



INTRODUCCIÓ



4 EL MITOCONDRI

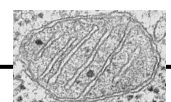
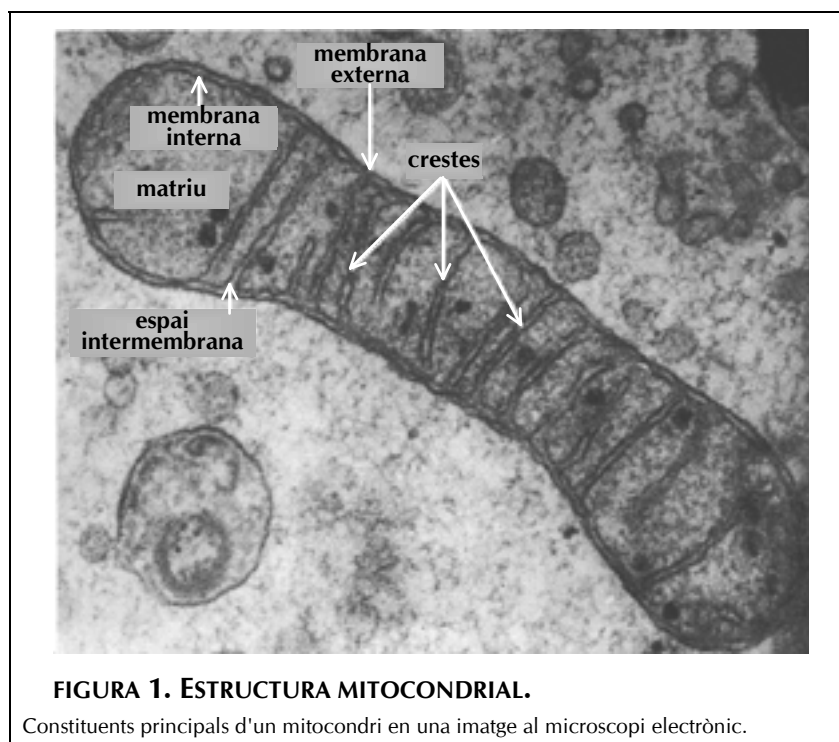
El mitocondri va ser el primer orgànel cel·lular relacionat amb una malaltia humana. Això va succeir el 1962, quan Luft et al. van descriure un pacient amb hipermetabolisme el qual presentava disfunció mitocondrial (Luft 1962).

Els mitocondris són orgànuls presents al citoplasma de la majoria de les cèl·lules eucariotes. Van ser identificats per primer cop a finals del segle XIX per Altmann, qui els va definir com a "organismes elementals" que vivien dins de la cèl·lula. Gairebé un segle més tard, Lynn Margulis va formular la teoria endosimbiont que proposa que els mitocondris actuals són descendents d'organismes primitius amb capacitat aeròbica els quals van ser "ingerits" per cèl·lules protoeucariotes anaeròbiques fa 1.500–2.000 milions d'anys. Com a conseqüència d'aquesta associació les dues espècies s'haurien beneficiat: l'hoste utilitzant l'energia generada per l'activitat aeròbica del bacteri incorporat, i aquest accedint a nutrients que aconseguiria l'hoste. Les similituds entre mitocondris i bacteris (observacions que donen suport a la teoria endosimbiont) són molt interessants, però s'allunyen del tema d'estudi d'aquesta tesi. En aquest capítol s'ofereix una breu descripció morfològica del mitocondri i es presenten les funcions mitocondrials més rellevants en casos de malaltia.

CARACTERÍSTIQUES PRINCIPALS

El mitocondri té una mida mitjana d'aproximadament 0,3–1,0 per 5–10 μm . Pot desplaçar-se a través del citoplasma cel·lular, i la seva estructura bàsica la formen dues membranes diferents quant a funció i composició: la membrana externa i la interna, que es plega en estructures anomenades crestes (FIGURA 1). La membrana externa és una bicapa fosfolipídica composta per gairebé un 50% de lípids, que

conté estructures proteiques anomenades porines les quals la fan permeable a molècules ≤ 10 kDa. La membrana interna ocupa molta més superfície que l'externa a causa dels plegaments que presenta, i té una estructura molt més complicada ja que alberga una sèrie de proteïnes i complexos bàsics per al desenvolupament de les funcions metabòliques que tenen com escenari els mitocondris. Està composta per aproximadament



un 20% de lípids, amb un elevat contingut en cardiolipina, i només és permeable a l'oxigen, el CO₂ i l'aigua, la qual cosa té una gran importància, com s'explicarà més endavant.

Les membranes delimiten dues cavitats o espais dins del mitocondri: la matriu i l'espai intermembrana. La matriu és més densa que el citoplasma cel·lular, i normalment al microscopi electrònic són visibles punts foscos (grànuls mitocondrials) que són condensacions de calci. A més a més, hi ha oxigen, CO₂, aigua, enzims (que participen en el cicle de Krebs, l'oxidació dels àcids grassos...), ribosomes i el DNA propi del mitocondri (mtDNA), que acostuma a localitzar-se a prop de la membrana interna i del qual es parlarà abastament. A l'espai intermembrana es troben enzims que catalitzen reaccions de transferència de grups fosfat a partir del trifosfat d'adenosina (ATP), com ara la creatin-quinasa i la mioquinasa.

El nombre de mitocondris per cèl·lula és força variable: de 10 a 2.000 en cèl·lules somàtiques, i fins al voltant de 100.000 en oòcits. Són especialment abundants en cèl·lules (i parts de cèl·lules) associades a processos que requereixen molta energia. Per exemple, a esperma de mamífers i a protozous flagel·lats els mitocondris es localitzen a la base dels flagells¹; a múscul cardíac ocupen l'espai entre les miofibril·les. Els òrgans molt actius des d'un punt de vista metabòlic —per exemple fetge, cervell i múscul esquelètic— presenten un nombre més gran de mitocondris. La seva forma externa, el nombre de crestes i la seva estructura també varia segons el tipus cel·lular (FIGURA 2).

Els mitocondris són el compartiment cel·lular on té lloc la **respiració aeròbica**. Aquest procés, al qual està acoblada la **fosforilació oxidativa** (o sistema **OXPHOS**), serà tractat amb més detall a continuació. Als mitocondris tenen lloc, però, altres funcions importants, com ara la producció de calor mitjançant el desacoblament de la respiració oxidativa i la síntesi d'ATP a teixit adipós marró, l'homeòstasi del calci a la matriu mitocondrial, la síntesi del grup hemo en fetge i precursors d'eritròcits, i l'apoptosi. A més, aquests orgànuls participen també en la síntesi d'aminoàcids, nucleòtids, fosfolípids, pirimidines i diversos metabòlits.

¹ Recentment s'ha comprovat que la qualitat del semen (referida a la mobilitat dels espermatozoides, la concentració dels mateixos, etc.) és directament proporcional a l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria (Ruiz-Pesini 2000).

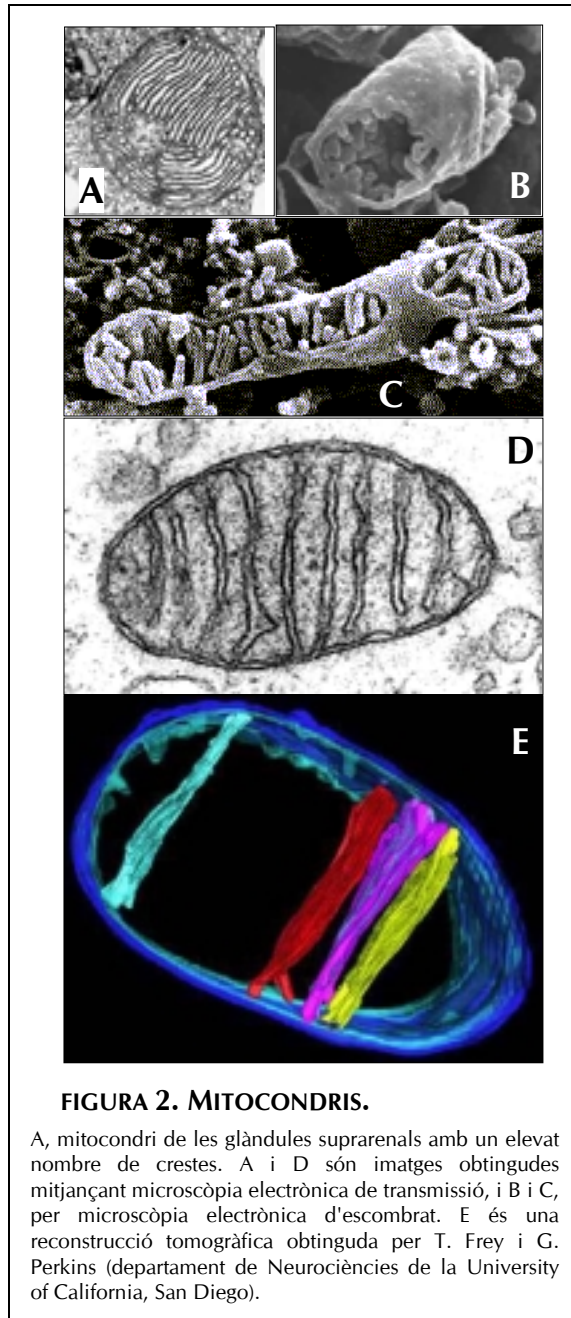


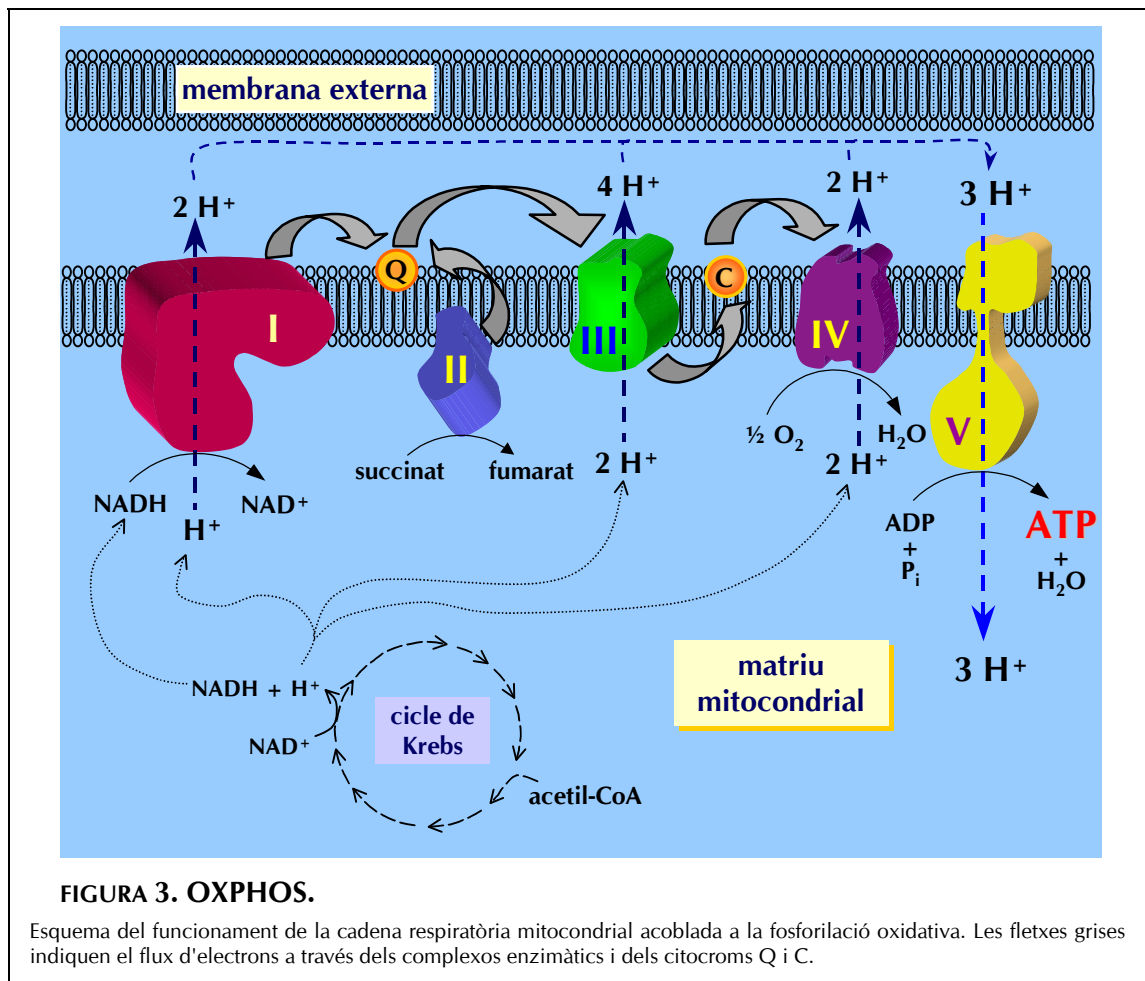
FIGURA 2. MITOCONDRI.

A, mitocondri de les glàndules suprarenals amb un elevat nombre de crestes. A i D són imatges obtingudes mitjançant microscòpia electrònica de transmissió, i B i C, per microscòpia electrònica d'escombrat. E és una reconstrucció tomogràfica obtinguda per T. Frey i G. Perkins (departament de Neurociències de la University of California, San Diego).

RESPIRACIÓ AERÒBICA

És considerada la principal funció mitocondrial ja que proporciona al voltant d'un 90% del requeriment cel·lular d'ATP. Al mitocondri entren àcids grassos que són oxidats a acetilcoenzim A (acetilCoA) en el procés anomenat β -oxidació. El piruvat (producte final de la glucòlisi al citoplasma cel·lular) també entra al mitocondri, i és descarboxilat per la piruvat descarboxilasa, que incorpora la molècula del coenzim A i es produeix acetilCoA. La regió acetat d'aquesta molècula s'oxida en el cicle dels àcids tricarboxílics o cicle de Krebs, al final del qual es





generen dues molècules de CO_2 i 4 parells d'àtoms d'hidrogen, els quals es transfereixen al dinucleòtid d'adenina i nicotinamida (NAD^+) i al dinucleòtid de flavina i adenina (FAD) que es redueixen a NADH i FADH_2 respectivament. Aquests compostos tenen una capacitat donadora d'electrons molt elevada i aquesta energia es va alliberant en una sèrie de reaccions redox que tenen lloc a les crestes mitocondrials en les que participen complexos enzimàtics i coenzims. Es tracta de la **cadena respiratòria mitocondrial (CRM)** o cadena de transport d'electrons (FIGURA 3).

Les proteïnes que intervenen en la cadena respiratòria estan agrupades en complexos localitzats a la membrana de les crestes, que travessen la bicapa lipídica i sobresurten a la matriu i a l'espai intermembrana. Els coenzims estan dissolts en lípids i difonen al llarg de la membrana o a través de la seva superfície. El **complex I**, NADH ubiquinona oxidoreductasa (o NADH deshidrogenasa), és el més gran i està compost per un mínim de 42 polipèptids. Catalitza la transferència d'electrons des del

NADH a l'ubiquinona o coenzim Q (CoQ). El **complex II**, succinat CoQ oxidoreductasa, està format per 4 pèptids i catalitza l'oxidació de succinat a fumarat (dins del cicle de Krebs), i transfereix els electrons també a l'ubiquinona (dins de la CRM). La citocrom c oxidoreductasa o **complex III** està constituïda aproximadament per 10 subunitats. El citocrom c actua com a intermediari per a la transferència d'electrons entre els complexos III i IV i està localitzat a l'espai intermembrana. El **complex IV**, citocrom c oxidasa (COX), transfereix 4 electrons des del citocrom c a l'oxigen molecular, i es genera una molècula d'aigua. Està format per 13 subunitats.

Aquesta transferència d'electrons d'un membre de la cadena de transport d'electrons a un altre genera energia que s'inverteix en la síntesi d'ATP per una via indirecta. A l'inici de la cadena, les molècules de NADH i FADH_2 transfereixen els electrons de l'hidrogen al següent complex enzimàtic, i alliberen els protons a la matriu mitocondrial mitjançant mecanismes no coneguts encara. Quan els complexos enzimàtics transfereixen els electrons al següent component



de la cadena, utilitzen l'energia generada en aquest procés per bombejar protons a l'espai intermembrana travessant la membrana interna. Aquesta acumulació de protons a l'espai intermembrana en front als electrons de la matriu, crea un potencial elèctric que tendeix a portar els protons de nou cap a la matriu. Però la membrana interna és extremadament impermeable als protons i cal l'acció del complex V (F₀-F₁-ATP sintasa) perquè aquests puguin ser transportats de nou a l'interior mitocondrial. L'energia generada amb l'entrada dels protons s'utilitza per a sintetitzar ATP a partir d'ADP i fòsfor inorgànic (P_i). A continuació, l'ATP generat pel mitocondri és bescanviat per ADP citoplasmàtic mitjançant el transportador de nucleòtids d'adenina (ANT). El **complex V** està constituït per 12–14 polipèptids, i s'hi diferencien dues regions: la F₀, que està lligada a la membrana i hom pensa que s'encarrega de transportar electrons, i la F₁, que representa la part catalítica de la molècula inserida a la matriu mitocondrial.

Perquè la fosforilació oxidativa tingui lloc, calen dues condicions: que la membrana interna estigui intacta de forma que els protons només puguin tornar a la matriu per un procés acoblat a la síntesi d'ATP; i que s'acumuli una concentració elevada de protons a l'espai intermembrana.

L'any 1961 el bioquímic Peter Mitchell va proposar per primera vegada el mecanisme pel qual les cèl·lules produïen ATP a partir del metabolisme oxidatiu. El 1978 li va ser concedit el premi Nobel de Química.

APOPTOSI

L'estudi de la mort cel·lular programada —o apoptosi— ha captat l'interès d'un gran nombre d'investigadors en els últims anys. És lògic, si es considera que l'apoptosi s'esdevé en una gran varietat de teixits en resposta a certes situacions tant fisiològiques com patològiques. És un procés crític per a l'existència de molts organismes, necessari per a modelar el sistema nerviós durant el desenvolupament, i per a mantenir el funcionament normal del sistema immunològic. L'alteració dels mecanismes normals d'apoptosi pot comportar conseqüències greus: càncer i malalties autoimmunitàries si manca, i infarts o la degeneració nerviosa típica de la malaltia d'Alzheimer si es produeix en excés.

L'apoptosi pot ser iniciada per una varietat d'agents que danyen el DNA, per a exemple les radiacions ultraviolades i X, i determinades drogues terapèutiques. Les proteïnes que detecten

el dany al DNA i engeguen l'apoptosi també afecten al cicle cel·lular: aturen la divisió perquè el dany es pugui reparar o bé la cèl·lula mori si les alteracions al DNA són irreversibles.

Tres són les fases observades a la majoria de models d'apoptosi estudiats: 1) acidificació del citoplasma; 2) disfunció mitocondrial; 3) activació de les caspases (família de cisteïna-proteases intracel·lulars). Així doncs, a banda de ser les centrals energètiques de les cèl·lules, els mitocondris també s'han descobert íntimament implicats en diverses vies de mort cel·lular. Diversos membres de la família Bcl-2 es localitzen a les membranes mitocondrials. A aquesta gran família pertanyen alguns dels senyals de mort cel·lular més potents i també alguns dels agents més actius en la supervivència cel·lular, com per a exemple el mateix Bcl-2 (inicialment identificat com el producte d'un gen l'expressió del qual estava incrementada en cèl·lules B amb translocacions cromosòmiques).

De quina manera participa el mitocondri al procés apoptòtic? Es coneixen, com a mínim, tres mecanismes generals, que poden estar interrelacionats:

- interrupció del transport d'electrons
- alteració del potencial redox cel·lular
- alliberament de factors que promouen l'activació de les caspases (citocrom c,...)

Fa dècades que es coneix que la interrupció de la CRM és un senyal primerenc de mort cel·lular. Les radiacions γ indueixen apoptosi a timòcits i aturada de la cadena de transport d'electrons probablement a nivell de la interacció entre el complex III i el citocrom c (vegeu la **FIGURA 3**) (Scaife 1966). Una conseqüència d'aquesta interrupció hauria de ser la disminució de la síntesi d'ATP, i en efecte aquesta ha estat descrita, però només en les fases finals del procés d'apoptosi (Bossy-Wetzel 1998). Per això es pensa que és poc probable que el dèficit d'ATP sigui el mecanisme inductor de l'apoptosi, malgrat pugui comportar la mort cel·lular.

Els mitocondris són la font més gran de producció d'anions superòxid (O₂^{•-}). La major part de l'oxigen que consumeix el mitocondri és transformat en H₂O pel complex IV (**FIGURA 3**). Tot i amb això, existeix un 4–5% de l'oxigen que accepta electrons directament de les flavina-deshidrogenases i CoQH₂ i genera anions superòxid. Qualsevol factor que desacobli la CRM pot provocar un augment en la producció d'ions superòxid. Tant la peroxidació lipídica com els



superòxids estan incrementats quan la cèl·lula entra en apoptosi, però sembla que aquests fenòmens es donarien en una fase tardana, un cop la cascada de les caspases hagués estat activada.

Durant l'apoptosi, el mitocondri allibera citocrom c al citosol. A hores d'ara no es coneix per quin mecanisme deixa el citocrom c la membrana interna mitocondrial, a la que està associat mitjançant interaccions electrostàtiques. Al citosol el citocrom c, juntament amb la molècula Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor) i la procaspasa-9, forma "l'apoptosoma". El resultat de l'acció de l'apoptosoma és l'activació de la caspasa 9, que inicia la cascada proteolítica que deriva en apoptosi. La sortida del citocrom c del mitocondri sembla encaminar la cèl·lula cap a la mort, bé per un mecanisme apoptòtic mitjançant l'activació de les caspases per Apaf-1, bé per un procés necròtic més lent causat per la manca de transport d'electrons, que pot provocar la generació de radicals d'oxigen lliure i la disminució en la producció d'ATP. El bloqueig de l'alliberament de citocrom c per part de Bcl-2 inhibeix l'apoptosi (Kluck 1997; Zamzami 1997).

A més del citocrom c, els mitocondris alliberen altres molècules, com el factor inductor d'apoptosi (o AIF) i la procaspasa-3.

El **porus de transició mitocondrial** (MTP), un canal no selectiu d'estructura parcialment definida que té components a les dues membranes mitocondrials, ha estat implicat en la pèrdua de

Ca²⁺ i també en la mort cel·lular. En alguns sistemes experimentals s'ha vist que la fase inicial del procés apoptòtic (és a dir, l'estat que precedeix a la desintegració nuclear) està precedit per la pèrdua del **potencial de membrana interna** ($\Delta\Psi_m$) com a conseqüència de l'obertura dels MTP, regulada per Bcl-2. Una part dels fenòmens apoptòtics serien secundaris a l'obertura del MTP (Marchetti 1996). Aquesta obertura podria comportar la sortida del mitocondri de substrats metabòlics i substàncies antioxidants essencials (ATP, NADH, glutatió reduït o GSH). La disminució de GSH pot afectar enormement la viabilitat mitocondrial ja que és necessari per a la reducció del peròxid d'hidrogen (H₂O₂) i altres **espècies d'oxigen reactiu (ROS)**. En la pàg. 26 dins l'apartat **Mitocondri i malaltia** es parla d'aquestes espècies. Són nombrosos els treballs que les impliquen en les malalties neurodegeneratives.

Per una altra banda, l'obertura del MTP a la membrana interna podria provocar que s'equilibrassin les concentracions de protons de la matriu i de l'espai intermembrana, amb la qual cosa es desacoblarria la cadena respiratòria. En aquest cas, a més, per causa de la hipertonicitat normal de la matriu, el volum mitocondrial es veuria afectat per l'entrada de molècules d'aigua. Això podria esdevenir en el trencament de la membrana externa, amb l'alliberament des de l'espai intermembrana de proteïnes activadores de les caspases. En alguns sistemes s'ha aconseguit evitar l'apoptosi mitjançant la utilització de

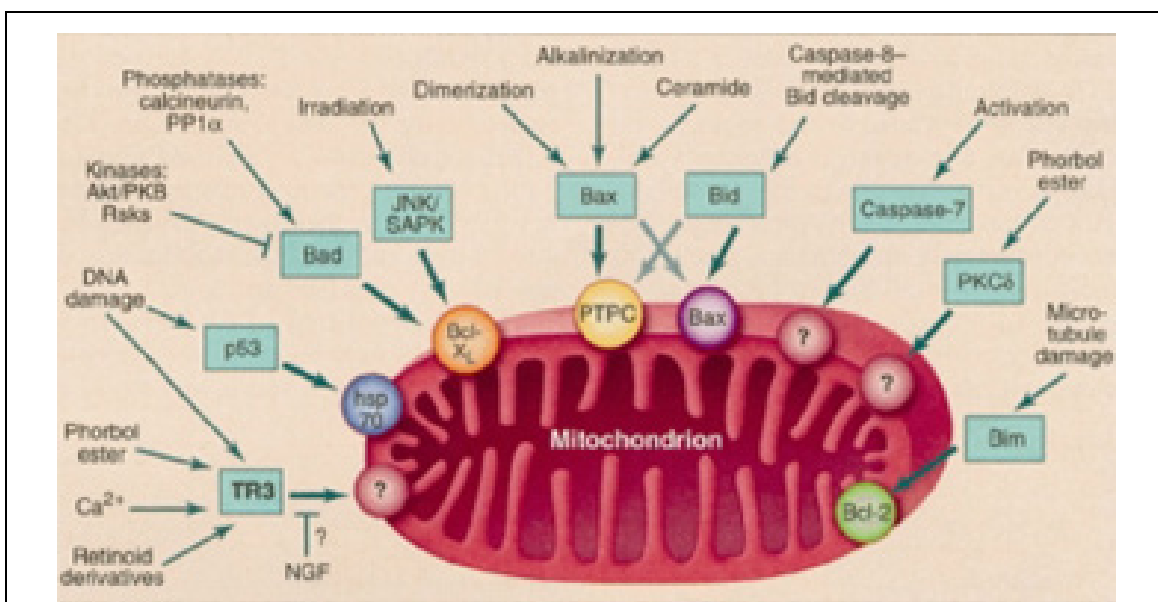
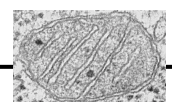


FIGURA 4. FACTORS IMPLICATS A L'APOPTOSI MITOCONDRIAL.

Il·lustració de la complexitat i l'elevat nombre de molècules implicades en la regulació de l'apoptosi. Reproduïda de Brenner i Kroemer (Brenner 2000).



molècules que inhibeixen l'obertura del MTP, el que presenta aquest porus com a un factor central en les processos apoptòtics (Zamzami 1996). Tot i amb això, alguns estudis demostren que la pèrdua de citocrom c i l'activació de les caspases pot succeir sense que es detecti una baixada de $\Delta\Psi_m$, el que implicaria que en aquests casos l'obertura del MTP ocorreria després de l'activació de les caspases per l'apoptosoma (Bossy-Wetzel 1998).

La **FIGURA 4** (pàg. 13) és un dels molts esquemes que intenten incloure els principals factors implicats en el fenomen apoptòtic.

L'apoptosi és tan indispensable per l'organisme com la divisió cel·lular, i segurament està tan finament regulada com aquesta. Fins ara han estat identificats els elements més importants de la maquinària de mort cel·lular (molts dels quals impliquen l'acció del mitocondri), però encara resten detalls per a poder tenir la fotografia completa del mecanisme de mort cel·lular programada. Això ha de permetre noves perspectives a l'hora de guarir certes malalties que tenen el seu origen en el funcionament anòmal dels mecanismes apoptòtics.

5 DNA MITOCONDRIAL

El 1963 Nass i Nass (Nass 1963) descobriren que els mitocondris contien el seu propi DNA (mtDNA), la qual cosa representava un argument més a favor dels que pensaven que havien estat organismes independents milions d'anys enrera. En l'actualitat es coneix la seqüència completa del mtDNA de molts vertebrats i invertebrats, i se sap que les seves funcions essencials estan molt conservades. Una pàgina web del NCBI² ofereix la possibilitat de consultar les seqüències dels mtDNA de 40 espècies diferents de mamífers inclòs l'home, que van des de l'esquirol vermell fins al rinoceront indi, passant pel ratpenat i el catxalot (<www.ncbi.nlm.nih.gov/coffeebreak/archive>, cytosolic help for mitochondrial defects). Tan sols dues espècies de marsupials presenten una desviació parcial de l'ordre genètic mitocondrial respecte a les altres espècies.

Encara que el mtDNA d'algunes espècies de protozous ciliats, algues o llevats és lineal, la gran majoria dels mtDNAs són circulars. Quant a la mida de les molècules, s'observen certes diferències interespecífiques, però aquestes no necessàriament impliquen diferències en el contingut genètic. El sistema genètic mitocondrial més estudiat és el dels humans, i és aquest en el qual ens centrarem.

EL GENOMA MITOCONDRIAL

Cada mitocondri conté entre 2 i 10 molècules de mtDNA, i hi ha entre 1.000 i 10.000 molècules a la cèl·lula. Anderson et al. van completar la seva seqüència l'any 1981 (Anderson 1981). El número d'accés de Genbank és J01415.

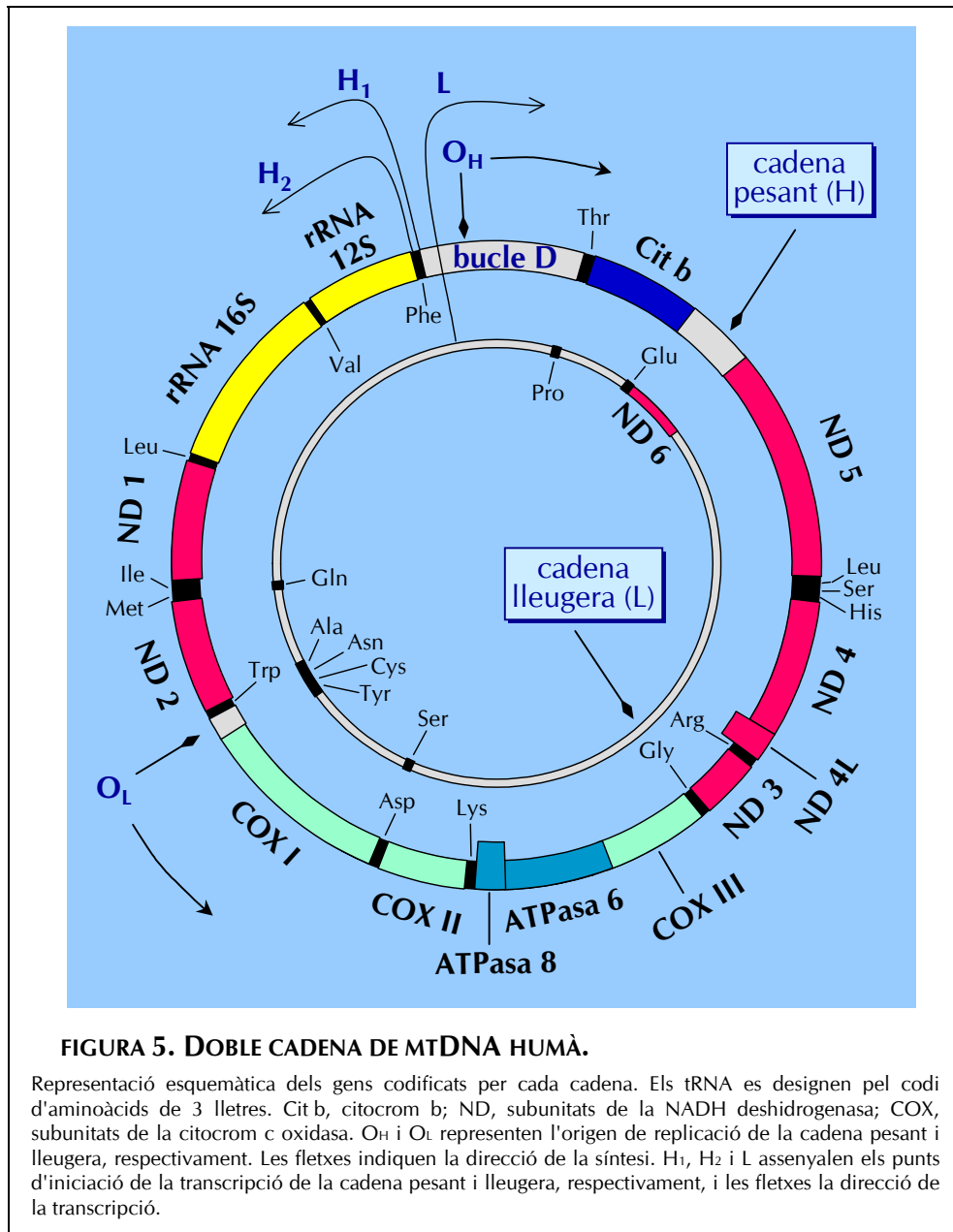
La molècula de mtDNA humana és una doble cadena circular de 16.569 parells de bases (pb). El mtDNA (**FIGURA 5**), que es replica i transcriu a la matriu mitocondrial, conté 37 gens. Vint-i-dos corresponen a RNA de transferència (tRNA), dos a RNA ribosòmic (rRNA), i 13 codifiquen polipèptids que formen part dels complexos de la CRM (**FIGURA 3**): set d'aquests del complex I (ND1 a ND6), un al complex III (Cit b), tres al complex IV (COX 1 a COX3), i dos al complex V (ATPasa 6 i 8). Així doncs, tan sols el complex II està

enterament codificat pel genoma nuclear. Per a la formació (que inclou la síntesi i l'encaixament) dels altres quatre complexos enzimàtics de la CRM cal la participació dels dos genomes cel·lulars, el nuclear i el mitocondrial.

L'observació de l'organització genètica del mtDNA revela una estructura altament compactada en la qual la cadena pesant codifica per la majoria de gens, mentre que la lleugera tan sols conté els gens per a la subunitat 6 de la NAD deshidrogenasa i vuit tRNA. Una regió que no codifica per a cap gen és la del bucle D (D de desplaçament, ja que en les fases inicials de la replicació de la cadena pesant una secció d'aquesta es desplaça i es forma una triple hèlix). Aquesta també és anomenada zona de control, i

² National center for biotechnology information.





allotja regions dites "hipervariables" per l'elevada variabilitat de seqüència que presenten. La zona que inclou el bucle D (entre els gens tRNA^{Phe} i tRNA^{Pro}, de 1.122 pb) conté l'origen de replicació de la cadena pesant i els promotors de la transcripció de les dues cadenes (FIGURA 5). Enríquez *et al.* descriuen amb detall el que es coneix en l'actualitat sobre la replicació i traducció mitocondrials (Enríquez 1998).

LA GENÈTICA MITOCONDRIAL

El sistema genètic dels mitocondris presenta diverses característiques que el diferencien del

genoma nuclear, i que estan resumides a la Taula 1 (pàg. 16).

Com s'acaba d'esmentar suara, **l'estructura del mtDNA és molt densa**. La cadena pesant està organitzada en gens contigus sense seqüències intròniques. Les seqüències intergèniques són escasses, la més gran de les quals és el bucle D. Un altre factor que il·lustra el grau de compactació del mtDNA és el fet que la majoria de gens que codifiquen proteïnes manquen de codó de terminació: després de l'últim codó amb sentit es troba una T o TA, i immediatament després comença un altre gen. El codó de terminació es formarà després de la transcripció per poliadenilació de l'extrem 3'.



El codi genètic mitocondrial difereix del nuclear en cinc codons: UGA codifica triptòfan, en comptes de ser un codó d'aturada, AGA i AGG són codons d'aturada, en comptes de codificar arginina; i AUA i AUU codifiquen la metionina en lloc de l'isoleucina, així juntament amb AUG són els tres possibles codons d'iniciació.

El mtDNA s'hereta per via materna (Giles 1980). És l'òcit —amb ~100.000 molècules de mtDNA— el que aporta la immensa majoria de mitocondris en el moment de la fecundació. El mtDNA patern s'elimina a la fase primerenca de l'embriogènia (Kaneda 1995). Sembla que les escasses molècules de mtDNA aportades per l'espermatozoide són eliminades en ser reconeguts senyals d'ubiquitinació (Sutovsky 2000). En cap cas no sembla que participin en el genotip de la descendència.

L'elevada taxa de mutació del mtDNA en comparació a la del DNA nuclear (Neckelmann 1987) es creu probablement conseqüència de la manca d'histones que protegeixin les dobles hèlixs de mtDNA. D'altra banda, el mtDNA pot ser danyat per un excés de molècules ROS subproductes de la fosforilació oxidativa. Aquest efecte nociu està afavorit pel fet que el mtDNA està en contacte amb la membrana mitocondrial interna i, per tant, molt a prop de la CRM que genera les ROS.

Malgrat s'han descrit alguns mecanismes de reparació del mtDNA en resposta a danys específics (Shen 1995; Stierum 1999), fins aquest moment no sembla existir dins del mitocondri un sistema general reparador de mutacions, el que pot provocar que certes mutacions es vagin acumulant. Pel que fa a la possibilitat de recombinació mitocondrial, es creia que no existia, però en l'actualitat s'estan publicant treballs a favor (i en contra) d'aquesta hipòtesi (Eyre-Walker 2000; Elson 2001a).

Hom parla d'**homoplàsmia** quan totes les cèl·lules tenen el mateix mtDNA, i d'**heteroplàsmia** quan coexisteixen molècules salvatges i molècules mutants. Els percentatges d'heteroplàsmia poden ser diversos, segons la proporció de mtDNA normals i mutants que hi hagi. Durant la divisió cel·lular **els mitocondris es distribueixen a l'atzar entre les cèl·lules filles** i, en conseqüència, aquestes poden

rebre diferents percentatges de mtDNA mutants. Això és el que s'anomena **segregació replicativa** (Wallace 1986). Com a conseqüència, el percentatge de molècules mutants pot variar entre els diferents teixits, i també anar canviant al llarg del temps.

El fenotip d'una cèl·lula, teixit o individu heteroplàsmic depèn del percentatge de mtDNA mutant. Si el nombre de molècules mutants és baix es produirà una complementació de la funció per part de les molècules normals, però a mida que augmenta la proporció de molècules anòmales la complementació és més difícil, fins que s'arriba a un fenotip patològic. Així, el fenotip s'expressa d'acord amb un **efecte llindar**. La malaltia apareix quan la producció d'ATP al teixit heteroplàsmic és insuficient per al seu funcionament normal. Els requeriments energètics són particulars de cada teixit, i el nombre de mitocondris i de molècules de mtDNA també. D'aquesta manera, es pot donar la situació en què un determinat percentatge de molècules de mtDNA mutants tingui repercussions completament diferents segons sigui l'òrgan afectat: des de no afectar el funcionament fins a anul·lar-lo per complet. Els òrgans i teixits que més pateixen una deficiència en la síntesi d'ATP són ulls, sistema nerviós, múscul, cor, pàncrees, ronyó i fetge.

Per a concloure aquest breu repàs sobre el mtDNA, cal afegir que el mtDNA s'utilitza rutinàriament en identificacions forenses per organitzacions de gran "prestigi" com són el Departament de Defensa i el FBI nord-americans. La mida de la molècula de mtDNA i el nombre de còpies per cèl·lula facilita molt la seva extracció en restes forenses en comparació al DNA nuclear. L'anàlisi de les regions hipervariables a la zona de control del mtDNA ha permès identificar fills que havien estat separats dels seus pares durant els règims militars a l'Argentina, i va ser clau en el reconeixement de les restes de la família real

TAULA 1. CARACTERÍSTIQUES DEL SISTEMA GENÈTIC MITOCONDRIAL

- ✗ estructura del mtDNA molt densa
- ✗ alguns codons difereixen del codi universal
- ✗ el mtDNA s'hereta exclusivament de la mare
- ✗ taxa de mutació 10-20 vegades superior a la del DNA nuclear
- ✗ la replicació del mtDNA és independent de la divisió cel·lular
- ✗ el mtDNA es distribueix a l'atzar a les cèl·lules filles
- ✗ efecte llindar en el fenotip



rusa 70 anys després de la seva mort durant la Revolució (Ivanov 1996). Les regions hipervariables aporten una base per a diferenciar grups humans, i la transmissió per herència materna evita les confusions possibles en casos de recombinació genètica. L'elevada taxa de mutació del mtDNA representa una eina molt valuosa per a establir relacions evolutives entre organismes, sempre que aquests no estiguin molt allunyats evolutivament. Mitjançant l'estudi del mtDNA, també s'ha determinat que els Neandertals i els humans moderns van divergir genèticament fa 500.000–600.000 anys, per la qual cosa no es consideren els avantpassats de l'*Homo sapiens* modern³ (Krings 1997). En general, es considera que l'anàlisi del mtDNA és una eina molt útil per als estudis antropològics (Wallace 1999b).

TIPUS DE MUTACIONS AL MTDNA

En aquest subapartat es descriuen breument els tipus de mutacions descrites al mtDNA, i a l'apartat **Mitocondri i malaltia** es tractarà, entre d'altres temes, de les malalties associades a aquestes mutacions.

Les alteracions al mtDNA poden ser reordenaments que canvien la longitud de la molècula —delecions i duplicacions—, o bé poden afectar punts concrets —mutacions puntuals. Les delecions —senzilles o múltiples— impliquen, donada la compactació del mtDNA, la pèrdua de gens o parts de gens mitocondrials. En general, s'ha vist que afecten la regió compresa entre el gen del citocrom b i el de la subunitat I de la citocrom oxidasa (FIGURA 5, pàg. 15). Existeix una àmplia gamma de delecions identificades, que van des d'una kilobase (kb) fins a 8 kb, però n'hi ha dues d'especialment freqüents ja que s'han trobat al voltant del 60% de casos, per això se les anomena **delecions comunes**. Les seves mides són 7.436 i 4.977 pb. Malgrat la majoria de les delecions representen casos esporàdics també se n'han descrit amb herència materna —pocs— i amb herència mendeliana dominant i recessiva. El mecanisme que provoca l'aparició de delecions al mtDNA és a hores d'ara desconegut.

A les duplicacions es troba la presència repetida d'algun segment del mtDNA. El mtDNA duplicat d'entre 23 i 26,5 kb podria ser un estat

intermedi previ a la formació de molècules delecionades (Poulton 1993).

Les delecions són rarament detectades en teixits amb una elevada taxa de recanvi, com per exemple el teixit sanguini. És possible que els mtDNA delecionats es perdin per selecció clonal en aquests teixits i, per contra, s'acumulin en teixits postmitòtics (cervell, múscul). En sang sí s'han detectat duplicacions, fet que facilita la seva identificació perquè no cal practicar mètodes agressius sobre els pacients (vegeu FIGURA 8, pàg. 28).

Des de l'any 1988 en què Wallace *et al.* van descriure una mutació puntual al gen ND4 (Wallace 1988), s'han identificat unes 100 mutacions puntuals al mtDNA que afecten tant a gens que codifiquen polipèptids de la CRM com a gens dels tRNA i dels rRNA. Les mutacions puntuals s'anomenen d'acord amb la seva posició a la cadena lleugera de la seqüència de referència de Cambridge (Anderson 1981).

Tant les delecions com les mutacions puntuals que afecten gens dels tRNA i rRNA poden alterar la síntesi proteica mitocondrial, fet que en alguns casos comporta conseqüències molt greus, tal i com s'explica al proper apartat.

Existeix una darrera categoria de mutació —o més pròpiament dit anomalia, car no implica l'alteració de la seqüència— al mtDNA que s'anomena **depleció**. La síndrome de depleció suposa una reducció del contingut de molècules de mtDNA que algunes vegades ha arribat a ser del 90% respecte a controls d'edat similar. Els mecanismes moleculars responsables d'aquest fenomen no es coneixen, però qualsevol defecte en algun punt de la replicació pot alterar el nombre de còpies del mtDNA (Hirano 2000).

Les molècules de mtDNA identificades en la síndrome de depleció són normals. No presenten delecions ni mutacions puntuals, la qual cosa fa pensar que no és conseqüència de cap altre procés patogènic sinó precisament causa de malaltia.

³ De tota manera, els investigadors insisteixen que aquestes troballes s'han fet a partir d'un únic espècimen i que l'home Neandertal no hauria contribuït al mtDNA de l'home modern però potser sí a alguns gens nuclears.



6 MITOCONDRI I MALALTIA

Com ja s'ha esmentat anteriorment, el mitocondri va ser el primer orgàdul cel·lular relacionat amb una malaltia humana, l'any 1962. En la darrera dècada, el descobriment de gran quantitat de mutacions al mtDNA causants de malalties ha generat una nova àrea d'estudi dins de la genètica, la genètica molecular mitocondrial.

El concepte de malaltia mitocondrial s'aplica només a aquelles malalties que tenen alterat el funcionament de la CRM, malgrat existeixen enzims mitocondrials també implicats en malalties del metabolisme intermediari, com per exemple en alteracions de la β -oxidació o el cicle de Krebs. Com ja s'ha vist, en la CRM participen polipèptids codificats pel mateix mitocondri i sintetitzats a la matriu mitocondrial, i també moltes subunitats codificades pel DNA nuclear (nDNA), sintetitzades al citosol i guiades a la membrana interna del mitocondri mitjançant pèptids-senyal amino-terminal. Conseqüentment, les malalties mitocondrials poden tenir l'origen no únicament en defectes del genoma mitocondrial, sinó també en defectes del genoma nuclear. Alteracions en les translocases mitocondrials (encarregades del transport de metabòlits des del citoplasma a la matriu mitocondrial), en la comunicació entre els dos genomes o en els mecanismes que importen proteïnes del citoplasma també poden provocar malalties. Aquest darrer és el cas de la síndrome Mohr-Tranebjaerg, o síndrome de sordesa-distonia-atròfia òptica (Koehler 1999).

Tots els factors necessaris per a la replicació del mtDNA són codificats pel nDNA, així doncs no és estrany que mutacions al nDNA afectin d'una forma important el funcionament del mitocondri.

CLASSIFICACIÓ DE LES MALALTIES MITOCONDRIALS

El fet que els mitocondris estiguin àmpliament distribuïts entre els diferents teixits i òrgans fa que les típiques classificacions anatòmiques no siguin oportunes per al conjunt de les malalties mitocondrials. La primera característica que defineix les malalties mitocondrials és la gran heterogeneïtat de les manifestacions clíniques que presenten. Els fenotips poden ser diversos i coincidents. Una mutació concreta al mtDNA pot produir fenotips molt variables, i mutacions diferents poden provocar símptomes similars.

La **TAULA 2** (modificada de (Chinnery 1999)) recull els trets clínics més característics de les malalties mitocondrials. Són malalties multi-sistèmiques que afecten òrgans i teixits no sempre relacionats funcionalment —ni embriològicament. L'afectació no depèn només del teixit on s'expressa la mutació, sinó també de les necessitats energètiques d'aquest teixit.

La classificació de les malalties mitocondrials s'ha modificat en el temps a mesura que s'ha anat avançant en el coneixement d'aquestes. El diagnòstic de les primeres citopaties mitocondrials es realitzava en base a la presència o no de **fibres vermelles desestructurades (RRF, ragged-red fibres)**. Les RRF són fibres musculars amb acumulacions anormals de mitocondris sota el sarcolemma que es tenyeixen de color púrpura o

vermell amb la tinció tricromàtica de Gomori, i que també es poden observar mitjançant una tinció de la succinat deshidrogenasa (SDH), la qual es troba únicament a mitocondris. Ara se sap que no són un marcador específic ja que s'han trobat en una àmplia varietat de malalties musculars, i fins i tot a atletes. Les classificacions purament clíniques o bioquímiques s'han deixat de banda, i el que potser interessa més en l'actualitat és conèixer on resideix el defecte que provoca la malaltia per a poder arribar ràpidament a un diagnòstic encertat i per a intentar aplicar la millor teràpia disponible. La **TAULA 3** (pàg. 20, modificada de (Chinnery 2000c)) resumeix les principals malalties mitocondrials a partir de la localització del defecte primari que les causa⁴.

Les malalties mitocondrials mostren uns patrons d'herència variats: materna, mendeliana, i una combinació d'ambdues. Les alteracions primàries al mtDNA es tradueixen en una disminució de la producció d'energia, sigui quin sigui el tipus de gen mutant. Els teixits amb majors necessitats energètiques són els preferentment afectats (cervell, cor, múscul...). Les malalties resultants es transmeten per herència materna. Un

⁴ Per a una relació més extensa consulteu la revisió de Chinnery et al. (Chinnery 1999).



TAULA 2. MANIFESTACIONS CLÍNiques DE LES MALALTIES MITOCONDRIALS**cardíacues**

cardiomiopatia hipertròfica, bloqueig cardíac

dermatològiques

lipomatosi múltiple

endocrinesdiabetis *mellitus*, hipoparatiroidisme, hipogonadisme, infertilitat**gastrointestinals**

episodis de nàusees i vòmits, disfàgia, pseudoobstrucció, pèrdua de pes

hematològiques

síndrome de Pearson amb pancitopènia, anèmia sideroblàstica

neuromusculars

atàxia, infarts, atacs, demència, migranya, encefalomiopaties, miopatia, sordesa neurosensorial, distonia, neuropatia perifèrica, paraparèsia, atròfia òptica, oftalmoplegia externa i ptosi, retinopatia, rabdomiolisi

pàncrees i fetge

fallada pancreàtica exocrina, fallada hepatocel·lular

psiquiàtriques

depressió, psicosi

renals

aminoacidúria, disfunció tubular, síndrome de Fanconi, glomerulopatia

altre grup de malalties es troba freqüentment associat a delecions múltiples del mtDNA però es transmet de forma autosòmica, per aquest motiu es pensa que són conseqüència d'una comunicació defectuosa entre el nucli i el mitocondri.

REORDENAMENTS

L'**oftalmoplegia externa progressiva** (PEO, *progressive external ophthalmoplegia*, MIM⁵ 165130) és una de les formes d'afectació muscular característica de les malalties mitocondrials que es presenta generalment com a conseqüència de defectes al mtDNA o en la comunicació entre el genoma mitocondrial i nuclear. Els pacients pateixen oftalmoparesi, ptosi de parpelles, disfàgia i debilitat proximal, que s'inicien en l'adolescència o lleugerament més tard, i que van progressant lentament. Als casos esporàdics de PEO s'han descobert delecions senzilles al mtDNA, el que permet diferenciar-los d'altres formes hereditàries causades per mutacions al DNA nuclear que provoquen delecions múltiples al mtDNA (TAULA 3). Aquesta malaltia aportà la primera evidència que una

mutació a un gen nuclear podia afectar la integritat del mtDNA (Zeviani 1989).

La **síndrome Kearns-Sayre** (KSS, MIM 530000) es caracteritza per la presència de delecions simples al mtDNA, i comporta oftalmoplegia externa progressiva i retinopatia pigmentària, amb inici dels símptomes anterior als 20 anys. El diagnòstic es confirma si a més es dona alguna de les següents condicions: bloqueig cardíac, síndrome cerebelosa i concentració de proteïnes al líquid cefaloraquídi superior a 1 g/L. Aquestes alteracions poden ésser acompanyades per sordesa neurosensorial, deteriorament cognitiu, diabetis, hipoparatiroidisme i baixa estatura. En la tercera o quarta dècada de vida, el pacient mor.

També té un pronòstic fatal la **síndrome de Pearson** (MIM 557000), que afecta a nens petits amb anèmia sideroblàstica, pancitopènia, disfunció pancreàtica exocrina, i vacuolització dels precursors cel·lulars de la medul·la òssia. Els pacients que aconsegueixen sobreviure —gràcies a transfusions i factors de creixement de la medul·la— desenvolupen una KSS.

L'**encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial**, o **MNGIE** (MIM 550900), s'inicia entre la segona i la cinquena dècada de vida de la persona, i es caracteritza per greus alteracions gastrointestinals, ptosi, oftalmoplegia externa progressiva, neuropatia perifèrica, miopatia, leucoencefalopatia i acidosi làctica. Els afectats

⁵ MIM, número de referència al *Mendelian Inheritance in Man* (V.A. McKusick, Johns Hopkins University Press, 1998) o a l'*Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>>).



acostumen a ser de constitució molt prima, i el múscul esquelètic presenta diverses alteracions mitocondrials: RRF amb mitocondris ultraestructuralment anòmals, activitats dels enzims de la CRM disminuïdes, i delecions múltiples i/o depleció del mtDNA.

MUTACIONS PUNTUALS

Les mutacions puntuals més freqüents són les que causen l'**atròfia òptica hereditària de Leber (LHON, Leber's hereditary optic neuropathy; MIM 535000)**, que predominantment afecta a homes en la segona dècada de vida amb una pèrdua indolora i progressiva de visió dels dos ulls (bilateral). A aquesta malaltia es dedicarà un

capítol especial atès que el seu estudi en població espanyola ha ocupat part del treball d'aquesta tesi.

La **NARP (neurogenic myopathy, ataxia and retinitis pigmentosa; MIM 551500)** es caracteritza per retard en el desenvolupament, retinopatia pigmentària, atàxia, demència, debilitat proximal i neuropatia sensitiva. L'inici de les manifestacions clíniques acostuma a donar-se a l'adult jove, i van progressant lentament. En aquests pacients s'han trobat les mutacions T8993G i T8993C, que afecten el gen de la subunitat 6 de l'ATPasa (c. V). El canvi T8993C acostuma a presentar un fenotip més lleu. Si la mutació és molt abundant (superior al 90%, detectada en sang i cervell) es produeix

TAULA 3. MALALTIES MITOCONDRIALS

DEFECTES PRIMARIS AL MTDNA

reordenaments

PEO
KSS
síndrome de Pearson
diabetis i sordesa

mutacions puntuals

a gens que codifiquen proteïnes

LHON: G11778A, T14484C, G3460A
NARP/síndrome de Leigh: T8993G/C
intolerància a l'exercici i immunoglobulinúria: citocrom b

a gens dels tRNA

MELAS: A3243G, T3271C, A3251G
MERRF: A8344G, T8356C
CPEO: A3243G, T4274C
miopatia: T14709C, A12320G
cardiomiopatia: A3243G, A4269G
diabetis i sordesa: A3243G, C12258A
encefalomiopatia: G1606A, T10010C
sordesa neurosensorial no sindròmica: A7445G

a gens dels rRNA

sordesa no sindròmica induïda per aminoglucòsids: A1555G

DEFECTES DEL NDNA

afecten directament la MRC

síndrome Leigh (c. I): subunitat AQP4 al cromosoma 5
síndrome de Leigh (c. II): subunitat Fp de la SDH al cromosoma 5
síndrome de Leigh (c. IV): gen a 9q1 que codifica SURF 1
atròfia òptica i atàxia (c. II): subunitat Fp de la SDH al cromosoma 5
cardioencefalomiopatia (c. IV): gen que codifica SCO2

afecten indirectament la funció mitocondrial; associats a delecions múltiples del mtDNA

PEO autosòmica dominant: gens *C10orf2* (10q24), *ANT1* (4q34-35), *POLG* (15q25), 3p14-21
MNGIE: gen timidina fosforilasa a 22q13.32-qter



una encefalopatia infantil anomenada **síndrome de Leigh d'herència materna** (o MILS, MIM 516060) que atura el desenvolupament psicomotor de nens de 6–12 mesos i que causa la pèrdua dels coneixements adquirits fins aleshores i l'aparició d'atròfia òptica, oftalmoplegia, tremolor i atàxia, entre d'altres símptomes. A una mateixa família poden trobar-se casos NARP i casos Leigh. Els afectes NARP tenen aproximadament el 70-90% de molècules mutants. Les mares, asimptomàtiques, poden arribar a presentar fins el 70% de les molècules de mtDNA mutants en sang.

La **síndrome de MELAS** (*mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*, MIM 251910) es caracteritza per quadres recurrents d'hemiparèsia i ceguesa cortical, acidosi làctica i episodis de vòmits. També pot donar-se deteriorament cognitiu i baixa estatura. Els pacients normalment desenvolupen sordesa bilateral al final de la infantesa o principi de l'adolescència, i diabetis, atacs i encefalopatia cap als 30–40 anys. A la majoria de casos es troba un defecte al complex I de la CRM causat per la mutació puntual A3243G al gen tRNA^{Leu}, però s'han descrit altres mutacions en el mateix gen o en gens diferents (COXIII, ND5, tRNA^{Val}, tRNA^{Cis}) associades a aquesta síndrome.

La **síndrome de MERRF** (*myoclonic epilepsy with ragged-red fibres*, MIM 254775) provoca epilèpsia mioclònica, atàxia i miopatia que s'inicien a la infantesa, i que poden derivar en demència progressiva, atròfia òptica, sordesa i acidosi làctica. Bioquímicament hi ha defectes als complexos III o IV, o en diversos altres, i les mutacions causants es localitzen al gen tRNA^{Lis} essent la més freqüent la A8344G (Enriquez 1995). Aquesta transició ha estat detectada també en algun pacient amb lipomatosi simètrica múltiple⁶ (Gamez 1998).

La **sordesa neurosensorial amb diabetis** (MIM 520000) és present en pacients amb la mutació A3243G i també en individus amb una deleció senzilla. En ambdós casos la sordesa s'inicia a l'adolescència i progressa lentament al llarg dels primers anys. Cap als 40 anys acostuma a aparèixer la diabetis.

Avui es coneixen més de 50 mutacions puntuals al mtDNA que causen una àmplia gamma de manifestacions clíniques.

OBSERVACIONS GENERALS

MITOMAP és una base de dades de mutacions del genoma mitocondrial, i la seva pàgina a Internet

<<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>> ofereix la informació disponible sobre les mutacions descrites.

El paper patogènic d'una mutació s'estableix en funció dels següents criteris:

- la mutació afecta un residu important des d'un punt de vista funcional i evolutivament conservat
- les mutacions deletèries acostumen a trobar-se en heteroplàsmia, malgrat existeixen algunes excepcions (per exemple, la mutació LHON G11778A)
- el grau d'heteroplàsmia entre els familiars ha de correlacionar amb la gravetat dels símptomes que presenten

Nombroses observacions clíniques han suggerit que les mutacions que afecten la síntesi proteica mitocondrial —mutacions puntuals a gens dels rRNA o tRNA i deleccions— causen malalties multisistèmiques, acidosi làctica i RRF. Mentre que les malalties associades a mutacions puntuals es transmeten mitjançant herència materna, les deleccions senzilles són fenòmens esporàdics en la gran majoria dels casos.

Fins a aquest moment els únics complexos de la CRM als quals s'han descrit mutacions patogèniques al DNA nuclear són l'I, el II i el IV, i pel que fa al complex IV, cap d'aquestes no afecta directament subunitats del complex sinó proteïnes necessàries per a l'encaixament de les subunitats. La manca de mutacions a subunitats "nuclears" dels complexos III, IV i V potser és deguda a què mutacions d'aquest tipus podrien ser incompatibles amb la vida. Les activitats dels complexos I i II són paral·leles, de forma que si un falla, la CRM pot seguir funcionant per l'acció de l'altre. En canvi, els complexos III, IV i V tenen un paper únic i seqüencial en la CRM i la fosforilació oxidativa (**FIGURA 3**, pàg. 11).

A diferència de la diversitat en l'expressió fenotípica que caracteritza a les mutacions al mtDNA, les mutacions al nDNA causen un fenotip ben concret des d'un punt de vista clínic com és el cas de la síndrome de Leigh.

⁶ La lipomatosi simètrica múltiple es caracteritza per acumulacions de greix subcutani al voltant de la cara, part posterior del cap, coll i braços, preferentment.



Existeix una sèrie de malalties associades a la depleció del mtDNA i delecions múltiples que es consideren el resultat d'alteracions en la comunicació entre nucli i mitocondri, més concretament entre els seus genomes. Hom pensa que en aquestes malalties les mutacions al nDNA interrompen l'intercanvi normal que controla la integritat i quantitat de mtDNA. La primera malaltia d'aquest tipus —la PEO autosòmica dominant— fou descrita l'any 1989 (Zeviani 1989) i en l'actualitat n'hi ha al voltant d'una desena més, entre les que fins fa poc es trobava la síndrome de Wolfram (vegeu la recopilació feta per Hirano i Vu (Hirano 2000)), qüestió ara debatuda⁷.

HI HA CORRELACIÓ GENOTIP/FENOTIP EN LES MALALTIES MITOCONDRIALS?

Com ja s'ha comentat anteriorment, la malaltia mitocondrial es caracteritza per l'afectació de diversos òrgans. A aquesta afectació multi-sistèmica cal afegir la variabilitat en l'expressió fenotípica —també entre membres de la mateixa família— que fa que de vegades passi molt temps fins que el pacient arriba a ser diagnosticat correctament. Sens dubte l'heteroplàsmia i l'efecte llindar són trets exclusius de la genètica mitocondrial que tenen un paper bàsic en aquests dos fenòmens.

Qualsevol tipus de mutació al mtDNA té potencialment com a conseqüència l'alteració en el funcionament de la CRM i la disminució de la producció d'energia en forma d'ATP. De quina manera, doncs, un mateix defecte es tradueix en problemes en uns òrgans o teixits però no en d'altres dins d'un mateix individu? Per què un determinat defecte provoca malaltia en una persona i no en una altra? L'existència de l'efecte llindar pot respondre d'un mode relativament simple aquestes qüestions: cada òrgan té un consum d'energia particular i no és estrany que el mateix percentatge de molècules de mtDNA mutants pugui comprometre el funcionament del nervi òptic i no el del fetge, per exemple.

Però hi ha molts altres factors que condicionen l'aparició de malalties mitocondrials —i la seva transmissió dins d'un pedigrí—, cosa que les fa particularment interessants des d'un punt de vista científic, però també especialment complicades

des d'una perspectiva mèdica. Certes mutacions al mtDNA heretades per via materna predisposen a una varietat de malalties neurodegeneratives, i la gravetat de les mutacions correlaciona amb l'edat d'inici de les malalties. Si les mutacions s'han heretat via materna és que són presents en l'individu des del naixement, aleshores, què és el que retarda l'aparició dels primers símptomes de malaltia? Es pensa que l'acumulació secundària de mutacions al mtDNA en teixits postmitòtics associada a l'edat pot ser el factor que engega l'aparició dels primers símptomes. Els individus que hereten un defecte "menor" al mtDNA necessitaran un major nombre de mutacions somàtiques per a arribar al llindar que comprometi la funcionalitat del teixit mutant i, per tant, poden viure la major part de la seva vida sense manifestacions clíniques. En canvi si la mutació heretada és deletèria, la capacitat respiratòria de l'individu serà limitada des del principi i caldran menys mutacions somàtiques per a l'aparició de la malaltia⁸.

Una altra "complicació" de les malalties mitocondrials és el fet que dins d'una família la mateixa mutació pugui tenir efectes fenotípics diferents. És possible que les molècules de mtDNA mutants del zigot es distribueixin de maneres diferents al llarg de les divisions cel·lulars que succeeixen durant el desenvolupament embrionari. Així, en un individu les molècules de mtDNA mutants es podrien acumular al cervell i múscul esquelètic, mentre que en el germà —per exemple— es poden acumular al miocardi. A propòsit d'això, ¿què és el que determina el nivell de mtDNA mutant als oòcits? Aquest és un tema que s'està estudiant amb interès per part dels grups més importants dins del camp de la genètica mitocondrial.

Una dona amb una mutació heteroplàsmica pot transmetre una quantitat variable de mtDNA mutant a cada fill. Llavors, ¿hi ha selecció en la transmissió de mutacions patogèniques, o s'hereten com a variants gèniques neutres? S'han descrit casos en els quals una mutació nova s'ha fixat en molt poques generacions, el que suggereix que existeix algun procés que fa que només una petita proporció de les aproximadament 100.000 molècules de mtDNA que contenen els oòcits sigui transmesa a les cèl·lules filles, l'anomenat **coll d'ampolla genètic**. Un cop superat aquest, el mtDNA es replicaria

⁷ Dins de l'apartat **Síndrome de Wolfram o DIDMOAD** (pàg. 39) s'amplia aquest tema en ser aquesta una de les malalties estudiades durant aquesta tesi.

⁸ A l'apartat **L'envelliment i el paper dels radicals lliures** (pàg. 26) es parla més extensament de l'acumulació de mutacions somàtiques amb l'edat.



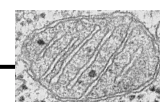
fins a assolir la quantitat normal, i les molècules es distribuïrien a l'atzar entre les cèl·lules filles. Grans diferències en la proporció de molècules de mtDNA mutants entre una progènie indiquen que hi ha hagut, en algun moment (durant l'oogènesi, l'embriogènesi...), un procés de restricció del nombre de molècules per cèl·lula seguit d'una amplificació. Un coll d'ampolla a la línia germinal provoca deriva genètica d'una manera ràpida, de forma que o es perd directament la mutació, o alternativament es generen individus que són homoplàsmics per a la nova mutació, exposant-la a les forces de la selecció natural que operarien a nivell de l'individu. Chinnery *et al.* creuen que l'efecte del coll d'ampolla a la línia germinal té una "utilitat" evolutiva ja que suposa la pèrdua de mutacions mitjanament deletèries abans que s'acumulin a la població, però a curt termini pot ocasionar problemes a l'individu ja que les mutacions que "superen" el coll d'ampolla, tendiran a ser homoplàsmiques amb rapidesa (Chinnery 2000b). En un treball més recent del mateix grup en el qual estudien 82 oòcits primaris d'una dona amb la mutació MELAS A3243G (amb el 18% de molècules mutants a quàdriceps i el 7% a leucòcits) s'afirma que és la deriva genètica el que determina la proporció de mtDNA mutant als oòcits primaris humans (Brown 2001), tal com s'havia determinat per a ratolins (Jenuth 1996).

Si bé a la línia germinal no sembla, doncs, existir selecció genètica, hom pensa que per algunes mutacions al mtDNA —especialment aquelles amb efectes fenotípics més greus— sí es donen fenòmens de selecció al llarg de la vida de l'individu. En alguns teixits la selecció provoca una disminució de la quantitat de mtDNA mutant, mentre que en d'altres un increment. En poblacions de cèl·lules mare que es divideixen ràpidament, el mtDNA mutant pot ser eliminat per selecció que actuï a nivell de cèl·lula. La segregació replicativa pot resultar en quantitats elevades de mtDNA mutant en algunes cèl·lules mare, i en quantitats baixes en unes altres. Les primeres potser no es podran dividir, però les segones és probable que es divideixin normalment. Potser és un mecanisme similar el que fa que disminueixi el nivell de la mutació A3243G en sang amb el temps (t Hart 1996). En canvi, en altres casos i en altres teixits la quantitat de molècules mutants pot augmentar amb el temps, i de vegades, l'increment s'ha relacionat amb l'evolució de la malaltia (Larsson 1990; Weber 1997). Les raons per a aquesta "selecció" positiva són desconegudes, però sovint s'ha parlat d'un intent de compensar les deficiències en la CRM mitjançant la replicació selectiva del

mtDNA en mitocondris amb un funcionament alterat per la presència de mtDNA mutant (Shoubridge 1990; Yoneda 1992).

La genètica mitocondrial té un important component quantitatiu. Utilitzant un sistema *in vitro* d'híbrids transmitocondrials (o **cíbrids**, dels quals es donen més detalls a l'apartat **Cíbrids transmitocondrials**, pàg. 29), el grup del professor Giuseppe Attardi determinà que un 10% de molècules de mtDNA salvatges és capaç de complementar la síntesi de proteïnes i el funcionament de la CRM per a les mutacions MELAS A3243G i MERRF A8344G, dues de les mutacions puntuals més freqüents en encefalopaties (Attardi 1995). Attardi pensa que la **complementació** es dona perquè els productes generats a partir del 10% (o més) de molècules normals interacciona amb els productes defectuosos del 90% de molècules mutants, més que no pas perquè per a mantenir la capacitat energètica normal només calgui un 10% de molècules salvatges. En un altre estudi amb cíbrids aquest cop preparats a partir d'un pacient amb PEO (amb deleccions al mtDNA) s'observà complementació dels tRNA no transcrits per les molècules mutants quan el percentatge de molècules salvatges era superior al 40% (Hayashi 1991). L'aparent discrepància entre les dues xifres no és tal segons Attardi ja que el seu grup ha determinat una capacitat d'aminoacilació del tRNA^{Lis} en cèl·lules transformants portadores de la mutació MERRF del 40-50% respecte transformants salvatges (Attardi 1995).

Pel que fa a dades sobre pacients amb aquestes mutacions, s'ha vist que existeix correlació entre la freqüència de les manifestacions clíniques més habituals i la proporció de mtDNA mutant a múscul, però no a sang (Chinnery 1997). Els autors creuen que la manca de correlació en el cas de la mutació MERRF en sang pot ser deguda a la petita mida de la mostra analitzada, ja que normalment els individus amb la mutació A8344G tenen els mateixos percentatges a múscul que a sang. En aquest treball, en el qual els pacients s'agrupen d'acord amb el percentatge de mtDNA mutant que presenten —tant a múscul com a sang— i segons els símptomes clínics que pateixen, s'observa que la mutació MELAS A3243G causa manifestacions fenotípiques a partir d'un 30% de molècules mutants, i la mutació MERRF A8344G a partir del 70%. Aquestes xifres són molt inferiors al 90% establert en experiments *in vitro*, però Chinnery *et al.* pensen que dins d'un òrgan es pot donar una acumulació de mutacions a algunes cèl·lules i no



a d'altres, cosa que afecta igualment el seu funcionament, però que fa que el percentatge mig al teixit sigui baix. Així, individus amb menys del 60% de mtDNA mutant a algun teixit del sistema nerviós central (SNC) poden arribar a patir síndromes neurològiques molt greus.

A banda de diferències quant a percentatge d'heteroplàsmia i susceptibilitat particular de cada teixit, hi ha altres factors (genètics i ambientals) que poden determinar unes manifestacions clíniques completament diferents per a dues persones amb la mateixa mutació mitocondrial. En experiments amb híbrids s'ha vist que l'entorn nuclear de la cèl·lula que rep artificialment la mutació MELAS A3243G pot influenciar la segregació de les molècules de mtDNA mutants, de manera que en uns casos aquestes molècules estiguin afavorides mentre que en d'altres, es tendeixi a la seva eliminació (Dunbar 1995). L'entorn nuclear també pot tenir un paper clau en la manifestació fenotípica de la sordesa no sindròmica associada a la mutació A1555G (Guan 2001). Fins i tot és possible que en determinades situacions existeixin interaccions entre les mateixes molècules de mtDNA que puguin condicionar les repercussions clíniques de les mutacions. En aquest sentit, s'ha descrit l'aparició d'una segona mutació al mtDNA capaç de suprimir l'efecte patogènic de la mutació introduïda A3243G (El Meziane 1998).

MALALTIES NEURODEGENERATIVES

S'ha especulat que les neurones poden ser especialment vulnerables a la disminució del metabolisme mitocondrial que se suposa acompanya el procés d'envelliment. El teixit neuronal és postmitòtic, i conseqüentment s'hi poden acumular mutacions espontànies al mtDNA que no seran eliminades en no haver-hi selecció clonal per divisió cel·lular. La disfunció mitocondrial pot generar radicals lliures i dany oxidatiu, factors implicats en la patogènesi de les malalties neurodegeneratives. Dins d'aquest important conjunt de malalties s'han descrit

anomalies a la CRM associades a defectes primaris al mtDNA i també com a conseqüència de mutacions a gens nuclears directament implicats en funcions mitocondrials, com per exemple els gens que codifiquen les proteïnes SURF1, frataxina i paraplegina. També s'han observat defectes en la fosforilació oxidativa i una producció incrementada de radicals lliures en malalties neurodegeneratives no causades per defectes al mitocondri. En aquests casos es pensa que la disfunció mitocondrial és probablement un epifenomen que, en tot cas, contribueix a precipitar la mort cel·lular del teixit.

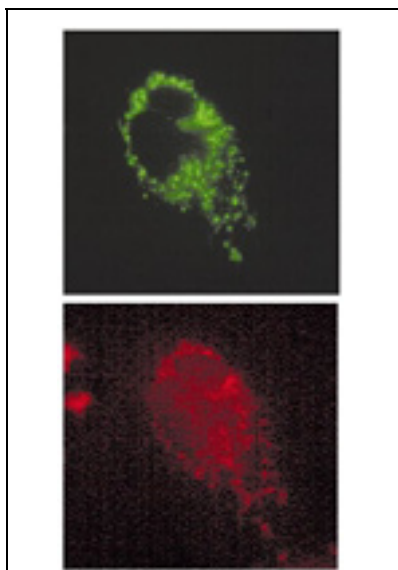


FIGURA 6.

Localització mitocondrial de la paraplegina. Immunofluorescències amb cèl·lules COS-7 transfectades amb el cDNA de la paraplegina marcat amb la seqüència per l'epítip c-myc. Baix, tinció amb un anticòs anti-c-myc. Baix, tinció amb rodamina utilitzant un anticòs policlonal anti proteïna mitocondrial que s'uneix a cadena senzilla (mtSSB). S'observa que la paraplegina colocalitza amb la mtSSB en el mitocondri. [imatge extreta de (DiMauro 1998), cedida per A. Ballabio i G. Casari].

A continuació es presenta un recull breu de les principals malalties neurodegeneratives i del paper que hi tenen els mitocondris.

La **paraplegia espasmòdica hereditària** és una malaltia caracteritzada per rigidesa progressiva a les cames, hiperreflèxia i dificultats per caminar. Afecta a la infantesa o més tard a l'adolescència. S'han descrit diverses formes d'herència de la malaltia. En famílies que pateixen la forma autosòmica recessiva s'han identificat deleccions homozigòtiques i mutacions de canvi de pauta de lectura en el gen responsable *SPG7* (paraplegina), a la regió 16q24.3. La paraplegina té una gran homologia amb Zn—metal·loproteases dependents d'ATP que són actives als mitocondris. La seva localització mitocondrial es va descobrir mitjançant tècniques immunohistoquímiques (**FIGURA 6**). Curiosament, no va ser fins després d'aquests experiments que no es van analitzar músculs esquelètics de malalts i s'hi van identificar RRF i fibres COX negatives.

L'**atàxia de Friedreich** és l'atàxia hereditària més comú (prevalença aproximada: 1/50.000) que es caracteritza per l'atàxia progressiva d'extremitats, cardiomiopatia i diabetis. La malaltia apareix abans dels 25 anys, i es transmet de manera autosòmica recessiva. El gen s'anomena frataxina i es localitza a 9q13, i a la major part dels casos l'alteració genètica és una expansió GAA al primer intró. Les mutacions provoquen una disminució en l'expressió de la proteïna, que es troba a diversos teixits i al SNC



és abundant al cerebel i medul·la espinal. Dins de la cèl·lula, la frataxina es localitza al mitocondri, on podria intervenir en l'homeòstasi del ferro, ja que en teixits afectats s'ha descrit un increment de ferro i una disminució de les activitats dels complexos I, II, III i aconitasa, els quals contenen grups de ferro i sofre.

A la **malaltia de Wilson**, en canvi, el que s'han descrit són alteracions en el metabolisme del coure. Es tracta d'una condició autosòmica recessiva a la que es pateix distonia i parkinsonisme, símptomes psiquiàtrics i fallada hepàtica. L'alteració en l'homeòstasi del coure resulta en l'acumulació del metall a fetge, als ganglis basals del cervell i al ronyó. El gen associat a la malaltia (*WND*) codifica una ATPasa tipus P transportadora de coure. La proteïna *WND* existeix en dues isoformes, una que es troba a la xarxa del complex de Golgi, i l'altra que es troba al mitocondri. Els mitocondris de teixits afectats presenten unes anomalies característiques, i malgrat no es coneix la funció de la *WND* es pensa que la isoforma mitocondrial podria tenir un paper en les funcions dels enzims mitocondrials dependents de coure.

L'**esclerosi lateral amiotròfica** (ALS) és una malaltia degenerativa que apareix cap als 40-50 anys aproximadament, i que en un temps mig de tres anys comporta la paràlisi i la mort de l'individu. La major part dels casos són esporàdics i de causes desconegudes. Entre un 10 i un 20% dels pacients són casos familiars i d'entre aquests, en un 10% s'han trobat mutacions al gen de la superòxid dismutasa (Rosen 1993), gen essencial per a l'eliminació de radicals $O_2^{\bullet-}$, els quals no són especialment tòxics però poden transformar-se en radicals hidroxil ($\bullet OH$) que sí ho són. D'aquesta manera, s'ha suggerit que l'ALS es produiria en casos en què s'alterés l'equilibri de les ROS i es produís dany oxidatiu mitocondrial.

La **malaltia de Huntington** (HD) és autosòmica dominant amb una penetració completa en els adults. Es caracteritza per moviments coreoatetòsics⁹ i per alteracions progressives emocionals i de reconeixement. Està causada per repeticions del triplet CAG al gen *IT15* en el cromosoma 4 que codifica la huntingtina, una proteïna encara de funció desconeguda. Pels resultats obtinguts a partir de teixits *in vivo* i *post mortem*, es creu que pot existir un defecte en el metabolisme energètic malgrat no es coneix

encara per quin mecanisme la huntingtina anòmala causaria la disfunció mitocondrial.

Diversos treballs apunten a una implicació mitocondrial també en malalties com el **Parkinson** i l'**Alzheimer**. A la substància nigra de malalts de Parkinson es va detectar deficiència del complex I i un increment del dany oxidatiu (Mecocci 1994). Moltes neurotoxines emprades com a pesticides o herbicides alteren el funcionament mitocondrial i són utilitzades en l'actualitat com a models de malalties neurodegeneratives. La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina (MPTP) —que causa parkinsonisme a humans, primats i altres mamífers— té com a dianes les neurones dopaminèrgiques de la substància nigra i es concentra dins dels mitocondris. Es metabolitza a 1-metil-4-fenilpiridini (MPP⁺), que inhibeix selectivament el complex I i també provoca la disminució del nombre de còpies del mtDNA.

La **malaltia d'Alzheimer** (AD) és la demència més freqüent a la vellesa. Un 5% dels casos es transmeten de forma autosòmica dominant i són causats per mutacions en el gen de la proteïna precursora amiloide o presenilina. La gran majoria de pacients amb AD representen casos esporàdics sense que es conegui el defecte genètic que els origina. Neuropatològicament es caracteritzen per la presència de cabdells neurofibril·lars i de plaques amiloides, i per pèrdua neuronal. En cervells de malalts s'ha vist que l'activitat COX està reduïda. Diverses mutacions al mtDNA s'han associat amb l'AD, però no s'ha demostrat un paper d'aquestes en la patogènesi de la malaltia. Benjamín Rodríguez, en el nostre grup, ha estudiat mostres de cerebel, còrtex frontal i hipocamp de cervells AD, i no ha detectat reordenacions ni quatre mutacions puntuals al mtDNA associades a AD (B. Rodríguez, en premsa). Sí ha detectat, però, una reducció en el contingut de mtDNA en còrtex frontal del 28% respecte a cervells controls, tot i que aquesta diferència no és estadísticament significativa, potser degut a la mida de la mostra (12 cervells AD i set cervells controls) (Rodríguez-Santiago 2001).

L'escassa disponibilitat de mostres de teixit cerebral humà sens dubte limita enormement l'estudi de les malalties neurodegeneratives. La generació de models animals *knock-out* als quals es redueixi la producció d'energia de diferents àrees del cervell potser aportarà algun indici sobre els mecanismes patogènics d'alguna d'aquestes greus malalties.

⁹ Moviments involuntaris ràpids, desordenats i irregulars de predomini facial i de la part distal de les extremitats.



L'ENVELLIMENT I EL PAPER DELS RADICALS LLIURES

Diverses funcions mitocondrials es veuen afectades per l'edat. Els factors que hi contribueixen inclouen el pas intrínsec de protons a través de la membrana mitocondrial interna, la disminució en la fluïdesa de les membranes, i reduccions en la quantitat i funció de la cardiolipina, que té un paper molt important ja que facilita la tasca d'enzims de la membrana interna (Ames 1995).

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la taxa de mutació del mtDNA és més de 10 vegades superior a la del DNA nuclear. Mentre que mutacions a cèl·lules de la línia germinal provoquen malalties d'herència materna, l'acumulació de mutacions somàtiques en teixits postmitòtics pot tenir com a conseqüència el declivi progressiu del metabolisme mitocondrial observat en el desenvolupament de malalties heretades i també en l'envelliment. L'inici tardà i el curs progressiu de moltes malalties mitocondrials suggereixen que el funcionament dels mitocondris va empitjorant amb el temps.

Diversos treballs han descrit increments estadísticament significatius en l'acumulació de mutacions somàtiques al mtDNA amb l'edat, tant delecions com mutacions puntuals (Corral-Debrinski 1992; Cortopassi 1992; Liu 1998). El que no és tan clar però, és si l'envelliment implica la disminució de l'activitat de la CRM. Mentre hi ha estudis als que es detecten reduccions en l'activitat d'alguns complexos, altres no troben correlació entre edat i capacitat energètica del múscul (Barrientos 1996a; Chretien 1998; Kopsidas 1998). És possible que aquests resultats contraposats siguin conseqüència de diferències quant a factors com el grau d'exercici o el consum de tabac o altres substàncies tòxiques en els grups estudiats pels diversos laboratoris. En qualsevol cas, no és especialment sorprenent que l'envelliment no impliqui necessàriament una reducció de l'activitat OXPHOS de l'individu si es considera que l'increment de mutacions mitocondrials en persones grans (del 0,1 al 10%) és molt inferior a, per exemple, el percentatge de delecions necessari per a la disminució de l'activitat COX en experiments *in vitro* amb cèl·lules d'un pacient amb PEO (50-60%) (Hayashi 1991).

La **teoria mitocondrial de l'envelliment** proposa que si les espècies d'oxigen reactiu (o ROS) que es generen com a subproductes de la cadena respiratòria es produeixen en excés i no

són neutralitzades pels mecanismes antioxidants de què disposa la cèl·lula, poden reaccionar amb el mtDNA i danyar-lo. Això afectarà el funcionament de la pròpia CRM, i aleshores es produiran més radicals lliures. Aquest cercle viciós pot comportar una disminució en la producció d'ATP que alteraria el potencial transmembrana i induiria la cèl·lula cap a l'apoptosi (vegeu l'apartat **Apoptosi**, pàg. 12). L'excés d'oxidants també pot afectar els lípids de membrana, proteïnes i altres macromolècules.

Barja i Herrero han demostrat que espècies animals amb una menor durada de vida presenten més dany oxidatiu en cervell i cor que altres espècies de longevitat superior¹⁰ (Barja 2000). La implicació de les espècies ROS en l'envelliment ha estat confirmada per estudis a *D. melanogaster*, *C. elegans* i ratolí. La sobreexpressió del gen de la superòxid dismutasa a motoneurons de *Drosophila* va aconseguir incrementar un 40% el període de vida de les mosques (Parkes 1998). I ja s'ha esmentat anteriorment l'existència de mutacions en aquest gen a humans afectats per esclerosi lateral amiotròfica (pàg.25).

La **FIGURA 7** il·lustra els fenòmens que poden participar en el procés de l'envelliment i les malalties neurodegeneratives. Les mutacions somàtiques són probablement conseqüència del dany oxidatiu, que s'incrementa amb l'edat tant a ratolins com a humans (Ames 1993; Mecocci 1993). Diversos treballs suggereixen que les mutacions somàtiques s'acumulen amb l'edat a teixits postmitòtics a causa del dany ocasionat per les ROS. La disminució de la fosforilació oxidativa resultant alteraria la capacitat energètica del teixit fins ultrapassar un determinat llindar a partir del qual apareixeria l'envelliment (Wallace 1999a) i símptomes o malalties degeneratives que sovint l'acompanyen (problemes cardiovasculars, disfunció cerebral, cataractes, càncer, afectació del sistema immunològic...).

En un treball d'aquest any 2001 Elson *et al.* (Elson 2001b) dissenyen i apliquen un model per a la replicació del mtDNA que explica l'acumulació de mutacions somàtiques al mtDNA amb l'edat. Conclouen que la replicació mitocondrial (que és independent de la divisió cel·lular i segueix ocorrent també en teixits postmitòtics) pot provocar —sense l'existència

¹⁰ Aquest treball també demostra que el dany oxidatiu (mesurat en forma de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina) al mtDNA és com a mínim tres vegades superior al del nDNA, tant en cervell com en cor.



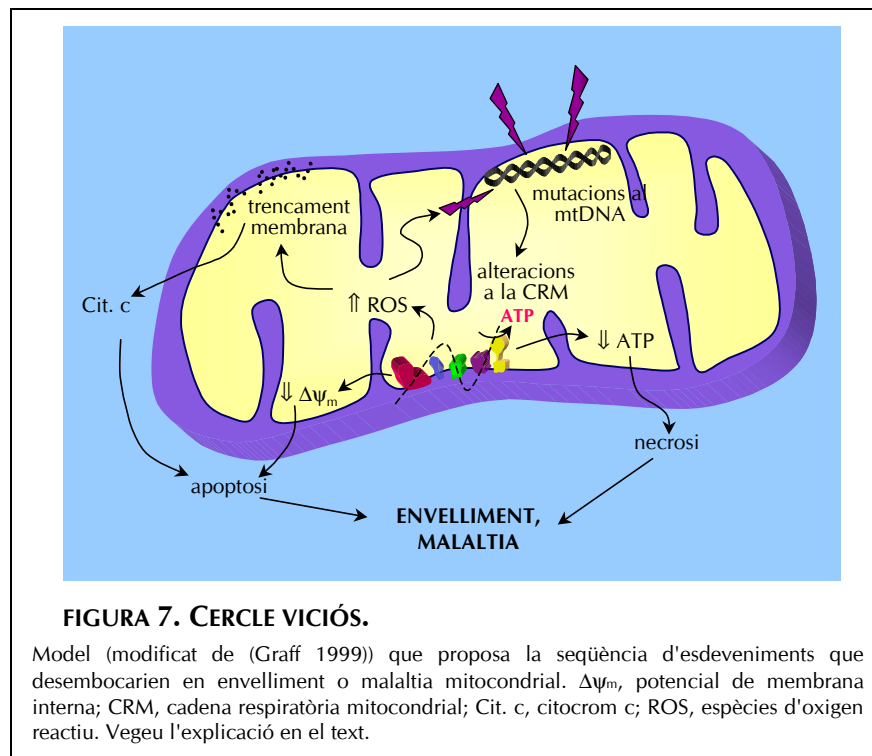


FIGURA 7. CERCLE VICIÓS.

Model (modificat de (Graff 1999)) que proposa la seqüència d'esdeveniments que desembocarien en envelliment o malaltia mitocondrial. $\Delta\psi_m$, potencial de membrana interna; CRM, cadena respiratòria mitocondrial; Cit. c, citocrom c; ROS, espècies d'oxigen reactiu. Vegeu l'explicació en el text.

d'avantatges replicatius— un canvi substancial en la quantitat de molècules de mtDNA mutants dins d'una cèl·lula al llarg de la vida d'un individu. Mantenen que les mutacions somàtiques susceptibles de provocar un efecte patogènic han d'aparèixer probablement durant la infantesa o joventut, ja que en cas de succeir en una fase més tardana de la vida de l'individu, no podrien acumular-se en proporcions suficients per a causar la malaltia.

Si les premisses d'aquest grup són correctes, les conseqüències biològiques del "cercle viciós" proposat per a explicar l'envelliment i la malaltia mitocondrial podrien ser mínimes, per tal com les noves mutacions originades pel dany oxidatiu no tindrien temps d'assolir un percentatge patogènic.

EINES PER AL DIAGNÒSTIC I L'ESTUDI DE LES MALALTIES MITOCONDRIALS

L'estratègia bàsica que cal seguir davant la sospita d'una malaltia mitocondrial es recull a la **FIGURA 8**, pàg. 28, modificada de (Nardin 2001) i (Chinnery 1999). Ambdós treballs remarquen la necessitat de realitzar tota una sèrie de proves clíniques en els pacients amb símptomes neuromusculars abans d'endegar la recerca del possible defecte mitocondrial, ja que per aquesta pot ser necessària una biòpsia muscular. Algunes malalties mitocondrials (com per exemple la MERRF o la LHON) sovint poden ser diagnos-

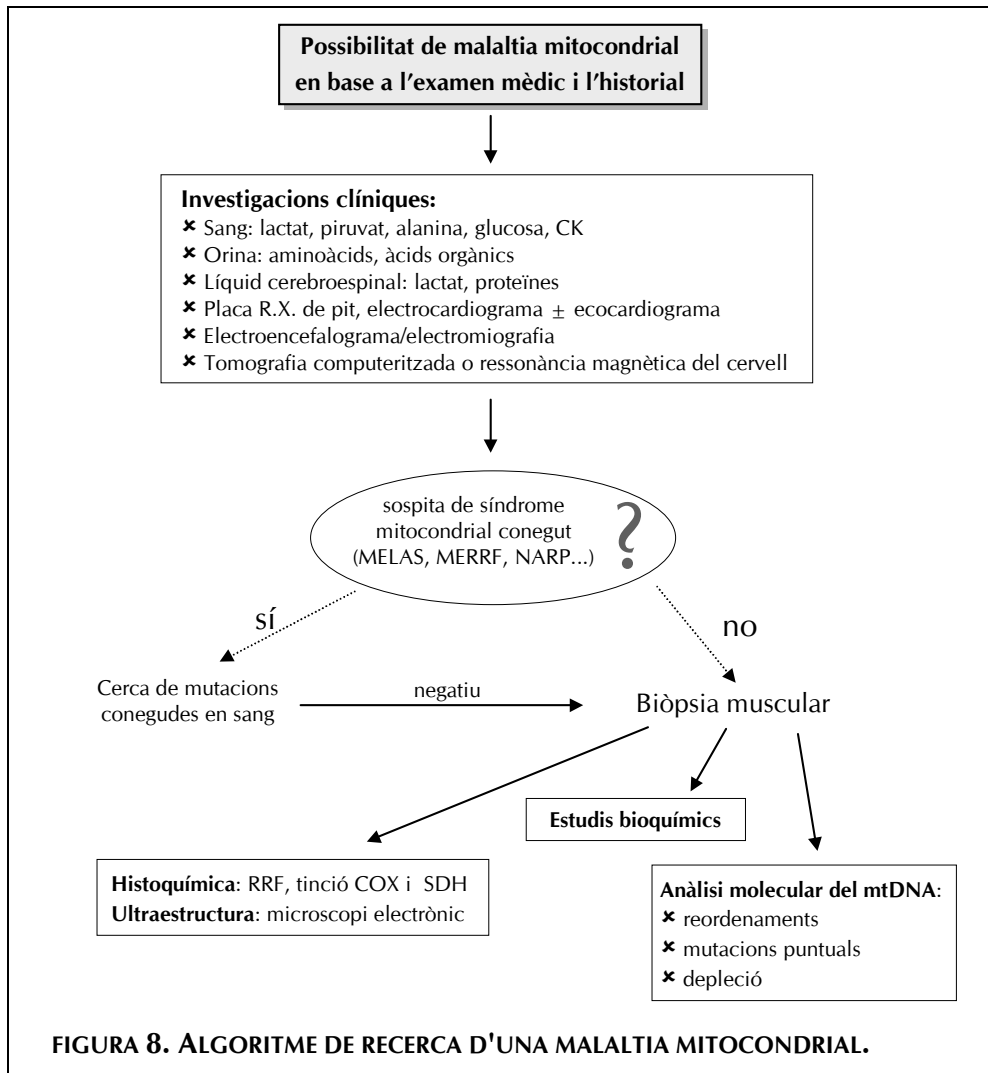
ticades a partir de mostres de sang, però en d'altres casos (MELAS, KSS, PEO...) la quantitat de mtDNA mutant en sang és molt baixa o inexistent.

Si el pacient no presenta cap de les mutacions mitocondrials més freqüents (LHON, MELAS o MERRF), caldrà analitzar una mostra de múscul. La quantitat de mtDNA mutant pot variar d'òrgan a òrgan, però també de cèl·lula a cèl·lula, per això molts experts prefereixen realitzar una biòpsia normal en lloc d'una biòpsia amb agulla que causa moltes menys molèsties. Un cop s'ha obtingut el teixit muscular es poden iniciar tres grans grups d'estudi: els histològics, els bioquímics i els genètics (**FIGURA 8**, pàg. 28).

La presència de RRF¹¹ és freqüent en casos de deleció, depleció del mtDNA o en mutacions puntuals als gens dels tRNA; en canvi, rarament es detecten quan existeixen mutacions a gens estructurals. Per aquest motiu es creu que aquestes fibres anormals apareixen com a conseqüència d'una síntesi de proteïnes mitocondrials alterada. Un altre sistema per a identificar anomalies mitocondrials és tenyir el tall histològic per a comprovar l'activitat de la citocrom c oxidasa. Les fibres COX-negatives revelen un defecte en el complex IV. Si el defecte

¹¹ Vegeu l'apartat **Classificació de les malalties mitocondrials**, pàg. 18.





es troba a un altre complex, les fibres són COX-positives.

Les proves bioquímiques determinen l'activitat individual dels complexos mitocondrials. A més, estudien el funcionament global de la CRM acoblada a l'OXPPOS a partir de mitocondris aïllats de teixit fresc. Si hi ha diversos complexos afectats és probable que existeixi alguna alteració de la síntesi proteica mitocondrial. Quan només un complex és afectat, pot ser resultat d'una mutació a un gen que codifica algun polipèptid que el constitueix. Si el complex II és deficient, el defecte molecular caldrà buscar-lo al DNA nuclear, atès que no està constituït per cap subunitat codificada al mtDNA. L'heteroplàsmia i la complementació (vegeu la pàg. 23 dins l'apartat **Hi ha correlació genotip/fenotip en les malalties mitocondrials?**) fan que sigui difícil identificar déficits enzimàtics.

Aquestes proves són les que estableixen si existeix o no alguna alteració mitocondrial en l'individu amb senyals i símptomes sospitosos de malaltia mitocondrial, independentment que la causa es trobi al mateix mitocondri o fora d'ell. Per a determinar aquest darrer punt cal l'anàlisi molecular del mtDNA, i si aquest no dona resultats positius s'haurà de contemplar la possibilitat d'un defecte al DNA nuclear.

Les tècniques bàsiques per a l'estudi molecular del mtDNA són la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) —tant l'estàndard com la llarga, que pot amplificar la molècula sencera de mtDNA— i el *Southern blot*. La seqüenciació del genoma mitocondrial és una altra eina, però cal tenir present que el mtDNA és altament polimòrfic i que, a més de la mutació responsable del fenotip del pacient, poden identificar-se canvis sense cap efecte perjudicial (els criteris per a considerar una mutació com a patogènica es troben resumits a la pàg. 21). També és important



tenir en compte que si s'està analitzant un teixit que no és el diana, es poden obtenir seqüències completament normals en pacients heteroplàsmics per a mutacions causants de malaltia. Una altra font de "falsos negatius" pot ser l'amplificació de pseudogens mitocondrials al DNA nuclear, per la qual cosa és important fer una bona selecció dels encebadors que s'han d'emprar en les PCR.

Pel que fa a l'estudi dels mecanismes patofisiològics de les malalties mitocondrials, les tècniques utilitzades són diverses: hibridació *in situ*, PCR en fibra muscular aïllada, cultiu de mioblasts¹², fibroblasts i limfoblasts, generació de línies de híbrids, preparació de models animals.

Aquesta darrera eina no s'ha aconseguit fins molt darrerament, a causa de la dificultat que suposa obtenir models animals adequats. En l'actualitat es disposa de ratolins amb deficiència crònica d'ATP causada per la inactivació del gen nuclear *ANT1* (translocador de nucleòtids d'adenina); altres porten mutacions que inactiven els gens nuclears que codifiquen la superòxid dismutasa mitocondrial; també existeixen ratolins amb el gen nuclear que codifica el factor de transcripció mitocondrial *Tfam* inactivat, que pot ser un model per a les malalties amb depleció del mtDNA (Wallace 1999a). Darrerament s'ha aconseguit un ratolí amb una deleció al mtDNA patogènica, el que permetrà desenvolupar estudis sobre la seva transmissió i la segregació en els diferents teixits (Inoue 2000); també s'ha descrit un ratolí amb una mutació natural al mtDNA que provoca sordesa (Johnson 2001). És previsible que en un futur no gaire llunyà apareixeran dades molt interessants sobre aquests models animals, que a més potser podran ésser aprofitades per a crear noves estratègies terapèutiques. En el camp de les malalties neurodegeneratives tindrà un gran valor el desenvolupament d'animals que presentin una producció d'energia selectivament disminuïda en diverses regions del cervell.

¹² Les fibres musculars són sincicis polinucleats postmitòtics, per la qual cosa no és possible el seu cultiu. Els mioblasts són cèl·lules satèl·lit que les envolten i que conserven la capacitat de dividir-se, per tant es poden aïllar d'una biòpsia muscular i establir un cultiu primari a partir d'ells. Si s'indueix la diferenciació dels mioblasts, aquests es fusionen i formen miotubs, de manera que es pot estudiar com una determinada mutació al mtDNA afecta la diferenciació muscular. També han estat usats per a l'estudi de la traducció mitocondrial.

CÍBRIDS TRANSMITOCONDRIALS

Sens dubte una de les tècniques que més dades ha aportat al coneixement de les malalties mitocondrials ha estat la preparació de híbrids mitocondrials. Aquesta metodologia consisteix a fusionar mitocondris de pacients amb línies cel·lulars que contenen mitocondris "buits" de mtDNA. La **FIGURA 9** (pàg. 30) esquematitza tot el procés.

Va ser el grup del doctor Attardi el que va aconseguir establir per primera vegada una línia cel·lular sense mtDNA (King 1989). Per tal de seguir la nomenclatura emprada amb els equivalents a llevat, aquestes cèl·lules van ser anomenades ρ^0 (rho zero). La forma més freqüent d'obtenir les cèl·lules ρ^0 és afegir bromur d'etidi (a una concentració ~ 50 ng/mL) al medi de cultiu de línies cel·lulars establertes. A baixa concentració, el bromur d'etidi inhibeix la síntesi del mtDNA però no afecta la síntesi del nDNA. Després de n divisions (al voltant de 15 generacions) les cèl·lules han perdut tot el mtDNA. Els mitocondris mantenen el potencial de membrana utilitzant el translocador de nucleòtids d'adenina i l'ATP generat a la glucòlisi, però han perdut la capacitat de sintetitzar els polipèptids de la CRM i en conseqüència, no "respiren". Les cèl·lules ρ^0 creixen en un medi amb glucosa enriquida amb piruvat¹³ i generalment uridina (50 μ g/mL), com a font de pirimidines, ja que la síntesi d'aquestes està interrompuda per la manca d'un transport d'electrons funcional.

S'han preparat cèl·lules ρ^0 a partir de línies establertes de cèl·lules de carcinoma de pulmó, de cèl·lules HeLa, de cèl·lules derivades de fibroblasts i de la línia 143B Tk⁻ derivada d'un osteosarcoma. Aquesta línia és deficient en timidina-quinasa, fet que la fa resistent a la bromodesoxiuridina i que és aprofitat com a marcador nuclear recessiu per a la selecció. Aquestes cèl·lules sense mtDNA es poden congelar i utilitzar posteriorment, com qualsevol altra línia establerta.

¹³ A una concentració de 100 μ g/mL. El piruvat pot ser necessari com a substrat de la lactat deshidrogenasa per a oxidar el NADH citosòlic.

