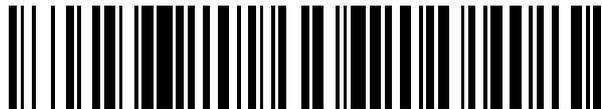


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 522**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013 PCT/EP2013/070666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13773237 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2904391**

54 Título: **Prueba de toxicidad mitocondrial**

30 Prioridad:

05.10.2012 DK 201270609

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.04.2018

73 Titular/es:

**NEUROVIVE PHARMACEUTICAL AB (100.0%)
Medicon Village Scheelevägen 2
223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**SJÖVALL, FREDRIK;
EHINGER, JOHANNES;
HANSSON, MAGNUS;
ELMER, ESKIL y
BATCHELLER, DEREK GREGORY**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 665 522 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Prueba de toxicidad mitocondrial

5

Campo de la invención

La presente invención proporciona un método novedoso que es útil en el examen de fármacos. En particular el método es útil para someter a prueba los efectos de sustancias sobre las mitocondrias, especialmente efectos tóxicos o beneficiosos de principios activos o principios activos candidatos. El método está basado en medición en mitocondrias humanas vivas *ex vivo*, pero en un entorno tan cercano a la situación *in vivo* como sea posible. El método también es útil para someter a prueba el impacto de sustancias sobre la respiración mitocondrial.

10

Antecedentes de la invención

15

En el desarrollo de fármacos, es difícil estimar si un fármaco afectará a las mitocondrias productoras de energía cuando se use en seres humanos. En los últimos años muchos de los nuevos fármacos aprobados por la FDA se han retirado posteriormente debido a efectos tóxicos tales como cardio o hepatotoxicidad. Por tanto, de los nuevos fármacos que registró la FDA entre 1994 y 2006, 38 fármacos se retiraron debido al efecto tóxico sobre el hígado y el corazón, que son síntomas típicos de toxicidad mitocondrial. Evidentemente, estos nuevos fármacos pasaron la prueba de toxicidad convencional llevada a cabo antes de su aprobación, y los efectos tóxicos se observaron sólo después de que un gran número de pacientes se hubieran tratado con los fármacos. Dykens y Will (2007) señalan que las evidencias indican que la disfunción mitocondrial desempeñó un papel en la toxicidad de varios principios activos que se retiraron del mercado y sólo se reintrodujeron con fuertes restricciones.

20

25

Además, en los últimos años la función mitocondrial ha recibido mucho interés y se cree generalmente que la disfunción de las mitocondrias es un factor que contribuye a la patogenia de un gran número de enfermedades (por ejemplo trastornos musculares, neuropatías, cardiomiopatías, encefalopatía, insuficiencia multiorgánica inducida por septicemia).

30

Actualmente, la toxicidad mitocondrial de candidatos a fármaco se evalúa principalmente en animales y cultivos celulares, resultados que son difíciles de traducir al futuro uso en seres humanos.

35

Beeson *et al.* (Analytical Biochemistry 2010, 404 (1), págs. 75-81) describen un ensayo basado en células para someter a prueba los efectos tóxicos de fármacos sobre mitocondrias.

Sjövall *et al.* (Critical Care 2010, 14 (6), págs. 1-11) describen el análisis de la disfunción mitocondrial en plaquetas de individuos que padecen septicemia.

40

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar una prueba para la toxicidad mitocondrial, que sea sensible, reproducible, fiable y fácil, y que pueda usarse en pruebas de desarrollo de fármacos.

Descripción detallada de la invención

45

La presente invención se refiere a un método que implica componentes de sangre humana que contienen mitocondrias. La ventaja del método desarrollado es la medición de la toxicidad (o de los efectos beneficiosos) de fármacos en mitocondrias humanas vivas *ex vivo*, pero tan cerca de la situación *in vivo* como sea posible. Los componentes de la sangre humana que contienen mitocondrias (glóbulos blancos y/o plaquetas) se investigan en plasma, lo que proporciona una relación muy estrecha con la situación *in vivo*. Por tanto, están presentes todos de la capacidad tamponante, albúmina sérica, electrolitos, enzimas hidrolizantes, etc. durante las mediciones.

50

El método novedoso dará como resultado directamente una estimación de una concentración en sangre tóxica realista en seres humanos que no es posible en cultivos celulares o estudios con animales, que son los métodos actuales usados. Por tanto, pueden someterse a prueba y examinarse principios activos candidatos para detectar toxicidad en seres humanos en una fase mucho más temprana de lo que ahora es posible. A su vez, esto permitirá la eliminación de candidatos a fármaco tóxicos en una fase más temprana, obviando así muchas pruebas en animales y mucho sufrimiento humano futuro. Facilitará la selección de principios activos candidatos en una fase temprana, reduciendo así el tiempo y el coste globales del desarrollo de fármacos.

55

60

El método puede usarse en entornos diferentes con variaciones en la configuración dependiendo del propósito del método.

Por tanto, sin limitar el alcance a ello, el método según la presente invención puede usarse para:

65

1. Examinar y seleccionar candidatos a fármaco en fase temprana o tardía en células derivadas de sangre de individuos sanos o en la denominada capa leucocítica, que es una disolución concentrada de plaquetas y glóbulos

blancos.

2. Someter a prueba la sensibilidad de un paciente a un tóxico mitocondrial conocido.

5 3. Analizar la toxicidad mitocondrial de fármacos en ensayos clínicos.

4. Analizar los efectos beneficiosos de fármacos destinados a mejorar la función mitocondrial.

10 Un método adecuado para el examen y la selección de posibles candidatos a fármaco o para someter a prueba la sensibilidad de una persona a una sustancia con efecto sobre las mitocondrias (es decir, los puntos 1 y 2 anteriores) es un método que comprende

15 i) someter una muestra de células sanguíneas humanas que contienen mitocondrias a respirometría de alta resolución

ii) añadir a la muestra de células una sustancia que aumenta la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna,

20 iii) añadir a la muestra de ii) una sustancia de prueba en un vehículo,

vi) añadir a la muestra de iii) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I,

v) añadir a la muestra de vi) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, y

25 vi) comparar el consumo de oxígeno mitocondrial antes y después de la adición de la sustancia de prueba con el consumo de oxígeno mitocondrial del vehículo, en el que una disminución del consumo de oxígeno mitocondrial inducida por la sustancia de prueba indica un efecto negativo sobre las mitocondrias, y en el que un aumento del consumo de oxígeno mitocondrial inducido por la sustancia de prueba indica un efecto positivo sobre las mitocondrias.

30 Un protocolo alternativo para examinar y seleccionar posibles candidatos a fármaco o para someter a prueba la sensibilidad de una persona a una sustancia con efecto sobre las mitocondrias (es decir, los puntos 1 y 2 anteriores) es investigar el efecto de una sustancia de prueba de este tipo en un ensayo de examen del complejo II. Un método de este tipo se ilustra en la figura 11 y comprende

35 i) someter una muestra de células que contienen mitocondrias vivas aisladas de una muestra de sangre humana a respirometría de alta resolución,

40 ii) poner en contacto la muestra de células a una sustancia que inhibe la respiración del complejo I,

iii) añadir una muestra de prueba que contiene una sustancia de prueba en un vehículo,

iv) añadir una sustancia que permeabiliza la membrana plasmática,

45 v) añadir una sustancia de referencia a la muestra obtenida en iv), y

v) añadir una sustancia que inhibe la respiración del complejo III.

50 Los resultados de la prueba se compararon con los resultados obtenidos mediante el método, en el que la sustancia de prueba usada es idéntica a la sustancia de referencia. Se muestra un resultado típico en la figura 11, que muestra que el fármaco candidato puede hasta un cierto grado atravesar la membrana plasmática (es decir, se logra un aumento de la respiración). La adición de digitonina, que permeabiliza la membrana plasmática, no da como resultado un aumento adicional en la respiración, es decir ningún efecto adicional de la sustancia de prueba. Cuando se añade la sustancia de referencia (un sustrato ligado al complejo II tal como succinato), que es normalmente un sustrato endógeno como un succinato, se observa un aumento de la respiración y se logra la capacidad máxima. Después se añade un complejo III, tal como antimicina A, para determinar cualquier actividad de consumo de oxígeno no mitocondrial, tal como autooxidación de dicha muestra.

60 En comparación con los resultados de la sustancia de referencia, que es un sustrato endógeno tal como un succinato, se observa que la sustancia de referencia no atraviesa la membrana plasmática. Sólo cuando se permeabiliza la membrana, por ejemplo, con digitonina, aumenta la respiración. La adición adicional de la sustancia endógena no cambia la respiración mientras que la adición de inhibidor del complejo III detiene la respiración mitocondrial.

65 Obviamente, el patrón observado con una sustancia de prueba puede diferir del mostrado en la figura 11. El método proporciona información valiosa con respecto a si una sustancia de prueba puede atravesar la membrana plasmática

e influir en la actividad de consumo de oxígeno mitocondrial de una manera positiva (es decir, aumento de la respiración mitocondrial del complejo II). Por consiguiente, la sustancia de prueba más ideal tendrá un nivel a que es mayor que a' y en donde el nivel a es o se aproxima al nivel b'. Se dan más detalles en los ejemplos en el presente documento.

5 Otro enfoque es estudiar la influencia de una sustancia de prueba sobre la respiración del complejo I, complejo II y/o complejo IV. Estudiando la respiración de los complejos I, II y/o IV, pueden obtenerse más detalles con respecto al impacto de una sustancia específica sobre la respiración mitocondrial y para evaluar cualquier efecto positivo o negativo sobre la función mitocondrial. La figura 14 muestra la influencia de aumentar la concentración de metformina sobre la respiración mitocondrial de los complejos I, II y IV. La figura muestra la disfunción específica de la respiración del complejo I con concentraciones crecientes de metformina, mientras que la respiración de los complejos II y IV parece no verse afectada.

15 La respiración del complejo I (OXPHOS_{CI}) se estimuló por la adición posterior de ADP seguido por un sustrato del complejo I adicional, glutamato (véase figura 3), seguido por la adición de cantidades crecientes de una sustancia de prueba (por ejemplo metformina).

20 La respiración del complejo II se obtuvo por la adición de un inhibidor del complejo I (por ejemplo rotenona) a una muestra de células seguido por la adición de cantidades crecientes de una sustancia de prueba.

25 La respiración del complejo IV se obtuvo añadiendo N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD, 0,5 mM), un donador de electrones al complejo IV. Debido al alto nivel de autoxidación de TMPD, se añadió azida de sodio (10 mM), un inhibidor del complejo IV, y la diferencia entre los dos niveles obtenidos se calculó como actividad específica del complejo IV.

Un método adecuado para investigar los efectos mitocondriales de candidatos a fármaco en ensayos clínicos o en regímenes de tratamiento (es decir, los puntos 3 y 4 anteriores) es un método que comprende

30 i) someter una muestra de células sanguíneas humanas que contienen mitocondrias a respirometría de alta resolución, en el que la muestra de células procede de una persona sometida a un estudio clínico o a un régimen de tratamiento, y en el que se ha administrado una sustancia de prueba a la persona durante el estudio clínico o el régimen de tratamiento

35 ii) añadir a la muestra de células una sustancia que aumenta la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna,

iii) añadir a la muestra de ii) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I,

40 vi) añadir a la muestra de iii) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, y

v) comparar el consumo de oxígeno mitocondrial de la muestra de la persona sometida al estudio clínico o a un régimen de tratamiento con el consumo de oxígeno mitocondrial de una muestra de control, en el que una disminución del consumo de oxígeno mitocondrial indica un efecto negativo sobre las mitocondrias, y en el que un aumento del consumo de oxígeno mitocondrial indica un efecto positivo sobre las mitocondrias.

45 Tal como se observa a partir de lo anterior, los métodos son casi idénticos y sólo varían con respecto a las muestras que se someten a prueba, es decir si es una sustancia de prueba o una muestra de células de una persona sometida o bien a un ensayo clínico o bien a un régimen de tratamiento. La persona sometida al ensayo clínico o a un régimen de tratamiento recibe una sustancia de prueba o un principio activo según el ensayo clínico o régimen de tratamiento. Esto quiere decir que las mitocondrias aisladas de una muestra de sangre de tal persona se han expuesto al principio activo o al posible principio activo en cuestión y por consiguiente, cualquier efecto de una sustancia de este tipo sobre la respiración mitocondrial puede observarse mediante el método descrito en el presente documento.

55 La respiración mitocondrial se sigue mediante el uso de respirometría. Se describen parámetros adecuados en los ejemplos en el presente documento, pero un experto en la técnica sabrá como cambiar o ajustar los parámetros si es necesario o si se usa otro aparato.

60 La muestra de sangre puede ser una muestra de sangre venosa. Pueden aislarse y usarse plaquetas o glóbulos blancos o una combinación de los mismos.

65 Ejemplos adecuados de sustancias que aumentan la permeabilidad de las membranas mitocondriales internas a los protones son carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP), carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP) u otro protonóforo.

En los ejemplos en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, se dan detalles adicionales para los

métodos.

A continuación se dan detalles con respecto a los métodos anteriores.

- 5 *1. Examen y selección de candidatos a fármaco en fase temprana o tardía en células derivadas de sangre de individuos sanos o en la denominada capa leucocítica, que es una disolución concentrada de plaquetas y glóbulos blancos*

Un método de este tipo comprende

- 10 i) someter una muestra de células que contienen mitocondrias vivas aisladas de una muestra de sangre venosa humana a respirometría de alta resolución a concentraciones de oxígeno en el intervalo de O₂ 400-25 μM a una temperatura constante de 37°C
- 15 ii) poner en contacto la muestra de células con una sustancia que aumenta la permeabilidad de membranas mitocondriales internas a protones tal como carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP), carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP) u otro protonóforo para obtener la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias presentes en las plaquetas,
- 20 iii) añadir una muestra de prueba que comprende una sustancia de prueba en un vehículo; la adición es normalmente en dosificación gradualmente creciente, en comparación con la adición de vehículo,
- 25 iv) poner en contacto la muestra resultante de iii) con un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I, tal como rotenona, para dilucidar la respiración celular dependiente de la oxidación de sustratos del complejo II,
- v) poner en contacto la muestra resultante de iv) con el inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, tal como antimicina A, para determinar cualquier actividad de consumo de oxígeno no mitocondrial, tal como autooxidación de dicha muestra, y
- 30 iv) comparar el consumo de oxígeno antes y después de la adición de la muestra de prueba y comparar el consumo de oxígeno entre la prueba y el vehículo, en el que una disminución del consumo de oxígeno indica un efecto negativo sobre las mitocondrias.

La disminución puede ser significativa o dependiente de la dosis.

- 35 Tal como se mencionó anteriormente, la muestra de sangre humana es de individuos sanos. Normalmente la muestra se obtiene tal como se describe en los ejemplos en el presente documento. Las células son normalmente o bien plaquetas o bien glóbulos blancos o bien una combinación de los mismos.

- 40 Las células pueden estar suspendidas en plasma humano (en algunos casos el plasma del propio sujeto) o pueden estar suspendidas en tampón acuoso que contiene por ejemplo sacarosa, HEPES, lactobionato de K, cloruro de magnesio, dihidrogenofosfato de potasio, EGTA y BSA u otros tampones adecuados. El pH se ajusta normalmente a pH entre 7,0 y 7,5, especialmente 7,1. Normalmente, se prefiere la disolución en plasma para glóbulos blancos o para plaquetas intactos con el fin de imitar la situación *in vivo* lo mejor posible. Sin embargo, en determinadas
- 45 situaciones, o como complemento a la disolución en plasma, puede usarse una solución salina tamponada con fosfato con adición de glucosa 5 mM (puede usarse para comparación con ejecuciones en plasma), o un tipo más intracelular de tampón que contiene productos intermedios del ciclo de Krebs para plaquetas o glóbulos blancos permeabilizados. El tipo intracelular se usaría para plaquetas (y WBC, *white blood cells*) permeabilizados y cuando los sustratos respiratorios mitocondriales estén presentes en exceso (en cantidades saturables) para maximizar el
- 50 transporte de electrones y aumentar la resolución del ensayo.

Las células obtenidas a partir de la muestra de sangre humana pueden someterse a ensayo o bien intactas o bien permeabilizadas.

- 55 Pueden usarse diferentes protocolos experimentales dependiendo de si se usan plaquetas o glóbulos blancos intactos o permeabilizados (protocolo de SUIT, titulación de sustrato-desacoplador-inhibidor, *Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titulation*). En general, se usan plaquetas o glóbulos blancos intactos. Se usan plaquetas o glóbulos blancos permeabilizados para reunir tanta información como sea posible de la capacidad de los diferentes complejos respiratorios durante un experimento. La permeabilización de la plaqueta se lleva a cabo sometiendo las células a digitonina u otras sustancias que hacen que la membrana plasmática de las células sea permeable a sustratos y ADP. Otras sustancias pueden ser saponina o tritón-x. Tal como se observa a partir de los ejemplos en el presente
- 60 documento, se encontró que una dosificación óptima de digitonina era de 1 μg/1 x 10⁶ plaquetas.

- 65 Las células se suspenden normalmente en la cámara de vidrio del aparato en una concentración de desde 200 x 10⁶/ml hasta 400 x 10⁶/ml.

La muestra de prueba puede añadirse varias veces en concentraciones crecientes con el fin de identificar la concentración mínima que proporciona un efecto negativo sobre las mitocondrias (es decir, efecto tóxico). La concentración inicial y final de la sustancia de prueba depende de la potencia de la sustancia, pero estará normalmente en un intervalo de desde submicromolar hasta milimolar.

5 Por tanto, el método puede usarse para determinar qué niveles de dosis son seguros y cuáles no y, por consiguiente, deben evitarse.

10 El método puede usarse también para comparar dos o más principios activos o principios activos candidatos entre sí con el fin de identificar la sustancia con el perfil más seguro. Por tanto, el método se repite con la(s) otra(s) sustancia(s) en investigación y se comparan los resultados obtenidos. La sustancia que tiene la menor disminución de la respiración en comparación con el nivel normal es la sustancia más segura con respecto a efectos tóxicos mitocondriales.

15 Las figuras 7-9 muestran el resultado de tal comparación. La figura 7 muestra los resultados obtenidos a partir de dos experimentos con agentes antidiabéticos; uno que implica titulación con el principio activo troglitazona y el otro experimento con el uso de rosiglitazona. La figura 7 muestra claramente que la rosiglitazona es un principio activo más seguro que la troglitazona con respecto a la toxicidad mitocondrial. La troglitazona ya no está en el mercado debido a efectos tóxicos.

20 La figura 8 muestra los resultados obtenidos a partir de dos experimentos usando minociclina y doxiciclina, que indican que la doxiciclina es más segura que la minociclina.

25 La figura 9 muestra los resultados obtenidos a partir de dos experimentos usando cerivastatina y simvastatina, que muestran que la simvastatina es más segura que la cerivastatina. De hecho, la cerivastatina ya se ha retirado del mercado, mientras que la simvastatina está todavía en el mercado.

30 Se añade carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) u otra sustancia que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a protones para obtener la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias presentes en las plaquetas. Tal como se observa a partir de los ejemplos en el presente documento, una concentración de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 μM da una respuesta adecuada. Cuando se usa plasma para disolver el sedimento de plaquetas, se encontró que una concentración óptima era de aproximadamente 100 μM con un intervalo adecuado de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 μM , y cuando se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS) era óptima una
35 concentración más baja, concretamente 6 μM aproximadamente con un intervalo de desde 2 hasta aproximadamente 20 μM .

40 En un momento adecuado después de que se haya añadido la sustancia de prueba (tal como desde 1 hasta 10 min), se añaden secuencialmente un inhibidor del complejo I (CI) tal como rotenona y un inhibidor del complejo III (CIII) tal como antimicina-A para inhibir el sistema de transporte de electrones (ETS, *electron transport system*), lo que proporciona el consumo de oxígeno residual, no mitocondrial, que se resta de los diferentes parámetros respiratorios en análisis adicionales. Este procedimiento permite la evaluación de la respiración mitocondrial específica y puede revelar también las propiedades de autooxidación de los compuestos sometidos a prueba.

45 Se añade rotenona en una cantidad correspondiente a una concentración final en la muestra de aproximadamente 2 μM con un intervalo de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 μM . Si se usa otro inhibidor del complejo I, la concentración final debe tener un tamaño que conduce al mismo efecto que si se usa rotenona.

50 Se añade antimicina-A en una cantidad que corresponde a una concentración final en la muestra de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ con un intervalo de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$. Si se usa otro inhibidor del complejo III, la concentración final debe tener un tamaño que conduce al mismo efecto que si se usa antimicina-A.

55 La antimicina-A se añade siempre después de la rotenona con el fin de determinar la actividad del complejo II tras la inhibición del complejo I.

Los detalles de los experimentos aparecen en los ejemplos y las reivindicaciones en el presente documento.

60 2. Someter a prueba la sensibilidad de un paciente a un tóxico mitocondrial conocido

En la actualidad muchos de los tóxicos mitocondriales conocidos están registrados y se usan. Sin embargo, el médico querría saber, antes de iniciarse el tratamiento con el fármaco, si el paciente es sensible a estos fármacos. Un ejemplo es el fármaco antiepiléptico ampliamente usado ácido valproico, que puede provocar daño cerebral o hepático grave si se administra a los pacientes equivocados.

65

Un método de este tipo es en esencia el mismo que se describió en el punto 1) anterior. El método comprende

i) someter células que contienen mitocondrias vivas aisladas de una muestra de sangre venosa humana a respirometría de alta resolución a concentraciones de oxígeno en el intervalo de O₂ 400-25 μM a una temperatura constante de 37°C,

ii) poner en contacto la muestra de células con carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) u otra sustancia que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a protones para obtener la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias presentes en las plaquetas,

iii) añadir una muestra de prueba que comprende dicha sustancia en dosificación gradualmente creciente, en comparación con la adición de vehículo,

iv) poner en contacto la muestra resultante de iii) con un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I, tal como rotenona, para dilucidar la respiración celular dependiente de la oxidación de sustratos del complejo II,

v) poner en contacto la muestra resultante de iv) con el inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, tal como antimicina A, para determinar cualquier actividad de consumo de oxígeno no mitocondrial, tal como autooxidación de dicha muestra, y

vi) comparar el consumo de oxígeno antes y después de la adición de la muestra de prueba, en el que una disminución en el consumo de oxígeno indica un efecto negativo sobre las mitocondrias.

En el presente documento, se toma la muestra de sangre humana del paciente que puede someterse a un tratamiento específico con un principio activo o principio activo candidato específico y la muestra de prueba contiene el principio activo o principio activo candidato específico.

Según se describió anteriormente en 1), la muestra de prueba puede añadirse varias veces en concentraciones crecientes con el fin de identificar la concentración mínima que da un efecto negativo sobre las mitocondrias (es decir, efecto tóxico). La concentración inicial y final de la sustancia de prueba depende de la potencia de la sustancia, pero normalmente será de hasta 10 veces los niveles finales o de estado estacionario para explicar la acumulación de fármacos en tejidos.

Por tanto, el método puede usarse para determinar qué niveles de dosis son seguros y cuáles no y, por consiguiente, deben evitarse.

El método puede usarse también para determinar qué principio activo de una serie de posibilidades debe seleccionarse para el paciente particular. Por tanto, el método puede implicar la comparación de dos o más principios activos o principios activos candidatos entre sí con el fin de identificar la sustancia con el perfil más seguro en el paciente en cuestión. Por tanto, el método se repite con otras sustancias y los resultados obtenidos se comparan. La sustancia que tiene la menor disminución de la respiración en comparación con el nivel normal es la sustancia más segura con respecto a los efectos tóxicos mitocondriales para el paciente en cuestión.

Todos los detalles relativos a las partes individuales del método son tal como se describió anteriormente en el presente documento y se hace referencia a ello.

3. Análisis de la toxicidad mitocondrial de fármacos en ensayos clínicos

El ensayo clínico puede ser cualquier ensayo, por ejemplo estudios de búsqueda de dosis, estudios de seguridad en seres humanos etc. y el método se basa en una simple toma de muestras de sangre. Pueden evaluarse tanto efectos a corto plazo, agudos, a largo plazo, como crónicos. Un ejemplo sorprendente son los medicamentos contra el VIH, que pueden dar síntomas de insuficiencia mitocondrial tras su uso a largo plazo (debido al agotamiento del ADN mitocondrial). Para este fin es una gran ventaja del presente método que permite la determinación de la toxicidad combinada del principio activo así como sus metabolitos circulantes en el plasma del sujeto.

Un método de este tipo es esencialmente el mismo que se describió anteriormente, pero la muestra de sangre humana se toma del sujeto incluido en el estudio y de individuos sanos que funcionan como un grupo de control. Por consiguiente, el sujeto ha recibido un principio activo o un posible principio activo antes de que se tome la muestra de sangre. La respiración mitocondrial puede seguirse durante el régimen de tratamiento o el estudio clínico completo tomando regularmente una muestra de sangre del sujeto en cuestión.

Por tanto, un método de este tipo comprende más específicamente

i) someter células que contienen mitocondrias vivas aisladas de una muestra de sangre venosa humana a respirometría de alta resolución a concentraciones de oxígeno en el intervalo de O₂ 400-25 μM a una temperatura constante de 37°C, en el que la muestra de sangre humana se obtiene de una persona sometida a un estudio clínico

o a un régimen de tratamiento, y en el que se ha administrado una sustancia de prueba a la persona durante el estudio clínico o el régimen de tratamiento,

5 ii) poner en contacto la muestra de células con carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) u otra sustancia que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a protones para obtener la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias presentes en las plaquetas,

10 iii) poner en contacto la muestra resultante de ii) con un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I, tal como rotenona, para dilucidar la respiración celular dependiente de la oxidación de sustratos del complejo II,

iv) poner en contacto la muestra resultante de iii) con el inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, tal como antimicina A, para determinar cualquier actividad de consumo de oxígeno no mitocondrial, tal como autooxidación de dicha muestra, y

15 v) comparar el consumo de oxígeno de la muestra de sangre humana de una persona sometida al estudio clínico o al régimen de tratamiento con el consumo de oxígeno de una muestra de sangre humana de una persona de un grupo de control, en el que una disminución en el consumo de oxígeno en comparación con el control indica un efecto negativo sobre las mitocondrias.

20 En el presente contexto un estudio clínico puede ser cualquier estudio incluyendo estudios preclínicos y estudios de seguridad a largo plazo. Tal como se observa a partir de lo anterior, la persona puede también ser un paciente que padece una enfermedad o trastorno y se somete a un régimen de tratamiento con uno o más principios activos o principios activos candidatos.

25 Las muestras pueden ser de un individuo o pueden ser muestras agrupadas de más individuos. En algunos casos se recoge el plasma de pacientes que se someten a tratamiento con un fármaco en ensayos clínicos o de otra manera. El plasma debe centrifugarse y puede congelarse y almacenarse hasta que pueda realizarse el análisis. El plasma contendría fármaco original así como metabolitos del fármaco (que pueden ser tan tóxicos o más para las mitocondrias que el fármaco original). El plasma se descongelaría y las plaquetas o glóbulos blancos (WBC) sanos podrían sumergirse en este plasma para ver si ello afectaría a la función mitocondrial. Hay varios beneficios con esto incluyendo que no es necesario transportar sangre de ensayos clínicos urgentemente para el análisis.

30 Todos los detalles relativos a las partes individuales del método son tal como se describe en el presente documento y se hace referencia a ello.

35 *4. Análisis de los efectos beneficiosos de fármacos destinados a mejorar la función mitocondrial*

Pueden ejecutarse grandes programas de examen antes de los ensayos clínicos en células derivadas de sangre de individuos sanos o de capa leucocítica. El análisis puede llevarse a cabo también en la sangre del paciente (a menudo niños) antes del tratamiento y durante el tratamiento y tras los cambios en la dosificación.

40 El método es esencialmente idéntico al método descrito en el punto 3, pero las muestras de sangre humana se toman de los pacientes antes y durante el tratamiento o después de los cambios en la dosificación o en la vía o forma de administración. Las muestras se analizan y los resultados se comparan. Por tanto, puede tomarse una primera muestra de sangre antes del tratamiento (o de cualquier cambio en el tratamiento) y puede tomarse una segunda muestra de sangre durante el tratamiento o después de cualquier cambio en el tratamiento. El efecto del tratamiento puede seguirse también sometiendo a prueba muestras tomadas en ese momento durante el tratamiento.

50 Por tanto, un método de este tipo comprende

i) someter células que contienen mitocondrias vivas aisladas de una muestra de sangre venosa humana a respirometría de alta resolución a concentraciones de oxígeno en el intervalo de O_2 400-25 μM a una temperatura constante de 37°C, y en el que se ha administrado una sustancia de prueba a la persona antes de que se tome la muestra de sangre,

55 ii) poner en contacto la muestra de células con carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) u otra sustancia que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a protones para obtener la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias presentes en las plaquetas,

60 iii) poner en contacto la muestra resultante de ii) con un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I, tal como Rotenona, para dilucidar la respiración celular dependiente de la oxidación de sustratos del complejo II,

65 iv) poner en contacto la muestra resultante de iii) con el inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, tal como antimicina A, para determinar cualquier actividad de consumo de oxígeno no mitocondrial, tal como autooxidación de dicha muestra,

v) comparar el consumo de oxígeno de una primera muestra de sangre humana con el consumo de oxígeno de una segunda muestra de sangre, en el que una disminución en el consumo de oxígeno indica un efecto negativo sobre las mitocondrias y un aumento en el consumo de oxígeno indica un efecto positivo sobre las mitocondrias.

El resultado se compara con un control o referencia.

Las etapas i)-v) pueden repetirse con una tercera, cuarta, quinta etc. muestra dependiente de la clase de cambio que se investiga.

La primera muestra puede ser una muestra de control, es decir una muestra de sangre tomada antes de que se inicie cualquier tratamiento. Alternativamente, la primera y segunda muestras representan muestras de sangre tomadas a diferentes puntos de tiempo durante un régimen de tratamiento. Por ejemplo si un régimen de tratamiento dura una semana, la primera muestra puede tomarse el día 1 (muestra de referencia) y la segunda muestra el día 2 (y muestras adicionales tomadas en los días siguientes). Si se cambia un régimen de dosis, la primera muestra de sangre puede tomarse antes de que se cambie la dosis y la segunda muestra después de que se cambie la dosis.

La figura 10 muestra los trazos experimentales del efecto beneficioso y tóxico sobre la respiración mitocondrial de un posible candidato a fármaco en comparación con el control.

Todos los detalles con respecto a las partes individuales del método son tal como se describe en el presente documento y se hace referencia a ello.

Función de las mitocondrias

La disfunción mitocondrial se reconoce en enfermedades primarias de la cadena respiratoria debidas a mutaciones del ADN nuclear o mitocondrial y también está implicada en trastornos tales como enfermedad de Huntington, de Alzheimer y de Parkinson así como el resultado de inflamación excesiva tal como en septicemia (Brealey *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2010; Kones, 2010; Rosenstock *et al.*, 2010).

El estudio de la función mitocondrial es esencial tanto para investigación básica de la fisiología mitocondrial y los mecanismos patógenos, así como para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales. Un método común para investigar la función mitocondrial es la determinación de la actividad enzimática máxima de complejos del sistema de transporte de electrones (ETS, *electron transport system*) individuales en mitocondrias alteradas por espectrofotometría. El beneficio de este procedimiento es su fácil almacenamiento y transporte a instalaciones de laboratorio centrales con análisis de alto rendimiento dado que las muestras pueden congelarse (Haas *et al.*, 2008). Sin embargo, la mitocondria y sus componentes no funcionan como unidades aisladas. Los complejos de la cadena respiratoria están interconectados en el ETS que a su vez se reúnen en complejos multienzimáticos y supercomplejos (Lenaz y Genova, 2009). Las mitocondrias experimentan fusión y fisión, forman redes y producen interferencias con otros compartimentos subcelulares (Picard *et al.*, 2011). Esto resalta claramente la necesidad de analizar la función mitocondrial sin, o al menos con mínima, alteración celular y con un entorno tan cercano como sea posible al fisiológico. Esto puede lograrse usando mediciones polarográficas de la respiración mitocondrial en células (Kitchens y Newcomb, 1968). La respiración puede analizarse en células intactas con medios circundantes naturales, tales como plasma, utilizando sustratos endógenos. Adicionalmente, con la permeabilización de la membrana celular, puede lograrse acceso directo a las mitocondrias para inhibidores y sustratos e investigarse complejos individuales del ETS sin la necesidad de alteración celular ni purificación mitocondrial (Hutter *et al.*, 2006).

Cuando se selecciona qué tejido investigar para reunir pruebas de disfunción mitocondrial la mejor elección es el tejido más profundamente afectado por el proceso patológico en un paciente dado. Sin embargo, esto casi nunca es posible debido a la invasividad y los riesgos asociados con biopsias de órganos internos tales como cerebro, hígado y corazón. Por tanto, se usan otros tejidos y lo más comúnmente células musculares y fibroblastos cutáneos (Haas *et al.*, 2008).

Las plaquetas son una fuente fácilmente obtenible de mitocondrias viables y la toma de muestras es menos invasiva en comparación con biopsia de músculo o piel. Las alteraciones mitocondriales de las plaquetas se han demostrado en una variedad de enfermedades, que afectan principalmente a otros sistemas de órganos (Hauptmann *et al.*, 2006; Krige *et al.*, 1992) así como en el proceso de envejecimiento (Merlo Pich *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2007) y se ha propuesto por tanto que sirven como un posible marcador de disfunción mitocondrial sistémica (Sjövall *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2007). Además, las plaquetas son muy adecuadas para el análisis polarográfico (Kitchens y Newcomb, 1968; Sjövall *et al.*, 2010).

Desarrollo de un método según la invención

El objetivo del estudio notificado en la sección experimental fue establecer una metodología y hacer una evaluación profunda de la función respiratoria de plaquetas normales *ex vivo* en células viables intactas y la función de complejos individuales en células permeabilizadas usando respirometría de alta resolución. En segundo lugar, se

estudiaron el impacto del almacenamiento en entorno frío y a temperatura ambiente, la influencia del género y la edad y, en tercer lugar, la constancia del método aplicado a diferentes cohortes de referencia.

Para detalles relacionados con la configuración experimental se hace referencia a la sección experimental.

Se presentan datos que reflejan la función respiratoria mitocondrial de plaquetas normales de varias cohortes de referencia diferentes. La fosforilación oxidativa representa aproximadamente el 85% de la producción de energía en la plaqueta en reposo (Kilksen *et al.*, 1984) y además de la glicolisis, la β -oxidación de ácidos grasos contribuye también al suministro de sustratos (Cesar *et al.*, 1987). La capacidad respiratoria de reserva de las plaquetas intactas, es decir, cuánto puede aumentar la respiración mediante el desacoplador FCCP con respecto al estado habitual, fue mayor en plaquetas suspendidas en plasma en comparación con PBS tal como se indica por las diferencias en ETS/habitual (tabla 2). Esto refleja probablemente los diversos tipos y niveles de suministro de sustratos en los diferentes medios. La capacidad respiratoria de reserva de las plaquetas intactas fue aproximadamente del 64%, cuando los experimentos se llevaron a cabo en PBS con glucosa sólo como sustrato exógeno, en comparación con aproximadamente el 88% cuando las células se incubaron y analizaron en su propio plasma donde tienen un suministro de sustrato fisiológico. Cuando se exponen a oligomicina, la capacidad respiratoria de reserva fue generalmente menor, aproximadamente del 28% en PBS-glucosa y del 25% en plasma, reflejando posiblemente rutas de oxidación dependientes de energía comprometidas de glucosa y otros sustratos en células con producción de ATP inhibida.

En células permeabilizadas, tanto la glicolisis como la β -oxidación se sortean proporcionando cantidades de saturación de sustratos al ciclo del ácido cítrico. El resultado es un ETS y circuito de protones que puede evaluarse sin que los sustratos sean limitantes de la tasa. Pudo aumentarse el consumo máximo de oxígeno, o bien estimulado por ADP (acoplado) o bien por FCCP (desacoplado), en ~ 50% adicional en células permeabilizadas en comparación con células intactas. Esto sugiere una etapa limitante de la tasa del suministro de sustratos en células intactas estimuladas que no está presente en el estado en reposo ya que la respiración habitual era similar independientemente de los medios de suspensión. Las plaquetas intactas usan NADH y entrada de electrones a través del complejo I casi exclusivamente ya que no pudo detectarse respiración dirigida por el complejo II después de la inhibición del complejo I por rotenona. El hallazgo de que los valores de respiración de ETS de células intactas estaban en el mismo intervalo que para OXPPOS_{CI} de células permeabilizadas presta respaldo adicional a esta noción. Esto también enfatiza la importancia de alimentar los ETS con electrones de tanto el complejo I como el complejo II en la unión Q con el fin de establecer el transporte de electrones máximo en células permeabilizadas. Con un suministro de sustrato no restringido, el complejo I contribuye aproximadamente 2/3 y el complejo II 1/3 de la respiración total en la entrada de electrones convergente. No se observó que la ATP sintasa provocase ninguna limitación de la tasa significativa ya que las capacidades respiratorias estimuladas por ADP y por FCCP máximas eran similares con una razón OXPPOS_{CI+II}/ETS_{CI+II} cercana a uno. Además, la respiración de las plaquetas presentó un fuerte acoplamiento con la fosforilación oxidativa tal como se demostró por una baja respiración de LEAK en relación con la capacidad respiratoria máxima y las razones ETS/LEAK altas correspondientes tanto en células intactas como en células permeabilizadas. Se observó un estado de LEAK superior en células permeabilizadas en comparación con células intactas. Aunque la permeabilización de la membrana plasmática con digitonina pudo afectar a la permeabilidad de la membrana mitocondrial, esto no está respaldado por los hallazgos ya que hubo un gran margen de seguridad de la concentración de digitonina observado en los experimentos de titulación de digitonina. No hubo tampoco ningún efecto sobre la respiración por citocromo c exógeno y por tanto la membrana externa mitocondrial permaneció intacta. Una explicación más probable es que con suministro de sustrato de saturación puede generarse un gradiente de protones mayor a través de la membrana interna aumentando la respiración de LEAK ya que esta tasa de respiración basal está en proporción con la fuerza de protrón-motriz (Nicholls, 1977).

La reducción en la función mitocondrial con la edad ha estado muy implicada (Lesnefsky y Hoppel, 2006; Vendelbo y Nair, 2011). En las plaquetas se observó una disminución de la respiración del complejo II con la edad sin un efecto sobre la función respiratoria global, un efecto relacionado principalmente con una diferencia entre la cohorte pediátrica y la de adultos. El declive en la respiración parecía ser específico del complejo II ya que un efecto más aguas abajo sobre el complejo III, complejo IV o la ATP-sintasa también debería haber influido en la actividad de ETS o OXPPOS máxima.

La diferencia entre la respiración habitual y la respiración de LEAK se atribuye generalmente a la producción de ATP en reposo. Dado que el estado de LEAK permaneció al mismo nivel a lo largo de toda la franja de edad estudiada, el aumento de la respiración habitual observado en el presente documento sugiere un producción de ATP basal aumentada con la edad. Generalmente hay un declive en la tasa metabólica en reposo con la edad (Johannsen y Ravussin, 2010) pero cómo ello afecta a diversos tejidos no está dilucidado claramente. Porqué las plaquetas requerirían una producción de ATP basal aumentada con la edad no queda claro a partir del presente estudio. En comparación con los homólogos de adultos suecos, los voluntarios japoneses mostraron una respiración de LEAK aproximadamente el 27% superior. Esto dio como resultado una ETS_{CI}/LEAK significativamente aumentada en la respiración dirigida por sustrato del complejo II pero una OXPPOS_{CI}/LEAK y OXPPOS_{CI+II}/LEAK significativamente reducidas. Se ha notificado que japoneses y caucásicos muestran diferencias en los patrones de enfermedad (Benfante, 1992). Esto se ha explicado tanto por diferencias genéticas pero también debido a factores de la

alimentación y el estilo de vida ya que las diferencias, en gran medida, desaparecen en una población migrante (Yamori, 2006). La comida japonesa es tradicionalmente rica en pescado y otros productos marinos que tienen un alto contenido de FFA con propiedades desacoplantes (Cha *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2008). Se ha sugerido que un desacoplamiento moderado es beneficioso en cuanto al envejecimiento debido a una fuerza protón-motriz reducida y como resultado menos producción de ROS (Brand, 2000). El ADN mitocondrial japonés está dominado por el haplogrupo D en comparación con el europeo donde el haplogrupo H es predominante. Con respecto al tamaño de muestra pequeño, las diferencias observadas en este estudio podrían por tanto o bien ser genéticas o bien estar relacionadas con el estilo de vida o con una combinación de ambos. Se necesitan estudios adicionales para aclarar estas cuestiones. Los niveles de respiración de muestras de cordón umbilical fueron generalmente mayores en comparación con las otras cohortes. Esto es probablemente un reflejo de los requisitos diferentes entre la vida intra y extrauterina. Sin embargo, son escasos los datos sobre la función mitocondrial en la vida fetal (Yanicostas *et al.*, 2011).

El método presentado podría servir potencialmente como un complemento a la presente evaluación convencional de enfermedad mitocondrial sospechada que habitualmente implica biopsias musculares. Como tal, están recogiéndose actualmente datos de varias cohortes diferentes tales como pacientes con trastornos neurodegenerativos y niños recién nacidos con trastornos mitocondriales sospechados. Se desea por tanto evaluar las limitaciones planteadas por el almacenamiento y el pequeño volumen de muestra. Aun cuando el almacenamiento en viales de EDTA no es un medio optimizado para las plaquetas, parece que sólo hay alteraciones sin importancia en la función respiratoria después de 24 h de almacenamiento en sangre. Para fines de diagnóstico, podía por tanto transportarse potencialmente una muestra a instalaciones centrales a lo largo de distancias más largas con la posibilidad mantenida de análisis de la capacidad respiratoria en plaquetas viables. En niños muy pequeños puede haber limitaciones con respecto a cuánta sangre puede extraerse para diferentes análisis y se evaluó por tanto lo bajas que serían las concentraciones de plaquetas que podrían usarse y todavía obtener valores fiables. A 50×10^6 plaquetas/ml el consumo de oxígeno absoluto era sólo de aproximadamente 25 nmol/ml para un experimento completo. Los estados respiratorios no se vieron afectados cuando se evaluaron a diferentes concentraciones con la excepción de ETS_{Cl + II}, que se redujo ligeramente a 50×10^6 plaquetas/ml. El motivo de esto no está completamente claro pero el efecto máximo de FCCP y su impacto de unión inespecífica a otras membranas celulares pueden alterarse con un contenido celular reducido incluso si se titulan cuidadosamente.

La fortaleza del presente método es la capacidad para combinar análisis tanto de plaquetas intactas como permeabilizadas. Analizar células intactas suspendidas en el plasma del propio sujeto es un entorno experimental probablemente muy similar a las condiciones fisiológicas. Esto hace posible estudiar no sólo defectos genéticos inherentes sino también defectos mitocondriales inducidos por factores exógenos tales como toxinas o productos farmacéuticos. Puede obtenerse información adicional de células permeabilizadas donde pueden usarse protocolos de titulación diferentes (SUIT) para cambiar el control de flujo a diferentes partes del sistema respiratorio para dilucidar dónde está situada la patología.

Aunque la respirometría puede considerarse como uno de los métodos preferidos en la evaluación de la función bioenergética mitocondrial (Brand y Nicholls, 2011), y las mitocondrias de plaquetas parecen ser una buena fuente de mitocondrias humanas viables, el método tiene limitaciones. Las enfermedades que afectan a las mitocondrias pueden ser más o menos específicas de tejido y se sabe que las mutaciones en el ADNmt se expresan a diferentes razones en diferentes tejidos, un fenómeno conocido como heteroplasmia. Como tales, las alteraciones podrían no reconocerse si no están sustancialmente presentes en el tejido analizado. Las células tienen la capacidad de compensar niveles decrecientes de ATP presentan habitualmente un umbral donde la compensación ya no puede producirse más y se sobreviene un fallo orgánico (Rossignol *et al.*, 2003). Por tanto es difícil predecir a qué nivel la respiración mitocondrial reducida debe considerarse patológica. Sin embargo, todas las limitaciones anteriores no son únicas para el presente método sino que existen independientemente de qué tejido o técnica está usándose. Con el presente protocolo de titulación no se incluyeron mediciones específicas del complejo IV que normalmente se realizan mediante el donador de electrones artificial TMPD conjuntamente con ascorbato para mantener TMPD reducido. TMPD/ascorbato se somete a autooxidación catalizada por diferentes proteínas que contienen metales (tales como citocromo C) y es también dependiente de la concentración de oxígeno. Debido a la naturaleza de la preparación de las muestras, varía la cantidad de material celular inespecífico y plasma y por tanto no es posible hacer ninguna corrección de fondo para autooxidación de TMPD/ascorbato.

Conclusión

Las mediciones respiratorias de plaquetas son muy adecuadas para estudiar mitocondrias humanas en condiciones fisiológicas *ex-vivo*. Se demuestra que pueden obtenerse resultados fiables con cantidades minúsculas de muestra y después de almacenamiento hasta 24 h usando respirometría de alta resolución. Aplicando protocolos de SUIT diferentes puede obtenerse información detallada de la capacidad respiratoria de las células y diferencias entre diferentes cohortes y se describe cómo evaluar estos resultados. Este enfoque puede ser adecuado para evaluar trastornos mitocondriales activados exógenamente así como endógenos y está evaluándose actualmente el método para estos fines.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Trazado representativo de la titulación de digitonina. Plaquetas a una concentración de 100×10^6 /ml suspendidas en tampón MiR05 que contiene inicialmente succinato 5 mM y ADP 1 mM. Después de la estabilización a respiración habitual se inhibió el complejo I mediante rotenona seguido por titulación de digitonina gradual (20 μ g) hasta que no se detectó aumento adicional.

Figura 2. Protocolo experimental de plaquetas intactas. La respiración endógena (habitual) estuvo seguida por inducción de respiración independiente del complejo V (LEAK) por oligomicina (1 μ g/ml). Se logró respiración máxima por titulación del protonóforo, carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP, en concentración media de PBS 6 μ M, en concentración media de plasma 100 μ M) seguido por rotenona (2 μ M) y posteriormente antimicina-A (1 μ g/ml), inhibición del complejo I y III, respectivamente, para la medición del consumo de oxígeno residual. Los estados respiratorios inducidos y los sustratos respiratorios usados se indican por encima de la gráfica. ETS = sistema de transporte de electrones.

Figura 3. Protocolo experimental de plaquetas permeabilizadas. Trazado a partir del experimento que presenta la tasa de consumo de oxígeno usando un protocolo de titulación de sustrato, desacoplador, inhibidor. Los estados respiratorios inducidos y los complejos respiratorios activados se definen por encima de la gráfica. Las plaquetas se permeabilizaron con digitonina y se añadieron simultáneamente los sustratos del complejo I (CI) malato y piruvato (5 mM, respectivamente). Se estimuló la fosforilación oxidativa (OXPHOS) por adición posterior de ADP (1 mM) seguido por el sustrato del complejo I adicional glutamato (5 mM). La adición del sustrato ligado al complejo II (CII) succinato (10 mM) permitió la entrada de electrones convergente tanto por medio del complejo I como del complejo II. Se inhibió OXPHOS por oligomicina (1 μ g/ml) revelando la respiración independiente del complejo V (LEAK). La capacidad respiratoria máxima del sistema de transferencia de electrones (ETS) se indujo por titulación del protonóforo, carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP, concentración media 6 μ M)). La inhibición del complejo I por rotenona (2 μ M) reveló respiración respaldada por el complejo II. El consumo de oxígeno no mitocondrial residual se expuso por adición del inhibidor del complejo III antimicina-A (1 μ g/ml). No se presenta la adición de TMPD (0,5 mM) y azida (10 mM). Los estados respiratorios inducidos y los sustratos respiratorios usados se indican por encima de la gráfica.

Figura 4. Correlación de edad y sexo con la respiración mitocondrial de plaquetas. A, correlación entre respiración habitual con la edad, los puntos individuales son medias de valores por duplicado. B, correlación entre ETSCII y C, respiración de OXPHOS_{CII+III} y edad. D, comparación de respiración de ETSCI+II entre géneros. Para la definición de los estados respiratorios véase la figura 3.

Figura 5. Efecto de la concentración de plaquetas sobre diferentes estados respiratorios en plaquetas permeabilizadas. Consumo de oxígeno en los diferentes estados del sustrato, protocolo de titulación de inhibidor a concentraciones que oscilan entre 50 y 400×10^6 plaquetas/ml. Para la definición de los estados respiratorios véase la figura 3. N = 5, cada experimento se llevó a cabo por duplicado, * = p < 0,05.

Figura 6. Efecto del almacenamiento sobre diferentes estados respiratorios en plaquetas permeabilizadas. La sangre se almacenó en tubos vacutainer de K₂EDTA en mesa basculante o bien a temperatura ambiente o bien a 4°C. A las 72 h todos los parámetros excepto la respiración de LEAK estaban significativamente disminuidos en comparación con el tiempo 0. Para la definición de los estados respiratorios véase la figura 3. N = 4, cada experimento se realizó por duplicado, * = p < 0,05.

Figura 7. Trazado experimental del ensayo de toxicidad mitocondrial de troglitazona y rosiglitazona. Plaquetas humanas a 200×10^6 células/ml en un tampón que contiene sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1. La troglitazona presenta toxicidad mitocondrial tal como se muestra por flujos de oxígeno disminuidos con concentraciones superiores. Se añadieron FCCP (2 μ M), rotenona (2 μ M) y antimicina (1 μ g/ml) donde se indica. FCCP = carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona.

La figura 8 muestra el trazado experimental a partir del ensayo de toxicidad mitocondrial de minociclina y doxiciclina. Plaquetas humanas a 200×10^6 células/ml en un tampón que contiene sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1. La minociclina presenta toxicidad mitocondrial tal como se muestra por flujos de oxígeno disminuidos con concentraciones superiores. La doxiciclina también muestra una toxicidad pero menos pronunciada en comparación con minociclina. Se añadieron FCCP (2 μ M), rotenona (2 μ M) y antimicina (1 μ g/ml) donde se indica. FCCP = carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona.

La figura 9 muestra el trazado experimental a partir del ensayo de toxicidad mitocondrial de cerivastatina y simvastatina. Plaquetas humanas a 200×10^6 células/ml en un tampón que contiene sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1. La cerivastatina presenta toxicidad mitocondrial tal como se muestra por flujos de oxígeno disminuidos con concentraciones superiores. Se añadieron FCCP (2 μ M), rotenona (2 μ M) y antimicina (1 μ g/ml) donde se indica.

FCCP = carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona.

5 La figura 10 muestra trazados experimentales de efectos beneficiosos y tóxicos sobre la respiración mitocondrial de un candidato a fármaco novedoso en comparación con el control. Plaquetas humanas a 200×10^6 células/ml en un tampón que contiene sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, $MgCl_2$ 3 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1. Se añadieron FCCP (2 μ M), rotenona (2 μ M) y antimicina (1 μ g/ml) donde se indica. La dosis añadida en cada etapa de titulación se indica por encima del trazado. El fármaco propuesto incrementa la respiración mitocondrial hasta una dosis acumulada de 2 mM tras lo cual la respiración disminuye con la titulación adicional, indicando toxicidad mitocondrial. FCCP = carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona.

15 La figura 11 es una figura esquemática del ensayo de examen del complejo mitocondrial II. Muestra el protocolo para evaluar sustratos mitocondriales permeables en células novedosos. En el ensayo, se reprime la función mitocondrial en células intactas con el inhibidor del complejo respiratorio I rotenona. Los candidatos a fármaco se comparan con sustratos endógenos antes y después de la permeabilización de la membrana plasmática para evaluar la potenciación o inhibición bioenergética.

20 La figura 12 es una figura esquemática del ensayo de examen de respiración convergente mitocondrial. Describe el protocolo para evaluar la potencia de sustratos mitocondriales permeables en células novedosos. En el ensayo, la actividad mitocondrial se estimula desacoplando las mitocondrias con el protonóforo FCCP. Los candidatos a fármaco se titulan para obtener el nivel de respiración convergente máxima (derivada del complejo I y del complejo II). Después de la adición de rotenona, se obtiene la estimulación dependiente del complejo II. Se añade el inhibidor del complejo III antimicina para evaluar el consumo de oxígeno no mitocondrial.

25 La figura 13 muestra el aumento de la respiración (flujo de oxígeno por unidad) con titulación gradual de fármacos en comparación con el control (succinato de sodio) en plaquetas humanas intactas (ensayo descrito en la figura 12).

30 La figura 14 muestra el consumo de oxígeno dependiente de los complejos mitocondriales I, II y IV, respectivamente. El consumo de oxígeno se midió a diferentes concentraciones de metformina presente en tampón con métodos descritos anteriormente. Con concentraciones crecientes de metformina, se observa una disminución significativa en la respiración del complejo I. Los datos se expresan como media y desviación estándar. * $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ en comparación con el vehículo (metformina 0 mM). Plaquetas humanas a 200×10^6 células/ml en un tampón que contiene sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, $MgCl_2$ 3 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1.

35 Sección experimental

Materiales y métodos

40 1.1 Adquisición de muestras humanas.

El estudio fue aprobado por la junta regional de revisión ética de Lund, Suecia (adultos: 113/2008 y 644/2009, niños: 59/2009) y el comité de ética de la Universidad Médica de Tokio, Japón (número de permiso 1514). Para los adultos suecos, se recogieron muestras de sangre de donantes de sangre sanos en la central de donantes de sangre, Hospital Universitario de Skåne, Lund y de adultos sanos que se someten a rehabilitación después de lesión de rodilla. La cohorte japonesa consistió en voluntarios adultos sanos. Se obtuvieron las muestras después de que se consiguiera el consentimiento informado por escrito. Los experimentos se llevaron a cabo según los mismos procedimientos y protocolos y por los mismos investigadores en ambos centros de investigación. Las muestras de control pediátricas se obtuvieron de pacientes que se someten a cirugía programada menor. El consentimiento informado por escrito se consiguió de los padres o tutores y la sangre se extrajo antes de la inducción de anestesia. Se tomaron muestras de sangre del cordón umbilical después del parto de individuos sanos que experimentan un embarazo normal. Las muestras se obtuvieron después de que se consiguiera el consentimiento informado por escrito.

55 Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE.UU.) si no se establece otra cosa.

1.2 Preparación de plaquetas

60 Para donantes de sangre, se tomaron muestras del tubo de recogida al mismo tiempo que una donación de sangre planificada y en las otras cohortes de adultos y en niños por medio de punción venosa. Se tomaron muestras de sangre del cordón umbilical directamente después de dar a luz el bebé o bien por vía vaginal o bien por cesárea. Se extrajo un volumen de 21 ml, de adultos, 6-12 ml, de niños y 3-6 ml de cordón umbilical en tubos de K_2EDTA (Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH, Kremünster, Austria). En estudios piloto, se mostró que K_2EDTA daba como resultado el mejor rendimiento e impedía la activación de plaquetas en comparación con heparina, citrato y ácido-citrato-dextrosa (ACD) como anticoagulantes (datos no mostrados). Se prepararon en ese momento muestras de sangre y se analizaron en un plazo de 3-5 h. Se centrifugaron los tubos 15 min a $300 \times g$ a temperatura ambiente,

para proporcionar un plasma rico en plaquetas (PRP). Se retiró con una pipeta este PRP y se centrifugó durante 5 minutos a 4600 x g, a temperatura ambiente, produciendo un plasma casi libre de células y un sedimento de plaquetas. Se disolvió el sedimento en 1-3 ml del propio plasma del sujeto de control pipeteando suavemente para obtener un PRP altamente enriquecido con una concentración final media de $1864 \times 10^9/\text{ml}$ (intervalo 941-2498).

1.3 *Respirometría de alta resolución*

Se midió la respiración a una temperatura constante de 37°C en un oxígrafo de alta resolución (Oxigraph-2k Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria (Gnaiger *et al.*, 2000)) en cámaras de vidrio de 2 ml con velocidad de agitador de 750 rpm. Se registraron los datos con el software DatLab 4.3. (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) con una velocidad de toma de muestras ajustada a 2 s. Se llevaron a cabo todos los experimentos a una concentración de oxígeno en el intervalo de O_2 210-50 μM . Si fue necesario, se llevó a cabo reoxigenación elevando parcialmente el tapón de la cámara para un breve equilibrado de aire. Se midió el flujo de oxígeno de fondo instrumental en un conjunto de experimentos diferenciado y se corrigió automáticamente en los experimentos posteriores según las instrucciones del fabricante. Para las mediciones de la respiración en células permeabilizadas, se suspendieron las plaquetas en un medio de respiración mitocondrial (MIR05) que contenía sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, MgCl_2 3 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1 (Gnaiger *et al.*, 2000). Para experimentos en células intactas, se suspendieron las plaquetas o bien en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con adición de glucosa 5 mM o bien en el plasma del propio sujeto de control. Se llevó a cabo la calibración a saturación de aire cada día antes de comenzar los experimentos permitiendo que se agitara agua Millipore o medios de respiración con aire en la cámara del oxígrafo hasta el equilibrado y se obtuvo una señal estable. La concentración de oxígeno se calculó automáticamente a partir de la presión barométrica y los factores de solubilidad que se ajustaron a 1,0 para agua, 0,92 para MIR05 y PBS-glucosa y 0,89 para plasma (Baumgärtl y Lübbers, 1983).

1.3.1 *Protocolo experimental para plaquetas intactas*

Se evaluó la respiración integrada de células intactas con sustratos mitocondriales endógenos con dos protocolos de titulación diferentes. Se suspendieron las plaquetas o bien en PBS-glucosa o bien en el plasma del propio sujeto de control. Inicialmente, se dejó que las muestras se estabilizaran en un estado de respiración habitual, revelando las demandas de energía de las células en reposo sobre la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Para evaluar la contribución de la respiración independiente de fosforilación de ADP, se añadió secuencialmente oligomicina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inhibidor de ATP-sintasa) induciendo el estado de respiración de LEAK (también conocido como respiración en el estado 4 inducido por oligomicina). Se midió la capacidad máxima del ETS después de la titulación cuidadosa del protonóforo, carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) hasta que no se detectó ningún aumento adicional en la respiración (en concentración media de PBS 6 μM , en concentración media de plasma 100 μM). Se añadieron entonces secuencialmente rotenona (2 μM , inhibidor del complejo I [CI]) y antimicina-A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inhibidor del complejo III [CIII]) para inhibir el ETS proporcionado el consumo de oxígeno residual que se restó de los diferentes parámetros respiratorios en análisis adicionales.

Con el fin de evaluar la influencia sobre la capacidad respiratoria máxima por la inhibición de ATP-sintasa, se llevó a cabo un segundo protocolo experimental, donde se evaluó la capacidad del ETS mediante titulación directa de FCCP después de la estabilización de la respiración habitual, seguido por los mismos inhibidores que anteriormente. Las razones de control se dedujeron de la respiración máxima, estimulada por FCCP, dividida entre la respiración de LEAK (ETS/LEAK) y la respiración habitual (ETS/habitual).

1.3.2 *Protocolo experimental para plaquetas permeabilizadas*

Para acceder al ETS con inhibidores y sustratos exógenos en saturación, se permeabilizó la membrana plasmática con el detergente digitonina. Se llevaron a cabo un conjunto de experimentos para establecer la concentración óptima de digitonina para inducir la permeabilización máxima de la membrana plasmática sin afectar a la membrana mitocondrial externa o interna. Se suspendieron plaquetas ($200 \times 10^9/\text{ml}$) en MIR05 y se preincubaron con ADP 1 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 mM. Se tituló digitonina 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hasta que se obtuvo la respuesta máxima en la respiración (Gnaiger *et al.*, 1998). Se muestra una gráfica representativa de un experimento de titulación en la figura 1. Se encontró que la dosificación óptima era de 1 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ plaquetas. El citocromo c exógeno no indujo ningún efecto significativo sobre la respiración indicando que la membrana externa mitocondrial había permanecido intacta (datos no mostrados).

Se usó un protocolo de titulación de sustrato, desacoplador, inhibidor (SUIT) para establecer las capacidades respiratorias con flujo de electrones a través tanto del complejo I como del complejo II (CII) por separado así como entrada de electrones convergente por medio de la unión Q (CI + II) (Gnaiger, 2009). Después de que se estableciera la respiración habitual, se inició la titulación con permeabilización de la membrana plasmática con digitonina y una adición concomitante de malato (5 mM) y piruvato (5 mM). La capacidad de OXPHOS del complejo I, dirigido por sustratos relacionados con NADH, se evaluó añadiendo ADP (1 mM), y adicionalmente glutamato (5 mM) (OXPHOS_{CI}, o estado 3_{CI}). Secuencialmente, se añadió succinato 10 mM induciendo la capacidad de

OXPHOS máxima con entrada convergente a través de tanto el complejo I como el complejo II (OXPHOS_{CI + II}, o estado 3_{CI+II}). Se usó oligomicina (1 µg/ml) para inhibir la ATP sintasa e inducir respiración de LEAK. Se obtuvo posteriormente la capacidad respiratoria convergente máxima del ETS titulando FCCP (ETS_{CI + II}, concentración media 6 µM). Se inhibió con rotenona (2 µM) el complejo I para evaluar la capacidad del ETS respaldada por succinato a través del complejo II sólo (ETS_{CI}). Finalmente, se inhibió el flujo de electrones a través del ETS por adición de antimicina-A (1 µg/ml) proporcionando el consumo de oxígeno residual no relacionado con el ETS. Se dedujeron las razones de control a partir de la respiración oxidativa máxima o la respiración estimulada por FCCP máxima dividida entre la respiración de LEAK (OXPHOS_{CI + II + II/LEAK} y ETS_{CI + II/LEAK} respectivamente). Las muestras analizadas se almacenaron a -80°C.

1.4 Análisis de datos

Se llevó a cabo la evaluación estadística usando Graph Pad PRISM (software GraphPad versión 5.01, La Jolla, CA, EE.UU.). Se presentan los valores como media ± EEM, o valores individuales. Se encontró que todos los valores de las diferentes cohortes, excepto para el cordón umbilical y las razones de control para células intactas (ETS/LEAK, ETS/habitual), estaban distribuidos de manera normal con la prueba de normalidad colectiva de D'Agostino y Pearson. Se llevó a cabo la comparación entre múltiples grupos por ANOVA de una vía con análisis a posteriori entre grupos por prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para datos paramétricos y prueba de Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Dunn para datos no paramétricos. Para la correlación con la edad, se usó regresión lineal. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

2. Resultados

Se tomaron muestras de sangre de 46 voluntarios adultos sanos (24 de Suecia y 22 de Japón), 28 varones y 18 mujeres, con mediana de edad de 37 años (intervalo de 19-65 años) y 25 niños, 18 varones y 7 mujeres, con mediana de edad de 4 (intervalo de 1 mes-12 años) y 22 cordones umbilicales (13 de cesárea y 9 de parto vaginal).

2.1 Rendimiento, viabilidad y e integridad de mitocondrias de plaquetas

Se midió la concentración de plaquetas de sangre completa y el rendimiento calculado después de la preparación del plasma rico en plaquetas altamente enriquecido era en promedio del 92% (± 8%, n = 16). Con el fin de evaluar la viabilidad de plaquetas después del protocolo de preparación, se llevó a cabo respirometría en plaquetas centrifugadas una etapa, es decir 300 x g durante 15 minutos y se compararon con la respiración después de sedimentación. No pudieron observarse diferencias significativas concluyendo que había buena estabilidad y viabilidad de las plaquetas a lo largo de todo el proceso de aislamiento (N = 16 datos no mostrados).

2.2 Respiración mitocondrial de plaquetas intactas

Se muestra una gráfica representativa de un experimento en células intactas en la figura 2 y se presentan valores de parámetros respiratorios en la tabla 1. En células intactas la respiración está dirigida sólo por sustratos endógenos. La respiración habitual era similar en células incubadas o bien en PBS-glucosa o bien en plasma. La respiración de LEAK era muy baja, por debajo de O₂ 1 pmol/s/10⁸ plaquetas. La razón de control consecuentemente alta ETS/LEAK indica una respiración acoplada muy fuertemente. La estimulación máxima del ETS con FCCP era significativamente mayor en experimentos sin oligomicina y la capacidad respiratoria de reserva, tal como se indica por la razón de control ETS/habitual, era significativamente mayor en plaquetas no tratadas con oligomicina suspendidas en plasma en comparación con PBS-glucosa. Se observó inhibición del complejo I con respiración inhibida con rotenona en ~99% y no se observó inhibición adicional después de la adición de antimicina-A (tabla 1). Entre las diferentes cohortes hubo una diferencia significativa entre respiración estimulada por FCCP máxima (ETS) en controles japoneses frente a sangre de cordón umbilical (O₂ 15 ± 1,3 frente a 23 ± 2,3 pmol/s/1 * 10⁶ plaquetas). No se observaron otras diferencias significativas.

2.2.1 Respiración mitocondrial de plaquetas permeabilizadas

Se desarrolló el protocolo de SUIT para adquirir tanta información como fuera posible de la capacidad de los diferentes complejos respiratorios a partir de un único experimento. Se representa en la figura 3 un trazado significativo con adiciones de sustratos e inhibidores y definiciones de los diferentes estados. La respiración habitual de las células en MiR05 estaba en el mismo intervalo que para plaquetas intactas incubadas en PBS-glucosa o plasma. Después de la adición de digitonina se observó un declive constante de la respiración a medida que difundieron sustratos citosólicos y nucleótidos de adenina en los medios circundantes. En presencia de malato y piruvato como sustratos del complejo I, la estimulación con ADP incrementó la respiración en ~80% en comparación con la respiración habitual. Con glutamato añadido para la generación de NADH adicional y entrada de electrones al complejo I, la respiración aumentó en otro ~10% (tabla 2). Después de la adición de succinato, se logró un flujo de electrones convergente con entrada tanto desde el complejo I como el complejo II al ETS, y dio como resultado tasas de respiración tres veces la de la respiración de rutina y un aumento de ~50% de la respiración con sólo sustratos del complejo I. La respiración de LEAK era ~15% de la respiración acoplada máxima, OXPHOS_{CI+II}. La

razón $OXPHOS_{CI+II}/LEAK$ de $\sim 7,0$ indicó buen acoplamiento del transporte de electrones con la síntesis de ATP y es comparable a otros tejidos (Kuznetsov *et al.*, 2002) (tabla 2). La capacidad respiratoria máxima, ETS_{CI+II} , inducida por el protonóforo FCCP, era $\sim 5\%$ más alta en comparación con $OXPHOS_{CI+II}$. La razón $OXPHOS/ETS$ era cercana a uno e indica que casi no se ejerce limitación de flujo por el sistema de fosforilación en sustratos endógenos en saturación. La actividad de ETS_{CII} , medida después de la inhibición del complejo I con rotenona, era $\sim 35\%$ de las actividades combinadas del complejo I y el complejo II, ETS_{CI+II} . En el material de referencia japonés, la respiración máxima con sustratos del complejo I así como la entrada convergente era similar a sus homólogos suecos. Sin embargo, tanto la respiración de LEAK como la respiración estimulada del complejo II eran $\sim 25\%$ más altas en comparación con los valores de las cohortes sueca y pediátrica dando como resultado una razón $ETS_{CI+II}/LEAK$ disminuida (tabla 2). Los valores de sangre de cordón umbilical diferían presentando valores superiores de respiración máxima tanto en $OXPHOS$ así como en ETS . La respiración de LEAK era también significativamente superior tanto en valores absolutos así como proporcionalmente, dado que las razones resultantes eran menores (tabla 2).

2.3 Correlación de edad y sexo

Dos estados respiratorios demostraron correlaciones significativas con la edad. La respiración habitual aumentó ($r^2 = 0,15$, $p < 0,05$) y ETS_{CII} disminuyó ligeramente ($r^2 = 0,14$, $p < 0,05$) con la edad (datos de cordones umbilicales no incluidos) tal como se muestra en la figura 4A, B. Entre todos los demás parámetros respiratorios, no hubo cambios significativos, ejemplificados con $OXPHOS_{CI+II}$ en la figura 4C. No se observó ninguna correlación entre parámetros respiratorios y género ni en las plaquetas intactas ni en las impermeabilizadas (figura 4 D).

2.4 Linealidad de la respiración a diferentes concentraciones de plaquetas

Se evaluó la respiración a diferentes concentraciones de plaquetas. En el intervalo de $100-400 \times 10^6$ plaquetas/ml la respiración permaneció lineal en todos los estados. A una concentración de 50×10^6 plaquetas/ml la estimulación con FCCP máxima disminuyó en un 20-25% (figura 5). La mayoría de los experimentos adicionales se llevaron a cabo con una concentración de plaquetas de 200×10^6 /ml. El método mostró buena reproducibilidad cuando se evaluó por experimentos llevados a cabo a partir de los mismos individuos en días diferenciados. El coeficiente de variación era del 6-13% en los diferentes parámetros respiratorios (tabla 3).

2.5 La influencia de almacenamiento de sangre prolongado sobre los parámetros respiratorios

Se evaluó el efecto del almacenamiento de sangre completa sobre la respiración mitocondrial. Se almacenó sangre recién extraída en viales de EDTA o bien a temperatura ambiental o bien a 4°C en una mesa basculante durante hasta 72 horas. Después de 24 horas la respiración permanecía estable. A las 48 horas hubo una clara tendencia hacia una capacidad respiratoria reducida de los estados de respiración estimulada con sustratos, es decir $OXPHOS_{CI}$, $OXPHOS_{CI+II}$ y ETS_{CI+II} . A las 72 horas todos los parámetros excepto la respiración de LEAK habían declinado significativamente (figura 6).

3. Protocolo para glóbulos blancos (WBC)

3.1 Preparación de muestras

En pacientes, se extrajo un volumen máximo de 40 ml de sangre de una vía arterial existente en tubos de K_2EDTA (Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH, Kremünster, Austria). En los controles, se tomaron muestras de sangre por medio de punción venosa en tubos de K_2EDTA . Se aislaron leucocitos de sangre completa por centrifugación en gradiente de Ficoll (Böyum REF). Después de lavar en solución salina normal, se resuspendieron las células en $200-400 \mu\text{l}$ de solución salina, dependiendo del rendimiento, conjuntamente con $50-100 \mu\text{l}$ del plasma del propio sujeto. Se llevaron a cabo mediciones respirométricas en el plazo de 5 horas de la toma de muestras. El contenido analizado de la cámara de respirometría se almacenó congelado hasta su uso adicional.

3.2 Respirometría de alta resolución

Se colocaron los leucocitos en la cámara del oxígrafo de 2 ml a una concentración final de $2,5-5 \times 10^6$ células/ml. En las células intactas, los medios de respiración consistieron en el propio plasma del sujeto y para células permeabilizadas un medio de respiración que contenía sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, $MgCl_2$ 3 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1 (MiR05) [Gnaiger *et al.*, 2000]. Se llevaron a cabo las mediciones a una temperatura constante de 37°C en un oxígrafo de alta resolución (Oxygraph-2k Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Se registró la concentración de oxígeno (μM) y el flujo de oxígeno (derivada de tiempo negativa de la concentración de oxígeno; $\text{pmol } O_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ células) con el software DatLab 4.3 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Se llevaron a cabo todos los experimentos a una concentración de oxígeno en el intervalo de O_2 $210-50 \mu\text{M}$. Se llevó a cabo la calibración en saturación de aire cada día. Se midió el flujo de oxígeno de fondo instrumental en un conjunto de experimentos diferenciado y se corrigió automáticamente en los experimentos posteriores según las instrucciones del fabricante.

Se calculó automáticamente la concentración de oxígeno a partir de la presión barométrica y los factores de solubilidad que se ajustaron a 1,0 para agua, 0,92 para MIR05 y 0,89 para plasma.

5 Se usaron tres protocolos de titulación de sustrato-desacoplador-inhibidor (SUIT), uno en células intactas y dos en células permeabilizadas [Pesta y Gnaiger, 2012] En células intactas la estimulación con sustratos exógenos está limitada debido a la mala permeabilidad a través de la membrana plasmática. Se mantiene por tanto la respiración sólo por sustratos endógenos. Se suspendieron las células en el plasma del propio sujeto y se dejaron para que se estabilizara la respiración de rutina. Se añadió oligomicina (1 $\mu\text{g/ml}$) a la cámara de respiración para inducir una
10 respiración similar al estado 4 (LEAK o estado 4u) donde la respiración se debe principalmente a la fuga de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Se obtuvo el flujo de oxígeno máximo posteriormente por titulación gradual (20-40 μM) del desacoplador FCCP. Finalmente se inhibieron el complejo I y el complejo III añadiendo rotenona (2 μM) y posteriormente antimicina-A (1 $\mu\text{g/ml}$). Se restó el flujo de oxígeno residual de los valores de estado estacionario de respiración mitocondrial. Se llevaron a cabo los protocolos de SUIT segundo y tercero en células permeabilizadas. Las etapas iniciales fueron las mismas para ambos protocolos. Después de que las células se hubieran estabilizado a respiración habitual, se permeabilizó la membrana celular plasmática con la adición de digitonina (3 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células, concentración óptima evaluada en un conjunto de experimentos diferente, datos no mostrados). Simultáneamente, se añadieron los sustratos del complejo I malato y piruvato (5 mM respectivamente) a la cámara de respiración. La adición posterior de ADP (1 mM) estimuló la respiración y representa la capacidad de fosforilación oxidativa (OXPHOS o estado 3) para esa combinación de sustratos específica, ligada a NADH. Se convierte el piruvato en acetil-CoA por piruvato deshidrogenasa en la matriz mitocondrial y así pudo restringirse la capacidad de OXPHOS con una enzima inhibida o de funcionamiento defectuoso. Con la adición posterior de glutamato (5 mM) se sorteó/sorteo la piruvato deshidrogenasa, y se obtuvo la respiración del complejo I ligada a NADH máxima, OXPHOS_{C_I}. La adición posterior de succinato (10 mM) estimuló OXPHOS_{C_I+II} con entrada convergente de electrones tanto a través del complejo I como del II por medio de la unión Q. A partir de aquí los protocolos de SUIT divergían. En SUIT-2 se inhibió la respiración ligada al complejo I con rotenona (2 μM) quedando la capacidad de OXPHOS_{C_{II}} con entrada de electrones a través del complejo II sólo. Se inhibió posteriormente el sistema de transporte de electrones (ETS) en el complejo III añadiendo antimicina-A y se restó el flujo de oxígeno residual de los estados estacionarios de respiración mitocondrial.

30 En SUIT-3, tras la capacidad de OXPHOS_{C_I+II} máxima, se inhibió la ATP-sintasa con oligomicina (1 $\mu\text{g/ml}$), con el fin de evaluar la respiración de LEAK_{C_I+II} (estado 4) que está provocada predominantemente por deslizamiento o fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Se evaluó el transporte de electrones máximo a través de respiración sin fosforilación oxidativa, ETS_{C_I+II}, mediante titulación gradual (2-4 μM) de FCCP. Se evaluó la respiración ligada al complejo II, no acoplada a fosforilación oxidativa, ETS_{C_{II}}, añadiendo rotenona y se inhibió posteriormente ETS con antimicina-A. Se llevó a cabo reoxigenación en ese momento, en ambos protocolos de SUIT-2 y 3 hasta un nivel de O₂ 160-180 μM . Se evaluó la actividad del complejo IV añadiendo N,N,N',N'-tetrametil-p-fenildiamina (TMPD 0,5 mM), un donante de electrones al complejo IV. Se añadió azida de sodio (10 mM), un inhibidor del complejo IV, debido a la autooxidación de TMPD y se calculó la diferencia entre los dos niveles obtenidos como actividad del complejo IV.

A continuación se facilitan protocolos más específicos para el examen de posibles candidatos a fármaco

45 Se utilizaron dos protocolos de examen.

(1) Se llevó a cabo el examen inicial, efecto del complejo II, con plaquetas o glóbulos blancos aislados en un tampón que contenía sacarosa 110 mM, HEPES 20 mM, taurina 20 mM, lactobionato de K 60 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 g/l, pH 7,1. Después de que se estableciera la respiración de nivel inicial con sustratos endógenos, se inhibió el complejo I con rotenona 2 mM. Se titularon los candidatos a fármaco disueltos en DMSO en etapas hasta una concentración final de 100 μM , 500 μM y 5 mM. Posteriormente, se permeabilizaron las membranas celulares con digitonina (1 mg/1 $\times 10^6$ plt). Tras estabilizarse la respiración, se añadió succinato 10 mM y tras estabilizarse la respiración se finalizó el experimento mediante la adición de antimicina a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ y se midió la respiración residual. La figura 11 muestra el protocolo para evaluar sustratos mitocondriales permeables en células novedosos. En el ensayo, se reprime la función mitocondrial en células intactas con el inhibidor del complejo respiratorio I rotenona. Se comparan los candidatos a fármaco con sustratos endógenos antes y después de la permeabilización de la membrana plasmática para evaluar la potenciación o inhibición bioenergética. La figura 11 es una figura esquemática del ensayo de examen del complejo mitocondrial II. Muestra el protocolo para evaluar sustratos mitocondriales permeables en células novedosos. En el ensayo, se reprime la función mitocondrial en células intactas con el inhibidor del complejo respiratorio I rotenona. Se comparan los candidatos a fármaco con sustratos endógenos antes y después de la permeabilización de la membrana plasmática para evaluar la potenciación o inhibición bioenergética.

65 (2) En el segundo protocolo, respiración convergente, se usaron el mismo tampón de respiración y concentraciones celulares tal como se describió anteriormente. Tras establecerse respiración basal, se añadió el desacoplador mitocondrial FCCP a una concentración de 2 mM. Se titularon los candidatos a fármaco disueltos en DMSO en

etapas hasta una concentración final de 100 μM , 200 μM , 400 μM , 600 μM , 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM. Se indicó la concentración necesaria para alcanzar la respiración convergente máxima. Se finalizó el experimento mediante la adición de rotenona 2 μM y antimicina 1 $\mu\text{g/ml}$ y se midió la respiración residual. La figura 12 describe el protocolo para evaluar la potencia de sustratos mitocondriales permeables en células novedosos. En el ensayo, se estimuló la actividad mitocondrial desacoplando las mitocondrias con el protonóforo FCCP. Se titulan los candidatos a fármaco para obtener el nivel de respiración convergente máxima (derivada del complejo I y el complejo II). Tras la adición de rotenona, se obtuvo estimulación dependiente del complejo II. Se añade el inhibidor del complejo III antimicina para evaluar el consumo de oxígeno no mitocondrial. La figura 12 es una figura esquemática del ensayo de examen de respiración convergente mitocondrial. Describe el protocolo para evaluar la potencia de sustratos mitocondriales permeables en células novedosos. En el ensayo, se estimula la actividad mitocondrial desacoplando las mitocondrias con el protonóforo FCCP. Se titulan los candidatos a fármaco para obtener el nivel de respiración convergente máxima (derivada del complejo I y el complejo II). Tras la adición de rotenona, se obtiene la estimulación dependiente del complejo II. Se añade el inhibidor del complejo III antimicina para evaluar el consumo de oxígeno no mitocondrial.

En el ensayo de examen de respiración convergente un compuesto ideal presenta una respiración superior con titulación gradual en comparación con el control en mitocondrias desacopladas en células intactas. Remítase al protocolo esquemático en la figura 12 y las gráficas de ejemplo de experimentos con compuestos de ejemplo números 3, 5 y 13 en la figura 13. La figura 13 muestra el aumento de la respiración (flujo de oxígeno por unidad) con titulación gradual de fármacos en comparación con el control (succinato de disodio) en plaquetas humanas intactas (figura 12.).

Propiedades del compuesto deseado

(1) El compuesto ideal estimula la respiración en células intactas inhibidas con rotenona a baja concentración en el protocolo de examen del CII sin efecto inhibitor sobre la respiración estimulada con succinato tras la permeabilización. Tras la inhibición de la respiración con toxinas mitocondriales, la respiración debe detenerse. Remítase a la figura 1 y la lista a continuación.

$a > b$ significa que a es mayor que b

$a \gg b$ significa que a es mucho mayor que b

$a \rightarrow b$ significa que el valor de a se aproxima al valor de b

Propiedades deseadas de compuestos:

- valor máximo de a alcanzado a baja concentración de fármacos.

- $a \gg a'$

- $a \rightarrow b'$

- $c \rightarrow c'$

- $d \rightarrow d'$

Se identifican compuestos impermeables a la membrana celular en el ensayo como:

- $a \rightarrow a'$

Se identifica el consumo de oxígeno no mitocondrial inducido por candidato a fármaco cuando

- $d > d'$

Bibliografía

Baumgärtl, H., Lübbers, D., 1983. Microaxial needle sensor for polarographic measurement of local O₂ pressure in the cellular range of living tissue. Its construction and properties. , in: Gnaiger, E., Forstner, H. (Eds.), Polarographic Oxygen Sensors. Springer, Berlín, Heidelberg, Nueva York, págs. 37-65.

Benfante, R., 1992. Studies of cardiovascular disease and cause-specific mortality trends in Japanese-American men living in Hawaii and risk factor comparisons with other Japanese populations in the Pacific region: a review. Human biology 64, 791-805.

Boushel, R., Gnaiger, E., Schjerling, P., Skovbro, M., Kraunsoe, R., Dela, F., 2007. Patients with type 2 diabetes

- have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50, 790-796.
- Brand, M.D., 2000. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental gerontology* 35, 811-820.
- 5 Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297-312.
- Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N.A., Cooper, C.E., Singer, M., 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360, 219-223.
- 10 Cesar, J., DiMinno, G., Alam, I., Silver, M., Murphy, S., 1987. Plasma free fatty acid metabolism during storage of platelet concentrates for transfusion. *Transfusion* 27, 434-437.
- 15 Cha, S.H., Fukushima, A., Sakuma, K., Kagawa, Y., 2001. Chronic docosahexaenoic acid intake enhances expression of the gene for uncoupling protein 3 and affects pleiotropic mRNA levels in skeletal muscle of aged C57BL/6NJcl mice. *The Journal of nutrition* 131, 2636-2642.
- Cocco, T., Sgobbo, P., Clemente, M., Lopriore, B., Grattagliano, I., Di Paola, M., Villani, G., 2005. Tissue-specific changes of mitochondrial functions in aged rats: effect of a long-term dietary treatment with N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 38, 796-805.
- 20 Darnold, J.R., Vorbeck, M.L., Martin, A.P., 1990. Effect of aging on the oxidative phosphorylation pathway. *Mech Ageing Dev* 53, 157-167.
- 25 Davis, L.M., Rho, J.M., Sullivan, P.G., 2008. UCPmediated free fatty acid uncoupling of isolated cortical mitochondria from fasted animals: correlations to dietary modulations. *Epilepsia* 49 Supl. 8, 117-119.
- Ferreira, I.L., Resende, R., Ferreira, E., Rego, A.C., Pereira, C.F., 2010. Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 11, 1193-1206.
- 30 Gnaiger, E., 2009. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1837-1845.
- 35 Gnaiger, E., Kuznetsov, A.V., Lassnig, B., Fuchs, A., Reck, M., 1998. High-resolution respirometry - optimum permeabilization of the cell membrane by digitonin, in: Larsson, C., Pählman, I.-L., Gustafsson, L. (Eds.), *BioThermoKinetics in the Post Genomic Era*, Chalmers Reproservice, Göteborg, págs. 85-95.
- Gnaiger, E., Kuznetsov, A.V., Schneeberger, S., Seiler, R., Brandacher, G., Steurer, W., Margreiter, R., 2000. Mitochondria in the cold., in: Heldmaier, G., Klingenspor, M. (Eds.), *Life in the Cold*. Springer, Heidelberg, Berlin, Nueva York, págs. 431-442.
- 40 Haas, R.H., Parikh, S., Falk, M.J., Saneto, R.P., Wolf, N.I., Darin, N., Wong, L.J., Cohen, B.H., Naviaux, R.K., 2008. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 94, 16-37.
- 45 Hauptmann, S., Keil, U., Scherping, I., Bonert, A., Eckert, A., Muller, W.E., 2006. Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Experimental gerontology* 41, 668-673.
- Hutter, E., Unterluggauer, H., Garedew, A., Jansen-Durr, P., Gnaiger, E., 2006. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Experimental gerontology* 41, 103-109.
- 50 Johannsen, D.L., Ravussin, E., 2010. Obesity in the elderly: is faulty metabolism to blame? *Aging health* 6, 159-167.
- Kilgus, H., Holme, S., Murphy, S., 1984. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood* 64, 406-414.
- 55 Kitchens, C.S., Newcomb, T.F., 1968. Human platelet respiration. *J Appl Physiol* 25, 581-585.
- Kones, R., 2010. Parkinson's disease: mitochondrial molecular pathology, inflammation, statins, and therapeutic neuroprotective nutrition. *Nutr Clin Pract* 25, 371-389.
- 60 Krige, D., Carroll, M.T., Cooper, J.M., Marsden, C.D., Schapira, A.H., 1992. Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol* 32, 782-788.
- 65 Kuznetsov, A.V., Strobl, D., Ruttmann, E., Konigsrainer, A., Margreiter, R., Gnaiger, E., 2002. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem* 305, 186-194.

- Lemieux, H., Semsroth, S., Antretter, H., Hofer, D., Gnaiger, E., 2011. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 1729-1738.
- 5 Lenaz, G., Genova, M.L., 2009. Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1750-1772.
- Lesnefsky, E.J., Hoppel, C.L., 2006. Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing research reviews* 5, 402-433.
- 10 Merlo Pich, M., Bovina, C., Formiggini, G., Cometti, G.G., Ghelli, A., Parenti Castelli, G., Genova, M.L., Marchetti, M., Semeraro, S., Lenaz, G., 1996. Inhibitor sensitivity of respiratory complex I in human platelets: a possible biomarker of ageing. *FEBS Lett* 380, 176-178.
- Nicholls, D.G., 1977. The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue. Dependency on proton electrochemical potential gradient. *Eur J Biochem* 77, 349-356.
- 15 Nulton-Persson, A.C., Szewda, L.I., 2001. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry* 276, 23357-23361.
- 20 Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., Hepple, R.T., 2011. Mitochondria: Isolation, Structure and Function. *J Physiol*.
- Rasmussen, U.F., Krstrup, P., Kjaer, M., Rasmussen, H.N., 2003a. Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging. A study of isolated human skeletal muscle mitochondria. *Experimental gerontology* 38, 877-886.
- 25 Rasmussen, U.F., Krstrup, P., Kjaer, M., Rasmussen, H.N., 2003b. Human skeletal muscle mitochondrial metabolism in youth and senescence: no signs of functional changes in ATP formation and mitochondrial oxidative capacity. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 446, 270-278.
- 30 Rosenstock, T.R., Duarte, A.I., Rego, A.C., 2010. Mitochondrial-associated metabolic changes and neurodegeneration in Huntington's disease - from clinical features to the bench. *Curr Drug Targets* 11, 1218-1236.
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.P., Letellier, T., 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 370, 751-762.
- 35 Sjövall, F., Morota, S., Hansson, M.J., Friberg, H., Gnaiger, E., Elmer, E., 2010. Sepsis induces platelet mitochondrial uncoupling and a gradual increase in respiratory capacity that is negatively associated with clinical outcome. *Critical Care* 14, P:11.
- 40 Tonkonogi, M., Fernstrom, M., Walsh, B., Ji, L.L., Rooyackers, O., Hammarqvist, F., Wernerman, J., Sahlin, K., 2003. Reduced oxidative power but unchanged antioxidative capacity in skeletal muscle from aged humans. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 446, 261-269.
- Vendelbo, M.H., Nair, K.S., 2011. Mitochondrial longevity pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 634-644.
- 45 Xu, J., Shi, C., Li, Q., Wu, J., Forster, E.L., Yew, D.T., 2007. Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *J Bioenerg Biomembr* 39, 195-202.
- 50 Yamori, Y., 2006. Food factors for atherosclerosis prevention: Asian perspective derived from analyses of worldwide dietary biomarkers. *Experimental and clinical cardiology* 11, 94-98.
- Yanicostas, C., Soussi-Yanicostas, N., El-Khoury, R., Benit, P., Rustin, P., 2011. Developmental aspects of respiratory chain from fetus to infancy. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 16, 175-180.

REIVINDICACIONES

1. Método para examinar y seleccionar posibles candidatos a fármaco o para someter a prueba la sensibilidad de una persona a una sustancia con efecto sobre las mitocondrias, comprendiendo el método
- 5
- i) someter una muestra de células sanguíneas humanas que contienen mitocondrias a respirometría de alta resolución
- ii) añadir a la muestra de células una sustancia que aumenta la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna,
- 10
- iii) añadir a la muestra de ii) una sustancia de prueba en un vehículo,
- vi) añadir a la muestra de iii) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I,
- v) añadir a la muestra de vi) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, y
- 15
- vi) comparar el consumo de oxígeno mitocondrial antes y después de la adición de la sustancia de prueba con el consumo de oxígeno mitocondrial del vehículo, en el que una disminución del consumo de oxígeno mitocondrial inducida por la sustancia de prueba indica un efecto negativo sobre las mitocondrias, y en el que un aumento del consumo de oxígeno mitocondrial inducido por la sustancia de prueba indica un efecto positivo sobre las mitocondrias.
2. Método para investigar los efectos mitocondriales de candidatos a fármaco en ensayos clínicos o en regímenes de tratamiento, comprendiendo el método
- 20
- i) someter una muestra de células sanguíneas humanas que contienen mitocondrias a respirometría de alta resolución, en el que la muestra de células procede de una persona sometida a un estudio clínico o a un régimen de tratamiento, y en el que se ha administrado a la persona una sustancia de prueba durante el estudio clínico o el régimen de tratamiento
- 25
- ii) añadir a la muestra de células una sustancia que aumenta la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna,
- iii) añadir a la muestra de ii) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial I,
- vi) añadir a la muestra de iii) un inhibidor de la función del complejo mitocondrial III, y
- 30
- v) comparar el consumo de oxígeno mitocondrial de la muestra de la persona sometida al estudio clínico o a un régimen de tratamiento con el consumo de oxígeno mitocondrial de una muestra de control, en el que una disminución del consumo de oxígeno mitocondrial indica un efecto negativo sobre las mitocondrias, y en el que un aumento del consumo de oxígeno mitocondrial indica un efecto positivo sobre las mitocondrias.
- 35
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia que aumenta la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna se añade para obtener la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias presentes en la muestra.
- 40
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia que aumenta la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna se selecciona de carbonilcianuro-(p-trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP), carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP) y otros protonóforos, y mezclas de los mismos.
- 45
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia que aumenta la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna es FCCP.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5, en el que la muestra de prueba está en forma líquida y la muestra de prueba contiene una concentración conocida de la sustancia de prueba.
- 50
7. Método según la reivindicación 6, en el que la muestra de prueba se añade en concentraciones gradualmente crecientes.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-7, en el que la muestra de control en iii) es idéntica a la muestra de prueba pero sin contenido de sustancia de prueba.
- 55
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de la función del complejo mitocondrial I se añade para dilucidar la respiración celular dependiente de la oxidación de sustratos del complejo II.
- 60
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de la función del complejo mitocondrial I es rotenona.
- 65
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de la función del complejo mitocondrial III se añade para determinar cualquier actividad de consumo de oxígeno no mitocondrial, tal como autooxidación de dicha muestra.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de la función del complejo mitocondrial III es antimicina A.
- 5 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en el que la muestra de control es de un grupo de control.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en el que la muestra de control se tomó antes del inicio de cualquier tratamiento.
- 10 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-12, para examinar candidatos a fármaco.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para someter a prueba la sensibilidad de un sujeto a un principio activo o a un candidato a fármaco.
- 15 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2-14, para evaluar la toxicidad mitocondrial de una sustancia de prueba en ensayos clínicos, o para analizar el efecto de una sustancia sobre la función mitocondrial, o para evaluar un compuesto que puede estimular la respiración mitocondrial y producción de ATP.
- 20 18. Método según la reivindicación 16, en el que la muestra de células se aísla de dicho sujeto.
19. Método para examinar y seleccionar posibles candidatos a fármaco o para someter a prueba la sensibilidad de una persona a una sustancia con efecto sobre las mitocondrias, comprendiendo el método
- 25 i) someter una muestra de células sanguíneas humanas que contienen mitocondrias de una muestra de sangre humana a respirometría de alta resolución,
 ii) añadir a la muestra de células una sustancia que inhibe la respiración del complejo I,
 30 iii) añadir a la muestra de ii) una sustancia de prueba en un vehículo, en el que un aumento de la respiración indica permeabilidad de la membrana plasmática,
 iv) añadir a la muestra de iii) una sustancia que permeabiliza la membrana plasmática,
 v) añadir una sustancia de referencia a la muestra obtenida en iv) en el que la sustancia de referencia es un sustrato ligado al complejo II, y
 35 vi) añadir a la muestra de v) una sustancia que inhibe la respiración del complejo III, y comparar el consumo de oxígeno obtenido con el consumo de oxígeno obtenido cuando el método se lleva a cabo usando la sustancia de referencia en la etapa v) y por tanto omitiendo la adición de una muestra de prueba,
- 40 en el que la sustancia de prueba atraviesa la membrana plasmática si el consumo de oxígeno después de la adición de la sustancia de prueba en iii) es mayor que el consumo de oxígeno después de la adición de la sustancia de referencia en iii), cuando el método se lleva a cabo usando la sustancia de referencia, y en el que la sustancia de prueba induce consumo de oxígeno no mitocondrial si el consumo de oxígeno después de la adición de una sustancia que inhibe la respiración del complejo III en v) es mayor que el consumo de oxígeno en v), cuando el método se lleva a cabo usando la sustancia de referencia.
- 45 20. Método según la reivindicación 19, en el que la sustancia que permeabiliza la membrana plasmática es digitonina.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, en el que la sustancia de referencia es succinato.
- 50 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en el que los detalles para las etapas individuales i)-vi) son según una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15 y/o 17.

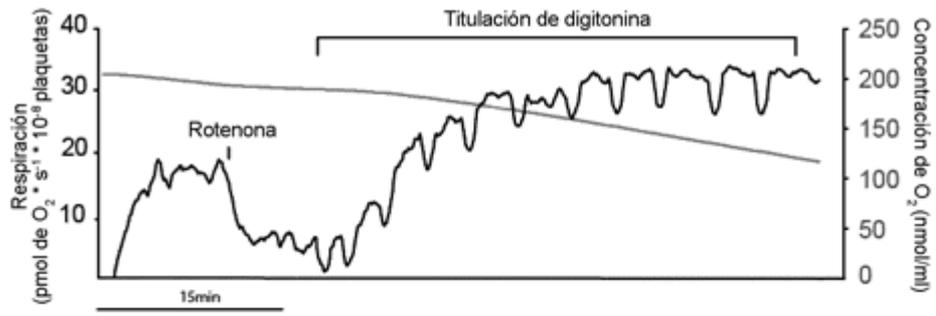


Figura 1

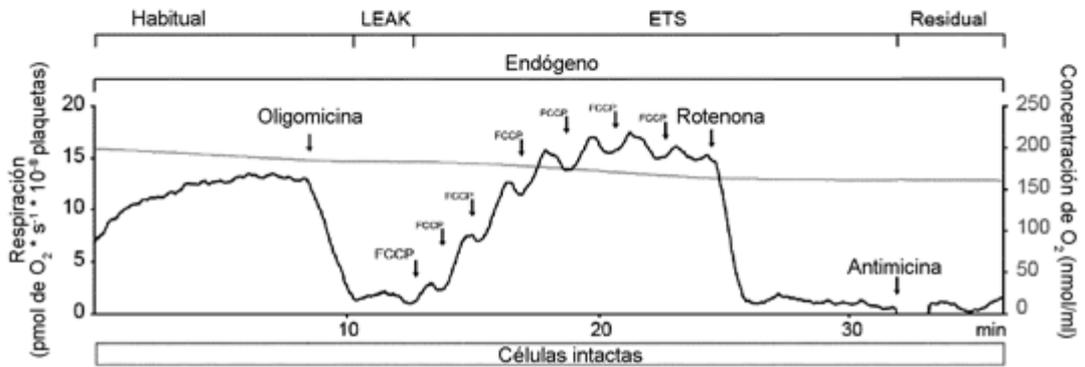


Figura 2

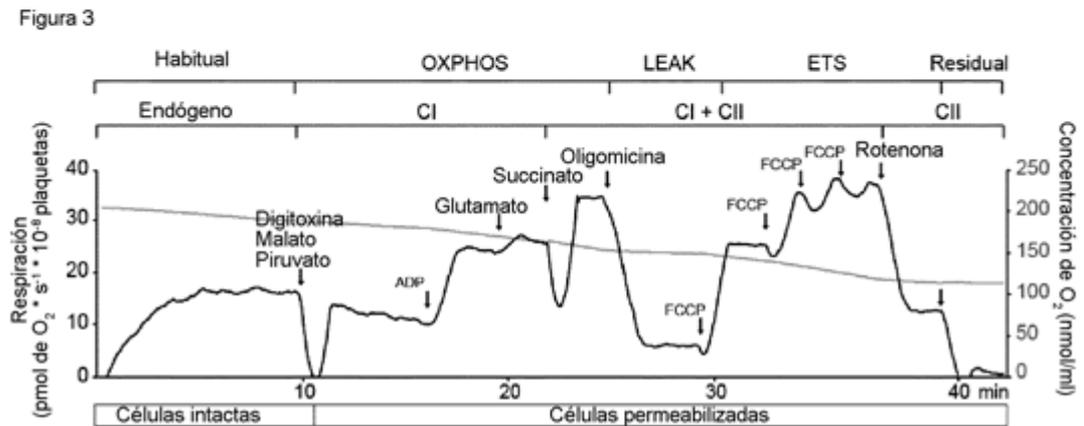


Figura 3

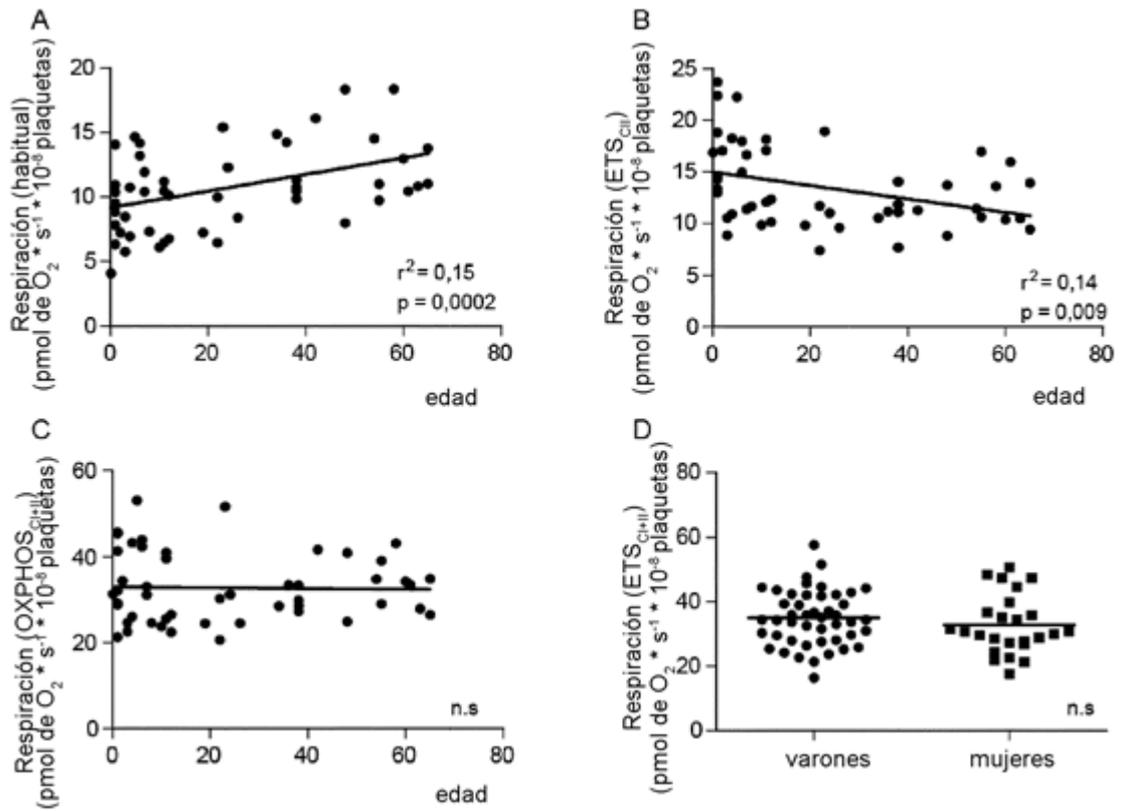


Figura 4

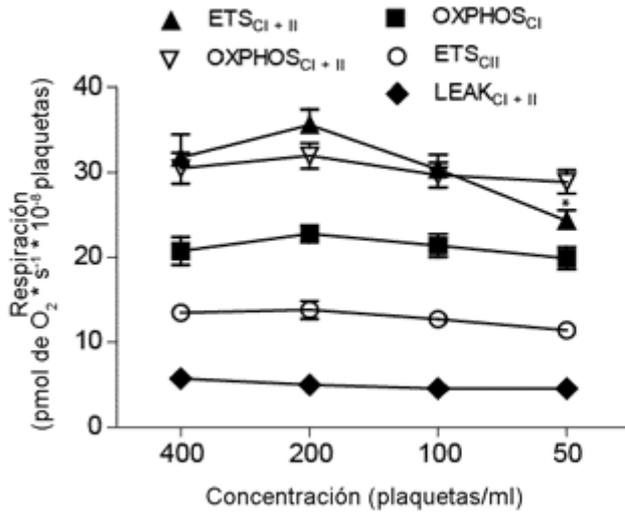
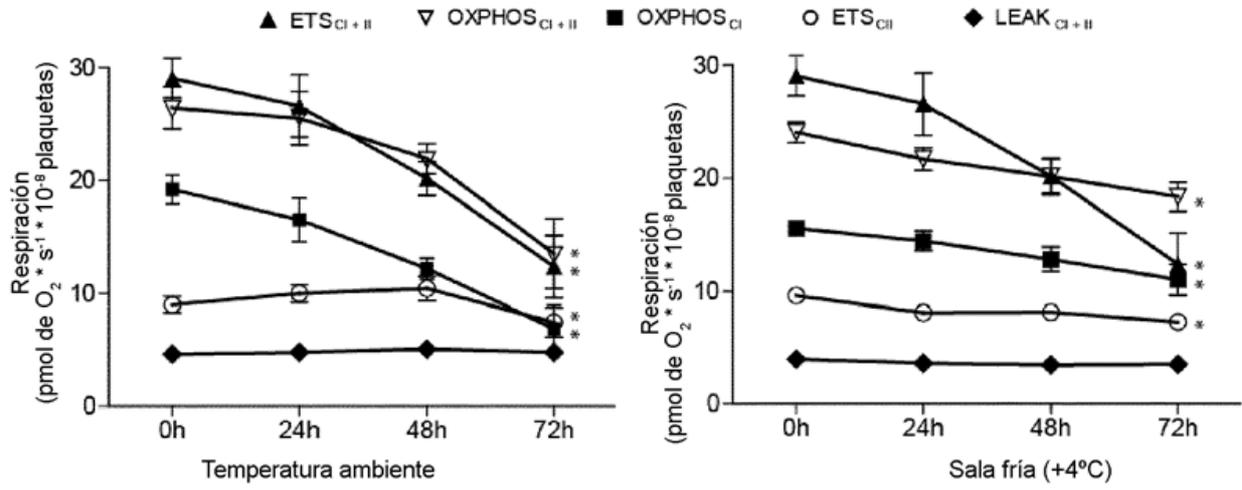


Figura 5

Figura 6



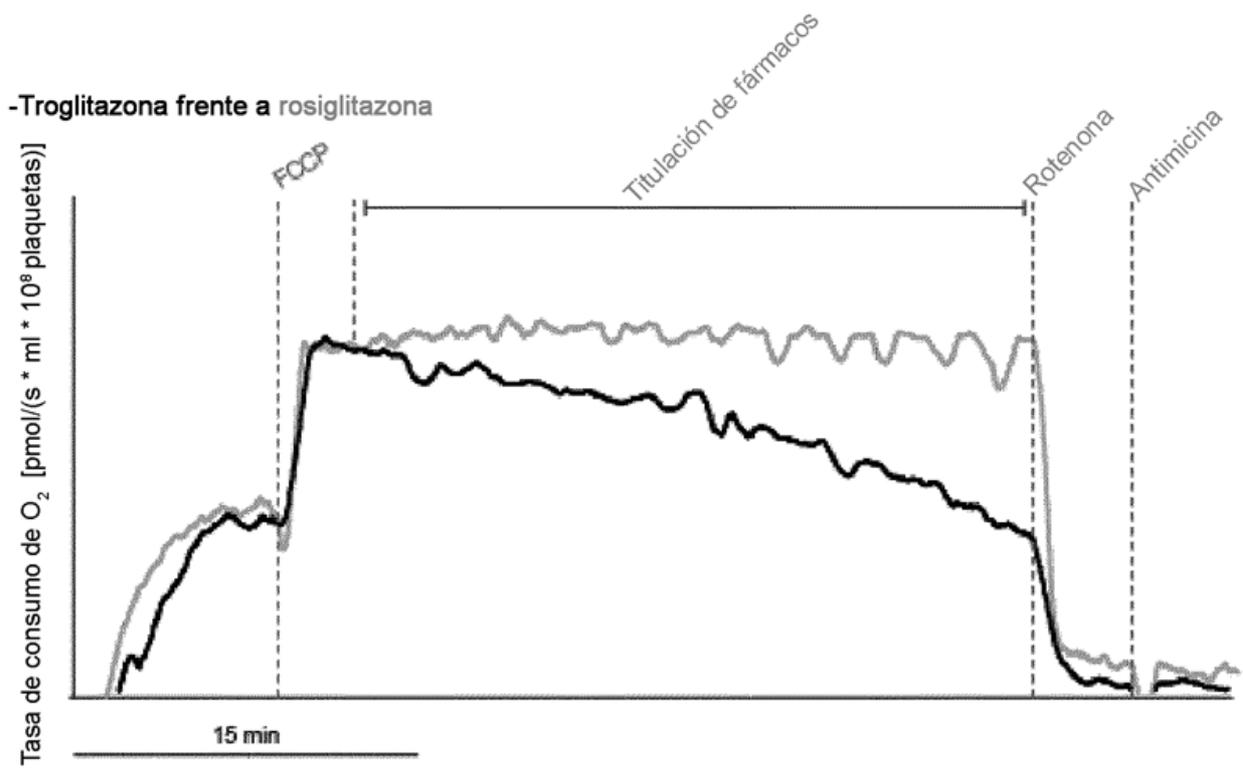


Figura 7

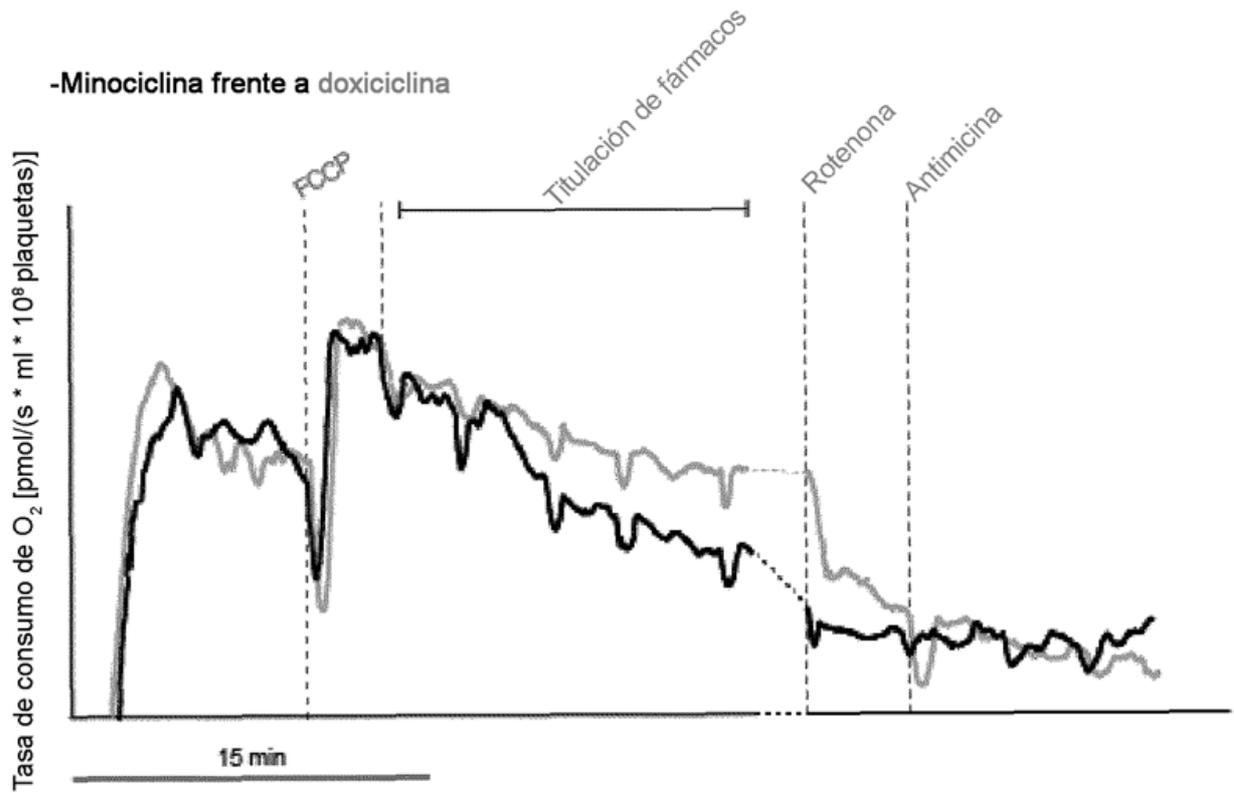


Figura 8

-Cerivastatina frente a simvastatina

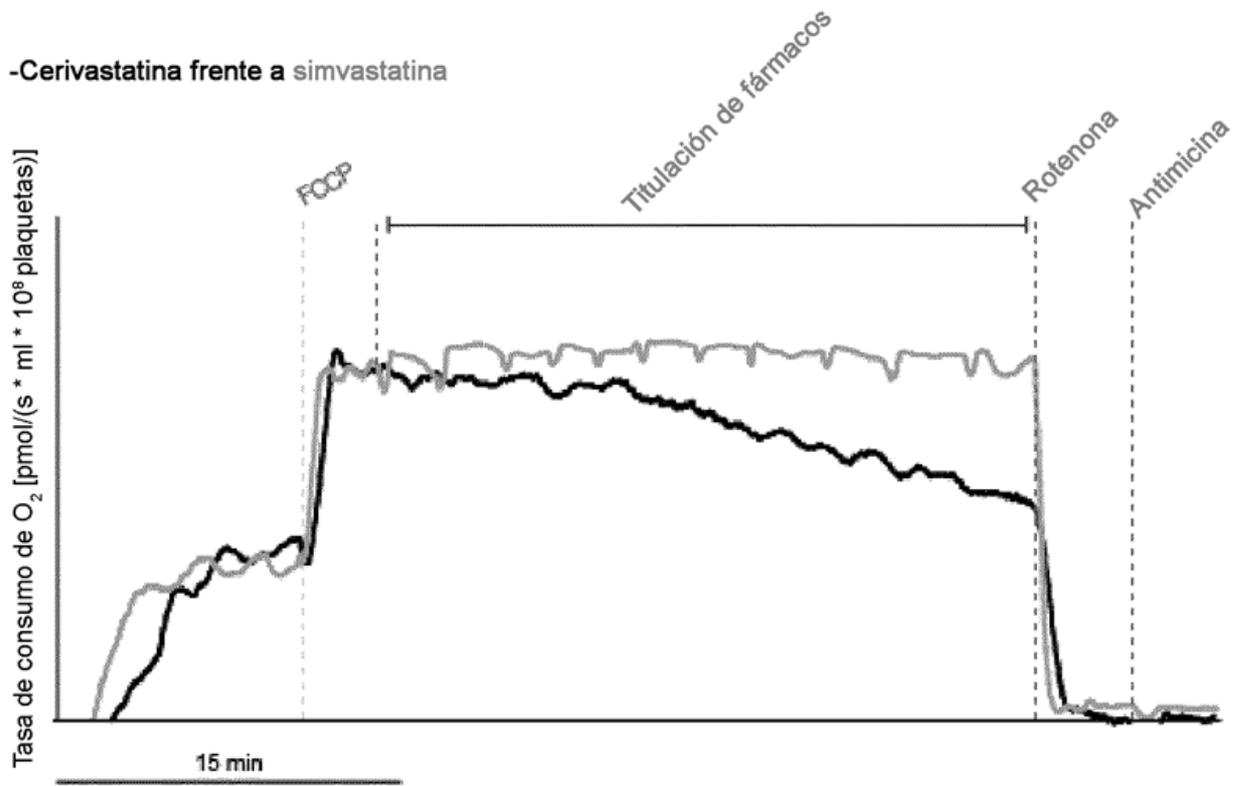


Figura 9

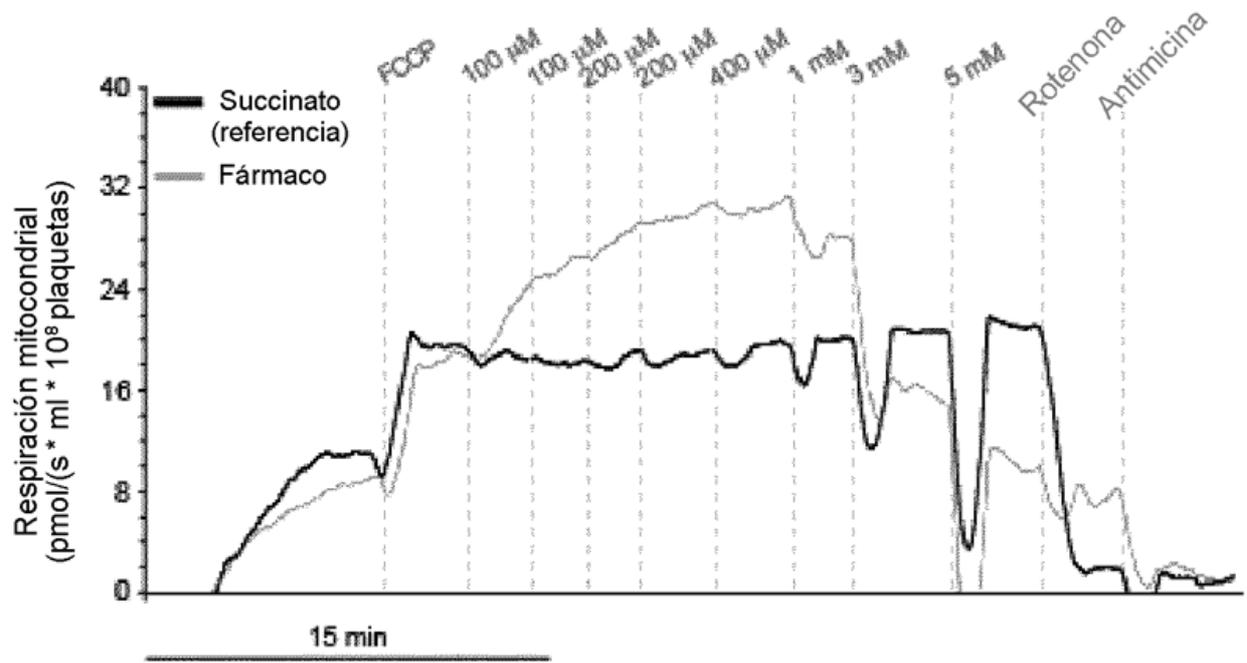


Figura 10

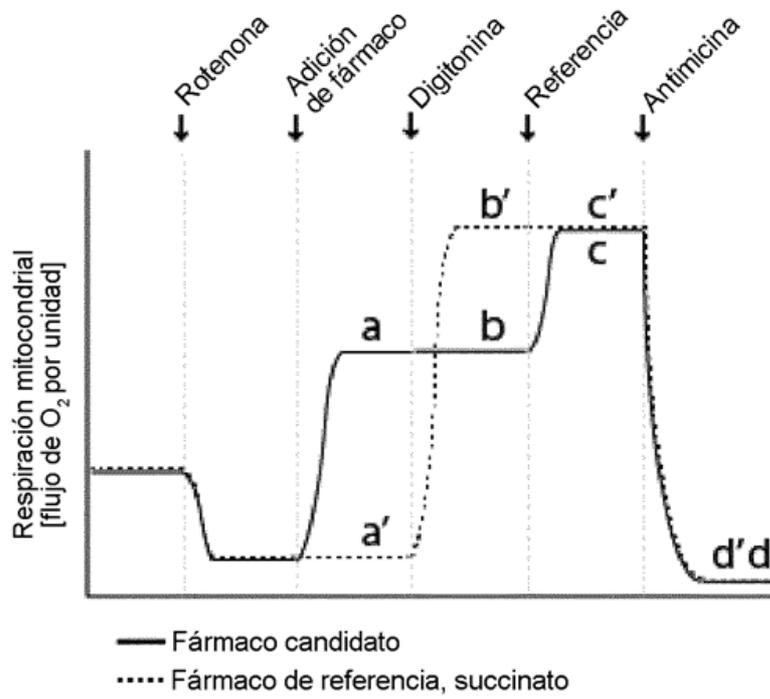


Fig. 11. Figura esquemática del ensayo de examen del complejo mitocondrial II.

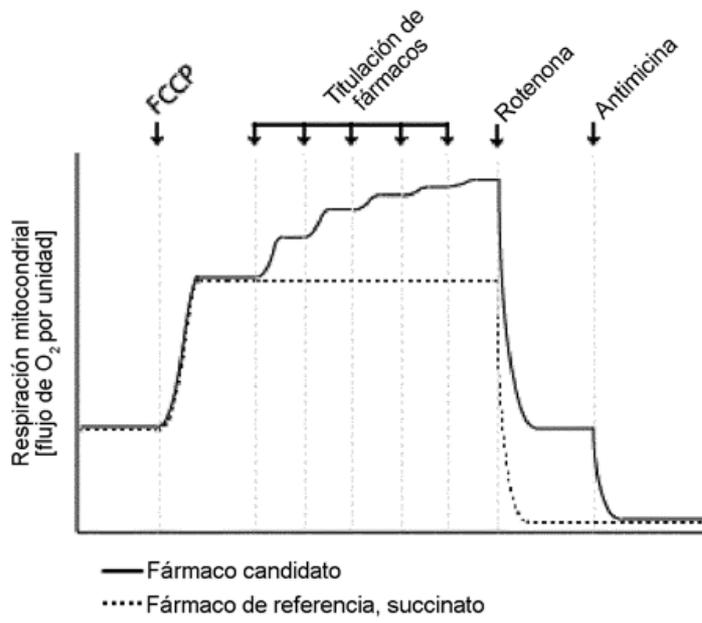


Fig. 12. Figura esquemática del ensayo de examen de respiración convergente mitocondrial.

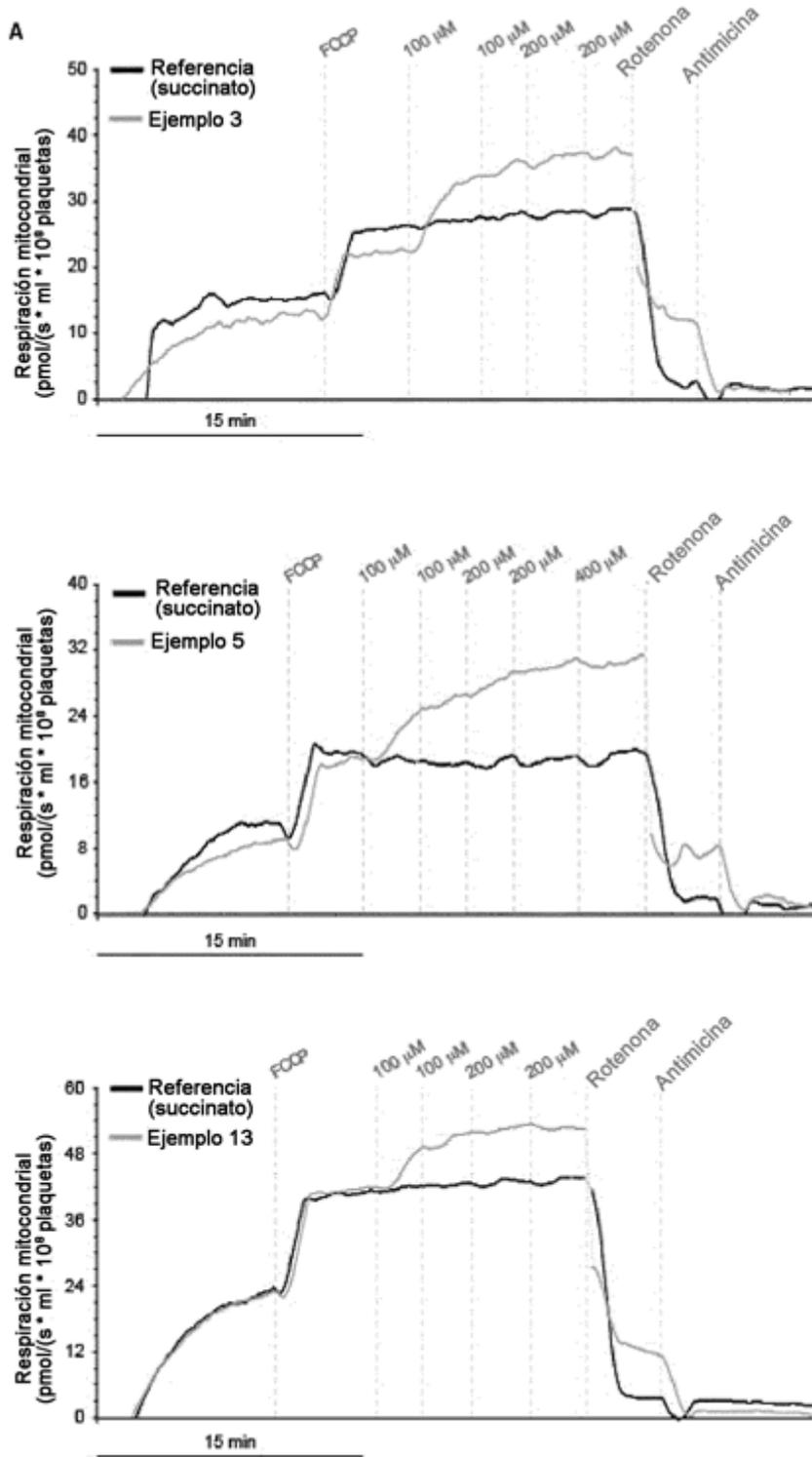


Fig. 13. Trazados experimentales de ejemplo para respiración mitocondrial convergente.

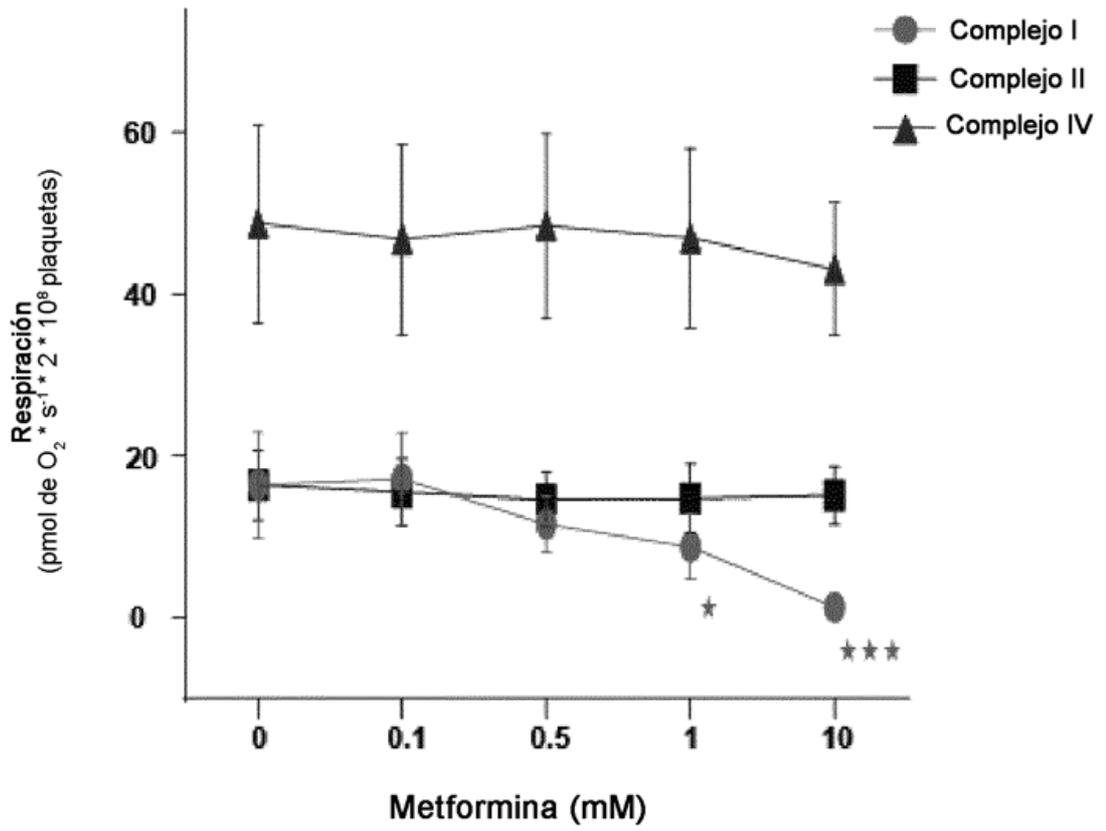


Fig. 14