



MATERIALS I MÈTODES

APÈNDIX

Aquest apartat té la intenció de donar una visió general dels procediments seguits a partir de l'obtenció d'una mostra de pacient, i de descriure els mètodes no detallats als articles, així com també els que han estat modificats o presenten alguna particularitat especial.

COMENTARIS PREVIS

Tot el treball que aquí es recull ha estat supeditat a la disponibilitat de mostres de pacients. Tan sols molt recentment hem aconseguit fibroblasts d'una família amb la síndrome de Wolfram distribuïts comercialment. Encara que aquest no és un teixit diana, per causa de la manca d'accés a mostres d'òrgans afectats en la síndrome, ens ha semblat interessant generar híbrids a partir d'aquests fibroblasts i analitzar el seu comportament. Els estudis amb aquestes cèl·lules encara s'estan desenvolupant i per això no s'inclouen en aquesta memòria.

La majoria de mostres recollides han estat de sang, i convé recordar que aquest teixit és adequat per a estudiar algunes malalties (LHON, MERRF), però no ho és per moltes altres. El problema rau en què l'alternativa a aquest tipus d'espècimen comporta una biòpsia muscular, que és una pràctica agressiva a la qual no tots els pacients accedeixen. A més, de vegades el pacient es troba en un estat de salut que no aconsella la realització de la biòpsia. Per una altra banda, alguns dels metges que fan arribar les mostres al laboratori de genètica molecular no són conscients de la importància de treballar amb teixits diana de la malaltia i que la manca d'anomalies mitocondrials en teixits no diana NO descarta les mateixes en teixits afectats en la malaltia. Així doncs, en nombroses ocasions no es disposa del teixit més adient per a l'estudi dels mitocondris del malalt. A l'hora d'analitzar els resultats, cal doncs tenir molt present quina és la malaltia que s'està investigant i sobre quines mostres s'han fet els estudis.

Si s'ha realitzat biòpsia, el material disponible és lògicament escàs ja que l'extracció s'acostuma a distribuir per a les proves bioquímiques, les histològiques i les genètiques. Això fa que els estudis estiguin limitats per la quantitat de DNA extret, i que sovint es prefereixi disposar de més DNA que no pas de RNA.

Ja s'ha comentat a la **INTRODUCCIÓ** que els afectats per la síndrome de Wolfram acostumen a morir sense haver superat la cinquantena d'anys. Malauradament, durant el temps en què el nostre grup s'ha dedicat a l'estudi d'aquesta síndrome han mort quatre pacients. Aquesta desgràcia, en determinades ocasions, permet l'estudi de teixits diana de la síndrome a partir de mostres recollides en autòpsia, amb una probabilitat més gran d'obtenir informació sobre la patogènesi de la malaltia. Però això no ha estat possible en els casos presentats aquí, potser per problemes de procediment hospitalari, qüestions burocràtiques, o manca de voluntat mèdica.

En l'estudi de malalties amb implicació mitocondrial, un aspecte gairebé tan important com aconseguir la mostra és disposar de la màxima informació familiar i de les màximes dades clíniques, no tan sols del pacient, sinó de la resta de família. Aquesta informació pot ser útil per a establir tipus d'herència, o bé reconèixer casos esporàdics; per a saber si hi ha consanguinitat dins d'un pedigrí, i en quin grau; per a determinar si existeix penetració incompleta, etc.

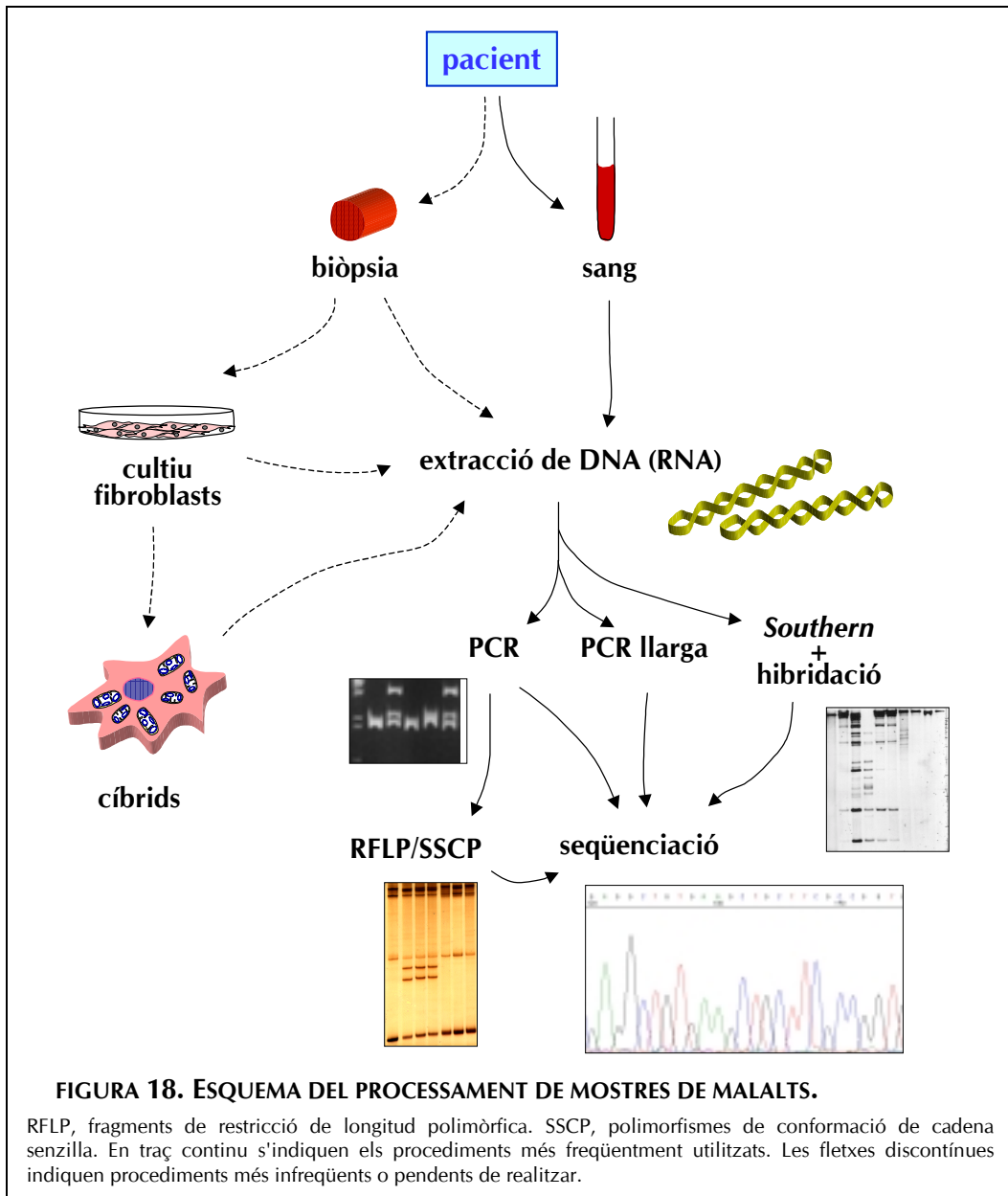


PROCEDÈNCIA DE LES MOSTRES

Els criteris per al diagnòstic i selecció de pacients es troben especificats en les articles. Les mostres estudiades foren enviades des de diversos serveis d'hospitals: Medicina Interna, Endocrinologia, Oftalmologia, Urologia i Genètica, entre d'altres. Les mostres de malalts amb neuropatia òptica de Leber i ambliopia alcohol-tabac provingueren de l'Hospital de Bellvitge. A l'Hospital de Granollers es seleccionaren els pacients amb lipodistròfia associada a tractament antivíric. En canvi, la procedència dels pacients amb la síndrome de Wolfram fou variada, i s'estudiaren famílies de Badajoz, Barcelona, Girona, Granada, Gipuzkoa, Tarragona i Valladolid.

ESQUEMA GENERAL DELS MÈTODES EMPRATS

La FIGURA 18 recull el procediment general seguit a partir de la recepció d'una



mostra. Les anàlisis concretes realitzades en cada mostra difereixen segons la malaltia patida o sospitada per la persona donant. En el cas de malalts amb l'atròfia òptica de Leber, es procedí a amplificar per PCR les zones de la molècula de mtDNA susceptibles de presentar les mutacions primàries i algunes de les mutacions secundàries més freqüents. La mateixa estratègia es seguí amb els individus amb ambliopia alcohol-tabac.

El plantejament emprat en l'estudi de la lipodistròfia associada al tractament antivíric fou diferent, ja que no es coneixia que hi haguessin anomalies mitocondrials al darrera d'aquesta malaltia, i era justament això el que es pretenia analitzar. En aquest cas s'estudià la presència de reordenaments al mtDNA mitjançant PCR llarga i *Southern blot* seguit d'hibridació amb diverses sondes específiques; també si existia depleció del mtDNA, ja que aquest fenomen havia estat observat en mostres de pacients HIV tractats amb zidovudina. A banda d'això, es va investigar la presència de dues mutacions puntuals al mtDNA descrites en pacients amb lipomes.

Per últim, sobre les mostres obtingudes de pacients amb la síndrome de Wolfram (22 afectats i 58 familiars) es van determinar nou mutacions LHON (responsables d'atròfia òptica), la mutació MELAS més freqüent (causant també de diabetis mellitus i sordesa en alguns pacients), la mutació 1555 (freqüent en població espanyola amb sordesa neurosensorial); igualment s'analitzà la presència de delecions i duplicacions al mtDNA. A més, en ser localitzat un gen nuclear responsable de la síndrome⁴⁵ mentre s'examinava el mtDNA de les famílies Wolfram, també es va analitzar la presència de mutacions a la regió codificant d'aquest gen. Això es va fer mitjançant PCR seguida de l'anàlisi de SSCP⁴⁶ i seqüenciació.

Paral·lelament es van establir cultius de fibroblasts a partir de dos pacients, biopsiats a l'Hospital Clínic de Barcelona⁴⁷. Un d'ells presentava una malaltia mitocondrial diferent a les estudiades aquí. L'altre pateix la síndrome de Wolfram. Amb els fibroblasts presents en el fragment de pell extret d'aquests pacients s'intentà obtenir híbrids, prèvia expansió d'aquestes cèl·lules. La primera fusió no va funcionar, ja que després de diverses setmanes en medi selectiu, tots els clons generats van morir. Resta pendent un segon intent de fusió dels fibroblasts d'aquest pacient amb cèl·lules p^o.

EXTRACCIÓ DE DNA

A PARTIR DE SANG PERIFÈRICA

- Un cop arribada la mostra al laboratori, es conserva a 4°C fins el moment en què es pot procedir a l'extracció.
- En un tub de 50 mL s'aboca la sang (normalment 10–15 mL). Els tubs primaris es renten amb solució salina, que s'afegeix al tub de 50 mL, i s'acaba d'omplir aquest amb la mateixa.
- Es centrifuga a 4°C durant 5 min en una centrifugadora de sobretaula, a 800 x g, sense programar frenada.

⁴⁵ Actualment se sap que existeix un locus addicional, també al cromosoma 4 (pàg. 40).

⁴⁶ En el cas de la mutació al gen *WFS1* 425ins16 no calgué l'anàlisi dels SSCP ja que fou possible detectar-la carregant el producte de PCR en un gel d'acrilamida al 7%.

⁴⁷ Això no ha estat possible pels pacients atesos fora de la província de Barcelona, que representen la majoria dels malalts estudiats.



- Amb una pipeta Pasteur connectada a un sistema de buit, s'elimina el sobrenedant, amb compte de no xuclar la capa de leucòcits (blanca). Fins a omplir de nou el tub, s'afegeix solució de lisi d'eritròcits de pH 7,6 acabada de preparar, composta per sacarosa 108 g/L, Tris-HCl 0,02 mol/L, MgCl₂ 0,005 mol/L i Tritó X-100 1,07%. S'agita per inversió per tal de barrejar bé les cèl·lules amb la solució de lisi.
- Es centrifuga a 4°C durant 10 min a 2.500 x g. Es decanta el tub vigilant de no perdre el sediment i es torna a omplir amb solució de lisi d'eritròcits. Es torna a centrifugar.
- Seguidament s'elimina el sobrenedant per decantació, s'afegeix tampò fosfat salí (PBS) i es barreja per inversió intentant que el sediment quedi el més net possible.
- Es centrifuga a 4°C durant 10 min a 2.500 x g. Es decanta el PBS. En aquest punt es pot congelar el sediment de leucòcits a -20 o -80°C o bé es pot seguir amb el protocol.
- Per tal de lisar els leucòcits, s'afegeixen 3 mL de la solució de pH 8,2 que conté NaCl 0,4 mol/L, Tris 0,1 mol/L i EDTA 0,002 mol/L; 0,2 mL de SDS 10%; i 0,5 mL de solució de proteïnasa K composta per proteïnasa K 0,2%, SDS 1% i EDTA 0,002 mol/L. Es barreja molt bé en el vòrtex i s'incuba a 37°C amb agitació tota la nit.

Quan ha estat possible, s'ha aplicat la mostra a un extractor de DNA automàtic, que combinava diverses etapes amb fenol i fenol/cloroform. Alternativament, s'ha realitzat l'extracció manual segons el procediment següent basat en la precipitació de les impureses amb sals:

- A la barreja tèrbola que ha estat incubada durant la nit s'afegeix 1 mL de NaCl saturat (a ~5,5 mol/L). S'agita en el vòrtex durant uns segons i es centrifuga a 4°C durant 15 min a 2.500 x g.
- Es recull el sobrenedant i es torna a centrifugar. Es repeteix aquest procés 2 o 3 cops més fins que pràcticament ja no apareix sediment de sals i proteïnes.
- S'afegeix un volum de cloroform, s'agita enèrgicament per inversió i es centrifuga de nou en les mateixes condicions que anteriorment, però sense programar frenada. Es recull amb cura la fase superior sense contaminar amb la fase intermèdia o inferior.
- Aleshores s'afegeix 2 volums d'etanol absolut, es barreja suaument per inversió fins que apareix la "medusa" de DNA. Ràpidament es recull amb una pipeta *pasteur* preparada acabada en ganxo i es submergeix en un tub de 10 mL amb etanol 70%, movent amunt i avall 4 o 5 cops amb cura de no perdre la "medusa".
- Es diposita en un tub d'1,5 mL, al qual s'ha afegit abans 0,5 mL de tampò Tris 0,01 mol/L, EDTA 0,001 mol/L, pH 7,2 (TE). S'incuba durant 2-3 hores a 37°C amb agitació, i es "rectifica" de TE segons la viscositat de la mostra.

A PARTIR DE MÚSCUL, CERVELL O CULTIU CEL·LULAR

En el cas de les biòpsies és molt important que es practiqui una congelació adequada i ràpida just després de l'extracció. De vegades s'han obtingut mostres de DNA que en etapes posteriors han presentat nombrosos problemes, i part d'aquests casos són segurament deguts a un procés de congelació defectuós que ha provocat la degradació del material genètic.



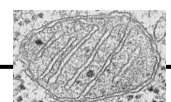
Un cop arriba la mostra al laboratori de genètica, el teixit es manté a -80°C fins el moment del processament. Aleshores es prepara un recipient amb gel sobre el que es col·locarà una meitat d'una placa de Petri, que és a on tindrà lloc la primera etapa d'aquest protocol.

- Amb dues fulles de bisturí es talla la mostra, el més ràpidament possible però també el més exhaustivament possible. Cal evitar escampar gaire la mostra per la superfície de la placa per tal de perdre la mínima quantitat de teixit. Si durant el procés aquest s'eixuga, es pot afegir unes gotes de solució de lisi amb urea: urea 48 g/L, NaCl 0,3 mol/L, EDTA 0,01 mol/L, Tris 0,01 mol/L, SDS 2%, pH 8,0.
- Un cop s'ha trinxat la mostra es traspasa a un microtub de 2 mL i s'afegeix 0,8 mL de solució de lisi amb urea. Aleshores, amb una pipeta automàtica i una punta amb l'extrem lleugerament retallat, es pipeteja la barreja diversos cops, de forma que s'homogeneïtzi bé el teixit.
- S'afegeix 0,05 mL de proteïnasa K 10 g/L i s'incuba amb agitació a 50°C tota la nit.
- S'afegeix un volum de fenol/cloroform/isoamílic (25:24:1), s'agita molt bé i es centrifuga durant 8 min a $\sim 16.000 \times g$ en una microcentrifugadora.
- Es recull amb compte el sobrenedant i es traspasa a un nou tub. Llavors s'afegeix un volum de cloroform, es barreja bé i es centrifuga a la mateixa velocitat durant 3 min.
- Es recull el sobrenedant en un nou tub i s'afegeix 0,01 mL de RNAasa lliure de DNAasa i 1 μL de SDS 10%. S'incuba durant 1 hora a 37°C i, seguidament, es repeteix les etapes de purificació amb fenol/cloroform/isoamílic, i cloroform.
- Al darrer sobrenedant se li fa una altra centrifugada per a eliminar restes de dissolvent orgànic. Aleshores s'afegeix 0,04 mL d'acetat sòdic 3 mol/L i 2 volums d'etanol absolut a -20°C . Es barreja amb suavitat per inversió i es manté a -80°C durant algunes hores (o en neu carbònica) o bé es centrifuga 15 min a $\sim 16.000 \times g$ en una microcentrifugadora.
- Es decanta el sobrenedant i es renta el sediment dos cops amb 0,5 mL d'etanol 70%; es centrifuga 5 min a $\sim 16.000 \times g$.
- Es decanta l'etanol i, un cop eixugat el sediment de DNA, s'afegeix 0,1 mL de TE.

PCR NORMALS

En general s'han preparat en un volum igual a 50 μL . El programa estàndard per a totes les PCR (no llargues) i les components utilitzades són els següents:

Programa de PCR		Components i concentracions		
10 min a 94°C		encebadors 1 i 2	0,5-0,8 $\mu\text{mol/L}$	
↓		dNTP	200 $\mu\text{mol/L}$	
35 x	{	35 s a 94°C	Tris-HCl	10 mmol/L
		35 s a T_h	MgCl ₂	1,5 mmol/L
		35 s a 74°C	KCl	50 mmol/L
↓		DNA polimerasa	1,5 U/50 μL	
10 min a 74°C		DNA	$\sim 200 \text{ ng}/50 \mu\text{L}$	



T_h és la temperatura utilitzada per a la hibridació entre els encebadors i el DNA motlle.

TAULA 6. ENCEBADORS PER A DETECTAR LES MUTACIONS LHON			
mutació	posició ^A	seqüències	T_h
11778A	11720-11740/11839-11820	cttacatcccattactattc/aagtcacaaaaagctatta	53
3460A	3330-3349/3618-3637	cctcattgtaccattctaa/ggctagagggtggctagaata	53
14484C	14399-14419/14513-14486	acactcaccaagacctcaacc/tagtttttttaatttttagggggact	55,5
15257A	15170-15189/15371-15351	ggggccacagtaattacaaa/ggggggtgtttgatcccgttt	53
4216C	4013-4031/4797-4778	cctcaccactacaatctt/gggctattcctagttttatt	53
4136G	4013-4031/4797-4778	cctcaccactacaatctt/gggctattcctagttttatt	53
15812A	15701-15724/16039-16017	ccactaagccattcactttattga/cttcccatgaaagaacagagaa	55,5
4917G	4853-4871/5051-5036	gctcttctcacatgacaa/cggtagaactgctattatt	47
3394C	3330-3349/3618-3637	cctcattgtaccattctaa/ggctagagggtggctagaata	54
4732G	4853-4871/5051-5036	gctcttctcacatgacaa/cggtagaactgctattatt	53

^A Posició al mtDNA d'acord amb la seqüència d'Anderson *et al.* (Anderson 1981). T_h , en graus Celsius. A l'esquerra de la barra "/" s'indiquen posicions de la cadena lleugera del mtDNA, i a la dreta, de la cadena pesant.

La **TAULA 6** recull els encebadors utilitzats en les PCR per a determinar les mutacions LHON. S'especificuen les temperatures utilitzades per a la hibridació entre els encebadors i els brins de mtDNA, ja que aquestes no s'inclouren als articles.

La **TAULA 7** mostra els encebadors utilitzats per a la determinació d'altres mutacions puntuals al mtDNA, la temperatura d'hibridació i l'enzim de restricció emprats per a les anàlisis dels fragments polimòrfics de restricció (RFLP), juntament amb les mides dels fragments obtinguts després de la digestió en parells de bases tant per a seqüències normals com mutants.

TAULA 7. ALTRES MUTACIONS PUNTUALS AL MTDNA							
mutació	posició ^A	seqüències	T_h	enzim	normal	mutant	
MELAS3243	3164-3183/3353-3334	cctcccccgtaaatgatat/gcgattagaatgggtacaat	52	<i>Apa</i> I	189	110 + 79	
MELAS3256	3164-3183/3282-3258	cctcccccgtaaatgatat/tctgactgtaaagtttaagftgta	52	<i>Acc</i> I	112	92 + 20	
MERRF8344	8201-8220/8375-8345	ttcatgcccctgcctaga/tggggcatttactgtaaagccg	56,5	<i>Bgl</i> I	175	143 + 32	
MERRF8356	8201-8220/8332-8357	ttcatgcccctgcctaga/gtatttagtggggcatttactcta	56,5	<i>Xba</i> I	85 + 97	85 + 69 + 28	
sord1555G ^B	1585-1556/1247-1276	ttccagtacacttaccatgttacgactgg/gctcagcctatatac cgccatctcagcaa	55	<i>Hae</i> III	216 + 123	216 + 93 + 30	
lipo12217A ^C	12063-12083/12370-12350	ccctcatgttcatacaccta/gggtaggggtggtatagta	56	<i>Scr</i> FI*	60 + 248	308	

^A Posició al mtDNA d'acord amb la seqüència d'Anderson *et al.* (Anderson 1981). ^B, mutació present a nombroses famílies amb sordesa neurosensorial (Estivill 1998). ^C, mutació detectada en lipomatosi múltiple simètrica (Diegoli 1999). (*) Talla a la posició 12127 si no es dona la mutació G>A.



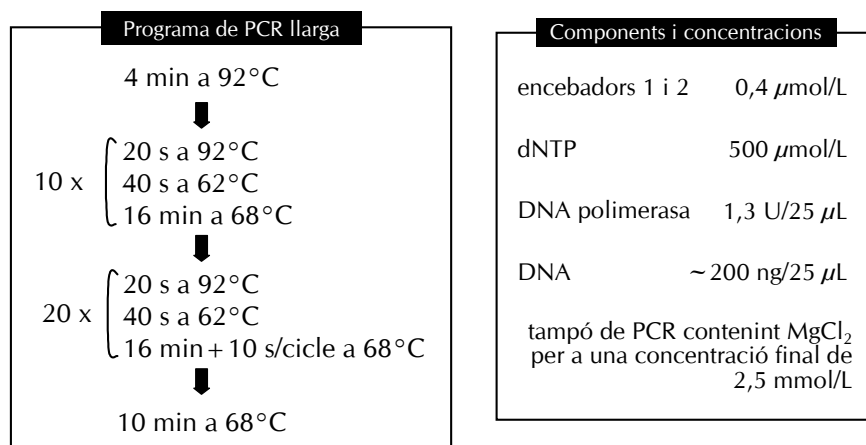
En les PCR per a amplificar els exons del gen *WFS1* s'han usat els encebadors recollits a la **TAULA 8**:

TAULA 8. PCR EXONS <i>WFS1</i>			
exó	seqüències (sentit/antisentit)	mida (pb)	T _h (°C)
2	ctggatgtgcctgacctg/cctgaacatccccagcctg	311	62
3	gaagaccctcatgcctgtc/atctcaggcaccgacacttc	272	61
4	cggagaatctggaggctgac/caaccctccagaggctgttc	234	58
5	acaaggcctttgaccacatc/gtgcccagggtgaatcctc	225	60
6	ctgtaatccaccctgtccc/gagtcgcacaggaaggagag	186	60
7	cctccacctgaaccactca/accggggtcttggctactc	301	58
8-1	ttcccacgtaccatctttcc/cacatccagggtgggctc	334	52
8-2	agaacttccgcaccctcac/tcagtagggccaattcaag	330	58
8-3	ctatcgctgctgcctcc/gggcaaagaggaagaggaag	307	54-55
8-4	gtgagctctccgtggtcatc/ccctctgagcggtagacacatag	346	62
8-5	atcctggtgtggctcacg/gtagaggcagcgcacccag	300	57
8-6	gcgtgactgacatcgacaac/gctgaactc gataggctg	356	52
8-7	cagcagcgagttcaagagc/cctcatggcaacatgcac	300	55

Els productes d'aquestes PCR s'examinaren mitjançant anàlisi SSCP i seqüenciació, segons s'explica a l'article corresponent.

PCR LLARGA

Aquesta tècnica pretén amplificar la molècula gairebé sencera de mtDNA. Podria ser una alternativa ràpida al *Southern*, capaç a més d'economitzar mostra, aspecte interessant sobretot en els casos en què el mtDNA s'ha extret d'un fragment muscular generalment molt minso. El problema és que presenta problemes tècnics que posen en dubte els resultats obtinguts. Al laboratori s'han provat diversos equips comercials i s'han dissenyat diferents programes, obtenint uns resultats semblants. A continuació es mostra el protocol i les condicions utilitzats amb més freqüència.



En la realització d'aquesta tècnica s'ha seguit les recomanacions del fabricant de l'equip utilitzat⁴⁸ excepte en el volum final de la PCR que ha estat de 25 μ L en comptes de 50 μ L. Això inclou l'ús de tubs de PCR de paret prima (de 0,2 mL), la preparació de dues barreges de reacció⁴⁹, i el cobriment del líquid amb oli mineral per a prevenir-ne l'evaporació en una reacció que dura aproximadament 10 hores.

Els encebadors emprats són XL1 i XL2, amb les seqüències i localització que il·lustra la **TAULA 9**:

TAULA 9. PCR LLARGA I "INTERMITJA"		
nom	posició ^A	seqüència
XL1	571-598	cccacagtttatgtagcttacctcctca
XL2	16220-16193	ttgattgctgtactgtgctgtaagcatg
PM1	8335-8355	attaagagaaccaacacctct
PM2	14010-13990	tagtcaggtaggtctaggag

^A Posició al mtDNA d'acord amb la seqüència d'Anderson et al. (Anderson 1981).

ser erròniament interpretades com a resultat de deleccions— que no s'han confirmat quan s'han emprat el *Southern blot* o la seqüenciació. Per causa d'aquesta baixa fiabilitat el nostre laboratori ha hagut de descartar el seu ús per a qüestions diagnòstiques, per a les quals és imprescindible la realització del *Southern blot* malgrat la gran quantitat de mostra que consumeix. També Kajander et al. recomanen no utilitzar aquesta tècnica per al diagnòstic, en un treball en el que observen que petites diferències en la concentració de DNA motlle en les PCR llargues origina resultats completament diferents quant a la presència de bandes deleccionades i a l'amplificació del mtDNA normal (Kajander 1999a). Aquest grup ha observat que les deleccions reals —les presents en proporcions patogènicament significatives— no desapareixen per dilució del DNA motlle, i proposa en tot cas amplificar per PCR llarga diverses dilucions en sèrie de la mostra, i confirmar els resultats positius mitjançant *Southern blot* sempre que sigui possible (Kajander 1999b).

En alguns casos s'ha utilitzat la parella d'encebadors PM1 i PM2 per tal de determinar si la mostra problema presentava la delecció comuna (pàg. 17). Si les mostres són normals el producte esperat té 5.675 pb, que es pot amplificar amb una DNA polimerasa convencional però augmentant el temps d'extensió del programa de PCR.

ESTABLIMENT DE CULTIUS CEL·LULARS

Un cop practicada la biòpsia i immediatament després de dividir el fragment per a totes les proves previstes (bioquímiques, histològiques...), es diposita la porció destinada a estudis genètics en un tub contenint medi DMEM⁵⁰ amb sèrum fetal boví (FCS) al 40%, L-glutamina 0,2 mol/L, penicil·lina 100 U/mL i sulfat d'estreptomicina 100 μ g/mL. El tub es col·loca en gel i es transporta fins al laboratori.

⁴⁸ Majoritàriament, l'Expand™ 20 kb^{Plus} PCR System, Boehringer Mannheim, Alemanya.

⁴⁹ Una amb la barreja d'enzims, i l'altra amb el DNA motlle, els dNTP i els encebadors; d'aquesta manera s'evita el *hot start* i la degradació dels encebadors i el DNA motlle.

⁵⁰ Dulbecco Modified Eagle Medium.



- Al Laboratori de Cultius, i sota campana de flux laminar vertical, s'aboca la mostra en una placa de 100 mm (de diàmetre). Amb dues fulles de bisturí es talla fins a obtenir trossets més petits, no diminuts.
- Amb una pipeta es recull el teixit i el medi i es traspassen a un tub de 15 mL. S'espera uns segons a què per gravetat el teixit baixi al fons del tub, i a continuació s'aspira el medi.
- Es renta 3 cops els trossets amb tampó fosfat salí. S'aspira el tampó, i s'afegeix 10 mL de medi DMEM amb FCS al 40%, glutamina i antibiòtics.
- Es barreja bé el medi i els fragments i es reparteix el contingut entre 2 plaques de 100 mm. S'afegeix 5 mL més de medi a cada placa.
- Les plaques es dipositen a un incubador de CO₂ al 5%, i es deixen en repòs aproximadament 8–10 dies perquè els fragments de teixit s'adhereixin a la placa.
- Passat aquest temps, s'observarà que els fibroblasts comencen a aparèixer pels marges dels fragments adherits a les plaques, i van envaint mica en mica tota la superfície. Ara es pot aspirar amb compte el medi, i substituir-lo per un amb un 10% de FCS.
- En el mínim nombre de passes possible, es preparen alíquotes per a congelar⁵¹, per a estudiar el mtDNA, i per a determinar el funcionament de la cadena respiratòria i l'activitat dels complexos enzimàtics mitocondrials.

⁵¹ En FCS 95% + dimetilsulfòxid 5%.

