clínicas y sus donantes. A Jimena, Cecilia y Gabriela por la excelente predisposición en la entrega de muestras.

A Laureana y Rodrigo por recibirme en Facultad de Veterinaria y ayudarme durante la pasantía.

A los miembros del tribunal por aceptar y dedicar su tiempo a corregir esta tesis.

A CSIC y al Espacio Interdisciplinario por apoyar y financiar este proyecto.

A mi familia, en especial a mis padres, por tanto amor, por el apoyo en todo y por darme las alas para ser lo que quiero ser.

A mis amigos, a los que tengo cerca y a los que tengo lejos, gracias por caminar conmigo.

9. Referencias

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- Alberts, B., Bray, D., Hopkins, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). Essential Cell Biology. In *Garland Science* (fourth edi).
- Alfatni, A., Riou, M., Charles, A., Meyer, A., Barnig, C., Andres, E., Lejay, A., Talha, S., & Geny, B. (2020). Peripheral Blood Mononuclear Cells and Platelets Mitochondrial Dysfunction , Oxidative Stress , and Circulating mtDNA in Cardiovascular Diseases. *J. Clin. Med.*, 9(311), 1–24. <https://doi.org/doi:10.3390/jcm9020311>
- Arias, A., García-Villoria, J., Rojo, A., Buján, N., Briones, P., & Ribes, A. (2012). Analysis of coenzyme Q10 in lymphocytes by HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 908, 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.027>
- Arik, M., Çelebi, N., & Onganer, Y. (2005). Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 170(2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2004.07.004>
- Badman, M. K., Koester, A., Flier, J. S., Kharitononkov, A., & Maratos-Flier, E. (2009). Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology*, 150(11), 4931–4940. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0532>
- Bai, R., & Wong, L. C. (2005). Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion (s), Depletion , and Over- Replication in Patients with Mitochondrial Disease. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7(5), 613–622. [https://doi.org/doi:10.1016/S1525-1578\(10\)60595-8](https://doi.org/doi:10.1016/S1525-1578(10)60595-8)
- Bandos, A. I., Guo, B., & Gur, D. (2018). Estimating the Area Under ROC Curve When the Fitted Binormal Curves Demonstrate Improper Shape. *Acad Radiol.*, 24(2), 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2016.09.020>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease*

in Childhood: Education and Practice Edition, 98(6), 236–238.
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>

Blanco-Grau, A., Bonaventura-Ibars, I., Coll-Cantí, J., Melià, M. J., Martínez, R., Martínez-Gallo, M., Andreu, A. L., Pinós, T., & García-Arumí, E. (2013). Identification and biochemical characterization of the novel mutation m.8839G>C in the mitochondrial ATP6 gene associated with NARP syndrome. *Genes, Brain and Behavior*, 12(8), 812–820. <https://doi.org/10.1111/gbb.12089>

Boitier, E., Degoul, F., Desguerre, I., Charpentier, C., François, D., Ponsot, G., Diry, M., Rustin, P., & Marsac, C. (1998). A case of mitochondrial encephalomyopathy associated with a muscle coenzyme Q10 deficiency. *Journal of the Neurological Sciences*, 156(1), 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(98\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00006-9)

Bøyum, A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, 97, 7.

Braganza, A., & Annarapu, G. K. (2020). Molecular Aspects of Medicine Blood-based bioenergetics: An emerging translational and clinical tool. *Molecular Aspects of Medicine*, 71(September 2019), 100835. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100835>

Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>

Buján, N., Arias, A., Montero, R., García-Villoria, J., Lissens, W., Seneca, S., Espinós, C., Navas, P., De Meirleir, L., Artuch, R., Briones, P., & Ribes, A. (2014). Characterization of CoQ10 biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ10 deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(1), 53–62. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9620-4>

Calvo, S. E., Clauser, K. R., & Mootha, V. K. (2016). MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research*, 44(October 2015), 1251–1257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003>

Campomenosi, P., Gini, E., Noonan, D. M., Poli, A., Antona, P. D., Rotolo, N., Dominioni, L., & Imperatori, A. (2016). A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC*

Biotechnology, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0292-7>

- Carroll, C. J., Brillhante, V., Suomalainen, A., & Carroll, C. J. (2014). Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *British Journal of Pharmacology*, *171*, 1837–1853. <https://doi.org/10.1111/bph.12469>
- Chacko, B. K., Kramer, P. A., Ravi, S., Johnson, M. S., Hardy, R. W., Ballinger, S. W., & Darley-usmar, V. M. (2013). Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets , lymphocytes , monocytes , and neutrophils , and the oxidative burst from human blood. *Laboratory Investigation*, *93*, 690–700. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.53>
- Chinnery, P. F. (2014). Mitochondrial Disorders Overview. In *Gene reviews* (pp. 1–21). https://www.dropbox.com/s/92278owgu4ewxeu/Bookshelf_NBK1224.pdf?dl=0
- Chocron, E. S., Munkácsy, E., & Pickering, A. M. (2019). Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1865*(2), 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.035>
- Costanzini, A., Sgarbi, G., Maresca, A., Del Dotto, V., Solaini, G., & Baracca, A. (2019). Mitochondrial Mass Assessment in a Selected Cell Line under Different Metabolic Conditions. *Cells*, *8*(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cells8111454>
- Crenadecer*. (n.d.). Retrieved August 19, 2020, from <https://www.bps.gub.uy/10594/crenadecer.html>
- Czajka, A., Ajaz, S., Gnudi, L., Kiran, C., Jones, P., Reid, F., & Malik, A. N. (2015). Altered Mitochondrial Function , Mitochondrial DNA and Reduced Metabolic Flexibility in Patients With Diabetic Nephropathy. *EBIOM*, *2*(6), 499–512. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.04.002>
- Dard, L., Blanchard, W., Hubert, C., Lacombe, D., & Rossignol, R. (2020). Molecular Aspects of Mitochondrial functions and rare diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, *71*(October 2019), 100842. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100842>
- Davis, R. L., Liang, C., Edema-Hildebrand, F., Riley, C., Needham, M., & Sue, C. M. (2013).

- Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease. *Neurology*, *81*(21), 1819–1826. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000436068.43384.ef>
- Davis, R. L., Liang, C., & Sue, C. M. (2018). Mitochondrial diseases. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 147). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00010-5>
- Divakaruni, A. S., Paradyse, A., Ferrick, D. A., Murphy, A. N., & Jastroch, M. (2014). Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. In *Mitochondrial Function* (1st ed., Vol. 547). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801415-8.00016-3>
- Doherty, E., & Perl, A. (2017). Measurement of Mitochondrial Mass by Flow Cytometry during Oxidative Stress. *Reactive Oxygen Species*, *4*(10), 275–283. <https://doi.org/10.20455/ros.2017.839>
- Fisher, F. M., & Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annual Review of Physiology*, *78*, 223–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105339>
- Frahm, T., Mohamed, S. A., Bruse, P., Gemünd, C., Oehmichen, M., & Meissner, C. (2005). Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. *Mechanisms of Ageing and Development*, *126*(11), 1192–1200. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.06.008>
- Fuente-alba, C. S., & Villagra, M. M. (2017). Likelihood ratio (razón de verosimilitud): definición y aplicación en Radiología. *Revista Argentina de Radiología*, *81*(3), 204–208. <https://doi.org/DOI:10.1016/j.rard.2016.11.002>
- Garcia-souza, L. F., & Oliveira, M. F. (2014). Mitochondria: Biological roles in platelet physiology and pathology. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *50*, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.015>
- Gerencser, A. A., Neilson, A., Choi, S. W., Edman, U., Yadava, N., Oh, R. J., Ferrick, D. A., Nicholls, D. G., & Brand, M. D. (2009). Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Analytical Chemistry*, *81*(16), 6868–6878. <https://doi.org/10.1021/ac900881z>

- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- Haas, R. H., Parikh, S., Falk, M. J., Saneto, R. P., Wolf, N. I., Darin, N., Wong, L., Cohen, B. H., & Naviaux, R. K. (2008). The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease The Mitochondrial Medicine Society ' s Committee on Diagnosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 94, 16–37. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.018>
- Hajian-Tilaki, K. (2013). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4(2), 627–635.
- Harbottle, A., & Birch-machin, M. A. (2006). Real-time PCR analysis of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion in nonmelanoma skin cancer and its use as a quantitative marker for sunlight exposure in human skin. *British Journal of Cancer* (2006), 94(12), 1887–1893. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603178>
- Hartman, M., Shirihai, O. S., Holbrook, M., Xu, G., Kocherla, M., Fetterman, J. L., Kluge, M. A., Frame, A. A., Hamburg, N. M., & Vita, J. A. (2014). Relation of Mitochondrial Oxygen Consumption in Peripheral Blood Mononuclear Cells to Vascular Function in Type 2 Diabetes Mellitus. *Vascular Medicine*, 19(1), 67–74. <https://doi.org/10.1177/1358863X14521315.Relation>
- Hinkle, D. E., Wiersma, W., & Jurs, S. G. (2003). *Applied statistics for the behavioral sciences* (5th ed.). Houghton Mifflin. <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/50716608.html>
- Hirano, M., Emmanuele, V., & Quinzii, C. M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 467–481. <https://doi.org/10.1042/EBC20170114>
- Hosgood, H. D., Liu, C. S., Rothman, N., Weinstein, S. J., Bonner, M. R., Shen, M., Lim, U., Virtamo, J., Cheng, W. ling, Albanes, D., & Lan, Q. (2010). Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 31(5), 847–849. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq045>
- Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K.,

- Fushiki, T., & Itoh, N. (2009). Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology*, *150*(10), 4625–4633. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0119>
- Jones, N., Piasecka, J., Bryant, A. H., Jones, R. H., Skibinski, D. O. F., Francis, N. J., & Thornton, C. A. (2015). Bioenergetic analysis of human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, *182*(1), 69–80. <https://doi.org/10.1111/cei.12662>
- Keipert, S., Ost, M., Johann, K., Imber, F., Jastroch, M., van Schothorst, E. M., Keijer, J., & Klaus, S. (2014). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine cross-talk through the induction of FGF21 as a myokine. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *306*(5), 469–482. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00330.2013>
- Kramer, P. A., Chacko, B. K., Ravi, S., Johnson, M. S., Mitchell, T., & Darley-Usmar, V. M. (2014). Bioenergetics and the oxidative burst: Protocols for the isolation and evaluation of human leukocytes and platelets. *Journal of Visualized Experiments*, *85*, 1–9. <https://doi.org/10.3791/51301>
- Kremer, L. S., Iuso, A., Gusic, M., Ye, V. A., Nadel, A., Wachutka, L., & Kopajtich, R. (2018). OCR-Stats : Robust estimation and statistical testing of mitochondrial respiration activities using Seahorse XF Analyzer. *PLoS ONE*, *13*(7), 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199938>
- Krishnan, K. J., Bender, A., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2007). A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells. *Anal. Biochem.* *370*, *370*, 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.024>
- Kudryavtseva, A. V, Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Boris, Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., & Fedorova, M. S. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, *7*(29), 44879–44905. <https://doi.org/doi:10.18632/oncotarget.9821>
- Kunji, E. R. S., Aleksandrova, A., King, M. S., Majd, H., Ashton, V. L., Cerson, E., Springett, R., Kibalchenko, M., Tavoulari, S., Crichton, P. G., & Ruprecht, J. J. (2016).

The transport mechanism of the mitochondrial ADP / ATP carrier. *BBA - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2379–2393. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.015>

Lakowicz, J. R., & Weber, G. (1973). Quenching of Fluorescence by Oxygen. A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules. *Biochemistry*, 12(21), 4161–4170. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (sixth). W.H. Freeman and Company.

Lehtonen, J. M., Forsström, S., Bottani, E., Viscomi, C., Baris, O. R., Isoniemi, H., Höckerstedt, K., Österlund, P., Hurme, M., Jylhävä, J., Leppä, S., Markkula, R., Heliö, T., Mombelli, G., Uusimaa, J., Laaksonen, R., Laaksovirta, H., Auranen, M., Zeviani, M., ... Suomalainen, A. (2016). FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology*, 87(22), 2290–2299. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003374>

Li, Biao, Krishnan, V. G., Mort, M. E., Xin, F., Kamati, K. K., Cooper, D. N., Mooney, S. D., & Radivojac, P. (2009). Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics*, 25(21), 2744–2750. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp528>

Li, Brian, Kaushik, S., Kalinowski, P., Kim, B. R., Gershon, C., Ching, J., & Poburko, D. (2018). Droplet digital PCR shows the D-Loop to be an error prone locus for mitochondrial DNA copy number determination. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29621-1>

Li, Z., & Graham, B. H. (2012). Measurement of Mitochondrial Oxygen Consumption Using a Clark Electrode. *Methods Mol Biol.*, 837, 63–72. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-504-6>

Liu, C.-S., Tsai, C.-S., Kuo, C.-L., Chen, H.-W., Lii, C.-K., Ma, Y.-S., & Wei, Y.-H. (2003). Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radical Research*, 37(12), 1307–1317. <https://doi.org/10.1080/10715760310001621342>

Liu, Y. J., McIntyre, R. L., Janssens, G. E., & Houtkooper, R. H. (2020). Mitochondrial

fission and fusion : A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 186(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111212>

López, I., & Pita. (2001). Curvas ROC. *Cad Aten Primaria*, 5(4), 229–235.

Melchinger, H., Jain, K., Tyagi, T., & Hwa, J. (2019). Role of Platelet Mitochondria : Life in a Nucleus-Free Zone. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00153>

Mendelson, Y. (2011). Biomedical Sensors. In *Introduction to Biomedical Engineering* (third). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374979-6.00010-1>

Mengel-From, J., Thinggaard, M., & Dalgård, C. (2015). Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum Genet.*, 133(9), 1149–1159. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1458-9>. Mitochondrial

Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W., & Nagley, P. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Research*, 31(11). <https://doi.org/10.1093/nar/gng060>

Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379–387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>

Mitra, K., & Lippincott-Schwartz, J. (2010). Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches. *Current Protocols in Cell Biology*, SUPPL. 46, 4251–42521. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0425s46>

Montero, R., Yubero, D., Villarroya, J., Henares, D., Jou, C., Rodríguez, M. A., Ramos, F., Nascimento, A., Ortez, C. I., Campistol, J., Perez-Dueñas, B., O'Callaghan, M., Pineda, M., Garcia-Cazorla, A., Oferil, J. C., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., Emperador, S., Meznaric, M., ... Jimenez-Mallebrera, C. (2016). GDF-15 is elevated in children with mitochondrial diseases and is induced by mitochondrial dysfunction. *PLoS ONE*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148709>

- Morava, E., Van Den Heuvel, L., Hol, F., De Vries, M. C., Hogeveen, M., Rodenburg, R. J., & Smeitink, J. A. M. (2006). Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. *Neurology*, *67*(10), 1823–1826. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000244435.27645.54>
- Morovat, A., Weerasinghe, G., Nesbitt, V., Hofer, M., Agnew, T., Quaghebeur, G., Sergeant, K., Fratter, C., Guha, N., Mirzazadeh, M., & Poulton, J. (2017). Use of FGF-21 as a Biomarker of Mitochondrial Disease in Clinical Practice. *Journal of Clinical Medicine*, *6*(8), 80. <https://doi.org/10.3390/jcm6080080>
- Mosca, F., Fattorini, D., Bompadre, S., & Littarru, G. P. (2002). Assay of coenzyme Q10 in plasma by a single dilution step. *Analytical Biochemistry*, *305*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5653>
- Mukaka, M. M. (2013). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, *24*(3), 69–71.
- Neergheen, V., Chalasani, A., Wainwright, L., Yubero, D., Montero, R., & Artuch, R. (2017). Coenzyme Q 10 in the Treatment of Mitochondrial Disease. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*, *5*, 1–8. <https://doi.org/10.1177/2326409817707771>
- Nguyen, Q. L., Corey, C., White, P., Watson, A., Gladwin, M. T., Simon, M. A., & Shiva, S. (2017). Platelets from pulmonary hypertension patients show increased mitochondrial reserve capacity. *JCI Insight*, *2*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91415>
- Nicholas, D., Proctor, E. A., Raval, F. M., Ip, B. C., Habib, C., Ritou, E., Grammatopoulos, T. N., Steenkamp, D., Doms, H., Apovian, C. M., Lauffenburger, D. A., & Nikolajczyk, B. S. (2017). Advances in the quantification of mitochondrial function in primary human immune cells through extracellular flux analysis. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170975>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, *148*(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- O'Hara, R., Tedone, E., Ludlow, A., Huang, E., Arosio, B., Mari, D., & Shay, J. W. (2019). Quantitative mitochondrial DNA copy number determination using droplet digital PCR with single-cell resolution. *Genome Research*, *29*(11), 1878–1888.

<https://doi.org/10.1101/gr.250480.119>

- Ojaimi, J., Masters, C. L., Opeskin, K., Mckelvie, P., & Byrne, E. (1999). Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age. *Mechanisms of Ageing and Development*, *111*, 39–47. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(99\)00071-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00071-8)
- Osellame, L. D., Hons, B. S., Ph, D., Blacker, T. S., Duchen, M. R., & Oxon, B. A. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *26*(6), 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
- Parikh, S., Goldstein, A., Karaa, A., Koenig, M. K., Anselm, I., Brunel-guitton, C., Christodoulou, J., Cohen, B. H., Dimmock, D., Enns, G. M., Falk, M. J., Korson, M., Kruer, M. C., Mancuso, M., Salvarinova, R., Saneto, R. P., Scaglia, F., Cunningham, Z. Z., & Rahman, S. (2017). Patient care standards for primary mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in Medicine*, *00*, 1–18. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.107>
- Parikh, S., Goldstein, A., Koenig, M. K., Scaglia, F., Enns, G. M., Saneto, R., Anselm, I., Cohen, B. H., Falk, M. J., Greene, C., Gropman, A. L., Haas, R., Hirano, M., Morgan, P., Sims, K., Tarnopolsky, M., Van Hove, J. L. K., Wolfe, L., & DiMauro, S. (2015). Diagnosis and management of mitochondrial disease: A consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in Medicine*, *17*(9), 689–701. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.177>
- Pelletier, M., Billingham, L. K., Ramaswamy, M., & Siegel, R. M. (2014). Extracellular flux analysis to monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 542). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00007-8>
- Pfeffer, G., Majamaa, K., Turnbull, D. M., Thorburn, D., & Chinnery, P. F. (2012). Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *1*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd004426.pub3>
- Phillips, N. R., Sprouse, M. L., & Roby, R. K. (2014). Simultaneous quantification of

- mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: A multiplex real-time PCR assay. *Scientific Reports*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep03887>
- Plutino, M., Chaussonot, A., Rouzier, C., Ait-el-mkadem, S., & Fragaki, K. (2018). Targeted next generation sequencing with an extended gene panel does not impact variant detection in mitochondrial diseases. *BMC Medical Genetics*, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12881-018-0568-y>
- Poe, B. G., Navratil, M., & Arriaga, E. A. (2008). Absolute Quantitation of a Heteroplasmic Mitochondrial DNA Deletion Using a Multiplex Three-Primer Real-Time PCR Assay. *Anal Biochem.*, 362(2), 193–200. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ab.2006.12.035>
- Presley, T., Kuppasamy, P., Zweier, J. L., & Ilangovan, G. (2006). Electron paramagnetic resonance oximetry as a quantitative method to measure cellular respiration: A consideration of oxygen diffusion interference. *Biophysical Journal*, 91(12), 4623–4631. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.090175>
- Reily, C., Mitchell, T., Chacko, B. K., Benavides, G. A., Murphy, M. P., & Darley-usmar, V. M. (2013). *Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. 1*, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.009>
- Reynolds, L. M., Ding, J., Taylor, J. R., Lohman, K., Soranzo, N., Fuente, A. De, Liu, T. F., Johnson, C., Barr, R. G., Register, T. C., Donohue, K. M., Talor, M. V, Cihakova, D., Gu, C., Divers, J., Siscovick, D., Burke, G., Post, W., Shea, S., ... Liu, Y. (2015). Transcriptomic profiles of aging in purified human immune cells. *BMC Genomics* (2015), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1522-4>
- Riou, M., Alfatni, A., Charles, A., Andr, E., Pisteia, C., Charloux, A., & Geny, B. (2020). New Insights into the Implication of Mitochondrial Dysfunction in Tissue , Peripheral Blood Mononuclear Cells , and Platelets during Lung Diseases. *J. Clin. Med.*, 9(1253), 1–20. <https://doi.org/doi:10.3390/jcm9051253>
- Rose, S., Carvalho, E., Diaz, E. C., Cotter, M., Bennuri, S. C., Azhar, G., Frye, R. E., Adams, S. H., Børshiem, X. E., Re, F., Sh, A., & Børshiem, E. A. (2020). A comparative study of mitochondrial respiration in circulating blood cells and skeletal muscle fibers in women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 317(3), E503–E512.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00084.2019>

- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J. P., & Letellier, T. (2003). Mitochondrial threshold effects. *Biochemical Journal*, *370*(3), 751–762. <https://doi.org/10.1042/BJ20021594>
- Schapira, A. H. V. (2006). Mitochondrial disease. *Lancet*, *368*(1), 70–82. [https://doi.org/DOI:10.1016/S0140-6736\(06\)68970-8](https://doi.org/DOI:10.1016/S0140-6736(06)68970-8)
- Schapira, A. H. V. (2012). Mitochondrial diseases. *The Lancet*, *379*(9828), 1825–1834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61305-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61305-6)
- Scholle, L. M., Lehmann, D., Deschauer, M., Kraya, T., & Zierz, S. (2018). FGF-21 as a potential biomarker for mitochondrial diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *25*, 2070–2081. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180111094336>
- Schon, E. A., Dimauro, S., & Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA : roles of inherited and somatic mutations. *Nature*, *13*(December), 878–890. <https://doi.org/10.1038/nrg3275>
- Schon, K. R., Ratnaike, T., van den Aamele, J., Horvath, R., & Chinnery, P. F. (2020). Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution. *Trends in Genetics*, *36*(9), 702–717. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.06.009>
- Short, K. R., Bigelow, M. L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-schimke, J., Raghavakaimal, S., & Nair, K. S. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(15), 5618–5623. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0501559102>
- Sjövall, F., Ehinger, J. K. H., Marelsson, S. E., Morota, S., Åsander Frostner, E., Uchino, H., Lundgren, J., Arnbjörnsson, E., Hansson, M. J., Fellman, V., & Elmér, E. (2013). Mitochondrial respiration in human viable platelets-Methodology and influence of gender, age and storage. *Mitochondrion*, *13*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.11.001>
- Sofronova, J. K., Ilinsky, Y. Y., Orishchenko, K. E., Chupakhin, E. G., Lunev, E. A., & Mazunin, I. O. (2016). Detection of mutations in mitochondrial DNA by droplet digital

PCR. *Biochemistry (Moscow)*, 81(10), 1031–1037.
<https://doi.org/10.1134/S0006297916100011>

Spangenberg, L., Graña, M., Mansilla, S., Martínez, J., Tapié, A., Greif, G., Montano, N., Vaglio, A., Gueçaimburú, R., Robello, C., Castro, L., Quijano, C., Raggio, V., & Naya, H. (2018). Deep sequencing discovery of causal mtDNA mutations in a patient with unspecific neurological disease. *Mitochondrion*, 46, 337–344.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.09.004>

Sun, D., Li, B., Qiu, R., Fang, H., & Lyu, J. (2016). Cell type-specific modulation of respiratory chain supercomplex organization. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060926>

Suomalainen, A. (2013). Fibroblast growth factor 21: A novel biomarker for human muscle-manifesting mitochondrial disorders. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 7(4), 313–317. <https://doi.org/10.1517/17530059.2013.812070>

Suomalainen, A., & Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: The contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.66>

Suomalainen, A., Elo, J. M., Pietiläinen, K. H., Hakonen, A. H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S. K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., Pihko, H., Darin, N., Öunap, K., Kluijtmans, L. A. J., Paetau, A., Buzkova, J., Bindoff, L. A., Annunen-Rasila, J., Uusimaa, J., ... Tyynismaa, H. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: A diagnostic study. *The Lancet Neurology*, 10(9), 806–818. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70155-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70155-7)

Szuhai, K., Ouweland, J. M. Van Den, Dirks, R. W., Lemaître, M., Truffert, J., Janssen, G. M., Tanke, H. J., Holme, E., Maassen, J. A., & Raap, A. K. (2001). Simultaneous A8344G heteroplasmy and mitochondrial DNA copy number quantification in Myoclonus Epilepsy and Ragged-Red Fibers (MERRF) syndrome by a multiplex Molecular Beacon based real-time fluorescence PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(3). <https://doi.org/doi: 10.1093/nar/29.3.e13>.

Tang, P. H., Miles, M. V, Degrauw, A., & Hershey, A. (2001). HPLC Analysis of Reduced

and Oxidized Coenzyme Q 10 in Human Plasma. *Clinical Chemistry* 47:2, 47(2), 256–265. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.2.256>

Tomas, C., Brown, A., Strassheim, V., Elson, J., Newton, J., & Manning, P. (2017). Cellular bioenergetics is impaired in patients with chronic fatigue syndrome. *PLoS ONE*, 12(10), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186802>

Trifunov, S., Pyle, A., Valentino, M. L., Liguori, R., Yu-Wai-Man, P., Burté, F., Duff, J., Kleinle, S., Diebold, I., Rugolo, M., Horvath, R., & Carelli, V. (2018). Clonal expansion of mtDNA deletions: different disease models assessed by digital droplet PCR in single muscle cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30143-z>

Tyynismaa, H., Carroll, C. J., Raimundo, N., Ahola-erkkilä, S., Wenz, T., Ruhanen, H., Guse, K., Hemminki, A., Peltola-Mjøsund, K. E., Tulkki, V., Orešič, M., Moraes, C. T., Pietiläinen, K., Hovatta, I., & Suomalainen, A. (2010). Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Human Molecular Genetics*, 19(20), 3948–3958. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq310>

Vikram, D. S., Ahmad, R., Pandian, R. P., Petryakov, S., & Kuppusamy, P. (2008). Evaluation of oxygen-response times of phthalocyanine-based crystalline paramagnetic spin probes for EPR oximetry. *J Magn Reson*, 193(1), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.04.034>.Evaluation

Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *Journal of Cell Biology*, 175(2), 237–247. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605138>

Wachsmuth, M., Hübner, A., Li, M., & Madea, B. (2016). *Age-Related and Heteroplasmy-Related Variation in Human mtDNA Copy Number*. 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005939>

Wallace, D. C. (1986). Mitotic segregation of mitochondrial dnas in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 12(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/BF01560726>

Watson, E., Davis, R., & Sue, C. M. (2020). New diagnostic pathways for mitochondrial disease. *Journal of Translational Genetics and Genomics*, 4, 188–202.

<https://doi.org/10.20517/jtgg.2020.31>

- Witters, P., Saada, A., Honzik, T., Tesarova, M., Kleinle, S., Horvath, R., Goldstein, A., & Morava, E. (2017). Revisiting mitochondrial diagnostic criteria in the new era of genomics. *Genetics in Medicine*, *20*(4), 444–451. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.125>
- Wolf, N. I., Smeitink, J. A. M., Wolf, N. I., & Smeitink, J. A. M. (2002). Mitochondrial disorders: A proposal for consensus diagnostic criteria in. *Neurology*, *59*, 1402–1405. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000031795.91814.D8>
- Wu, J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M. M., & Ilsa, I. (2009). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *AGING*, *1*(4), 425–437. <https://doi.org/doi:10.18632/aging.100038>.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S., & Ferrick, D. A. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *292*(1), 125–136. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00247.2006>
- Xing, J., Chen, M., Wood, C. G., Lin, J., Spitz, M. R., Ma, J., Amos, C. I., Shields, P. G., Benowitz, N. L., Gu, J., De Andrade, M., Swan, G. E., & Wu, X. (2008). Mitochondrial DNA content: Its genetic heritability and association with renal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, *100*(15), 1104–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn213>
- Yen, M., Chen, C., Wang, A., & Wei, Y. (2002). Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation. *Br J Ophthalmol*, *86*, 1027–1030. <https://doi.org/doi:10.1136/bjo.86.9.1027>
- Yubero, D., Allen, G., Artuch, R., & Montero, R. (2017). The Value of Coenzyme Q 10 Determination in Mitochondrial Patients. *J. Clin. Med.*, *6*(37), 1–10. <https://doi.org/10.3390/jcm6040037>
- Zhang, Y., Liu, J., Chen, X. Q., & Oliver Chen, C. Y. (2018). Ubiquinol is superior to

ubiquinone to enhance Coenzyme Q10 status in older men. *Food and Function*, 9(11), 5653–5659. <https://doi.org/10.1039/c8fo00971f>