

**Universidad de la República**  
**Facultad de Ciencias**  
**Licenciatura en Biología Humana**  
**Informe de Pasantía de Grado**

*Enfermedades mitocondriales humanas: estudio de casos clínicos uruguayos  
usando herramientas bioinformáticas y experimentales*

Estudiante: Mariana Chaves Suárez

Tutora: Dra. Celia Quijano

Orientador: Dr. Martín Graña

Co-orientadora: Dra. Adriana Cassina

Lugar de realización: Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur Montevideo;  
Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO); Departamento de Bioquímica, Facultad  
de Medicina, UdelaR.



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



**CEINBIO**



## Índice

1. Resumen
2. Introducción
  - 2.1 Mitocondrias, cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa
  - 2.2 Genoma mitocondrial y enfermedades mitocondriales
  - 2.3 Complejo I y enfermedades mitocondriales
  - 2.4 Caso clínico abordado
3. Objetivos
  - 3.1 Objetivo General
  - 3.2 Objetivos Específicos
4. Materiales y métodos
  - 4.1 Herramientas bioinformáticas
  - 4.2 Diseño y análisis de estructuras proteicas in silico
  - 4.3 Estudio de la función mitocondrial
  - 4.4 Reactivos y medios
  - 4.5 Obtención del tejido
  - 4.6 Permeabilización de las biopsias de músculo
  - 4.7 Ensayos de oximetría
  - 4.8 Parámetros e índices respiratorios
  - 4.9 Gráficos y análisis estadísticos
5. Resultados y discusión
  - 5.1. Análisis de polimorfismos de la secuencia del gen *MT-ND1*
  - 5.2. Análisis evolutivo de la secuencia de *MT-ND1*
  - 5.3. Análisis de estructuras proteicas en contexto wild type y contexto mutante
  - 5.4. Puesta a punto del estudio de la respiración mitocondrial en biopsia de músculo esquelético permeabilizado.
6. Conclusión
7. Perspectivas

## 1. Resumen

Las enfermedades mitocondriales constituyen uno de los errores innatos del metabolismo más frecuentes con una prevalencia estimada de 1:5000. Estas enfermedades afectan el funcionamiento de las mitocondrias y pueden tener su origen por mutaciones en el genoma nuclear o mitocondrial. El mal funcionamiento de las mitocondrias afecta el proceso de fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria incidiendo en la producción del adenosín trifosfato (ATP), necesario para los procesos celulares. Dada la gran variabilidad de fenotipos clínicos y la falta de biomarcadores sensibles y específicos, los avances en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes que padecen trastornos de este tipo son aún limitados. La variante mitocondrial m.3447 A>C del gen *MT-ND1* fue identificada en un paciente con fenotipo compatible con enfermedad mitocondrial. La mutación genera la sustitución de una glutamina por una histidina en la subunidad 1 (ND1) del Complejo I (NADH deshidrogenasa), primer paso de la cadena respiratoria. Como abordaje usamos herramientas computacionales y bioquímicas para entender el impacto de la mutación en la función molecular, y el fenotipo del paciente.

Las herramientas bioinformáticas permitieron observar que la mutación puede ocasionar cambios en las interacciones entre residuos aminoacídicos de la proteína, que podrían afectar la función del Complejo I y estar implicados en el fenotipo del paciente. Para validar estas predicciones, se trabajó para poner a punto la medida de respiración mitocondrial, dependiente de distintos sustratos de la cadena respiratoria, utilizando respirometría de alta resolución en biopsias musculares. Se evaluó la respiración de biopsias de ratón y se aspira a realizar medidas en individuos sin patologías metabólicas (controles) y en el paciente en estudio, además de otros pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial. Apuntamos a que estos estudios permitan comprender mejor la relación entre los cambios genéticos, la función mitocondrial y los fenotipos de los pacientes, y ayuden al diagnóstico de estas enfermedades.

## 2. Introducción

### 2.1. Mitocondrias, cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa

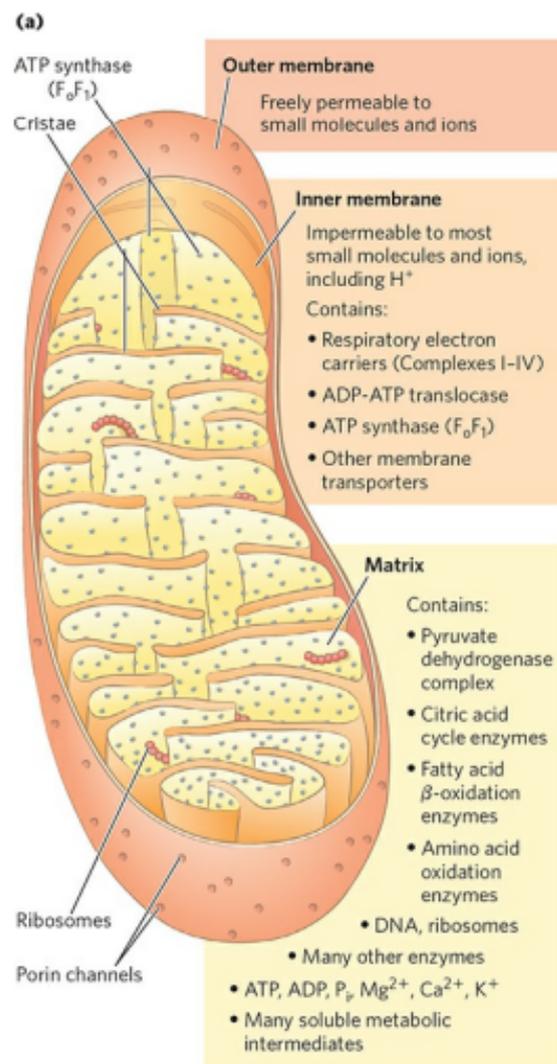
Las mitocondrias se han descrito como organelos dinámicos capaces de fusionarse, fisionarse y cuya morfología puede diferir según el tipo celular. Estructuralmente cuentan con dos membranas, una externa que delimita a todo el organelo y otra interna, generándose dos compartimentos que están vinculados a procesos metabólicos distintos, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Figura 1).

Las membranas mitocondriales presentan una permeabilidad diferente. La membrana externa es permeable a moléculas e iones  $< 500$  Da, entre las que están incluidas la molécula de adenosín trifosfato (ATP) y cofactores del metabolismo energético; en tanto que el pasaje de moléculas e iones por la membrana interna hacia la matriz es dependiente de transportadores (Karp, 2017). En la matriz, ubicada en el interior de esas membranas se concentran gran cantidad de proteínas hidrosolubles. Las membranas internas por su parte se diferencian en dos dominios, una membrana limitante interna encargada de importar proteínas, y un dominio en donde se localizan las crestas mitocondriales responsables de la transducción de energía. Los espacios intermembrana por su parte están vinculados a los procesos apoptóticos de las células (Karp, 2017).

Uno de los modelos mayormente aceptados sobre la presencia de mitocondrias en las células eucariotas es la teoría endosimbiótica propuesta por Lynn Margulis en 1966. Los postulados de esta teoría explican el origen de las células eucariotas como resultado de un proceso de simbiosis, mediante el cual formas de vida bacterianas primitivas fueron incorporadas por otras células, sufrieron modificaciones y fueron anexadas finalmente como los organelos celulares de células nucleadas que hoy conocemos como mitocondrias y cloroplastos (Margulis 1998).

En 1948 Eugene Kennedy y Albert Lehninger demostraron que las mitocondrias son el sitio donde ocurre la fosforilación oxidativa. El proceso se ajusta al modelo quimiosmótico, que implica el transporte de electrones ( $e^-$ ) y el bombeo de protones o hidrogeniones ( $H^+$ ) al espacio intermembrana por los complejos proteicos de la cadena respiratoria, ubicados en las crestas mitocondriales. Así como la fosforilación del ADP por la ATP sintasa, acoplada al retorno de los protones a la matriz. Este es el proceso por el cual los organismos aerobios producen energía en forma de ATP (Cox et al., 2019). El modelo quimiosmótico propone que el gradiente de concentración de protones y de cargas ( $\Delta pH$  y

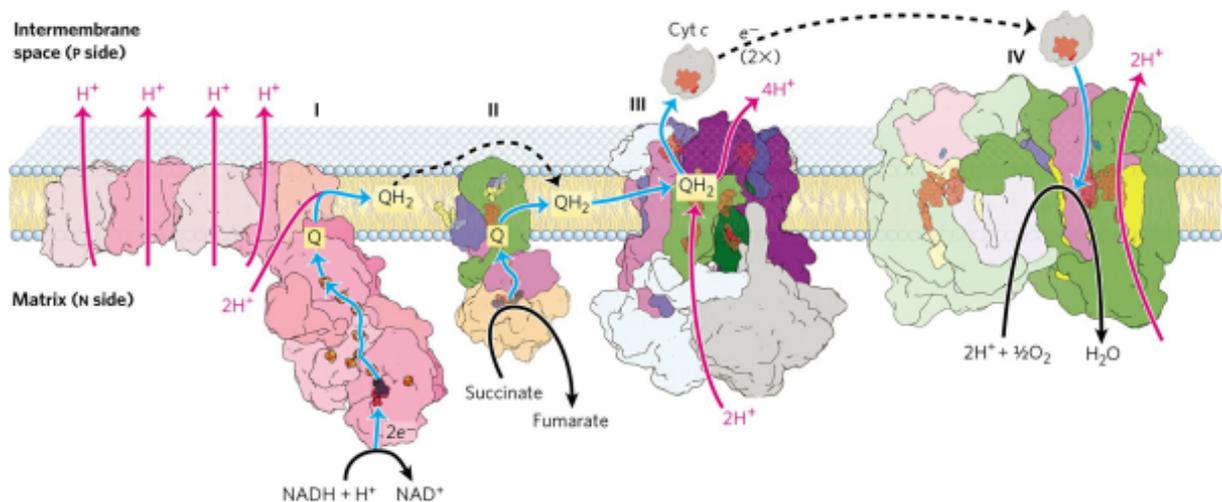
$\Delta\psi$ ) genera una diferencia de potencial electroquímico en el espacio intermembrana que da lugar a la fuerza próton-motriz mediante la cual la ATP sintasa realiza la síntesis de ATP. Los electrones transferidos a través de los complejos proteicos mitocondriales tienen como aceptor final el oxígeno ( $O_2$ ). Dada la afinidad del  $O_2$  por los electrones estas reacciones son altamente exergónicas y la energía liberada es utilizada para la síntesis de ATP (Cox et al., 2019).



**Fig 1. Anatomía y bioquímica de la mitocondria.** Extraído de Cox et al. (2019). Lehninger: Principios de Bioquímica (7ma. ed.). Barcelona: Omega. Pp. 1895.

Dentro de las estructuras involucradas en la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en eucariotas hay cinco complejos de proteínas (Figura 2 y Tabla 1) (Cox et al. 2019). También participan de este proceso cofactores que actúan como

transportadores de electrones dentro de los que se encuentran las coenzimas de oxidorreducción como el dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NAD}^+$ ), el mononucleótido de flavina (FMN) y el dinucleótido de flavina y adenina (FAD). Además de estos factores también participan otros tres tipos de moléculas transportadoras de electrones que son la ubiquinona o coenzima Q ( $\text{CoQ}_{10}$ ), los citocromos (a,  $a_3$ , b, c y  $c_1$ ) y las proteínas hierro-azufre (Fe-S). Los citocromos y las proteínas hierro-azufre tienen en común la presencia de hierro en su estructura.



**Fig 2. Transporte de electrones acoplado al bombeo de protones por los complejos de la cadena respiratoria.** Extraído de Cox et al. (2019). Lehninger: Principios de Bioquímica (7ma. ed.). Barcelona: Omega. Pp. 1927.

**Tabla 1. Complejos de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa.**

Complejo	Función
Complejo I: NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa	Catalizar la transferencia de $e^-$ de NADH a la ubiquinona.
Complejo II: Succinato- deshidrogenasa	Catalizar la transferencia de $e^-$ del succinato a la ubiquinona.
Complejo III: Citocromo c oxidoreductasa	Catalizar la transferencia de $e^-$ de la ubiquinona al citocromo c.

Complejo IV: Citocromo c oxidasa	Catalizar la transferencia de e <sup>-</sup> del citocromo c al O <sub>2</sub> , que actúa como aceptor final de e <sup>-</sup> .
Complejo V: ATP sintasa	Catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi.

## 2.2. Genoma mitocondrial y enfermedades mitocondriales

Las mitocondrias poseen su propio genoma, una molécula circular de 16.569 pares de bases (pb) que tiene la particularidad de heredarse exclusivamente por vía materna (Figura 3). Si bien algunos reportes señalan casos en los que la herencia mitocondrial es biparental (Luo et al., 2018), durante la fecundación las mitocondrias sufren un proceso de degradación en los espermatozoides por lo cual la información genética de las mitocondrias paternas no forma parte del óvulo fecundado<sup>1</sup>.

Además, las moléculas de ADN mitocondrial (ADNmt) no sufren recombinación, como en el caso de los pares homólogos en el núcleo, de modo tal que los eventos mutacionales constituyen la única manera de que la genética del ADNmt se diversifique. Esto determina que la transmisión del ADNmt desde la línea germinal materna se puede dar en igual proporción a los hijos e hijas, pero solamente la madre puede transmitir la información del ADNmt a su descendencia (Skorecki y Behar, 2019).

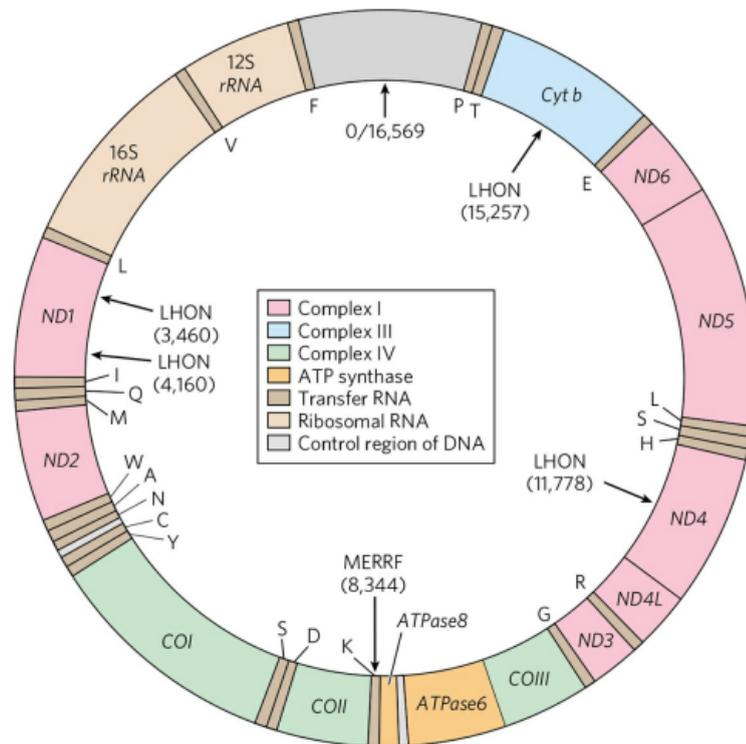
La mayoría de las proteínas de las mitocondrias procede de genes nucleares. Se han descrito aproximadamente 1300 genes responsables de sintetizar proteínas que son dirigidas desde el citosol a las mitocondrias. El genoma mitocondrial se encarga de codificar 37 genes de los cuales 13 se corresponden a proteínas de la cadena respiratoria y los restantes se corresponden a genes que codifican ARN ribosomal (2 genes) y ARN de transferencia (22 genes) de la maquinaria de síntesis proteica mitocondrial (Suomalainen y Battersby, 2017).

Las enfermedades mitocondriales son uno de los problemas metabólicos hereditarios más comunes. Dichas enfermedades, causadas por defectos en el funcionamiento de las mitocondrias que afectan la síntesis de ATP tienen una amplia variabilidad de fenotipos

---

<sup>1</sup> Durante el proceso de fecundación, las mitocondrias del espermatozoide son utilizadas para la producción de la energía que permite el movimiento del espermatozoide. En dicho proceso ocurre la degradación del mtDNA aportado por el espermatozoide mediante un proceso complejo que involucra el sistema proteasoma ubiquitina. (Sutovsky et al., 1999).

clínicos, que incluyen manifestaciones en diversos tejidos así como también la aparición de signos patológicos en distintas edades (Suomalainen y Battersby, 2017).



**Fig 3. Estructura del ADNmt.** El círculo exterior corresponde a la cadena H y el interior a la cadena L. Se detallan los genes mitocondriales y su ubicación dentro de la estructura del ADNmt. Extraído de de Cox et al. (2019). Lehninger: Principios de Bioquímica (7ma. ed.). Barcelona: Omega. Pp. 1985.

Las variantes tanto en genes nucleares como mitocondriales pueden conducir a fallas en la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (Suomalainen y Battersby, 2017). Estas rutas metabólicas están involucradas en la síntesis del ATP, que se utiliza como molécula proveedora de energía para los procesos celulares. Dentro de los principales mecanismos genéticos causantes de las enfermedades mitocondriales se encuentran los errores en la expresión de genes mitocondriales que afectan la replicación y transcripción del ADNmt y la traducción del ARNm. La herencia de alteraciones genéticas causantes de defectos mitocondriales puede darse en forma autosómica, esporádica, materna, ligada al X, así como también por mutaciones *de novo*. Estas mutaciones pueden conducir a defectos en todas las células del embrión o pueden ser tejido específicas (Suomalainen y Battersby, 2017).

Se ha señalado que el origen mitocondrial o nuclear de las mutaciones que causan enfermedades mitocondriales tiene influencia en el desarrollo del fenotipo del paciente, y también en la edad de aparición de signos asociados a la deficiencia (Swalwell et al., 2011).

El fenotipo clínico puede manifestarse en distintos grados y en distintos tejidos del cuerpo y en gran parte depende del nivel de heteroplasmia del organismo (Ng y Turnbull, 2016).

La existencia de diferentes genomas mitocondriales tanto a nivel celular como a nivel de tejidos de un organismo se denomina heteroplasmia. La presencia de distintas poblaciones de ADNmt en un mismo organismo está en estrecha relación con dos mecanismos: la replicación relajada y la segregación vegetativa del ADNmt (Stewart y Chinnery, 2020).

Por un lado la replicación relajada implica una expansión clonal del genoma de las mitocondrias por medio de una replicación no selectiva, en la que los porcentajes de moléculas de ADNmt mutadas en las células están sujetos a deriva génica. De igual modo las frecuencias alélicas están sujetas a la segregación vegetativa, por lo cual la distribución de las distintas copias de ADNmt entre las células hijas durante la división celular puede generar diferentes niveles de heteroplasmia, tanto entre células de tejidos distintos como entre células de un mismo tejido. A esto además se suma la hipótesis de que en la transmisión del ADNmt ocurre un cuello de botella, responsable de producir una reducción significativa del contenido heredado, que puede conducir a la fijación o pérdida de un nuevo alelo. Estos mecanismos, junto con la aparición de mutaciones *de novo* a nivel germinal o somático, serían posibles explicaciones para la heteroplasmia en el ADNmt observada en las poblaciones humanas (Stewart y Chinnery, 2021).

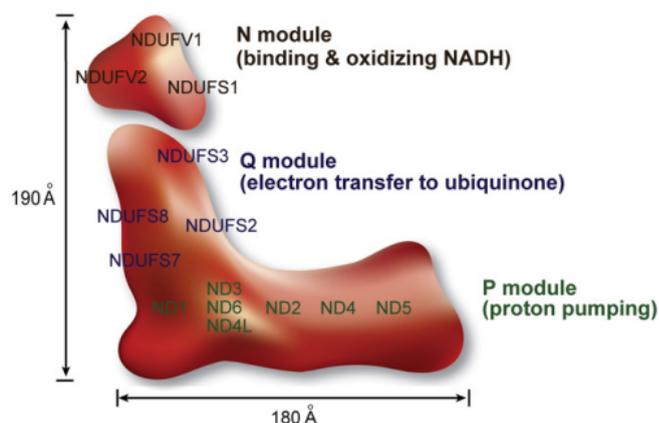
No obstante para que la heteroplasmia genere efectos patogénicos se debe superar un umbral en el que el porcentaje de moléculas afectadas es determinante para que se desarrollen los fenotipos de enfermedad. En tal sentido cuando los niveles de heteroplasmia son altos (~80%) la cadena respiratoria se ve afectada y las fallas en la producción de energía generan la aparición de signos de enfermedades mitocondriales (Stewart y Chinnery, 2021).

### 2.3 Complejo I y enfermedades mitocondriales

El Complejo I o NADH deshidrogenasa es el primer paso en la cadena de transporte de electrones. Está formado por 45 subunidades de las cuales 38 son codificadas por genes nucleares y 7 por genes del ADNmt. Es una estructura en forma de L compuesta por un brazo

que se ubica en la matriz y un brazo que se ubica en la membrana. Este complejo es responsable de catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la  $\text{CoQ}_{10}$  a través de una serie de transportadores de electrones entre los que se incluye la FMN y los centros Fe-S (Fig. 2). Hay siete genes del ADNmt (*MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6*) que codifican subunidades del Complejo I y se distribuyen a lo largo de este.

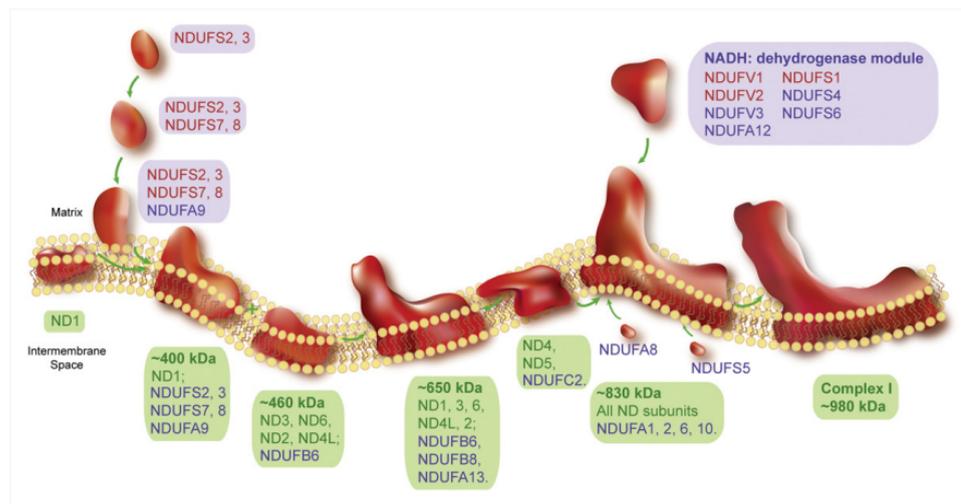
Estructuralmente el Complejo I cuenta con tres módulos funcionales conservados (Figura 4). Estos módulos son el módulo N (NADH deshidrogenasa), el módulo P (translocador de protones) y el módulo Q (transferencia de electrones a la ubiquinona).



**Fig 4. Estructura del Complejo I con los tres módulos funcionales y las subunidades codificadas por el ADNmt y ADNn.** Extraído de Mimaki et. al., (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(6), 851–862.

La subunidad ND1 es codificada por el gen mitocondrial *MT-ND1*. Dicho gen se ubica en una región de 955 pb rica en Guanina (G) de la cadena H del ADNmt (3307-4262) (Anderson et al., 1981; Wallace et al., 1994). Esta subunidad se relaciona con el fragmento hidrofóbico del Complejo I y con los centros Fe-S que se ubican en ese fragmento y que actúan como donantes de electrones a la  $\text{CoQ}_{10}$ . Dentro de los modelos del proceso de ensamblaje del complejo I se ha propuesto que existen cinco puntos de entrada de las subunidades codificadas por el ADNmt para el ensamblaje de dicha estructura (Figura 5). Utilizando fibroblastos de ratón se puede determinar que ND1 sería la primera subunidad

codificada por el ADNmt en incorporarse al complejo en el proceso de ensamblaje (Perales Clemente et al., 2010 en Mikami et al., 2012). Se propuso que la subunidad ND1 forma un complejo intermediario de ~400 kDa con factores nucleares. A este primer fragmento se van incorporando sucesivamente distintas subunidades codificadas por genes mitocondriales y nucleares que componen distintos módulos del Complejo I, resultando como producto final una proteína de ~980 kDa (Mimaki et al., 2012).



**Fig 5. Modelo de ensamblaje del Complejo I humano de la cadena respiratoria mitocondrial.** Extraído de Mimaki et al., (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(6), 851–862.

Las deficiencias en la actividad del Complejo I pueden ser tejido-específicas, y el individuo puede presentar por ejemplo una actividad normal en músculo esquelético y un déficit en hígado o corazón (Swalwell et al., 2011). Las manifestaciones clínicas de defectos en el Complejo I pueden incluir acidosis láctica, cardiomiopatía, encefalopatía, miopatía, tubulopatía y hepatopatía. El inicio de la manifestación de los signos asociados a las deficiencias en el Complejo I suele presentarse tempranamente y puede afectar de forma significativa el pronóstico y la calidad de vida del paciente (Ng y Turnbull, 2016).

#### 2.4 Caso clínico abordado

La variante m.3447 A>C del gen *MT-ND1* estudiada en este trabajo fue identificada mediante secuenciación del ADNmt en células de sangre de un paciente con fenotipo

consistente con una enfermedad mitocondrial. Esta mutación presentaba baja heteroplasmia en sangre (0.132) y fue catalogada como variante de significado incierto (VUS, del inglés *variant of uncertain significance*), con baja frecuencia poblacional, sin reportes asociados a su estudio. Considerando la relevancia de la subunidad ND1 (codificada por *MT-ND1*) en el proceso de ensamblaje del Complejo I y los datos clínicos de paciente, se analizó el impacto que podría tener la variante m.3447 A>C en la estructura y estabilidad del Complejo I. Además se trabajó en la generación de herramientas para evaluar si la variante podría afectar la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial del paciente. El paciente presentaba compromiso muscular y niveles elevados del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), que es secretado por células musculares con mutaciones en el ADNmt que afectan la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa. Por lo tanto se trabajó en la puesta a punto de medidas de función mitocondrial en músculo (Soumalainen y Battersby, 2018).

### **3. Objetivos**

#### 3.1 Objetivo General

Utilizar herramientas computacionales y bioquímicas para entender el impacto de la mutación m.3447 A>C en el gen *MT-ND1*, en la función de la proteína ND1 y el posible vínculo con el fenotipo del paciente.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 1) Utilizar las herramientas bioinformáticas para analizar el efecto de la mutación m.3447 A>C sobre la estructura de ND1.
- 2) Llevar a cabo estudios de velocidad de consumo de oxígeno para evaluar la función mitocondrial en biopsias de músculo.

### **4. Materiales y métodos**

#### 4.1 Herramientas bioinformáticas

MitoMap es una base de datos que recopila polimorfismos y mutaciones identificadas en el ADNmt. El buscador de alelos específicos de la base de datos permite analizar mutaciones identificadas en una posición puntual.

HHpred y HHmer son softwares que forman parte del paquete HH-suite. Los diferentes programas de este paquete de software permiten realizar la búsqueda de homólogos utilizando secuencias o alineamientos múltiples de secuencias (MSA, del inglés *multiple sequence alignment*). Tanto HHmer como HHpred utilizan para el análisis de secuencias modelos probabilísticos de Markov (Eddy, 2011). Hhpred permite además de la búsqueda de homólogos remotos realizar una predicción de la estructura asociada a esa secuencia. Los resultados entregan valores de *e value* que indican el nivel de homología de la secuencia analizada (*query*) con las demás secuencias identificadas como homólogas, siendo mayor la homología a menor valor de *e value*. Para la visualización de los resultados obtenidos en la búsqueda de homólogos se realizó un MSA. El MSA fue restringido a mamíferos y a secuencias con un número de residuos  $\geq 300$ . Con el MSA se calculó un árbol filogenético utilizando el software IQ-TREE2 (Minh et al., 2020) y una representación gráfica de la frecuencia de los aminoácidos en las columnas del MSA utilizando WebLogo (Crooks et al., 2004).

La base de datos Protein Data Bank es una base de datos que permite la visualización de estructuras 3D de proteínas, complejos proteicos y ácidos nucleicos. La base de datos cuenta con estructuras obtenidas mediante análisis experimental y análisis *in silico*. El repositorio permite filtrar las distintas estructuras ajustando según los parámetros de interés, tales como taxonomía, método experimental y resolución. Además cuenta con un visualizador 3D que permite analizar en detalle la estructura, composición e interacciones de las distintas estructuras. La búsqueda se limitó al análisis de estructuras de Complejo I de humanos obtenidas mediante métodos experimentales y cuyo nivel de resolución fuera alto considerando para ello la técnica con la que se obtuvo. La estructura de Complejo I elegida para el análisis fue la de código de acceso PDB 5 XTD, obtenida mediante Criomicroscopía electrónica (Cryo EM del inglés *Cryogenic electron microscopy*) a una resolución de 3.7 Å. La obtención de estructuras mediante Cryo EM consiste en el estudio de muestras a temperatura criogénica mediante microscopía electrónica. Esta técnica permite estudiar proteínas y complejos de alto peso molecular, reduciendo el daño generado por la radiación y conservando la estructura y funcionalidad nativa.

#### 4.2 Diseño y análisis de estructuras proteicas *in silico*

AlphaFold (Jumper et al., 2021) es un sistema de inteligencia artificial que realiza la predicción de estructuras 3D de proteínas a partir de su secuencia. AlphaFold utiliza un método de aprendizaje profundo mediante el cual el algoritmo luego de ser entrenado con datos de secuencias y de proteínas disponibles en bases de datos es capaz de predecir las interacciones entre los distintos aminoácidos de las secuencias y predecir a partir de estos datos de probables estructuras 3D, asociando las estructuras a valores de nivel de confianza de la predicción.

#### 4.3 Estudio de la función mitocondrial

Para los experimentos con animales se utilizó el protocolo “Estudio de la función mitocondrial”, aprobado por la Comisión de Ética en el uso de Animales (CEUA) cuyo número de expediente es el N° 070151-000025-22, responsable Dra. Adriana Cassina.

#### 4.4 Reactivos y medios

Los reactivos utilizados para la evaluación de la función mitocondrial fueron: saponina, glutamato, malato, succinato, ADP, citocromo c, oligomicina, cianuro de carbonilo p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), rotenona, antimicina A, K<sup>+</sup>-MES, taurina, ditiotritol, MgCl<sub>2</sub>, ATP, fosfocreatina, imidazol, KOH, Ca-EGTA, EGTA, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MOPS, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HEPES, sacarosa, albúmina sérica bovina (BSA). Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Medio de relajación y preservación de biopsias (BIOPS): 50 mM K<sup>+</sup>-MES, 20 mM taurina, 0.5 mM ditiotritol, 6.56 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.77 mM ATP, 15 mM fosfocreatina, 20 mM imidazol pH 7.1 ajustado con 5 N KOH a 0° C, 10 mM buffer Ca-EGTA (2.77 mM CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 M K<sub>2</sub>EGTA) con 0.1 μM de calcio libre (Kuznetsov et. al., 2003).

Medio de respiración mitocondrial MIR05: 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 60 mM MOPS, 20 mM taurina, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 110 mM sacarosa, 1 g/L BSA, pH 7.1 (Pesta y Gnaiger, 2012).

#### 4.5 Obtención del tejido

Se utilizaron muestras de músculo gastrocnemio de ratón. El número de animales utilizados fue 8. Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital intraperitoneal 40 mg/kg, en dosis única (aguja 27G), luego sacrificados con la dislocación cervical como método de eutanasia. Posteriormente se realizó una incisión a nivel de los miembros inferiores, y luego se extrajo la muestra del tejido y se cortó en trozos pequeños entre 5-15 mg de peso húmedo. Durante todo el procedimiento se mantuvo embebido el tejido en el medio de preservación de biopsias (BIOPS).

#### 4.6 Permeabilización de las biopsias de músculo

Las muestras se incubaron durante 10 minutos en soluciones de saponina 50 µg/ml, 500 µg/ml o 5 mg/ml, preparadas en medio BIOPS. Luego de la permeabilización las muestras fueron lavadas en medio de respiración mitocondrial MIR05.

Los valores finales de concentración de saponina utilizados fueron seleccionados tomando como referencia experimentos reportados previamente (Pesta y Gnaiger 2012) (Cardinale et al., 2018).

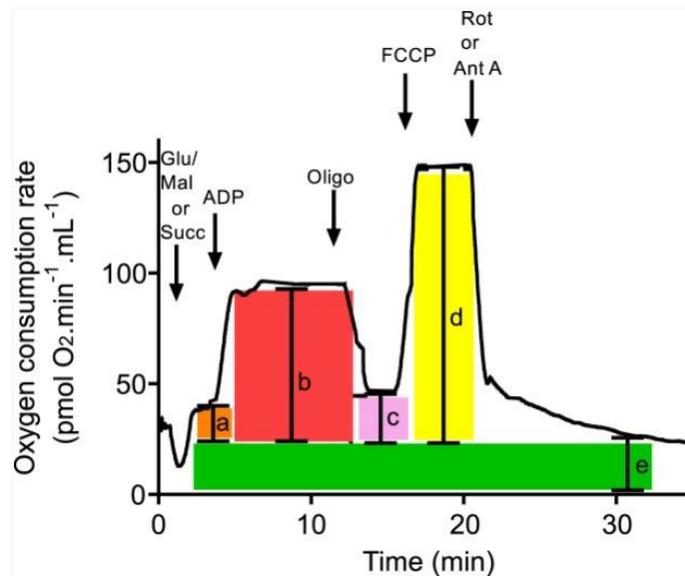
#### 4.7 Ensayos de oximetría

Para el estudio de la función mitocondrial en biopsias permeabilizadas, se midió la respiración (consumo de oxígeno) en un respirómetro de alta resolución OROBOROS Oxygraph-2 k a 37 °C. Los electrodos se calibraron en medio de respiración MIR05 modificado, con una concentración calculada de oxígeno saturado de 191 µM. La velocidad de consumo de oxígeno y su pendiente se midió con el software de análisis DatLab 4 (pmol O<sub>2</sub> s<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>). Se pesó el tejido (5 – 15 mg), y se colocó dentro de la cámara de Oroboros. Se comenzó a medir el consumo de O<sub>2</sub> sin sustratos ni inhibidores. Posteriormente se agregaron en forma secuencial los sustratos: 10 mM glutamato y 2 mM malato para la evaluación del complejo I y 10 mM de succinato para la evaluación del complejo II, y 5 mM de ADP. Se midió el consumo de oxígeno luego de inhibir la ATP sintasa con oligomicina (2 µg/ml), y luego se agregó FCCP, un desacoplante de la fosforilación oxidativa. Se realizó la titulación con FCCP agregando 0.05 µM- 0.5 µM (0.1 – 1 µl). Finalmente se agregó 0.5 µM de rotenona (inhibidor del complejo I) y 2.5 µM antimicina A (inhibidor del complejo III) (Pesta y Gnaiger, 2012).

Para comprobar que la permeabilización no afectó la integridad de la membrana se agregó citocromo c 10  $\mu\text{M}$  luego de la adición de ADP. El citocromo c es una proteína periférica de la membrana interna de la mitocondria. Cuando la membrana externa de la mitocondria está intacta el citocromo c permanece en el espacio intermembrana, pero si la membrana externa se rompe esta proteína puede salir del espacio intermembrana inhibiendo la respiración. En este caso, la adición de citocromo c exógeno estimula la respiración. Un aumento de la respiración de entre 5-15% es aceptable y no se considera que haya daño de la membrana (Kuznetsov et al., 2008).

#### 4.8 Parámetros e índices respiratorios.

De los registros de consumo de oxígeno se obtuvieron los parámetros respiratorios normalizados por el peso de las muestras y el volumen de las cámaras donde se realizó la evaluación de la respiración mitocondrial (2.2 ml). A esos valores se restó el consumo de oxígeno no mitocondrial (e), obtenido después de la inhibición de la cadena de transporte de electrones con antimicina A y rotenona (Figura 6).



**Figura. 6. Registro de consumo de oxígeno.** Se muestran los distintos valores de velocidad de consumo de oxígeno utilizados para el cálculo de los parámetros respiratorios mitocondriales: a) dependiente de sustratos, b) en presencia de ADP, c) resistente a oligomicina, que inhibe la ATP sintasa, d) en presencia del desacoplante FCCP, que disipa el gradiente de protones, e) resistente a inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial. Extraído de García-Roche et al., (2018). Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. *Redox biology*, 17, 207–212.

Los parámetros se obtuvieron de la siguiente manera:

(a) Respiración en estado 4, en presencia de sustratos específicos del complejo I y II:

$$\text{Estado 4} = \text{Velocidad (a)} \cdot V / \text{Peso de la muestra}$$

(b) Respiración en estado 3, en presencia de sustratos y ADP, similar a la respiración basal del tejido a concentraciones saturantes de sustratos y ADP:

$$\text{Estado 3} = \text{Velocidad (b)} \cdot V / \text{Peso de la muestra}$$

(c) Respiración resistente a la oligomicina, también conocida como respiración independiente de la formación de ATP, debida a la fuga de protones o al transporte de moléculas cargadas a través de la membrana mitocondrial interna, que disipa el gradiente:

$$\text{Respiración resistente a Oligomicina} = \text{Velocidad (c)} \cdot V / \text{peso de la muestra}$$

(d) Respiración máxima, obtenida después de la disipación del gradiente de protones por un desacoplante, depende de la cantidad y actividad de los complejos de transporte de electrones y de la cantidad de mitocondrias en el tejido.

$$\text{Respiración máxima} = \text{Velocidad (d)} \cdot V / \text{peso de la muestra}$$

(e) Tasa de consumo de oxígeno no mitocondrial, puede estar asociada a reacciones de oxidación mediadas por especies reactivas de oxígeno u oxidasas o a enzimas que catalizan reacciones que consumen O<sub>2</sub>:

$$\text{Tasa de consumo de oxígeno no mitocondrial} = \text{Velocidad (e)} \cdot V / \text{peso de la muestra}$$

La respiración sensible a la oligomicina se calculó como la diferencia entre la respiración del estado 3 y la respiración resistente a la oligomicina obtenida después de la

inhibición de la ATP sintasa, y representa el consumo de oxígeno o respiración dependiente de la síntesis de ATP.

*Respiración sensible a la Oligomicina = (Velocidad (b) – Velocidad (c)). V/ peso de la muestra*

Índice de control respiratorio (RCR). Una relación alta representa un fuerte acoplamiento entre la síntesis de ATP y el transporte de electrones:

$$\text{Índice de control respiratorio} = \text{Velocidad (b)} / \text{Velocidad (a)}$$

Se puede obtener información similar a la del RCR calculando la eficiencia del acoplamiento, que está dada por la relación entre la respiración en estado 3 y la respiración sensible a oligomicina, es decir dependiente de la síntesis de ATP.

$$\text{Eficiencia de acople} = \text{Velocidad (b) – Velocidad (c)} / \text{Velocidad (b)}$$

#### 4.9 Gráficos y análisis estadísticos

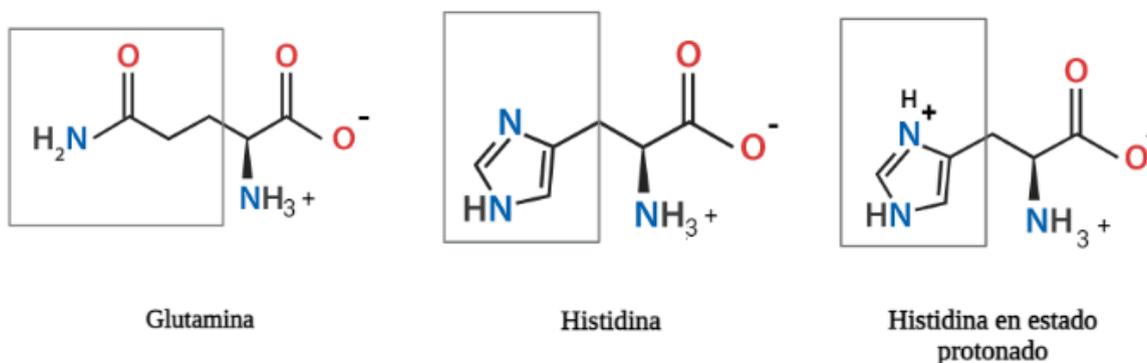
Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 9.0.0. Se identificaron *outliers* utilizando el método ROUT. Se descartaron los datos de uno de los animales evaluados que presentaba *outliers* en más de un parámetro. Se calculó el promedio y la desviación estándar ( $\pm$  SD). Los datos se analizaron mediante test t-Student de dos colas, no pareado. El valor de p utilizado para analizar la existencia de diferencias significativas entre condiciones fue  $< 0.05$ .

## **5. Resultados y discusión**

### 5.1. Análisis de polimorfismos de la secuencia del gen *MT-ND1*

En estado *wild type* el nucleótido en la posición 3447 del ADNmt, codifica a un residuo glutamina en la posición 47 (Gln47) de la proteína ND1. Para averiguar si existían

mutaciones reportadas en dicha posición se utilizó el buscador de mutaciones alelo-específicas de la base de datos MitoMap. La búsqueda en MitoMap reporta dos mutaciones en ese sitio. Una de las variantes es el cambio A>G, una sustitución sinónima, que por lo tanto no altera el aminoácido codificado manteniéndose un residuo de glutamina en esa posición. La otra variante reportada en la posición 3447 es el cambio A>C, coincidente con la mutación reportada en el paciente de estudio. Este cambio genético constituye una transversión en la que se da un cambio de una purina por una pirimidina. El polimorfismo A>C identificado en la posición 3447 del ADNmt implica un cambio en el marco de lectura (CAA>CAC) generando que la secuencia del gen *MT-ND1* codifique un residuo de histidina en la posición 47 (His47) de la proteína. Estos aminoácidos, glutamina e histidina, pertenecen a grupos distintos y difieren estructuralmente (Figura 7). La glutamina forma parte del grupo de aminoácidos polares sin carga mientras que la histidina forma parte del grupo de aminoácidos con carga positiva. La mutación reportada fue identificada dentro del haplogrupo K2a, con un valor de presencia poblacional bajo, con alta probabilidad de ser patogénica, > 0.67 según el valor de APOGEE<sup>2</sup>, y forma parte de una secuencia considerada como altamente conservada.



**Fig. 7. Estructura de los aminoácidos glutamina e histidina involucrados en la sustitución Gln47His de ND1.** El pKa del grupo imidazol que forma parte de la cadena lateral de la histidina es de aproximadamente 6.0. A pH fisiológico (pH=7.4), de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, aproximadamente solo un 3.4% del imidazol se encontrará protonado. Creado en BioRender.com.

<sup>2</sup> APOGEE es un índice de predicción de patogenicidad que combina predictores independientes y meta predictores estableciendo un score de patogenicidad que determina: >0.75 probablemente patogénico, >0.50-0.75 posiblemente patogénico, >0.25-0.50 neutral o posiblemente benigno, 0-0.25 neutral o probablemente benigno.

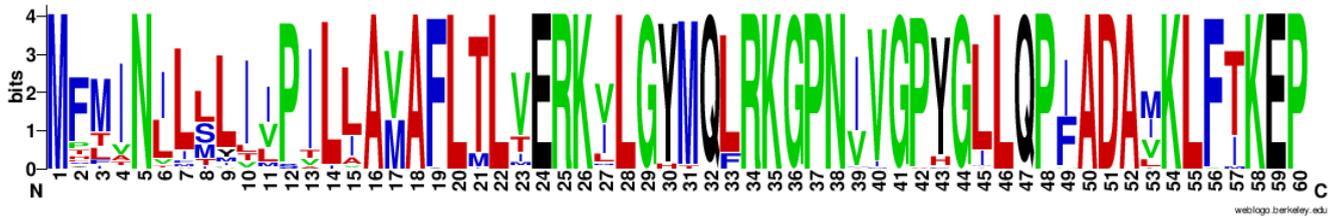
## 5.2. Análisis evolutivo de la secuencia de *MT-ND1*

Para confirmar el estado de conservación de la secuencia del gen *MT-ND1* se realizaron análisis evolutivos utilizando como punto de partida la secuencia de la proteína de interés.

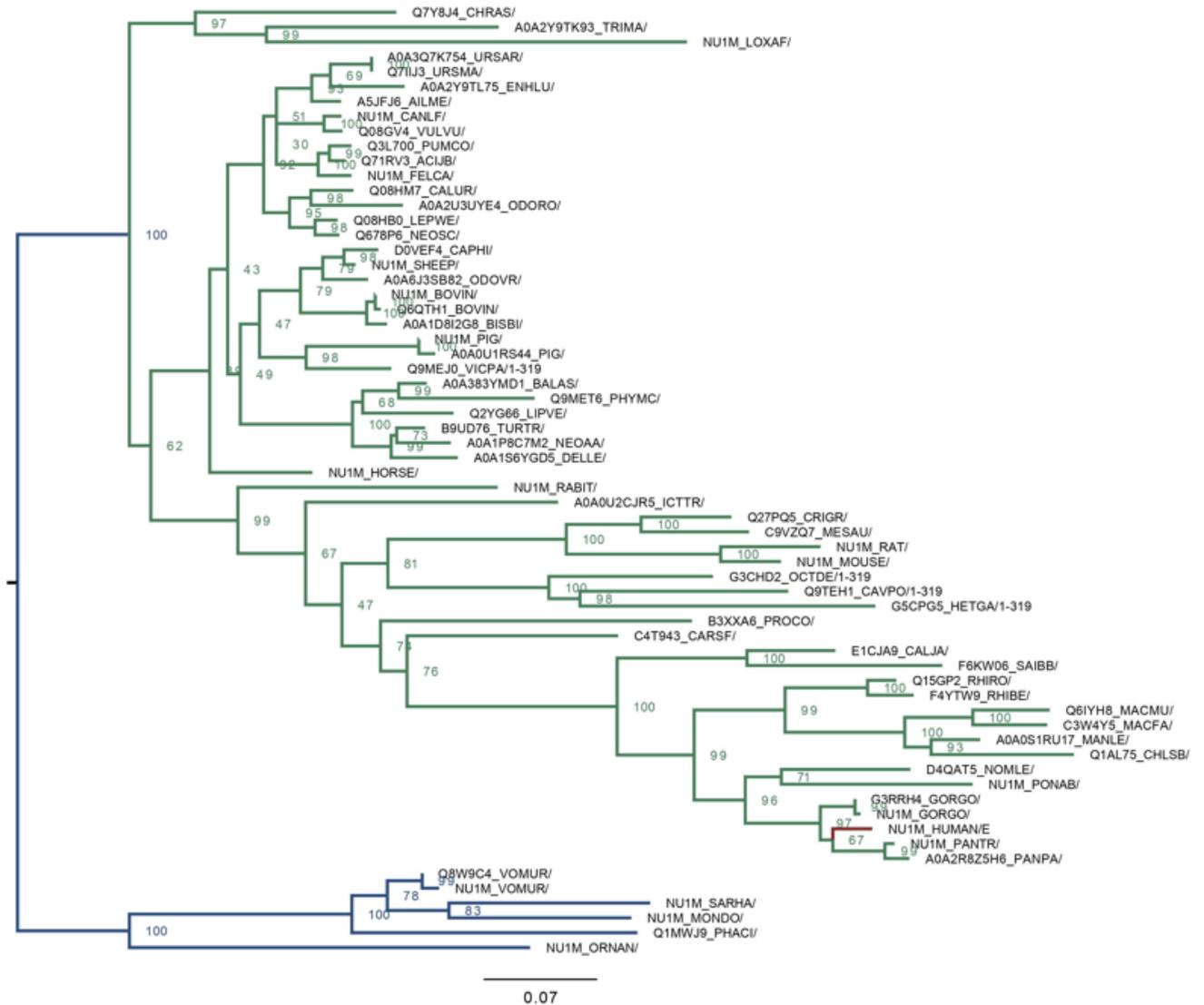
La búsqueda de secuencias homólogas con la secuencia de *MT-ND1* humana se realizó utilizando las herramientas HHmer y HHpred. Los resultados obtenidos en HHMER incluyen 8002 organismos cuyas secuencias presentan algún grado de homología con la secuencia de *MT-ND1* de humanos. Ordenando la información por *Phylum- Chordata-* y por reino- *Eukarya-* las secuencias que se filtran son las que presentan menor *e value* respecto a todos los resultados y por lo tanto mayor valor de similitud. Al aplicar esa selección, todos los organismos filtrados tienen como producto de su secuencia a la subunidad 1 del Complejo I de la cadena de transporte de electrones.

Los 8002 posibles homólogos pertenecen a eucariotas y bacterias y algunos a arquea, no obstante los *e-values* de estos últimos no se corresponden con valores altos de similitud entre organismos.

El análisis con HHpred permitió conocer las características de las estructuras de las secuencias identificadas como homólogas a las de *MT-ND1* humano. El software generó un MSA en el cual identificó 22 secuencias clasificadas como hits asociándose todas las secuencias a fragmentos de proteína transmembrana como resultado de la característica estructural esperada. De los 22 hits, 12 secuencias fueron clasificadas con una probabilidad de identidad = 100% para el fragmento de la secuencia con el que se tiene homología con *MT-ND1*. Los hits en los que hay mayor cantidad de residuos alineados con la secuencia (>290 para un total de 318 coincidencias posibles, dada la secuencia de la subunidad 1) pertenecen a distintos organismos entre los que se incluyen además de eucariotas, bacterias y plantas. De estos organismos, las secuencias homólogas de *Tetrahymena thermophila*, *Bos taurus* y *Yarrowia lipolytica* tienen como producto final de dicha secuencia a la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidoreductasa al igual que la secuencia de *MT-ND1* humana. En los demás casos los productos de las secuencias también corresponden a proteínas vinculadas a la cadena de transporte de electrones, pero pertenecen a otras subunidades. Para la representación de los datos evolutivos se generó un MSA restringido a mamíferos seleccionando secuencias que tuvieran un número de residuos mayor a 300. Con el MSA se creó una representación mediante WebLogo (Figura 8) y un árbol filogenético (Figura 9).



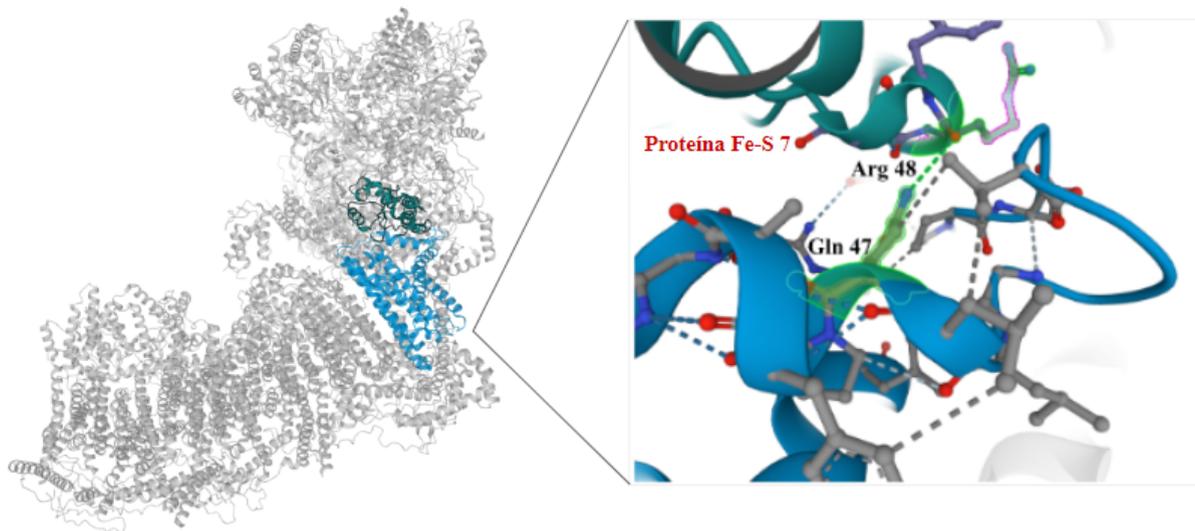
**Fig. 8. Weblogo.** Se representan los residuos 1-60 de las secuencias analizadas, el tamaño de las letras se corresponde con la frecuencia de la presencia del residuo dentro de las secuencias del MSA. Las posiciones ocupadas por un solo residuo se encuentran conservadas. Tanto la glutamina de la posición 47 como los residuos con las que establece interacciones (posiciones 44, 50 y 51) se encuentran conservados.



**Fig. 9. Árbol filogenético** computado en IQ-TREE2 utilizando el MSA generado. La secuencia correspondiente a humanos se indica en rojo. Las dos ramas observadas pertenecen a secuencias homólogas. En rojo se indica la secuencia de *MT-ND1* humano. La rama verde corresponde a placentados, la azul a marsupiales. Las referencias corresponden a los códigos de acceso Uniprot (UniProt Consortium, 2019).

### 5.3. Análisis de estructuras proteicas en contexto *wild type* y contexto mutante

Para analizar la estructura de la subunidad ND1 se utilizó como referencia una estructura de Complejo I de *Homo Sapiens* disponible en la base de datos Protein Data Bank (PDB) (código 5XTD), obtenida mediante CryoEM a una resolución de 3.70°A. Se analizaron aspectos de la estructura del Complejo I con el objetivo de identificar los sitios de interacción de la subunidad ND1 con otros componentes del Complejo I. Sobre los módulos P y Q se encuentran mayormente las proteínas que actúan como receptoras de electrones, incluidas subunidades de NADH deshidrogenasas y ubiquinona oxidoreductasa, flavin mononucleótidos y proteínas con centros Fe-S. La subunidad ND1 se ubica sobre el módulo P. En estado *wild type* el residuo de Gln47 forma a nivel intracatenario una interacción hidrofóbica con la valina 40 (Val40) y enlaces de hidrógeno con los residuos de alanina 50 (Ala50), ácido aspártico 51 (Asp51) y glicina 44 (Gli44). A nivel de interacciones con otras subunidades, la Gln47 establece enlaces de hidrógeno con el residuo de arginina 48 (Arg48) de la subunidad correspondiente a la proteína hierro-azufre 7 (Figura 10) (Tabla 2).



**Fig 10. Análisis de las interacciones de la subunidad 1.** A la izquierda se representa la interacción de la subunidad ND1 (celeste) con la proteína hierro-azufre 7 (verde) en el contexto del Complejo I. A la derecha se representa la interacción entre Arg48 y Gln47 en detalle (resaltado en verde).

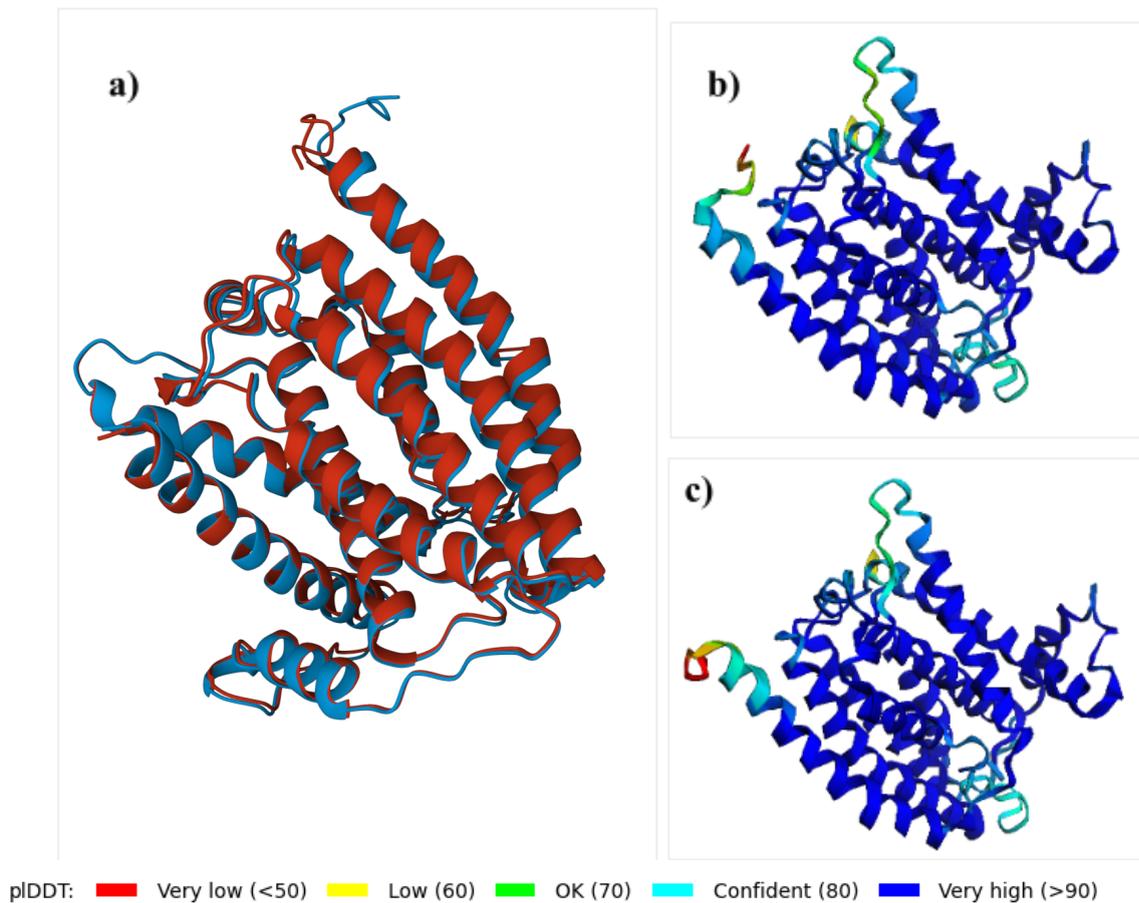
Los datos obtenidos mediante *software* de análisis evolutivo y de conservación de secuencias indican que la secuencia que da lugar a la subunidad ND1 de la NADH deshidrogenasa en humanos se ha conservado a lo largo de la evolución. La presencia de

homólogos bacterianos es esperable dado el origen endosimbiótico de la mitocondria. A su vez la conservación de la secuencia en organismos de distintos órdenes, géneros y especies puede ser indicativa de la importancia de que los residuos presentes en la secuencia ocupen sus correspondientes posiciones para un correcto funcionamiento en primera instancia de la subunidad ND1, así como también del Complejo I y de la cadena de transporte de electrones.

**Tabla 2. Interacciones que establece el residuo Gln47**

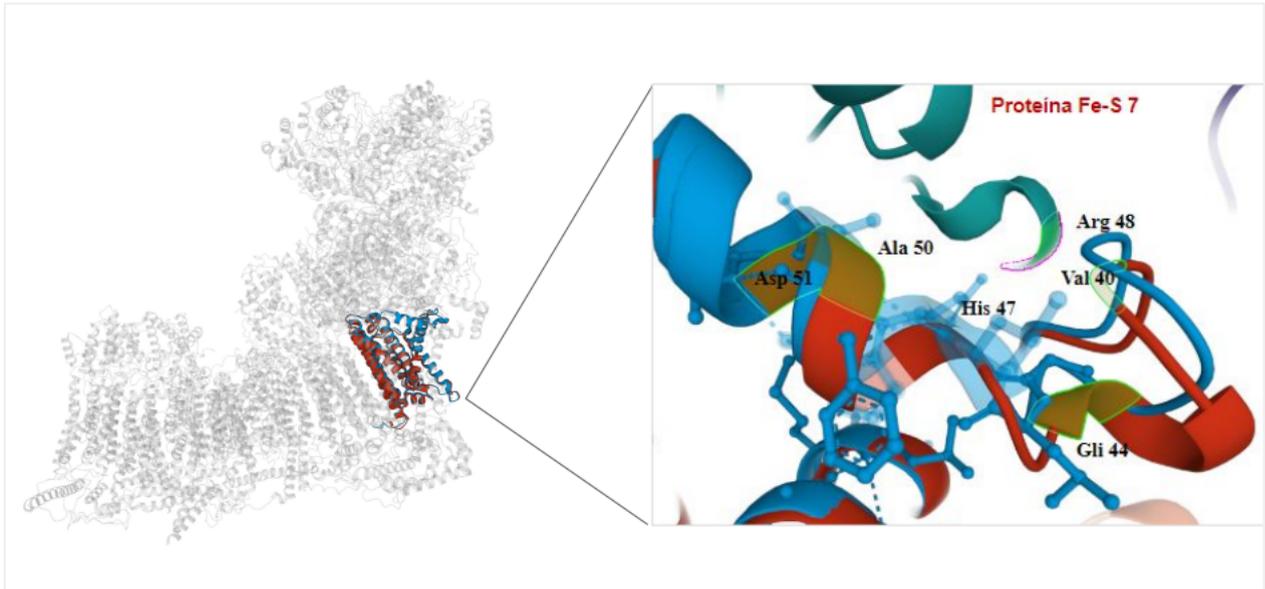
<b>Tipo de interacción</b>	<b>Residuos</b>	<b>Átomos que interactúan</b>
Enlace de hidrógeno	Gln47- Arg48 de proteína Fe-S 7	N (Gln47) - O (Arg48)
Enlace de hidrógeno	Gln47- Gli44 de subunidad 1	N (Gln47) - O (Gli44)
Enlace de hidrógeno	Gln47- Asp51 de subunidad 1	O (Gln47) - N (Asp51)
Enlace de hidrógeno	Gln47- Ala50 de subunidad 1	O (Gln47) - N (Ala50)
Hidrofóbica	Gln47- Val40 de subunidad 1	C (Gln47) - C (Val40)

Para observar los posibles efectos de la sustitución Gln47His se realizó la predicción de la estructura terciaria utilizando una secuencia *wild type* y una secuencia con el cambio Gln47His. Los modelos generados mediante AlphaFold tienen un alto índice de confianza de las predicciones realizadas. El análisis de la superposición de la estructura *wild type* y la mutante no muestra que hayan cambios a nivel de la estructura terciaria de la proteína mutante respecto a la *wild type*, logrando una superposición prácticamente completa (Figura 11). De igual modo, cuando se realiza en análisis comparativo de la ubicación de las dos cadenas modeladas- con la secuencia *wild type* y la secuencia mutante- ubicándolas en el lugar correspondiente a la subunidad ND1 dentro del Complejo I no se observa que se generen grandes alteraciones por la presencia de la estructura mutante y los cambios observados son coincidentes con las pequeñas diferencias observadas en la superposición de los modelos.



**Fig. 11. Predicción de la estructura terciaria de ND1 modelada mediante AlphaFold.** a) Se observa la superposición de las estructuras wild type (rojo) y mutante (celeste). b) Se observa la predicción de la estructura terciaria modelada con la secuencia *wild type*. c) Se observa la predicción de la estructura terciaria modelada con la secuencia mutante. El índice pLLDT es una estimación de la confianza por cada residuo modelado en una escala de 0 a 100.

Si bien no se observan grandes cambios a nivel de la estructura terciaria, cuando se analizan las interacciones en detalle se encuentran algunas diferencias entre la proteína *wild type* y la mutante. Con respecto a los residuos con los que interactúa la Gln47 *wild type*, ante la presencia de una histidina en esa posición se observa una disminución de la distancia que separa al residuo 47 de los residuos de Ala50 y Asp51 y un aumento de las distancia con Gli44 (Figura 12, Tabla 3).



**Fig 12. Superposiciones de estructuras de la subunidad 1 predichas por AlphaFold.** En el extremo izquierdo se observa la superposición de las estructuras de subunidad ND1 con secuencia *wild type* (celeste) y secuencia mutante (rojo) en su ubicación dentro del Complejo I. A la derecha se observa en detalle la región la sustitución Gln47His que genera ganancia y pérdida de interacciones.

A su vez la sustitución aminoacídica genera que se pierda la interacción por enlace de hidrógeno con Ala50 y la interacción hidrofóbica con Val40 al tiempo que se establece un enlace de hidrógeno débil con Asp51 (Fig. 12, Tabla 3). Por otra parte a nivel de las interacciones intercatenarias que establecía el residuo de la posición 47 en la secuencia *wild type*, cuando está presente el residuo de histidina se pierde el enlace de hidrógeno con la Arg48 que unía a la subunidad ND1 con la subunidad de la proteína Fe-S 7 (Figura 12, Tabla 3).

**Tabla 3. Impacto de la sustitución Gln47His en las interacciones de la subunidad ND1.**

Interacción	Tipo de interacción	Cambio
Gli44 de subunidad ND1	Enlace de hidrógeno	Aumenta la distancia
Asp51 de subunidad ND1	Enlace de hidrógeno	Disminuye la distancia

Ala50 de subunidad ND1	Enlace de hidrógeno	Se pierde interacción
Val40 de subunidad ND1	Interacción hidrofóbica	Se pierde interacción
Arg48 de proteína Fe-S 7	Enlace de hidrógeno	Se pierde interacción
Asp51 de subunidad ND1	Enlace de hidrógeno débil	Se gana interacción

#### 5.4. Puesta a punto del estudio de la respiración mitocondrial en biopsia de músculo esquelético permeabilizado.

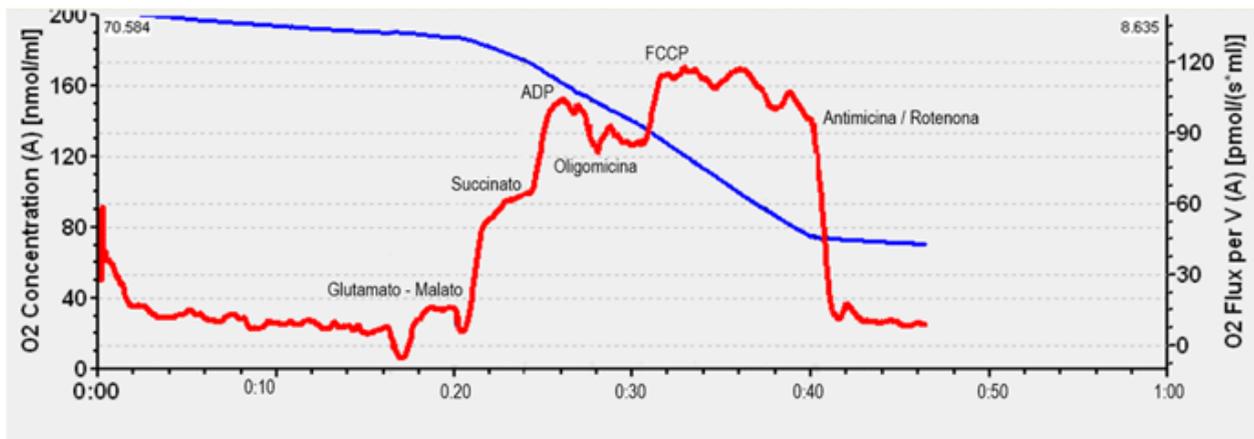
Los estudios bioinformáticos realizados sugirieron que la mutación encontrada en el paciente podría afectar las interacciones que estabilizan la estructura tridimensional de la subunidad ND1 así como las interacciones con otra subunidad del complejo I. Esto podría afectar la estabilidad y ensamblaje del complejo I, repercutiendo negativamente en la actividad del complejo y de la cadena respiratoria mitocondrial. Por esto, se trabajó en la puesta a punto de un método para medir esta vía en tejido muscular.

Se utilizaron muestras obtenidas de ratón, para familiarizarse con la técnica. Se obtuvieron biopsias del músculo gastrocnemio de ratones machos y hembras. Las biopsias fueron permeabilizadas con distintas concentraciones del detergente saponina para permitir el acceso de los sustratos de los complejos I y II de la cadena respiratoria, y del ADP, sustrato de la ATP sintasa. El paso de permeabilización es crítico ya que el detergente debe permeabilizar la membrana plasmática de las células sin afectar la membrana mitocondrial. Luego del tratamiento con saponina se transfirieron al oxímetro.

Para analizar la función mitocondrial medimos la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial en las biopsias de músculo esquelético incubadas con las dos concentraciones de saponina (0.050 mg/ml y 5 mg/mL). La Figura 13 ilustra el curso temporal de un experimento de medida de consumo de oxígeno mitocondrial para una muestra permeabilizada con 5 mg/ml de saponina. Como se observa en la figura luego del agregado de sustratos de los complejos I (glutamato y malato) y II (succinato) de la cadena respiratoria hay un aumento en

la velocidad de consumo de oxígeno. El agregado de ADP, sustrato de la ATP sintasa promueve la síntesis de ATP y la entrada de protones a la matriz, conduciendo a un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno. La posterior adición de oligomicina, que actúa como inhibidor de la ATP sintasa, genera una disminución en el consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno remanente está asociado a la fuga de protones. El agregado de FCCP, (un desacoplante) transporta protones a la matriz mitocondrial, disipando el gradiente de protones, y esto está asociado a un aumento en el consumo de oxígeno. El agregado de FCCP se realiza hasta alcanzar una concentración para la cual ya no se observa incremento en el consumo de oxígeno. El experimento concluye con el agregado de rotenona, que actúa como inhibidor del Complejo I y de antimicina A que actúa como inhibidor del Complejo III, generando una disminución del consumo de oxígeno dado que se interrumpen la transferencia de electrones hasta el Complejo IV. El consumo de oxígeno que se mantiene está asociado a reacciones independientes de la cadena respiratoria.

Las medidas de velocidad de consumo de oxígeno obtenidas en el experimento permiten obtener parámetros e índices respiratorios para evaluar el funcionamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa mitocondrial.



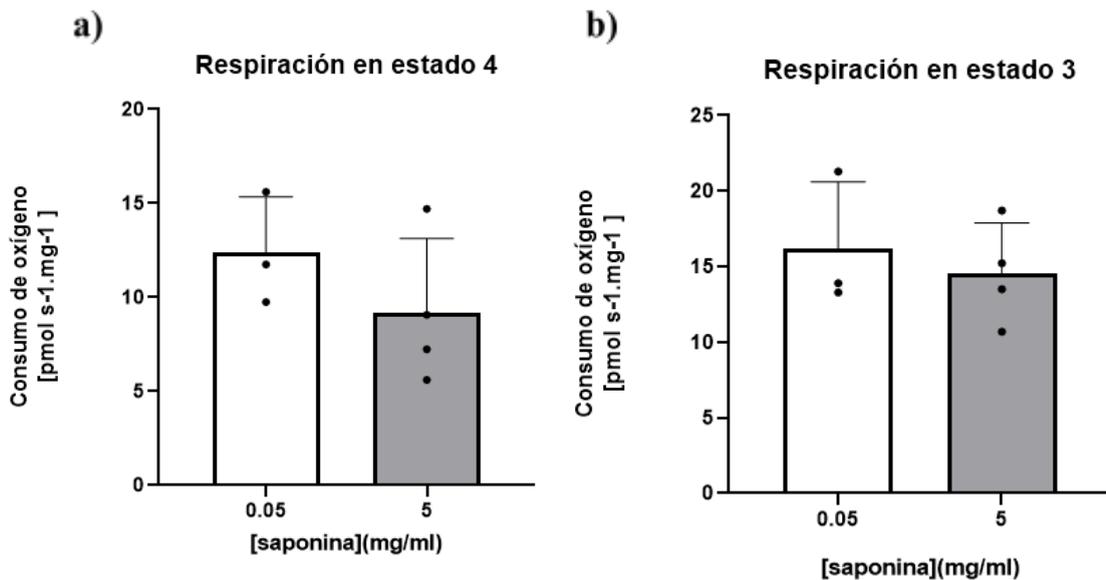
**Fig. 13. Análisis del consumo de oxígeno mitocondrial en una biopsia de músculo de ratón.**

Se midió la concentración de oxígeno (azul) y la velocidad de consumo de oxígeno (rojo) en una biopsia de músculo permeabilizada con 5 mg/ml de saponina tras el agregado de glutamato (10 mM), malato (2 mM), succinato (10 mM), ADP (5 mM), oligomicina (2 µg/ml), FCCP (0.05 µM- 0.5 µM) , rotenona (0.5 µM) y antimicina A (2.5 µM).

En las condiciones ensayadas, utilizando saponina 0.05 mg/ml y 5 mg/ml, se obtuvieron valores de respiración de estado 4 similares ( $12 \pm 3$  y  $12 \pm 8$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectivamente). En estado 3 tampoco se observó una diferencia significativa entre la condición con 5 mg/ml respecto a la de 0.05 mg/ml de saponina ( $14 \pm 3$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y  $16 \pm 4$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 14).

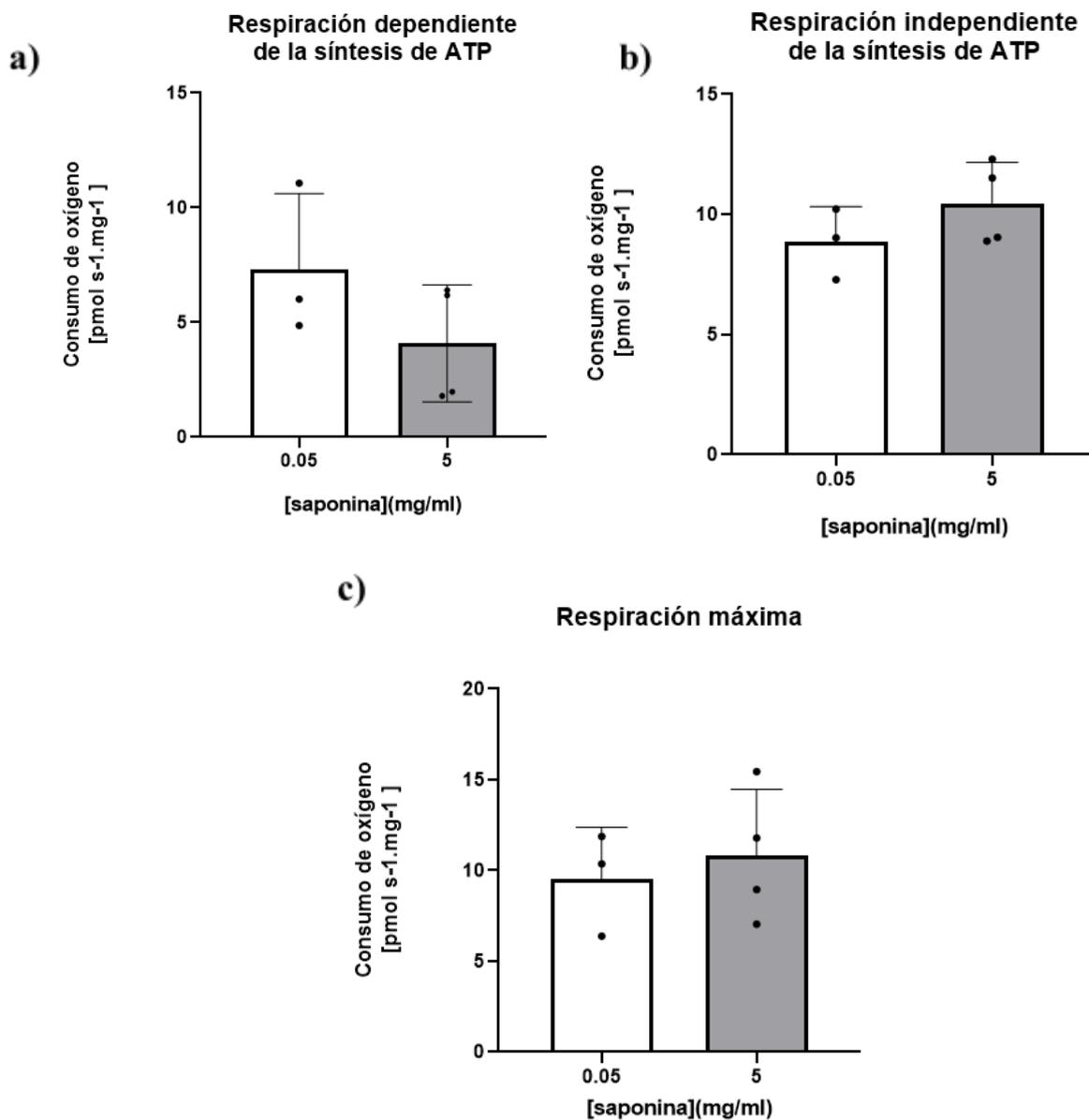
En los valores de respiración independiente de ATP tampoco se observan cambios significativos entre las muestras tratadas con 5 mg/ml ( $10 \pm 1$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) respecto a las tratadas con 0.05 mg/ml de saponina ( $8 \pm 1$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Lo mismo ocurrió con la respiración máxima, donde la permeabilización con 5 mg/ml tuvo un efecto similar a la realizada con 0.05 mg/ml del detergente ( $10 \pm 3$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y  $9 \pm 2$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectivamente); al igual que la respiración dependiente de la síntesis de ATP ( $4 \pm 2$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y  $7 \pm 3$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 15).

Tampoco se observaron cambios en los índices respiratorios entre tratamientos. El promedio de RCR fue  $1 \pm 0.1$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para 0.05 mg/ml y  $1 \pm 0.2$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para 5 mg/ml. La eficiencia de acople fue de  $0.44 \pm 0.08$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y  $0.26 \pm 0.11$   $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para las concentraciones de 0.05 mg/ml y 5 mg/ml respectivamente (Figura 16).

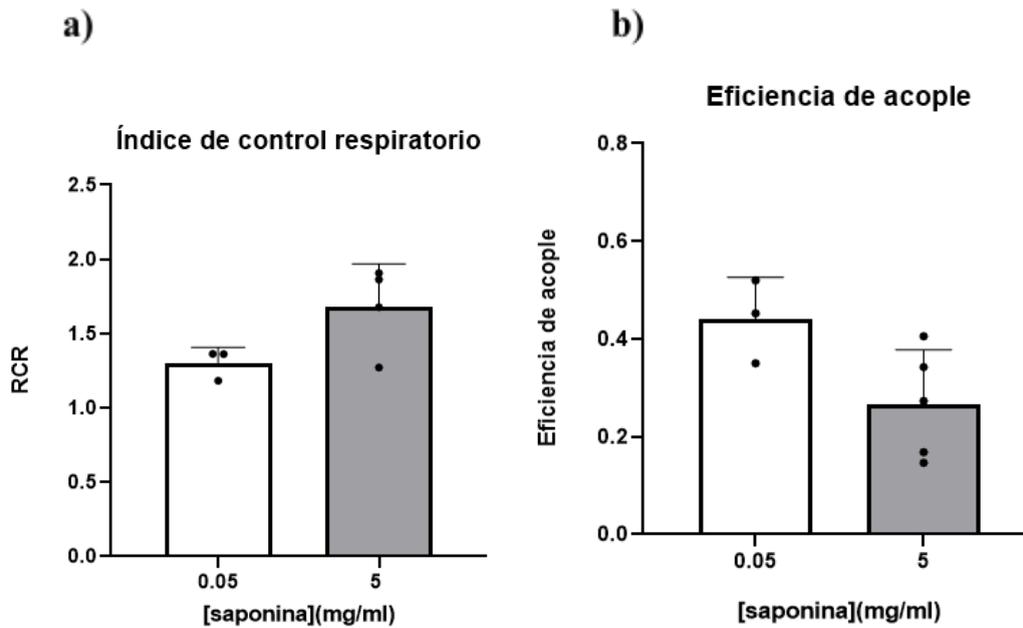


**Fig 14. Parámetros respiratorios obtenidos de la evaluación de función mitocondrial en los estados 3 y 4.** Se realizaron ensayos de consumo de oxígeno como se describe en la Fig. 13. a) Se muestra la velocidad de consumo de oxígeno en estado 4 obtenido luego del agregado glutamato (10 mM), malato (2 mM), y succinato (10 mM), para las dos concentraciones de saponina utilizadas. b) Se muestra la respiración en

estado 3 luego del agregado de ADP (5 mM). En ambos casos se muestra el promedio y el desvío estándar (SD) (n= 3-5). Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó un test t-Student con un p-valor <0.05.



**Fig. 15. Parámetros respiratorios obtenidos luego del agregado de un desacoplante e inhibidores de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.** Se realizaron ensayos de consumo de oxígeno como se describe en la Fig. 13. a y b) Se muestran los parámetros respiratorios correspondientes a la respiración independiente de la síntesis de ATP , y dependiente de la síntesis de ATP , obtenidas luego del agregado de oligomicina. c) Se muestra la respiración máxima obtenida luego de la titulación con FCCP. En todos los casos se muestra el promedio y el desvío estándar (SD) (n= 3-5). Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó un test t-Student con un p-valor <0.05



**Fig. 16. Índices respiratorios.** Se realizaron ensayos de consumo de oxígeno como se describe en la Fig. 13. Se determinaron los índices respiratorios como se indica a) El índice de control respiratorio (RCR) se determinó como la relación entre la respiración en estado 3 y el estado 4. b) La eficiencia de acople se calculó como estado 3 - respiración resistente a oligomicina / estado 3. En todos los casos se muestra el promedio y el desvío estándar (SD) para n= 3-5. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó un test t-Student con un p-valor <0.05

Para evaluar la integridad de la membrana mitocondrial externa se realizó el agregado de citocromo c y se evaluó la variación en el consumo de oxígeno respecto al estado 3. Los valores obtenidos fueron una disminución de 14% en la respiración de la muestra tratadas con una concentración de 0.05 mg/ml y un aumento de 4-7% para las muestras permeabilizadas con 5 mg/ml de saponina. Un incremento de entre 5- 15% en el nivel de consumo de oxígeno está dentro de los valores aceptados para que se considere que no hay daño de la membrana (Kuznetsov et al., 2008).

El análisis en conjunto de todos los datos obtenidos mediante los ensayos de respirometría demuestra que las dos concentraciones analizadas permiten evaluar la función mitocondrial sin que se afecte la integridad de la membrana externa. A su vez no se observaron diferencias significativas en los parámetros e índices obtenidos con las concentraciones de saponina utilizadas. Estos resultados indican que las dos concentraciones

del detergente reportadas en la literatura podrían ser útiles para realizar la permeabilización del tejido muscular a evaluar.

Por otra parte, se compararon los resultados obtenidos con datos de la literatura, donde también se realizaron permeabilizaciones de biopsias musculares para la evaluación de la función mitocondrial. Los reportes de análisis en biopsias de músculo de ratón son escasos, y no encontramos estudios hechos en las mismas condiciones de nuestro ensayo, por esto comparamos nuestros resultados con experimentos realizados en biopsias musculares humanas. Los valores de respiración máxima obtenidos fueron mayores a los del trabajo de Boushel et al. (2007). Los valores de estado 3 obtenidos son del mismo orden que los datos reportados por Rabol et al. (2009); Gnaiger (2009) y Boushel et al. (2007), pero son similares a los valores más bajos reportados en estos trabajos. En el mismo sentido, los valores de RCR obtenidos son inferiores a los reportados en la literatura (4-8) (Boushel et. al 2012; Rabol et. al 2009; Cardinale et. al 2018).

Los resultados que obtuvimos y el análisis de los resultados reportados en la literatura nos muestran que debemos continuar realizando ensayos para obtener valores de RCR más altos. El RCR es un parámetro indicativo del acople entre el transporte de electrones y la fosforilación del ADP a ATP, es por tanto relevante encontrar condiciones de evaluación de la muestra donde este valor se ajuste a los reportados en la literatura.

## **6. Conclusión**

La mutación identificada en *MT-ND1* 3447 A>C genera un cambio en un residuo (Gln47) y una secuencia aminoacídica de la proteína altamente conservados. Si bien la sustitución parece no afectar la estructura terciaria de la proteína, se observan cambios en las interacciones entre residuos al sustituir la glutamina por el residuo de histidina en la secuencia. Estos datos en conjunto con los datos evolutivos indican que la sustitución Gln47His puede afectar la estructura y estabilidad de la subunidad ND1, afectando principalmente al módulo al que pertenece, es decir el módulo P que participa del bombeo de protones. Estos cambios podrían tener consecuencias mayores, afectando la estructura y estabilidad del Complejo I y por tanto su actividad, no obstante se requiere un mayor número de ensayos y análisis más detallados para poder afirmar esto. En este sentido, la validación de un protocolo de medida de función mitocondrial en biopsias musculares será una herramienta útil para determinar si la mutación afecta la función de la cadena respiratoria y fosforilación

oxidativa en el paciente y es responsable de la enfermedad..

El desarrollo de herramientas que permitan profundizar en el diagnóstico de enfermedades mitocondriales asociadas a variantes genéticas de significado incierto es de gran importancia en el diagnóstico de estas patologías. Las herramientas bioinformáticas constituyen un novedoso método para lograr a través del análisis *in silico* investigar las posibles implicancias de las mutaciones en las estructuras proteicas y cómo estas pueden relacionarse con los fenotipos observados. En el mismo sentido, la evaluación de la función mitocondrial de biopsias musculares es una herramienta de análisis bioquímico que permite investigar los efectos de las variantes genéticas identificadas sobre el funcionamiento mitocondrial. Consideramos que el desarrollo de estas herramientas constituye un aporte a la mejora del diagnóstico de las enfermedades mitocondriales en el Uruguay.

## **7. Perspectivas**

- Continuar la puesta a punto del protocolo de permeabilización de biopsias musculares para evaluar la función mitocondrial, para lograr obtener mejores valores de RCR.

- Evaluar la presencia de la mutación y la función mitocondrial en músculo del paciente, ya que hasta el momento solo se han analizado muestras de sangre del mismo.

- Incorporar otras metodologías que permitan analizar al complejo I r, así como a la subunidad ND1. En tal sentido se pueden realizar ensayos mediante electroforesis nativa azul (BN-PAGE) para evaluar al complejo. Complementariamente se pueden analizar los niveles de ND1 mediante SDS-PAGE y *Western Blot* con un anticuerpo específico capaz de reconocer a esta subunidad, y los niveles de expresión del gen evaluando el transcrito de *MT-ND1* mediante RT- qPCR.

## Bibliografia

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., Young, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465, 1981.

Boushel, R., Gnaiger, E., Schjerling, P., Skovbro, M., Kraunsøe, R., & Dela, F. (2007). Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia*, 50(4), 790–796.

Cardinale, D. A., Gejl, K. D., Ørtenblad, N., Ekblom, B., Blomstrand, E., & Larsen, F. J. (2018). Reliability of maximal mitochondrial oxidative phosphorylation in permeabilized fibers from the vastus lateralis employing high-resolution respirometry. *Physiological reports*, 6(4), e13611.

Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190.

Eddy, S. R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Computational Biology*, 7(10), e1002195.

García-Roche, M., Casal, A., Carriquiry, M., Radi, R., Quijano, C., Cassina, A. (2018). Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. *Redox biology*, 17, 207–212.

Gnaiger E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(10), 1837–1845.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with Alpha Fold. *Nature*, 596(7873), 583–589.

Karp G(Ed.), (2017). Respiración aeróbica y la mitocondria. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*, 7e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2036&sectionid=1530>

Kuznetsov, A. V., Kunz, W. S., Saks, V., Usson, Y., Mazat, J. P., Letellier, T., Gellerich, F. N., & Margreiter, R. (2003). Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. *Analytical biochemistry*, 319(2), 296–303.

359.

Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols*, 3(6), 965–976. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>

Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S. M., Chien, Y. H., Hwu, W. L., Fan, P. C., Wong, L. J., Atwal, P. S., & Huang, T. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), 13039–13044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>

Margulis, Lynn (2002). Planeta simbiótico - Un nuevo punto de vista. Ed. Debate. Barcelona.

Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(6), 851–862.

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534.

Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2019). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (7ma. ed.). Barcelona: Omega.

Ng, Y. S., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial disease: genetics and management. *Journal of neurology*, *263*(1), 179–191.

Pesta, D., & Gnaiger, E. (2012). High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *810*, 25–58.

Rabøl, R., Højberg, P. M., Almdal, T., Boushel, R., Haugaard, S. B., Madsbad, S., & Dela, F. (2009). Effect of hyperglycemia on mitochondrial respiration in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *94*(4), 1372–1378.

Skorecki K, Behar D (2019). DNA mitocondrial y enfermedades y rasgos hereditarios. Kasper D, & Fauci A, & Hauser S, & Longo D, & Jameson J, & Loscalzo J(Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e*. McGraw Hill.

Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, *402*(6760), 371–372.

Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2021). Extreme heterogeneity of human mitochondrial DNA from organelles to populations. *Nature reviews. Genetics*, *22*(2), 106–118.

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.

Swalwell, H., Kirby, D. M., Blakely, E. L., Mitchell, A., Salemi, R., Sugiana, C., Compton, A. G., Tucker, E. J., Ke, B. X., Lamont, P. J., Turnbull, D. M., McFarland, R., Taylor, R. W., & Thorburn, D. R. (2011). Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. *European journal of human genetics : EJHG*, *19*(7), 769–775. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.18>

UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515.

Wallace, D. C., Lott, M. T., Torroni, A., Brown, M. D., Shoffner, J. M. Report of the committee on human mitochondrial DNA. In: Cuticchia, A. J.; Pearson, P. L. (eds.) *Human Gene Mapping, 1993: A Compendium*. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press (pub.) 1994. Pp. 813-845.



