

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

**Estimación y relación del ADN mitocondrial circulante
(ccf-mtDNA) con los niveles de glucosa, índice de masa
corporal y edad de una población de Quito**

Proyecto de Investigación

Santiago David Padilla Sánchez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 07 de enero de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Estimación y relación del ADN mitocondrial circulante (ccf-mtDNA) con los niveles de glucosa, índice de masa corporal y edad de una población de Quito

Santiago David Padilla Sánchez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

Andrés Caicedo, PhD

Firma del profesor:

Quito, 07 de enero de 2019

Derechos De Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Santiago David Padilla Sánchez

Código:

00117981

Cédula de Identidad:

1725804650

Lugar y fecha:

Quito, 07 de enero de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y papá por el gran esfuerzo que realizaron para que pudiera realizar mis estudios universitarios. Siéntanse satisfechos por todo el sacrificio que hicieron ya que este trabajo se los debo a ustedes y es fruto del apoyo y amor incondicional que he recibido de ustedes.

A todos mis grandes amigos: Analía, Daniela, Kevin, Esteban, Eduardo, Mauro, Stephy, Pamela, Paula, Nathaly, Leandro y Sol, les agradezco por todo el apoyo que me brindaron durante mis 5 años de estudio y por todos los momentos que pude compartir con ustedes.

A Andrés Caicedo, por haberme abierto las puertas del laboratorio hace 3 años, por haberme impulsado a participar en congresos científicos, y por siempre darme tu confianza, apoyo y fe para que cada vez sea mejor.

A todos, por siempre gracias.

RESUMEN

Las mitocondrias desempeñan un rol importante en la producción de energía, metabolismo celular. Sin embargo, estas también pueden existir fuera de las células, en donde median la comunicación célula a célula, reparan y sirven como un activador de la respuesta inmune. Sus efectos dependen de su estado fisiológico o de la forma en que están presentes en el medio, ya sea como una estructura funcional completa, en fragmentos o solo como ADN mitocondrial (mtDNA, del inglés mitochondrial DNA). Trabajos anteriores han demostrado que la medición del ADN mitocondrial circulante (ccf-mtDNA, por sus siglas en inglés) podría servir como un potencial biomarcador de la gravedad de la enfermedad; no obstante, a nuestro conocimiento ningún estudio ha medido el ccf-mtDNA en individuos jóvenes y adultos con un índice de masa corporal (IMC) normal (18.5-24.99 kg/m²), y en individuos adultos con un IMC elevado (≥ 25 kg/m²). En este proyecto de titulación medimos los niveles de ccf-mtDNA en el suero de 24 jóvenes y 20 adultos con un IMC normal (grupo control), y 30 adultos con un IMC elevado, mediante PCR cuantitativa. Para ello se utilizó mtDNA aislado directamente de las mitocondrias de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés peripheral blood mononuclear cells) con el cual se elaboró una curva estándar para así obtener la concentración de ccf-mtDNA en ng/ μ l. Además, se realizó una prueba de normalidad y se usó una transformación logarítmica de los datos para realizar una prueba *t* de 2 muestras y un análisis de correlación de Pearson de los niveles de ccf-mtDNA con el IMC, la edad y glucosa de cada grupo de estudio. A través de la prueba *t* de 2 muestras, encontramos una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la cantidad promedio de ccf-mtDNA entre las personas con un IMC normal y las personas con un IMC elevado, en donde estos últimos tuvieron la mayor cantidad de ccf-mtDNA en comparación con los del grupo de control. También encontramos una correlación positiva y significativa ($p < 0.05$) entre el ccf-mtDNA con la edad y el IMC. Nuestros resultados sugirieron que el ccf-mtDNA podría aplicarse como un biomarcador de diagnóstico no invasivo para las personas que estén en riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad.

Palabras clave: ADN mitocondrial, ADN mitocondrial circulante, Índice de Masa Corporal, edad, glucosa, PCR en tiempo real, biomarcador de diagnóstico.

ABSTRACT

Mitochondria play an important role as an intracellular energy plant and signaling organelle. However, mitochondria also exist outside of cells where they could mediate cell-to-cell communication, repair and serve as an activator of the immune response. Their effects depend on the mitochondrial state or the form in which it is present, either as a whole functional structure as fragments or only as mitochondrial DNA. Previous work have shown that measuring circulating cell-free mitochondrial DNA (ccf-mtDNA) could serve as a potential biomarker of the gravity of disease, however, to our knowledge no study has measured the ccf-mtDNA in young and adult individuals with a normal (18.5-24.99 kg/m²) body mass index (BMI) and in adult individuals with high BMI (≥ 25 kg/m²). In this study we measured the ccf-mtDNA levels in the serum of 24 young and 20 adults with normal BMI, and 30 adults with high BMI, through quantitative PCR. In order to do that we used the mtDNA directly isolated from mitochondrias of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which was used to make a standard curve and to obtain the concentration of ccf-mtDNA in ng/ μ l. A normality test was made and a logarithm transformation of the data was use to perform a 2 sample *t*-test and a Pearson correlation analysis of the ccf-mtDNA levels with the BMI, age and glucose levels of each study group. Through the 2 sample *t*-test we found a significant difference ($p < 0.05$) in the average amount of ccf-mtDNA between people with a normal BMI (control group) and people with a high BMI (type I obesity), where the latter had the highest ccf-mtDNA content compared to those of the control group. We also found a positive and significant correlation ($p < 0.05$) between the ccf-mtDNA with age and BMI. Our results suggested that ccf-mtDNA could be applied as a non-invasive diagnostic biomarker for individuals who are at risk of developing overweight or obesity.

Key words: mitochondrial DNA, circulating cell-free mitochondrial DNA, Body Mass Index, age, glucose, real time qPCR, diagnostic biomarker.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Mitocondrias	11
1.2. ADN mitocondrial	14
1.3. Mecanismos de liberación mitocondrial fuera de la célula	14
1.3.1. <i>Nanotubos</i>	15
1.3.2. <i>Vesículas</i>	16
1.3.3. <i>Apoptosis</i>	18
1.4. mtDNA como modulador de la respuesta inmunitaria innata y la inflamación	18
1.4.1. <i>TLR-9</i>	19
1.4.2. <i>Inflamasoma NLRP3</i>	19
1.4.3. <i>Vía STING</i>	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. ÁREA DE ESTUDIO	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	24
5.1. Recolección de muestras sanguíneas de los participantes	24
5.2. Toma de medidas antropométricas	24
5.3. Extracción de suero.....	24
5.4. Extracción y cuantificación de ADN	24
5.5. Cuantificación de glucosa.....	24
5.6. Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	24
5.7. Aislamiento de mitocondrias	25
5.8. Análisis cuantitativo mediante PCR en tiempo real	25
6. METODOLOGÍA	26
6.1. Recolección de medidas antropométricas y muestras sanguíneas	26
6.2. Cuantificación de glucosa.....	27
6.3. Extracción y cuantificación de ADN	27
6.4. Extracción de PBMCs.....	28
6.5. Aislamiento de mitocondrias	29

6.6. Elaboración y cuantificación de la curva estándar mediante qPCR	29
6.7. Cuantificación de los niveles ccf-mtDNA mediante qPCR.....	30
6.8. Análisis estadístico	30
7. RESULTADOS.....	32
7.1. Características clínicas de la población de estudio.....	32
7.1.1. <i>Hombres</i>	32
7.1.2. <i>Mujeres</i>	32
7.2. Amplificación de la curva estándar mediante qPCR	33
7.3. Curva de melting.....	33
7.4. Prueba de normalidad de Anderson – Darling.....	33
7.5. Transformación Box-Cox	34
7.6. Normalidad de los niveles de ccf-mtDNA (ng/μl) transformados a log 10.....	34
7.7. Prueba t de 2 muestras	34
7.7.1. <i>Grupo control vs grupo IMC elevado</i>	34
7.7.2. <i>Grupo control: Jóvenes vs adultos</i>	34
7.7.3. <i>Adultos grupo control vs adultos IMC elevado</i>	35
7.7.4. <i>Hombres vs mujeres</i>	35
7.8. Correlación de Pearson	35
7.9. Población de estudio con un nivel alto de ccf-mtDNA	36
8. DISCUSIÓN.....	37
9. CONCLUSIONES.....	43
10. RECOMENDACIONES	44
11. BIBLIOGRAFÍA.....	45
12. TABLAS.....	59
13. FIGURAS.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de la población masculina.....	59
Tabla 2. Características clínicas de la población femenina.....	59
Tabla 3. Prueba t de 2 muestras para la comparación de ccf-mtDNA entre hombres y mujeres de cada grupo de estudio.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva estándar de mtDNA.....	60
Figura 2. Curva de melting.....	60
Figura 3. Gráfica de probabilidad normal.....	61
Figura 4. Gráfica de Box-Cox para ccf-mtDNA (ng/μl).....	61
Figura 5. Gráfica de probabilidad normal de los datos de ccf-mtDNA transformados..	62
Figura 6. Comparación de los niveles de ccf-mtDNA entre el grupo control y los adultos con IMC elevado.....	62
Figura 7. Comparación de los niveles de ccf-mtDNA entre jóvenes y adultos del grupo control.....	63
Figura 8. Comparación de los niveles de ccf-mtDNA entre adultos del grupo control y adultos con IMC elevado.....	63
Figura 9. Análisis de correlación de Pearson entre todas las variables de estudio.....	64
Figura 10. Gráficas de dispersión con regresión lineal de cada variable analizada.....	64
Figura 11. Proporción de individuos con un nivel de ccf-mtDNA mayor a 0.1 ng/μl...	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares producto de una endosimbiosis establecida entre dos organismos independientes, un protoeucarionte y una alfa-proteobacteria, hace aproximadamente 1.8 billones de años atrás (W. Martin & Mentel, 2010). Dentro de esta teoría, la endosimbiosis permitió en gran medida una mejor producción de energía por parte del protoeucarionte y se piensa que también facilitó el desarrollo de la multicelularidad (Huettenbrenner et al., 2003). Temprano en la evolución de todos los organismos, esta endosimbiosis se ha convertido en piedra angular del metabolismo celular, siendo crucial en el mantenimiento de todas las funciones vitales y homeostasis en los organismos del reino animal. No obstante, si la mitocondria es disfuncional puede provocar la muerte celular y esto estar relacionado con la enfermedad del organismo.

La mitocondria puede llegar a ocupar un 25 % del volumen celular, siendo esto mediado por las necesidades energéticas de la célula y de su tipo (Koolman & Röhm, 2005). Su estructura presenta una doble membrana: una externa y otra interna, donde la primera al estar en contacto directo con el citoplasma y el retículo endoplasmático, permite el transporte de proteínas, mensajeros bioquímicos, factores de transcripción y compuestos necesarios para la producción de energía. La membrana interna tiene como función principal la de albergar a los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones, clave en la producción de energía. Adicionalmente, la matriz alberga el ADN mitocondrial (mtDNA, del inglés mitochondrial DNA) junto con los elementos necesarios para hacer funcionar el Ciclo de Krebs y otras vías metabólicas que permiten la síntesis de lípidos, ácidos nucleicos y otros componentes celulares (Scheffler, 2008).

La principal función de la mitocondria es la producción de energía mediante una cadena de transporte de electrones en reacciones de óxido-reducción que esta mediada por complejos enzimáticos. A medida que los complejos enzimáticos I, III, y IV transportan los electrones, se bombean iones hidrógeno (H^+) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. La acumulación de estos protones se transforma en una fuerza motriz protónica que la ATP sintetasa utiliza para fosforilar el ADP y formar ATP (Campbell & Reece, 2007).

El ATP producido por las mitocondrias es utilizado como energía para el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Campbell & Reece, 2007). Por tal razón, la cantidad de mitocondrias que tiene cada célula varía según la demanda bioenergética de esta. Por ejemplo, células de tejidos que requieren mucha energía como las del cerebro pueden tener alrededor de 2000 mitocondrias (Uranova et al., 2001), células sanguíneas como los leucocitos pueden tener menos de cien (Selak et al., 2011), mientras que los ovocitos pueden contener varios cientos de miles de mitocondrias (Duran, Simsek-Duran, Oehninger, Jones, & Castora, 2011).

Puesto que el oxígeno molecular (O_2) es necesario para que los electrones se muevan a lo largo de la cadena de transporte de electrones y se produzca ATP, algunos electrones pueden unirse al oxígeno y formar el anión superóxido (O_2^-), el cual es considerado como una especie reactiva de oxígeno mitocondrial (mtROS, del inglés mitochondrial reactive oxygen species) (Bhat et al., 2015). A niveles moderados, mtROS juega un rol importante en varios procesos fisiológicos como: rutas de señalamiento de ciertos factores de crecimiento y citoquinas, diferenciación celular, inducción de respuestas mitogénicas, defensa contra microorganismos patógenos, entre otros (M. T. Islam, 2017; Jo et al., 2001; Roberts & Sindhu, 2009; Schieber & Chandel, 2014).

Las mitocondrias poseen un mecanismo protector que les permite controlar y mantener su integridad. Dicho mecanismo comienza con la biogénesis mitocondrial, el cual consiste en el crecimiento y división de mitocondrias pre-existentes en lugar de la síntesis *de novo*. Cuando hay estrés, las mitocondrias se fusionan para separar a las mitocondrias sanas de las dañadas. Las mitocondrias saludables ingresan al ciclo de vida mitocondrial para producir energía, mientras que las mitocondrias dañadas se degradan por la ruta de autofagia mitocondrial (mitofagia). La eliminación sincronizada de las mitocondrias dañadas, disfuncionales y envejecidas desempeña un rol importante para prevenir la liberación de proteínas pro apoptóticas (el citocromo c) y de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, las cuales pueden provocar la activación del inflamasoma, la apoptosis y en consecuencia la liberación del mtDNA (Yue & Yao, 2016).

Sin embargo, condiciones de estrés crónico, obesidad, envejecimiento y enfermedad pueden afectar los mecanismos de control mitocondrial así como también el balance de ROS, lo que en consecuencia puede conllevar a un incremento en sus niveles (Herbet et al., 2017; Liguori et al., 2018; McMurray, Patten, & Harper, 2016; Srivastava & Kumar, 2015). La presencia elevada de ROS afecta la integridad de la membrana mitocondrial a causa de la peroxidación lipídica, daña las enzimas de la cadena transportadora de electrones y también al mtDNA (M. T. Islam, 2017).

La célula y la mitocondria han generado estos mecanismos de protección y mediación del stress que responden y mitigan el apareamiento y desarrollo de enfermedades crónicas. La presencia prolongada de una enfermedad hace que las células finalmente entren en una fase de muerte celular o reaccionen liberando componentes al espacio extracelular que muchas veces pueden ir cargados de mitocondrias para que células vecinas las puedan incorporar como un mecanismo que promueve la supervivencia celular (Favaro et al., 2016; Hayakawa et al., 2016; Torralba et al., 2018).

En la actualidad podemos determinar la presencia de mitocondrias extracelulares producto de la muerte o de una respuesta emergente al stress gracias a la estimación del ADN mitocondrial circulante (ccf-mtDNA por circulating cell free-mitochondrial DNA). La presencia de mitocondrias extracelulares es un nuevo hito en la biología y su estudio permitirá una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales la célula, los tejidos y el organismo mantienen su homeostasis y salud, así como también entender como esto podría estar relacionado al origen o consecuencia de una enfermedad (Ajaz, Czajka, & Malik, 2015; Boyapati, Tamborska, Dorward, & Ho, 2017; Duregotti et al., 2015).

1.2. ADN mitocondrial

Las mitocondrias en las células animales son los únicos organelos que poseen su propio ADN como material genético (Lodish et al., 2006). El ADN mitocondrial humano es una molécula circular de doble cadena de 16 569 pares de bases que se hereda en la mayoría de los casos por vía exclusivamente materna. Contiene 37 genes que codifican 2 ARN ribosomales (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 subunidades polipeptídicas de la cadena de transporte de electrones (Pon & Schon, 2007). A diferencia del ADN nuclear, el mtDNA es susceptible al daño oxidativo debido a que no posee histonas protectoras y un mecanismo eficiente de reparación de ácidos nucleicos. Razón por la cual tiene una elevada tasa de mutación (Yu, 2012).

1.3. Mecanismos de liberación mitocondrial fuera de la célula

La mitocondria ha dejado de ser una organela que existe solamente en el interior de la célula y en la actualidad se la considera como un factor de comunicación, de regeneración y alarma cuando se encuentra en forma extracelular. Se ha podido evidenciar que esta forma puede estar asociada a señales de stress que son compartidas de manera sistémica o que las mitocondrias pueden ser transportadas por vesículas y nanotubos siendo consideradas factores de supervivencia. La comprensión del significado biológico

de estas formas extracelulares, es un tema de alto interés dentro de la comunidad biomédica ya que proveería de biomarcadores y una mejor comprensión de la etiología de enfermedades crónicas (Caicedo, Aponte, Cabrera, Hidalgo, & Khoury, 2017).

1.3.1. *Nanotubos*

La capacidad de las células para recibir, procesar y responder a la información del ambiente que las rodea es esencial para una variedad de procesos biológicos. Gran parte de las células eucariotas no existen como entidades independientes, sino más bien están organizadas en tejidos especializados. Dentro de estos tejidos las células se comunican entre sí de diferentes maneras para coordinar los procesos fisiológicos. Uno de estos medios de comunicación es mediante la formación de nanotubos membranales entre células. Dichos nanotubos son ricos en F-actina y se conocen como nanotubos de tunelización (TNT, del inglés tunneling nanotubes) (Gurke, Barroso, & Gerdes, 2008).

Desde su descubrimiento, varios estudios han reportado que los TNT conectan a las células y facilitan el transporte intracelular de orgánulos, moléculas citoplasmáticas y componentes membranales (Demontis, 2004; Gerdes, Bukoreshtliev, & Barroso, 2007; Gerdes, Rustom, & Wang, 2013; Koyanagi, Brandes, Haendeler, Zeiher, & Dimmeler, 2005; Marzo, Gousset, & Zurzolo, 2012). Además de la formación de los nanotubos *in vitro*, diferentes estudios han demostrado que los TNT también se forman *in vivo*, por lo que dicho mecanismo de comunicación es una característica funcional, común e importante para el mantenimiento de varios procesos fisiológicos (Caneparo, Pantazis, Dempsey, & Fraser, 2011; Chinnery, Pearlman, & McMenamin, 2008; Pyrgaki, Trainor, Hadjantonakis, & Niswander, 2010; Vignais, Caicedo, Brondello, & Jorgensen, 2017).

Plotnikov et al., realizaron un co-cultivo de células madre humanas mesenquimales (MSCs, por Mesenchymal Stem Cells) con células renales tubulares de

rata y observaron la formación de nanotubos como una manera de contacto intracelular entre los dos tipos de células. Mediante sondas fluorescentes tras 3 horas de co-cultivo, los investigadores encontraron que se dio un intercambio intracelular de contenido citoplasmático, mitocondrias y proteínas en ambas direcciones. Sin embargo, dicho transporte fue más eficiente desde las células renales tubulares hacia las células madre mesenquimales, lo cual promovió la diferenciación de éstas a células tubulares de riñón gracias al intercambio de mitocondrias y moléculas de señalamiento que favorecieron dicha diferenciación (2010).

En otro estudio, Acquistapace et al., realizaron un co-cultivo de cardiomiocitos de ratón completamente diferenciados con MSCs. Al igual que en el estudio anterior, los investigadores observaron la formación de nanotubos por los cuales se transfirieron componentes celulares. No obstante, encontraron que el transporte de mitocondrias desde las MSCs hacia los cardiomiocitos, fue esencial para la reprogramación somática de los cardiomiocitos a un estado similar al de su célula progenitora (2011).

Cabe recalcar que en los estudios antes mencionados, la transferencia mitocondrial a través de los TNT tuvo un efecto notable en las células receptoras debido a la nueva biosíntesis y aumento del ATP generado por las mitocondrias exógenas. El transporte de mitocondrias permite cambios en la fisiología de las células que las reciben así como el aumento la producción energética.

1.3.2. Vesículas

Además de los TNT, se ha reportado otro mecanismo de comunicación celular mediado por vesículas extracelulares (EVs, del inglés extracellular vesicles). Según Tkach y Théry, las células pueden comunicarse con sus vecinas a través de la secreción de vesículas extracelulares que están compuestas por una bicapa lipídica (Tkach & Théry, 2016). Al igual que en los TNT, varios estudios han encontrado que mediante las EVs se

transportan varios componentes intracelulares como proteínas citosólicas, lípidos, ADN, ARN (Huang-Doran, Zhang, & Vidal-Puig, 2017; Lo Cicero, Stahl, & Raposo, 2015; Maas, Breakefield, & Weaver, 2017), y mitocondrias (Hough et al., 2018).

Islam et al. y sus colegas, provocaron una lesión pulmonar aguda en un ratón al introducir LPS de *E.coli* por vía aérea y luego introdujeron células estromales derivadas de la médula ósea del ratón. Estudios ópticos en vivo mostraron que las células estromales formaron uniones gap con el epitelio alveolar, y que además liberaron microvesículas que contenían mitocondrias que fueron engullidas por el epitelio alveolar. Sus resultados mostraron que las mitocondrias transferidas incrementaron la producción alveolar de ATP, lo que restauró la producción energética y protegió al epitelio alveolar del daño provocado por el LPS de *E.coli* (2012).

En otro estudio, se realizó un co-cultivo de MSCs con macrófagos de ratón. A través de microscopía electrónica, observaron que tras 45 minutos de co-cultivo, las MSCs transfirieron mitocondrias contenidas en vesículas a los macrófagos de ratón. Los macrófagos que engulleron tales vesículas mostraron un aumento de su bioenergética en comparación con los macrófagos que no fueron cultivados con las MSCs. Sus resultados mostraron que las mitocondrias transportadas por las MSCs modularon la función de los macrófagos y que también contribuyeron con su actividad anti-inflamatoria (Phinney et al., 2015).

Los estudios antes mencionados sugieren que estos mecanismos de comunicación intracelular por el cual se liberan las mitocondrias desempeñan un rol importante en la respuesta al estrés y en la bioenergética celular ya que favorece la recuperación de las células receptoras que han sido afectadas.

1.3.3. Apoptosis

Además de la liberación de las mitocondrias como un proceso de comunicación intracelular mediante TNT o EVs, las mitocondrias también pueden ser liberadas de la célula cuando se llevan a cabo procesos de muerte celular. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programado que depende de ATP para su realización y que no genera una respuesta inflamatoria. Durante la misma, se da una condensación de la cromatina y de los componentes citoplasmáticos que conducen a la formación de cuerpos apoptóticos que luego son fagocitados y degradados dentro de los lisosomas en células especializadas en esta función, como los macrófagos (Elena, 2002; S. J. Martin & Henry, 2013).

No obstante, pueden darse fallos en el funcionamiento normal de la apoptosis lo cual puede conllevar a la activación de una respuesta inmunitaria. Zhu y colaboradores indujeron la apoptosis en células humanas y murinas para examinar la liberación extracelular de las mitocondrias durante la muerte celular programada. Tales investigadores encontraron que las mitocondrias que fueron liberadas por las células apoptóticas indujeron una respuesta inflamatoria por la activación del inflamasoma y el reclutamiento de los neutrófilos (Zhu et al., 2018). Este estudio indica que las mitocondrias no solo pueden ayudar en la recuperación y bioenergética de las células mediante los mecanismos de comunicación intracelular, sino que también su liberación puede desencadenar respuestas inmunitarias que provocan un estado de inflamación.

1.4. mtDNA como modulador de la respuesta inmunitaria innata y la inflamación

En el apartado anterior se mencionó que cuando las mitocondrias se liberan de la célula por un proceso de muerte celular pueden ocasionar una activación de la respuesta inmunitaria, no obstante, el mtDNA es también responsable de ello ya que debido a su origen bacteriano o por su simple presencia este es reconocido por el sistema inmunitario

innato como un patrón molecular asociado al daño celular, (DAMPs del inglés *damage associated molecular patterns*). La acumulación de estrés, daño o una infección pueden provocar la liberación del mtDNA en el citoplasma celular (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015) La presencia del mtDNA en el citoplasma provoca la activación de los receptores de tipo *toll* 9 (TLR 9, del inglés *toll-like receptors*), el inflamasoma NLRP3 (del inglés *NOD-like receptor protein 3*) y la vía del estimulador de genes de interferón (STING, del inglés, *stimulator of interferón genes*) (Fang, Wei, & Wei, 2016).

1.4.1. TLR-9

Los TLR-9 se localizan dentro de las células en el retículo endoplasmático y en las membranas de los endosomas, en donde detectan las secuencias CpG no metiladas del ADN bacteriano. La presencia de mtDNA en el citoplasma puede activar los TLR-9 de los endosomas y conducir a la transcripción de genes que codifican citocinas proinflamatorias como el MMP-8, TNF- α , y las interleucinas 6 y 1 β (Fang et al., 2016).

1.4.2. Inflamasoma NLRP3

Los receptores de tipo NOD (NLR) son una familia de aproximadamente 20 proteínas citosólicas que reconocen PAMPs y DAMPs para, junto con otras proteínas, formar complejos transmisores de señal llamados inflamasomas, siendo el NLRP3 uno de los más estudiados. Nakahira et al. (2011) y Shimada et al. (2012) encontraron que la liberación del mtDNA en el citoplasma activa el inflamasoma NLRP3, y que tras la interacción con la proteína adaptadora ASC y la procaspasa-1, la caspasa-1 se activa y escinde a la pro-IL-1 β y la pro-IL-18 para generar las formas activas de dichas citosinas, las cuales realizan varias funciones proinflamatorias (Nakahira et al., 2011; Shimada et al., 2012).

1.4.3. *Vía STING*

Además, de interactuar con el TLR9 y el inflamasoma NLRP3, el mtDNA también puede activar la vía STING, la cual es una proteína que se localiza en la membrana del retículo endoplasmático. Varios estudios han encontrado (Rongvaux et al., 2014; West et al., 2015; White et al., 2014) que el mtDNA liberado en el citoplasma se une a la enzima sintasa del GMP-AMP cíclico (cGAS) y de esta manera cataliza la producción de un dinucleótido cíclico llamado GMP-AMP cíclico (cGAMP), el cual se une y activa a STING. La activación de STING promueve la fosforilación del factor de transcripción IRF3 y este a su vez estimula la producción del interferón de tipo 1 (IFN 1). La producción del IFN 1 resulta en un estado de resistencia viral para la célula (Rongvaux et al., 2014; West et al., 2015).

En resumen, las mitocondrias han pasado de ser consideradas no solo como los responsables de la producción de ATP, sino que también, gracias a evidencia científica como agentes importantes en la salud y enfermedad, así como también actores fundamentales en procesos de regeneración e inflamación. La detección de mitocondrias liberadas al medio extracelular o de su ADN ya sea por procesos de comunicación intracelular (TNT o EVs) o por muerte celular, podría ofrecer un biomarcador útil de enfermedad o pronóstico de daño debido a las correlaciones, ya sean positivas o negativas, que han sido obtenidas por varios equipos de investigación.

2. JUSTIFICACIÓN

La detección del mtDNA fuera de la célula, en el plasma y suero sanguíneo en diversas condiciones como traumas, infecciones, cánceres, entre otras enfermedades, ha despertado interés en la comunidad científica debido a que podría utilizarse como un biomarcador no invasivo de diagnóstico y prognosis para distintas afecciones (Chiu et al., 2003). El ccf-mtDNA ha sido asociado de igual manera a un sinnúmero de enfermedades inflamatorias e incluso psicológicas. Las consecuencias en la salud del incremento de la edad, obesidad, y estrés fisiológico podrían ser estimadas con el ccf-mtDNA. Si bien existe una creciente evidencia de la relación entre ccf-mtDNA y la enfermedad, ningún estudio se ha focalizado en saber qué es lo que ocurre en individuos en un estado sin aparentes complicaciones de salud, es decir en jóvenes y adultos sanos, junto con adultos con obesidad sin comorbilidades (Malik & Czajka, 2013). La relación entre el estrés diario, un incremento en la ingesta calórica y cómo afecta la fisiología en individuos sanos esta poco explorada (D. Lindqvist et al., 2016; Daniel Lindqvist et al., 2018) y es aquí donde el medir el ccf-mtDNA en individuos con un IMC normal y en individuos con un IMC elevado es importante para la generación de biomarcadores efectivos y universales para la prevención del sobrepeso, obesidad y enfermedades crónicas. La importancia de este estudio radica en que, de encontrar una correlación entre un índice de masa corporal alto, edad y una alta cantidad de ccf-mtDNA, proveerá la base para el desarrollo de nuevos y mejores biomarcadores para individuos sanos que estén en riesgo o no de generar sobrepeso u obesidad más rápido que otros.

3. ÁREA DE ESTUDIO

La población de estudio provino de la ciudad de Quito y se compuso de 74 participantes, de los cuales 24 individuos fueron jóvenes (13 hombres y 11 mujeres, 20-26 años) con un índice de masa corporal (IMC) normal (18.5-24.99 kg/m²), 20 fueron individuos adultos (7 hombres y 13 mujeres, 30-52 años) también con IMC normal, y 30 fueron adultos (15 hombres y 15 mujeres, 31-69 años) con IMC elevado (≥ 25 kg/m²). La población joven y adulta con IMC normal se consideró como el grupo control mientras que la población adulta con IMC elevado (obesidad tipo I) se consideró como el grupo de estudio. Las muestras de jóvenes y adultos del grupo control provinieron de estudiantes y profesores voluntarios, respectivamente, de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), mientras que las muestras de los adultos con obesidad provinieron del Hospital del Día Central de Quito, del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, IEES.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Investigar los cambios cuantitativos en el contenido de ccf-mtDNA de personas en relación a su edad, glucosa y masa corporal.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar si existen posibles diferencias en los niveles ccf-mtDNA entre jóvenes y adultos
- Evaluar si existe una relación entre el ccf-mtDNA con el IMC, los niveles de glucosa y la edad de todos los participantes.
- Determinar si hay diferencias en la cantidad de ccf-mtDNA entre hombres y mujeres.

5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

5.1 Recolección de muestras sanguíneas de los participantes

- Guantes de nitrilo
- Torniquete
- Agujas
- Holder o soporte de aguja para venopunción
- Tubos sin anticoagulante - 10 mL (tapa roja)
- Alcohol antiséptico -70 %
- Algodón estéril

5.2 Toma de medidas antropométricas

- Tallímetro, Seca 213
- Báscula electrónica de piso, Seca 813

5.3 Extracción de suero

- Centrífuga, Eppendorf 5810 R
- Tubos de microcentrifugación, Eppendorf -2 mL
- Pipetas graduadas, Eppendorf - Research plus

5.4 Extracción y cuantificación de ADN

- Invitrogen™ ChargeSwitch™ gDNA Serum Kit, 0.2-1 mL
- Soporte magnético - MagnaRack™
- Espectrofotómetro Epoch- BioTek

5.5 Cuantificación de glucosa

- Módulo de química clínica, Cobas c 501

5.6 Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

- Cámara de flujo laminar
- Tubos EDTA - 5 mL (tapa lila)

- Ficoll® Paque Plus -100 mL (4 °C)
- Tubos de centrifugación, Falcon 15 mL
- 50 mL de PBS 1 X (4 °C)

5.7 Aislamiento de mitocondrias

- Thermo Scientific™ Mitochondria Isolation Kit for Tissue
- Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 21 Microcentrifuge

5.8 Análisis cuantitativo mediante PCR en tiempo real

- Applied Biosystems™ Fast SYBR™ Green Master Mix – 50 mL (-20 °C)
- Invitrogen™ forward hMitoF3 primer:
5'-CAC TTT CCA CAC AGA CAT CA-3', (10 μM) (-20 °C)
- Invitrogen™ reverse hMitoR3 primer:
5'-TGG TTA GGC TGG TGT TAG GG-3', (10 μM) (-20 °C)
- Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System
- Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water

6. METODOLOGÍA

6.1 Recolección de medidas antropométricas y muestras sanguíneas

Todos los voluntarios del estudio recibieron un consentimiento informado de participación que fue aceptado y firmado por cada uno de ellos. Tanto el protocolo del estudio como el consentimiento informado de participación, fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la USFQ. Tras dar su aprobación, se realizó la toma de medidas antropométricas de cada voluntario. Para ello, se pidió a cada uno que se retirará los zapatos para proceder con la medición de su altura, y luego se les solicitó que se remuevan objetos que pudieran amentar su masa corporal en la báscula electrónica. El IMC de cada voluntario se calculó como la diferencia entre la masa en kilogramos y la altura en metros cuadrados (kg/m^2). Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada participante se agrupo según su IMC: el grupo control consistió de individuos con un IMC normal ($18.50 - 24.99 \text{ kg}/\text{m}^2$), mientras que el grupo de estudio por individuos con IMC elevado ($\geq 25.00 \text{ kg}/\text{m}^2$).

En cuanto a las muestras sanguíneas, la extracción de sangre de la población adulta con IMC elevado se realizó por el personal del laboratorio clínico del IESS, mientras que de la población joven y adulta con IMC normal, se realizó por el personal del laboratorio clínico del Hospital de los Valles. De cada participante se extrajo aproximadamente 10 mL de sangre en tubos sin anticoagulante (tapa roja). Posteriormente, se centrifugó cada tubo de sangre a 2200 g durante 10 minutos, a temperatura ambiente y con una aceleración/freno de 9. Una vez que se obtuvo el suero, de cada muestra se guardó 2 mL del mismo en un tubo eppendorf y se almaceno a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta la extracción de ADN.

6.2 Cuantificación de glucosa

Los niveles de glucosa basal de cada participante (en ayunas) se midieron inmediatamente después de la extracción del suero sanguíneo mediante el módulo de química clínica del equipo cobas c 501. Los rangos de glucosa en ayunas se clasificaron como: normal = 70-99 mg/dL; pre-diabetes = 100-125 mg/dL; y diabetes > 126 mg/dL. La clasificación se basó según los rangos de glucosa establecidos por la Asociación Estadounidense de Diabetes (ADA por American Diabetes Association).

6.3 Extracción y cuantificación de ADN

Los 2 mL de suero que habían sido almacenados a -20°C se dejaron a temperatura ambiente hasta que se descongelaron por completo. Posteriormente, se procedió a la extracción de ADN utilizando el kit “ChargeSwitch® gDNA 1 ml Serum Kit” de Invitrogen. En base al protocolo del fabricante, se colocaron 400 μl de suero (por cada muestra) en un tubo eppendorf estéril de 2 mL. Luego se agregaron 280 μl de una solución de lisis, 30 μl de proteinasa K, se resuspendió 10 veces y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. A 2 minutos de que terminará el tiempo de incubación, se realizó un vórtex al tubo con la solución de beads magnéticos para resuspenderlos. Tras el periodo de incubación, se agregaron 100 μl de la solución de purificación, 12 μl de los beads magnéticos, se resuspendió la mezcla 10 veces y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos para permitir la unión del ADN a los beads magnéticos. Luego se incubó cada muestra durante 3 minutos en el soporte magnético. Posteriormente, sin quitar el tubo de dicho soporte, se removió y descartó todo el sobrenadante, luego se quitó el tubo del soporte, se lavó el pellet de beads que contenía al ADN resuspendiéndolo 10 veces en 400 μl de la solución de lavado y se incubó nuevamente en el soporte magnético durante 2 minutos. Al término de la incubación se removió y descartó el sobrenadante y se repitió una vez más el proceso de lavado.

Tras el último lavado se resuspendió 20 veces el pellet de beads con ADN en 50 μ l de la solución de elución, y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos para permitir que el ADN se desprenda de los beads magnéticos. Luego se incubo en el soporte magnético durante 1 minuto para que los beads se adhieran a la pared del tubo y así se pueda remover todo el sobrenadante de ADN. Después se transfirieron los 50 μ l de ADN a un nuevo tubo eppendorf de 1.5mL. Finalmente, se tomaron 2 μ l de ADN para cuantificar por duplicado la concentración y pureza del ADN de cada muestra.

6.4 Extracción de PBMCs

En 10 tubos EDTA (tapa lila) se recolectaron aproximadamente 30 mL de sangre provenientes de voluntarios del Laboratorio de Investigación Médica de la Escuela de Medicina de la USFQ incluidos en el consentimiento informado. Posteriormente, dentro de la cámara de flujo laminar se colocaron en 5 tubos Falcon de 15 mL, 7 mL de Ficoll Paque Plus para poder separar la sangre en 5 fases: plasma, PBMCs, Ficoll Paque, granulocitos y eritrocitos. Una vez fuera de la cámara de flujo laminar, se distribuyeron cuidadosamente los 30 mL de sangre en los tubos Falcon (6 mL en cada uno). Luego se centrifugó cada tubo a 400 g durante 30 minutos, a 4 °C y sin aceleración y freno.

Posteriormente, se extrajo la mayor cantidad de la porción de PBMCs (anillo blanco que se encuentra por debajo de la capa de plasma y por encima de la capa de Ficoll Paque, procurando no extraer esta última) y se los colocó en un nuevo tubo Falcon de 15 mL. Luego se adicionó PBS 1 X hasta completar un volumen final de 10 mL y se centrifugó a 1500 g, durante 20 minutos, a 4 °C y con una aceleración y freno de 9. En seguida se extrajo 9 mL del sobrenadante y se resuspendió las PBMCs en el mililitro restante para después transferirlas a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL. Luego se centrifugó a 4400 g por 5 minutos y a 4 °C. Finalmente, se removió y descartó el

sobrenadante, y luego se almacenó el pellet de PBMCs a 4 °C hasta el aislamiento de mitocondrias.

6.5 Aislamiento de mitocondrias

A partir de las PBMCs que se extrajeron previamente, se utilizó el kit Mitochondria Isolation Kit for Tissue, para aislar sus mitocondrias. En base a las instrucciones del fabricante se resuspendió el pellet de PBMCs en 800 µl de BSA/Reactivo A, se realizó un vórtex a velocidad media durante 10 segundos y luego se incubó en hielo por 2 minutos. Después se agregaron 5 µl de Reactivo B, se hizo un vórtex a máxima velocidad durante 10 segundos, se incubó en hielo por 5 minutos y en dicho periodo, a intervalos de 50 segundos, se realizó un vórtex a máxima velocidad por 10 segundos. Posteriormente, se agregaron 800 µl de Reactivo C, se mezcló 10 veces por inversión y se centrifugó a 700 g durante 10 minutos y a 4 °C. Al término de la misma, cuidadosamente se transfirió 1300 µl del sobrenadante mitocondrial a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se almacenó el pellet mitocondrial a -80 °C hasta la extracción de su ADN mitocondrial, el cual se realizó con el mismo kit y protocolo que se utilizó para la extracción de ADN del suero sanguíneo.

6.6 Elaboración y cuantificación de la curva estándar mediante qPCR

Tras cuantificar la concentración que se obtuvo de mtDNA se realizaron 5 diluciones seriadas (factor de dilución 1:2) para obtener una curva estándar de 5 puntos. Para la primera dilución se mezclaron 10 µl de mtDNA en 10 µl de agua destilada ultra pura. Luego, para la segunda dilución se extrajeron 10 µl de la primera dilución y se mezclaron en otros 10 µl de agua destilada ultra pura. Dicho proceso se repitió tres veces más hasta obtener la quinta dilución. Posteriormente, se utilizaron 4 µl de mtDNA de cada dilución para amplificar por duplicado los 5 puntos de la curva estándar. El volumen

de cada reacción se compuso de: 5 μ l de Fast SYBR™ Green Master Mix, 0.5 μ l de primer forward hMitoF3, 0.5 μ l de primer reverse hMitoR3, y 4 μ l de mtDNA. Las condiciones para la amplificación de la curva estándar fueron: pre incubación a 95 °C por 5 minutos (1 ciclo); desnaturalización a 95 °C por 10 segundos; alineamiento y extensión a 60 °C por 30 segundos (40 ciclos). Para la etapa de la curva de melting se corrió a 95 °C por 5 segundos, 60 °C por 1 minuto, 95 °C por 15 segundos y 40 °C por 30 segundos (1 ciclo) (Ajaz et al., 2015). La ecuación de la curva estándar (recuadro rojo de la **figura 1**) se utilizó para determinar la cantidad de ccf-mtDNA presente en cada muestra.

6.7 Cuantificación de los niveles ccf-mtDNA mediante qPCR

Los primers que se utilizaron fueron: hMitoF3 (forward) y hMitoR3 (reverse), los cuales se tomaron de: Malik, Shahni, Rodriguez-de-Ledesma, Laftah, & Cunningham, 2011. Tanto los volúmenes de cada componente de la reacción así como las condiciones de amplificación de la qPCR que se emplearon para la generación de la curva estándar, también se utilizaron para cuantificar la cantidad de ccf-mtDNA de cada muestra. Cada una se amplificó por duplicado y se utilizó su Ct (del inglés Cycle threshold, ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia emitida por la muestra pasa el umbral base de fluorescencia) promedio para determinar la cantidad absoluta (ng/ μ l) de ccf-mtDNA mediante la ecuación de la curva estándar.

6.8 Análisis estadístico

Para determinar si los datos seguían una distribución normal, se realizó la prueba de normalidad utilizando el estadístico de Anderson-Darling. Posteriormente, se utilizó la transformación de Box-Cox para ajustar los datos a una distribución normal. Con los datos transformados se realizó una prueba t de 2 muestras para comparar y determinar la significancia de las cantidades promedio de ccf-mtDNA de toda la población de estudio. Las comparaciones que se realizaron fueron: grupo control vs grupo IMC elevado,

jóvenes vs adultos (del grupo control), adultos grupo control vs adultos IMC elevado, y hombres vs mujeres (de cada grupo). Adicionalmente, se hizo un análisis de correlación de Pearson entre todas las variables de estudio: ccf-mtDNA, edad, glucosa e IMC. Los análisis se realizaron en Minitab 17 y todos los valores $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Características clínicas de la población de estudio

7.1.1 *Hombres*

La **tabla 1** muestra que el IMC promedio de los jóvenes y adultos del grupo control se encontró dentro del rango normal (18,5 – 24,99 kg/m²), mientras que el IMC promedio los adultos con IMC elevado estuvo 5 unidades por encima (30,5 kg/m²) del rango normal, lo cual en base a la OMS fueron clasificados como adultos con obesidad tipo I (30,00 – 34,99 kg/m²). Por otra parte, la edad promedio de los jóvenes y adultos del grupo control fue de 22 y 37 años, respectivamente, mientras que la de los adultos con IMC elevado fue mayor (48 años). En cuanto a los niveles promedio de glucosa, los tres grupos estuvieron dentro del rango normal. Sin embargo, los adultos con IMC elevado fueron los que mayor glucosa presentaron entre los grupos.

7.1.2 *Mujeres*

La **tabla 2** muestra que al igual que los hombres, el IMC promedio de las mujeres jóvenes y adultas del grupo control estuvo dentro del rango normal (18,5 – 24,99 kg/m²), mientras que el de las adultas con IMC elevado estuvo 8 unidades por encima (33,30 kg/m²) de lo normal, lo cual al igual que en los adultos hombres con IMC elevado, significó que en promedio las mujeres tuvieron obesidad tipo I. Por otra parte, la edad promedio de las mujeres jóvenes fue de 21 años, mientras que la de las adultas del grupo control y las adultas con IMC elevado fue casi igual, 43 y 42 años, respectivamente. Por otro lado, los niveles promedio de glucosa de los tres grupos estuvieron dentro del rango normal, pero al igual que en el grupo de los hombres adultos con IMC elevado, las mujeres adultas con IMC elevado tuvieron el nivel más alto de glucosa.

7.2 Amplificación de la curva estándar mediante qPCR

A partir del aislamiento de las mitocondrias extraídas de PBMCs se obtuvieron 50 μl de mtDNA con una concentración de 2.35 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y una pureza de 1,78 en la relación de absorbancia 260/280. Tras las 5 diluciones seriadas, la concentración final ($\text{ng}/\mu\text{l}$) de cada punto de la curva estándar en la reacción de qPCR fue: (1) 0.47, (2) 0.12, (3) 0.059, (4) 0.029 y (5) 0.015. En la **figura 1** se muestra la ecuación que se obtuvo de la curva estándar (recuadro rojo), en donde X , Y , y m , representan la cantidad de ccf-mtDNA en $\text{ng}/\mu\text{l}$, el punto de corte con el eje Y , y la pendiente de la curva, respectivamente.

Por otro lado, se obtuvo un valor R^2 de 0.998, de modo que los valores de la curva estándar se ajustaron al modelo de regresión lineal en un 99.8 %. Por otra parte, con la pendiente de la curva estándar ($m = -3.58$) se obtuvo que la eficiencia de la reacción de qPCR fue del 90.26 %, misma que se encuentra dentro de los parámetros aceptables (90-110 %) (Thermo Fisher Scientific, 2014).

7.3 Curva de melting

La **figura 2** muestra que la temperatura de melting de los productos amplificados de cada muestra fue de 77 °C. Adicionalmente, no se observaron otros picos por debajo o por encima de dicha temperatura por lo que no hubo amplificación de productos inespecíficos como por ejemplo dímeros de primers.

7.4 Prueba de normalidad de Anderson – Darling

Al evaluar si los valores de ccf-mtDNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) de cada muestra seguían una distribución normal, se obtuvo un valor p (< 0.005) que fue menor al nivel de significancia escogido (0.05), por lo que se rechazó con un 95% de confianza la hipótesis nula (H_0) acerca de que los datos seguían una distribución normal. Adicionalmente, con el estadístico de Anderson-Darling (AD) y la prueba del “lápiz grueso” se corroboró que los datos no tenían una distribución normal (**figura 3**).

7.5 Transformación Box-Cox

Puesto que los datos de la cantidad de ccf-mtDNA en ng/ μ l no siguieron una distribución normal, el valor de lambda (λ) de la transformación Box-Cox que se obtuvo fue igual cero (**figura 4**, recuadro rojo), con lo cual la transformación sugerida para que los datos sigan una distribución normal fue la logarítmica.

7.6 Normalidad de los niveles de ccf-mtDNA (ng/ μ l) transformados a log 10

La **figura 5** muestra que el supuesto de normalidad para los datos de ccf-mtDNA transformados a su contraparte logarítmica si se cumplió ya que el valor p (0.165) fue mayor que alfa (0.05), por lo que con un nivel de confianza del 95% se estableció que no existe suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 , de modo que el supuesto de normalidad si se cumplió para los datos de ccf-mtDNA transformados.

7.7 Prueba t de 2 muestras

7.7.1 Grupo control vs grupo IMC elevado

La comparación de los niveles de ccf-mtDNA entre todos los individuos del grupo control ($n = 44$) y los individuos con IMC elevado ($n = 30$), mostró que las personas con un IMC elevado tuvieron en promedio (0.10 ng/ μ l) una mayor cantidad de ccf-mtDNA que las personas del grupo control (0.031 ng/ μ l). Tras realizar la prueba t de 2 muestras de las medias de ambos grupos, se obtuvo un valor p (0.028) menor que alfa (0.05) por lo que la diferencia entre la cantidad promedio de ccf-mtDNA de los dos grupos fue estadísticamente significativa (**figura 6**).

7.7.2 Grupo control: Jóvenes vs adultos

La **figura 7** muestra que los jóvenes del grupo control ($n = 24$) tuvieron en promedio una menor cantidad de ccf-mtDNA (0.016 ng/ μ l) en comparación con los adultos ($n = 20$) del mismo grupo (0.069 ng/ μ l) Tras realizar la prueba t se obtuvo un

valor p (0.02) menor que alfa (0.05), de modo que la diferencia promedio de ccf-mtDNA entre ambos fue estadísticamente significativa.

7.7.3 Adultos grupo control vs adultos IMC elevado

Al comparar los niveles de ccf-mtDNA de los adultos del grupo control ($n = 20$) y los adultos con IMC elevado ($n = 30$), el valor p (0.582) que se obtuvo de la prueba t de 2 muestras mostró que la cantidad promedio de ccf-mtDNA entre ambos no fue significativa (mayor que alfa), por lo que fueron estadísticamente iguales (**figura 8**).

7.7.4 Hombres vs mujeres

La comparación entre la cantidad promedio de ccf-mtDNA entre los hombres y mujeres de cada grupo de estudio se muestra en la **tabla 3**. Los valores p ($> 0,05$) que se obtuvieron de la prueba t de 2 muestras indicaron que los niveles promedio de ccf-mtDNA no difieren significativamente entre los hombres y mujeres de cada grupo.

7.8 Correlación de Pearson

En la **figura 9** se observa que el análisis de correlación de Pearson mostró que si existe una relación entre los niveles de ccf-mtDNA y el IMC, y que además es significativa debido a que el valor p (0.021) fue menor que alfa (0.05). Adicionalmente, hubo una correlación significativa entre los niveles de ccf-mtDNA y la edad de todos los participantes ya que el valor p (0.018) fue menor que el valor de significancia (0.05). No obstante, no se observó una correlación significativa entre los niveles de ccf-mtDNA y los niveles de glucosa debido a que el valor p (0.228) fue mayor que alfa.

Por otra parte, los valores p del análisis de correlación entre el IMC con los niveles de glucosa y la edad, así como también los niveles de glucosa y la edad, fueron todos menores que el nivel de significancia de 0.05, por lo que hubo una correlación significativa entre dichas variables (**figura 9**). Además, tanto el signo del coeficiente de

Pearson, como las gráficas de dispersión (**figura 10**), indicaron que todas las relaciones entre las variables tienden a aumentar a la vez.

7.9 Población de estudio con un nivel alto de ccf-mtDNA

Al considerar como “alto” el nivel promedio de ccf-mtDNA (0.1 ng/μl) de las personas con IMC elevado, se encontró que dentro de los jóvenes y adultos del grupo control, el 25% y 40%, respectivamente, tuvo una cantidad superior a los 0.1 ng/μl de los adultos con IMC elevado, y dentro de los cuales el 56.7 % superó dicho nivel de ccf-mtDNA (**figura 11**).

DISCUSIÓN

La cuantificación del ccf-mtDNA, en diferentes dolencias y en individuos sin signos de complicación en su salud, se muestra como un potencial biomarcador que podría permitir un mejor diagnóstico y pronóstico del desarrollo de la enfermedad. Dentro de su estimación, cada paso para la correcta identificación de su presencia fuera de la célula es importante para evitar confusores, tales como la distinción entre plasma y suero. El uso del suero libre de la fracción celular, permite una mejor identificación del ccf-mtDNA en comparación con otras técnicas donde el uso de plasma o sangre total puede dar lugar a falsos-positivos o correlaciones poco precisas (Malik et al., 2011). La selección de primers específicos para la amplificación del mtDNA es un paso fundamental al momento de cuantificar su cantidad mediante qPCR. La razón de ello es que las mitocondrias, al ser el resultado de la endosimbiosis de una alfa-proteobacteria con una célula eucariota primitiva, exportaron mtDNA y este se integró al núcleo. Dichos segmentos integrados se conocen como segmentos de ADN mitocondrial nuclear o Numts (por nuclear mtDNA segments) (Bensasson, 2001), los cuales sin un buen diseño de primers pueden generar confusión en la detección del mtDNA propio de la mitocondria.

A partir de su descubrimiento, se han identificado varios Numts en el genoma nuclear humano que son similares, pero no idénticos, a su contraparte mitocondrial. Esto representa un problema al momento de analizar el mtDNA ya que puede conllevar a interpretaciones erróneas cuando se lo amplifica mediante qPCR, y en consecuencia, afectar en el diagnóstico molecular de enfermedades correlacionadas con la presencia de ccf-mtDNA (Tourmen et al., 2002). Por tal motivo y en el presente estudio la estimación de la cantidad absoluta de mtDNA en el suero de todos los participantes fueron factores cruciales al momento de analizar los resultados. Nuestro trabajo estima directamente la presencia de ccf-mtDNA a través de la realización de una curva estándar, utilizando el aislamiento de mtDNA puro de mitocondrias extraídas de PBMCs. Usamos también los

primers específicos y ya probados en la literatura: hMitoF3 (forward) y hMitoR3 (reverse), ya que amplifican una región única del mtDNA que no se encuentra presente como un pseudogen nuclear (Malik et al., 2011).

Por otra parte, acerca de la comparación entre la cantidad promedio de ccf-mtDNA de las personas del grupo control vs las personas con IMC elevado (obesidad tipo I), la diferencia significativa encontrada en ambos grupos de estudio sugiere que el ccf-mtDNA podría servir como un biomarcador no invasivo de diagnóstico para individuos que estén en riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad. La acumulación excesiva de tejido adiposo en la obesidad, debido a un sobrenutrición y desequilibrio entre la ingesta y gasto de energía, resulta eventualmente en un exceso de almacenamiento de energía en forma de grasa (Lois y Kumar, 2009), lo que conlleva a que haya un aumento en la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria y un incremento en la producción de ROS. Debido a esto, la obesidad es considerada como una condición que genera estrés oxidativo ya que la capacidad antioxidante de las enzimas celulares se ve sobrepasada por la generación de ROS (Furukawa et al., 2004; Matsuda & Shimomura, 2013; Rovira-Llopis, Hernández-Mijares, Rocha, & Victor, 2014). Adicionalmente, el incremento de ROS eventualmente también conduce a una expresión defectuosa del gen de la insulina así como también de su secreción, lo que en consecuencia provoca una deficiencia de insulina y un incremento significativo de los niveles de glucosa (hiperglicemia) en la sangre (Yang, Jin, Kei Lam, & Yan, 2011).

El aumento de ROS provocado por el exceso de acumulación de grasa y azúcar conduciría a daño celular y a la activación de la apoptosis (Circu & Aw, 2010; Kannan & Jain, 2000; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016; Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). La muerte celular ocasionada por el estrés oxidativo eventualmente provocaría la liberación del mtDNA de las células dañadas en el torrente sanguíneo. Esto podría explicar el por

qué las personas con IMC elevado (obesidad tipo I) tuvieron una cantidad mayor de ccf-mtDNA en comparación con las personas del grupo control (IMC normal). Adicionalmente, la correlación significativa y positiva que se encontró entre el ccf-mtDNA y el IMC, corroboraría este hecho ya que a medida que se incrementa el IMC, también existe una mayor cantidad de ccf-mtDNA.

Con respecto a la comparación de los niveles de ccf-mtDNA de los individuos del grupo control, puesto que tanto los jóvenes como los adultos tuvieron un IMC normal, la diferencia en la cantidad de ccf-mtDNA de ambos grupos no podría deberse al estrés oxidativo derivado de la cantidad de grasa corporal presente en cada uno (como si sería el caso para los individuos que tuvieron un IMC elevado), sino más bien a la edad.

Está bien documentado en la literatura que con la edad la capacidad de adaptación corporal frente a alteraciones internas y/o externas disminuye, así como también la eficacia de los mecanismos de reparación de ADN nuclear y mitocondrial, las rutas de reparación de proteínas, la defensa antioxidativa de las enzimas contra las especies reactivas de oxígeno, la capacidad de la respuesta inmunitaria celular y humoral para combatir agentes patógenos, entre otros (DiLoreto & Murphy, 2015; Kirkwood, 2011; Partridge, 2010; Rattan, 2006, 2015). La reducción en el funcionamiento de dichos mecanismos a medida que envejecemos nos hacen más susceptibles al estrés, infecciones y enfermedades, de modo que el daño celular que se genera por cada una de ellas podría contribuir a que el mtDNA se libere de la célula e ingrese en la circulación. Por tanto, la diferencia en la cantidad de ccf-mtDNA de los jóvenes y adultos del grupo control no tiene relación con su IMC, sino que más bien podría estar relacionada con la edad.

Acerca de la correlación significativa y positiva que se encontró entre el IMC y los niveles de glucosa, dicho resultado reitera lo reportado por otros estudios (Agrawal, Agrawal, Kumari, & Kumar, 2017; Hossain, Islam, Hasan, Akter, & Khoka, 2017;

Innocent, ThankGod, Sandra, & Josiah, 2013; Vittal, Praveen, & Deepak, 2010) y corrobora lo mencionado en la literatura acerca de que el incremento en la cantidad de tejido adiposo conlleva a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias y ácidos grasos libres que eventualmente afectan la acción de la insulina y en consecuencia contribuyen a un estado de resistencia a la insulina, así como también a una mayor cantidad de glucosa en la sangre (Boden & Shulman, 2002; Frayn, Tan, & Karpe, 2007; Ros Pérez & Medina-Gómez, 2011; Vittal et al., 2010).

Por otro lado, la correlación significativa que se encontró entre el IMC y la edad también concuerda con la literatura ya que se conoce que con la edad el riesgo de obesidad incrementa. Durante el envejecimiento ocurren varios cambios corporales como la reducción de la masa muscular (sarcopenia) y ósea, así como también un incremento de la masa grasa. Tales cambios, además del estilo de vida más sedentario que muchas personas adquieren, junto con la limitada cantidad de ejercicio físico que se puede realizar a causa de la reducción de masa muscular, eventualmente conllevan al desarrollo de diversas enfermedades como la obesidad (Gómez-Cabello, 2012; Hughes et al., 2004; Ohkawa et al., 2005).

Además de la correlación entre el IMC y la edad, la relación significativa que se obtuvo entre la edad y la glucosa también reitera lo mencionado en la literatura (Reaven, 2003). Desde hace más de 30 años se conoce que la intolerancia a la glucosa incrementa con la edad debido al hecho de que las personas tienden a incrementar de peso y a ejercitarse menos a medida que envejecen (Fink, Kolterman, Griffin, & Olefsky, 1983; Rosenthal, Doberne, Greenfield, Widstrom, & Reaven, 1982; Rowe, Minaker, Pallotta, & Flier, 1983; Shimokata et al., 1991; Zavaroni et al., 1986). Adicionalmente, se ha reportado que la tasa de secreción de insulina decrece con la edad lo que en consecuencia

deteriora y disminuye la tolerancia a la glucosa generando así un incremento de la misma en la sangre (Chang & Halter, 2003; Iozzo et al., 1999; Refaie et al., 2006).

Puesto que los resultados de correlación antes mencionados son consistentes con otros estudios previamente reportados, se valida la metodología de estudio que se empleó para la realización del presente proyecto de titulación. Por otra parte, con respecto a la población de estudio con un nivel alto de ccf-mtDNA, llamó la atención el encontrar que dentro del grupo control había una proporción de individuos jóvenes y adultos que tenían una cantidad de ccf-mtDNA superior a los 0.1 ng/ μ l.

En un estudio publicado en Nature, Lindqvist et al., evaluó los niveles de ccf-mtDNA en el plasma de 37 individuos que intentaron suicidarse (y que fueron sometidos a una prueba de inhibición con dexametasona) y en 37 individuos sanos (control). Dichos investigadores encontraron que las personas que intentaron suicidarse tuvieron niveles significativamente más altos de ccf-mtDNA en comparación con el grupo control, y que además hubo una correlación positiva con los niveles de cortisol. La prueba de inhibición con dexametasona (utilizada para determinar la secreción anormal de cortisol) realizada en los individuos que intentaron suicidarse mostró que tenían un alto estrés psicológico a causa de los niveles elevados de cortisol que presentaron. Adicionalmente, los investigadores mencionan que la cantidad elevada de ccf-mtDNA en los individuos que intentaron suicidarse pudo deberse al estrés que estos presentaron, el cual podría causar daño celular y disfunción mitocondrial que eventualmente conduciría a la liberación del mtDNA en el torrente sanguíneo (2016).

La relación entre el estrés y el ccf-mtDNA encontrada por el estudio antes mencionado podría servir de explicación para los individuos del grupo control que tuvieron una cantidad elevada de ccf-mtDNA. Puesto que los jóvenes y adultos del grupo control provinieron principalmente de estudiantes y profesores voluntarios,

respectivamente, de la USFQ, se sugiere que la proporción de individuos de dicho grupo que tuvo una cantidad superior a los 0.1 ng/ μ l de los adultos con IMC elevado (obesidad tipo I), sea a causa del estrés derivado del entorno académico.

8. CONCLUSIONES

Se observó que existe una diferencia significativa en la cantidad promedio de ccf-mtDNA entre personas con un IMC normal (grupo control) y personas con un IMC elevado (obesidad tipo I), siendo estos últimos los que tuvieron mayor contenido de ccf-mtDNA que los del grupo control. Dicho resultado sugirió que el ccf-mtDNA podría ser aplicado como un biomarcador no invasivo de diagnóstico para individuos que estén en riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad. Por otra parte, se encontró que las diferencias en el contenido de ccf-mtDNA entre los hombres y mujeres de cada grupo no fue significativa.

En cuanto a los niveles de ccf-mtDNA entre jóvenes y adultos del grupo control, las diferencias observadas fueron significativas y no a causa del IMC, sino más bien muy probablemente debido a la edad. Por otro lado, el análisis de las relaciones del ccf-mtDNA con las 3 variables de estudio, indicó que existe una correlación significativa y positiva entre el ccf-mtDNA con el IMC y la edad, pero no con los niveles de glucosa. De modo que tales correlaciones mostraron que el ccf-mtDNA incrementa a medida que el IMC y la edad también aumentan.

Finalmente, el reiterar lo mencionado en la literatura acerca de que el IMC incrementa a medida que la cantidad de glucosa y edad también aumentan, así como también la reducción de la tolerancia a la glucosa que se da con la edad, apoyó la metodología empleada y permitió sugerir que ésta es adecuada para el análisis de los cambios de ccf-mtDNA según la edad e IMC.

9. RECOMENDACIONES

Se debería analizar a una población de individuos jóvenes con obesidad para tener un mejor entendimiento de la dinámica del ccf-mtDNA con el IMC. Además, se requieren de estudios que analicen las células y tejidos que contribuyen con los niveles de ccf-mtDNA, así como también la forma en la que se encuentra el mtDNA en el suero: fragmentado, contenido en microvesículas o libre. Conocer esto ayudaría a entender mejor la relevancia del incremento del ccf-mtDNA en relación al IMC de las personas, al igual que su posible aplicación como biomarcador de diagnóstico para el riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular + StudentConsult*. Barcelona: Elsevier España.
- Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P.-F., Figeac, F., Coudert, A. E., le Coz, O., ... Rodriguez, A.-M. (2011). Human Mesenchymal Stem Cells Reprogram Adult Cardiomyocytes Toward a Progenitor-Like State Through Partial Cell Fusion and Mitochondria Transfer: Cell Fusion-Mediated Cardiomyocyte Reprogramming. *STEM CELLS*, 29(5), 812–824.
<https://doi.org/10.1002/stem.632>
- Agrawal, N., Agrawal, M. K., Kumari, T., & Kumar, S. (2017). Correlation between Body Mass Index and Blood Glucose Levels in Jharkhand Population, 4(8), 4.
- Ajaz, S., Czajka, A., & Malik, A. (2015). Accurate Measurement of Circulating Mitochondrial DNA Content from Human Blood Samples Using Real-Time Quantitative PCR. Chapter 12. En V. Weissig & M. Edeas (Eds.), *Mitochondrial Medicine* (Vol. 1264, pp. 117–131). New York, NY: Springer New York.
Recuperado de http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2257-4_12
- Bensasson, D. (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(6), 314–321. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02151-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02151-6)
- Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101–110.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>
- Boden, G., & Shulman, G. I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell

dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(s3), 14–23.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x>

Boyapati, R. K., Tamborska, A., Dorward, D. A., & Ho, G.-T. (2017). Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases. *F1000Research*, 6, 169.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.10397.1>

Caicedo, A., Aponte, P. M., Cabrera, F., Hidalgo, C., & Khoury, M. (2017). Artificial Mitochondria Transfer: Current Challenges, Advances, and Future Applications [Research article]. Recuperado el 8 de agosto de 2018, de

<https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/7610414/abs/>

Campbell, N., & Reece, J. (2007). *Biología* (7a ed.). Buenos Aires: Médica

Panamericana. Recuperado de

<https://books.google.com.ec/books?id=QcU0yde9PtkC&printsec=frontcover&q=campbell&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj6w5bT7ubUAhXFOj4KHeVjATsQ6AEIMjAC#v=onepage&q=campbell&f=false>

Caneparo, L., Pantazis, P., Dempsey, W., & Fraser, S. E. (2011). Intercellular Bridges in Vertebrate Gastrulation. *PLOS ONE*, 6(5), e20230.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020230>

Chang, A. M., & Halter, J. B. (2003). Aging and insulin secretion. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 284(1), E7-12.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00366.2002>

Chinnery, H. R., Pearlman, E., & McMenamin, P. G. (2008). Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), 5779–5783.

- Chiu, R. W. K., Chan, L., Lam, N., Tsui, N., Ng, E., Rainer, T., & Lo, D. (2003). Quantitative Analysis of Circulating Mitochondrial DNA in Plasma. *Clinical Chemistry*, *49*(5), 719–726. <https://doi.org/10.1373/49.5.719>
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *48*(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
- Demontis, F. (2004). Nanotubes Make Big Science. *PLoS Biology*, *2*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020215>
- DiLoreto, R., & Murphy, C. T. (2015). The cell biology of aging. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(25), 4524–4531. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1084>
- Duran, H. E., Simsek-Duran, F., Oehninger, S. C., Jones, H. W., & Castora, F. J. (2011). The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation. *Fertility and Sterility*, *96*(2), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.056>
- Duregotti, E., Negro, S., Scorzeto, M., Zornetta, I., Dickinson, B. C., Chang, C. J., ... Rigoni, M. (2015). Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(5), E497–E505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417108112>
- Elena, G. A. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*, *60*(6), 391–401.
- Fang, C., Wei, X., & Wei, Y. (2016). Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses. *Protein & Cell*, *7*(1), 11–16. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0222-9>

- Favaro, E., Carpanetto, A., Caorsi, C., Giovarelli, M., Angelini, C., Cavallo-Perin, P., ... Zanone, M. M. (2016). Human mesenchymal stem cells and derived extracellular vesicles induce regulatory dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*, *59*(2), 325–333. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3808-0>
- Fink, R. I., Kolterman, O. G., Griffin, J., & Olefsky, J. M. (1983). Mechanisms of insulin resistance in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, *71*(6), 1523–1535.
- Frayn, K., Tan, G., & Karpe, F. (2007). Adipose Tissue: A Key Target for Diabetes Pathophysiology and Treatment? *Hormone and Metabolic Research*, *39*(10), 739–742. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990270>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., ... Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(12), 1752–1761. <https://doi.org/10.1172/JCI200421625>
- Gerdes, H.-H., Bukoreshtliev, N. V., & Barroso, J. F. V. (2007). Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Letters*, *581*(11), 2194–2201. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.071>
- Gerdes, H.-H., Rustom, A., & Wang, X. (2013). Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mechanisms of Development*, *130*(6), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.11.006>
- Gómez-Cabello, A. (2012). Envejecimiento y composición corporal: la obesidad sarcopénica en España. *Nutricion Hospitalaria*, (1), 22–30. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5502>

- Gurke, S., Barroso, J. F. V., & Gerdes, H.-H. (2008). The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochemistry and Cell Biology*, *129*(5), 539–550. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0412-0>
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., ... Lo, E. H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, *535*(7613), 551–555. <https://doi.org/10.1038/nature18928>
- Herbet, M., Korga, A., Gawrońska-Grzywacz, M., Izdebska, M., Piątkowska-Chmiel, I., Poleszak, E., ... Dudka, J. (2017). Chronic Variable Stress Is Responsible for Lipid and DNA Oxidative Disorders and Activation of Oxidative Stress Response Genes in the Brain of Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/7313090>
- Hossain, M. I., Islam, M. S., Hasan, M. R., Akter, M., & Khoka, M. S. H. (2017). Fasting blood glucose level and its association with sex, body mass index and blood pressure: a cross sectional study on a Bangladeshi public university students. *International Journal Of Community Medicine And Public Health*, *4*(8), 2663. <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20173310>
- Hough, K. P., Trevor, J. L., Strenkowski, J. G., Wang, Y., Chacko, B. K., Tousif, S., ... Deshane, J. S. (2018). Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox Biology*, *18*, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.009>
- Huang-Doran, I., Zhang, C.-Y., & Vidal-Puig, A. (2017). Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *28*(1), 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.10.003>

- Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M., & Krupitza, G. (2003). The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutation Research*, 543(3), 235–249.
- Hughes, V. A., Roubenoff, R., Wood, M., Frontera, W. R., Evans, W. J., & Fiatarone Singh, M. A. (2004). Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2), 475–482. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.2.475>
- Innocent, O., ThankGod, O., Sandra, E., & Josiah, I. (2013). Correlation between body mass index and blood glucose levels among some Nigerian undergraduates. *HOAJ Biology*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.7243/2050-0874-2-4>
- Iozzo, P., Beck-Nielsen, H., Laakso, M., Smith, U., Yki-Järvinen, H., & Ferrannini, E. (1999). Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. European Group for the Study of Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(3), 863–868. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5542>
- Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., ... Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature Medicine*, 18(5), 759–765. <https://doi.org/10.1038/nm.2736>
- Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39(1), 73–82. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Jo, S.-H., Son, M.-K., Koh, H.-J., Lee, S.-M., Song, I.-H., Kim, Y.-O., ... Huh, T.-L. (2001). Control of Mitochondrial Redox Balance and Cellular Defense against

- Oxidative Damage by Mitochondrial NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase (IDPm). *J Biol Chem*, 276(19), 16168–16176.
- Kannan, K., & Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology*, 7(3). 153-163.
- Kirkwood, T. B. L. (2011). Systems biology of ageing and longevity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1561), 64–70. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0275>
- Koolman, J., & Röhm, K.-H. (2005). *Bioquímica: texto y atlas*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Koyanagi, M., Brandes, R. P., Haendeler, J., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2005). Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circulation Research*, 96(10), 1039–1041. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000168650.23479.0c>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lindqvist, D., Fernström, J., Grudet, C., Ljunggren, L., Träskman-Bendz, L., Ohlsson, L., & Westrin, Å. (2016). Increased plasma levels of circulating cell-free mitochondrial DNA in suicide attempters: associations with HPA-axis hyperactivity. *Translational Psychiatry*, 6(12), e971–e971. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.236>
- Lo Cicero, A., Stahl, P. D., & Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Current Opinion in Cell Biology*, 35, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.013>

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., ... Darnell, J. (2006). *Biología celular y molecular* (5a ed.). Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*, 27(3), 172–188. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.003>
- Malik, A. N., Shahni, R., Rodriguez-de-Ledesma, A., Laftah, A., & Cunningham, P. (2011). Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: Accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.067>
- Martin, S. J., & Henry, C. M. (2013). Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. *Methods (San Diego, Calif.)*, 61(2), 87–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.001>
- Martin, W., & Mentel, M. (2010). The Origin of Mitochondria. *Nature Education*, 3(9), 58.
- Marzo, L., Gousset, K., & Zurzolo, C. (2012). Multifaceted Roles of Tunneling Nanotubes in Intercellular Communication. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00072>
- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice*, 7(5), e330–e341. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.05.004>
- McMurray, F., Patten, D. A., & Harper, M.-E. (2016). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches: ROS

and Oxidative Stress in Obesity. *Obesity*, 24(11), 2301–2310.

<https://doi.org/10.1002/oby.21654>

Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A. K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H. C., ...

Choi, A. M. K. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology*, 12(3), 222–230.

<https://doi.org/10.1038/ni.1980>

Ohkawa, S., Odamaki, M., Ikegaya, N., Hibi, I., Miyaji, K., & Kumagai, H. (2005).

Association of age with muscle mass, fat mass and fat distribution in non-diabetic haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(5), 945–951. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh643>

Partridge, L. (2010). The new biology of ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537), 147–154.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0222>

Phinney, D. G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C. M., ... Ortiz,

L. A. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nature Communications*, 6(1).

<https://doi.org/10.1038/ncomms9472>

Plotnikov, E. Y., Khryapenkova, T. G., Galkina, S. I., Sukhikh, G. T., & Zorov, D. B.

(2010). Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Experimental Cell Research*, 316(15), 2447–2455. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.06.009>

Pon, L. A., & Schon, E. A. (Eds.). (2007). *Mitochondria* (2nd ed). Amsterdam ; Boston: Academic Press.

- Pyrgaki, C., Trainor, P., Hadjantonakis, A.-K., & Niswander, L. (2010). Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Developmental Biology*, *344*(2), 941–947. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.010>
- Rattan, S. I. S. (2006). Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radical Research*, *40*(12), 1230–1238. <https://doi.org/10.1080/10715760600911303>
- Rattan, S. I. S. (2015). Biology of ageing: principles, challenges and perspectives. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, *56*(4), 1251–1253.
- Reaven, G. (2003). Age and Glucose Intolerance.pdf. *Diabetes Care*, *26*(2), 539–540.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1863*(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
- Refaie, M. R., Sayed-Ahmed, N. A., Bakr, A. M., Abdel Aziz, M. Y., El Kannishi, M. H., & Abdel-Gawad, S. S. (2006). Aging is an Inevitable Risk Factor for Insulin Resistance. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, *1*(1, Supplement C), 30–41. [https://doi.org/10.1016/S1658-3612\(06\)70005-1](https://doi.org/10.1016/S1658-3612(06)70005-1)
- Roberts, C. K., & Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, *84*(21–22), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.026>
- Rongvaux, A., Jackson, R., Harman, C. C. D., Li, T., West, A. P., de Zoete, M. R., ... Flavell, R. A. (2014). Apoptotic Caspases Prevent the Induction of Type I Interferons by Mitochondrial DNA. *Cell*, *159*(7), 1563–1577. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.037>

- Ros Pérez, M., & Medina-Gómez, G. (2011). Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición*, *58*(7), 360–369.
<https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.05.008>
- Rosenthal, M., Doberne, L., Greenfield, M., Widstrom, A., & Reaven, G. M. (1982). Effect of age on glucose tolerance, insulin secretion, and in vivo insulin action. *Journal of the American Geriatrics Society*, *30*(9), 562–567.
- Rovira-Llopis, S., Hernández-Mijares, A., Rocha, M., & Victor, V. M. (2014). The role of reactive oxygen species in obesity therapeutics. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, *9*(6), 629–639.
<https://doi.org/10.1586/17446651.2014.949242>
- Rowe, J. W., Minaker, K. L., Pallotta, J. A., & Flier, J. S. (1983). Characterization of the insulin resistance of aging. *Journal of Clinical Investigation*, *71*(6), 1581–1587. <https://doi.org/10.1172/JCI110914>
- Scheffler, I. E. (2008). *Mitochondria* (2a ed.). Hoboken, N.J: Wiley-Liss.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, *24*(10), R453–R462.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Selak, M. A., Lyver, E., Micklow, E., Deutsch, E. C., Önder, Ö., Selamoglu, N., ... Sarry, J.-E. (2011). Blood cells from Friedreich ataxia patients harbor frataxin deficiency without a loss of mitochondrial function. *Mitochondrion*, *11*(2), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.12.003>
- Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., ... Arditi, M. (2012). Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity*, *36*(3), 401–414.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>

- Shimokata, H., Muller, D. C., Fleg, J. L., Sorkin, J., Ziemba, A. W., & Andres, R. (1991). Age as independent determinant of glucose tolerance. *Diabetes*, *40*(1), 44–51.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, *87*(7), 1157–1180. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>
- Srivastava, K. K., & Kumar, R. (2015). Stress, Oxidative Injury and Disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *30*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0441-5>
- Thermo Fisher Scientific. (2014). Real-Time PCR handbook.
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, *164*(6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- Torralba, D., Baixauli, F., Villarroya-Beltri, C., Fernández-Delgado, I., Latorre-Pellicer, A., Acín-Pérez, R., ... Sánchez-Madrid, F. (2018). Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nature Communications*, *9*(1), 2658. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05077-9>
- Tourmen, Y., Baris, O., Dessen, P., Jacques, C., Malthièry, Y., & Reynier, P. (2002). Structure and Chromosomal Distribution of Human Mitochondrial Pseudogenes. *Genomics*, *80*(1), 71–77. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6798>
- Uranova, N., Orlovskaya, D., Vikhreva, O., Zimina, I., Kolomeets, N., Vostrikov, V., & Rachmanova, V. (2001). Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Research Bulletin*, *55*(5), 597–610. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00528-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00528-7)

- Vignais, M.-L., Caicedo, A., Brondello, J.-M., & Jorgensen, C. (2017). Cell Connections by Tunneling Nanotubes: Effects of Mitochondrial Trafficking on Target Cell Metabolism, Homeostasis, and Response to Therapy [Research article]. Recuperado el 14 de agosto de 2018, de <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/6917941/abs/>
- Vittal, B., Praveen, G., & Deepak, P. (2010). A study of BMI in health individuals and its relationship with fasting blood sugar. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 4, 3421–3424.
- West, A. P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M. C., Pineda, C. M., Lang, S. M., ... Shadel, G. S. (2015). Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature*, 520(7548), 553–557.
<https://doi.org/10.1038/nature14156>
- White, M. J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R. M., Cambier, J. C., Herold, M. J., ... Kile, B. T. (2014). Apoptotic Caspases Suppress mtDNA-Induced STING-Mediated Type I IFN Production. *Cell*, 159(7), 1549–1562.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.036>
- Yang, H., Jin, X., Kei Lam, C. W., & Yan, S.-K. (2011). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(11), 1773–1782.
<https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.250>
- Yu, M. (2012). Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA*, 23(5), 329–332.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2012.696625>
- Yue, L., & Yao, H. (2016). Mitochondrial dysfunction in inflammatory responses and cellular senescence: pathogenesis and pharmacological targets for chronic lung

diseases: Mitochondrial dysfunction in chronic lung diseases. *British Journal of Pharmacology*, 173(15), 2305–2318. <https://doi.org/10.1111/bph.13518>

Zavaroni, I., Dall’Aglia, E., Bruschi, F., Bonora, E., Alpi, O., Pezzarossa, A., & Butturini, U. (1986). Effect of age and environmental factors on glucose tolerance and insulin secretion in a worker population. *Journal of the American Geriatrics Society*, 34(4), 271–275.

Zhu, M., Barbas, A. S., Lin, L., Scheuermann, U., Bishawi, M., & Brennan, T. V. (2018). Mitochondria Released by Apoptotic Cell Death Initiate Innate Immune Responses. *ImmunoHorizons*, 2(11), 384–397. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800063>

11. TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de la población masculina

Variable	Control		IMC elevado
	Jóvenes (n = 13)	Adultos (n = 7)	Adultos (n = 15)
IMC (kg/m ²)	21,79 ± 2,2	23,15 ± 1,42	30,50 ± 5,30
Edad (años)	22,36 ± 2,38	37,43 ± 6,08	48,71 ± 12,36
Glucosa basal (mg/dL)	83,00 ± 6,61	92,57 ± 3,51	97,73 ± 9,60

Tabla 2. Características clínicas de la población femenina

Variable	Control		IMC elevado
	Jóvenes (n = 11)	Adultas (n = 13)	Adultas (n = 15)
IMC (kg/m ²)	21,75 ± 1,23	22,23 ± 1,75	33,30 ± 6,19
Edad (años)	21,10 ± 1,51	43,38 ± 7,63	42,87 ± 8,10
Glucosa basal (mg/dL)	86,27 ± 6,69	88,08 ± 7,22	96,57 ± 8,21

Tabla 3. Prueba t de 2 muestras para la comparación de ccf-mtDNA entre hombres y mujeres de cada grupo de estudio

Grupo		ccf-mtDNA (ng/μl)		Valor <i>p</i>
		Hombres	Mujeres	
Control	Jóvenes	0,024 ± 0,89	0,010 ± 0,72	0,271
	Adultos	0,030 ± 0,94	0,11 ± 0,81	0,221
IMC elevado	Adultos	0,12 ± 0,61	0,078 ± 1,17	0,581

12. FIGURAS

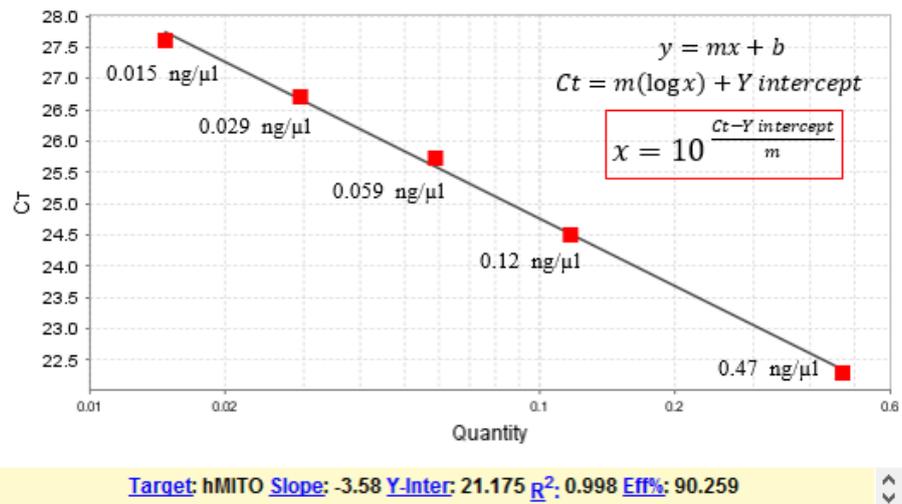


Figura 1. Curva estándar de mtDNA

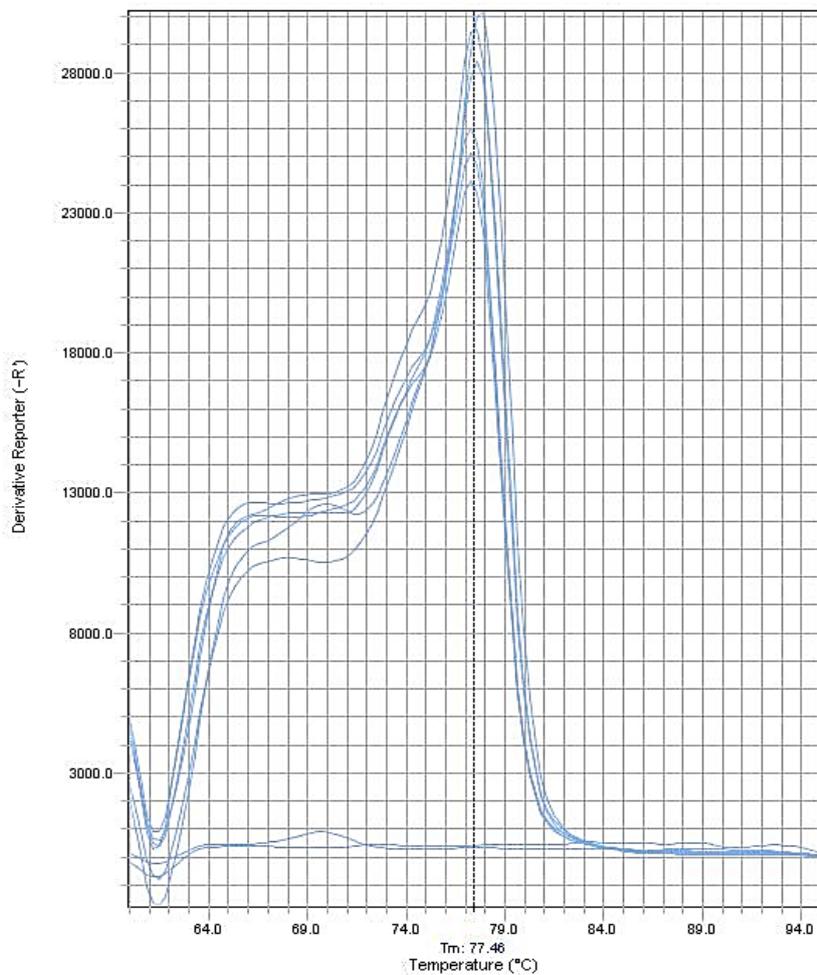


Figura 2. Curva de melting

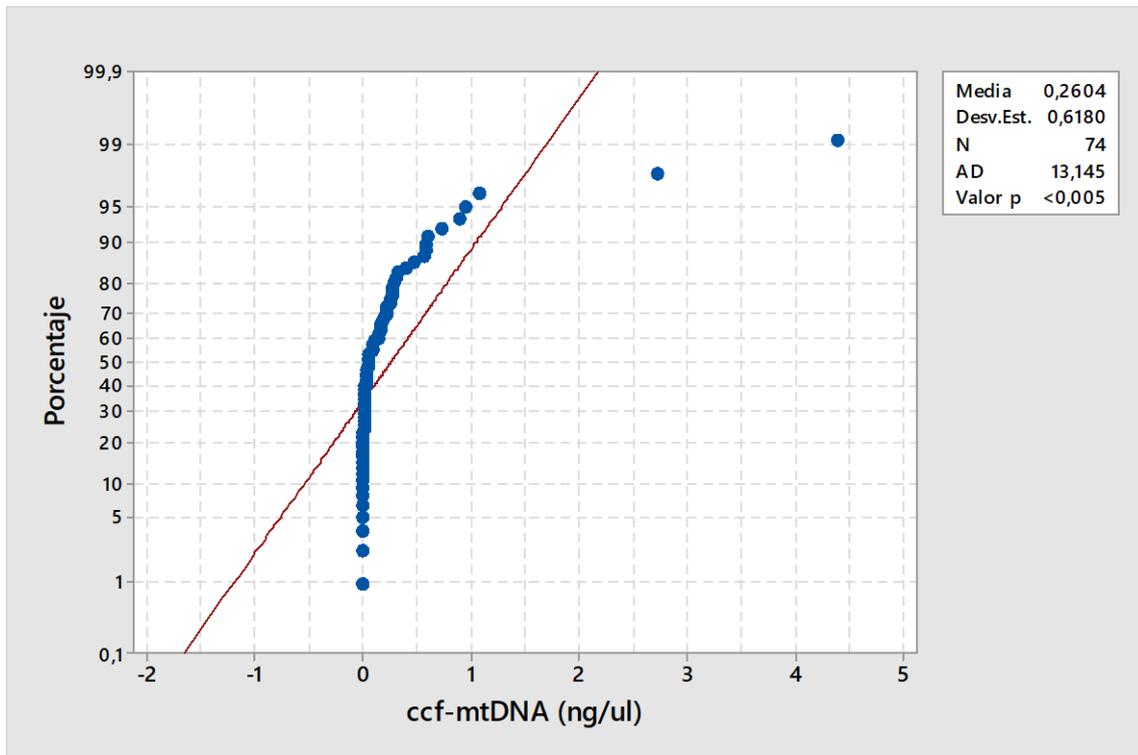


Figura 3. Grafica de probabilidad normal

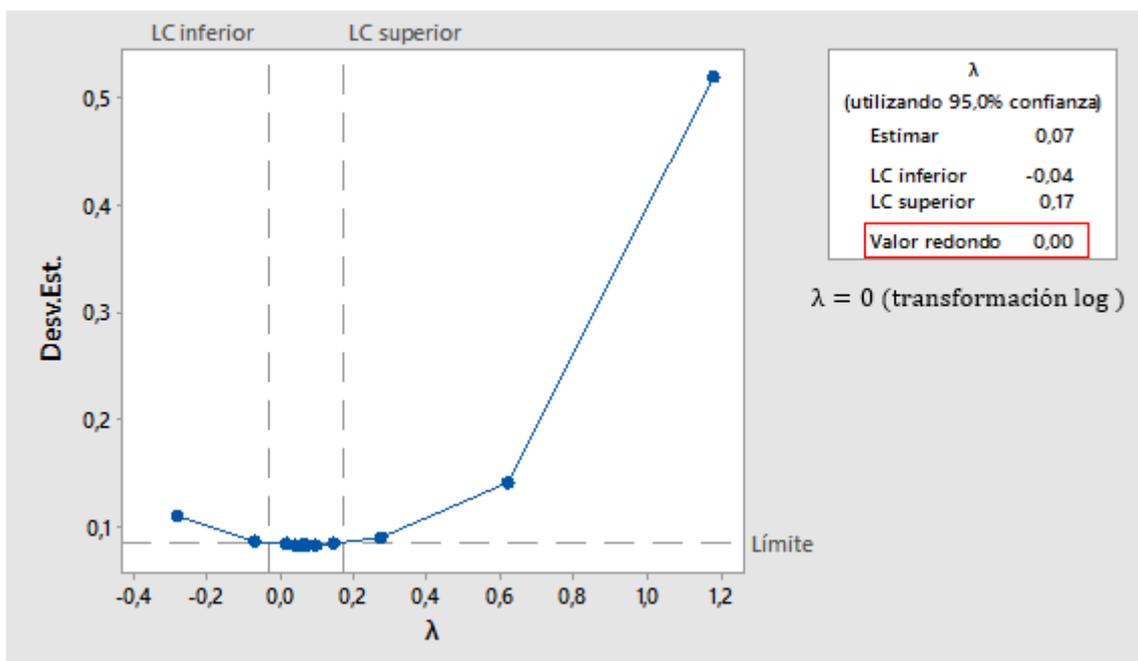


Figura 4. Gráfica de Box-Cox para ccf-mtDNA (ng/μl)

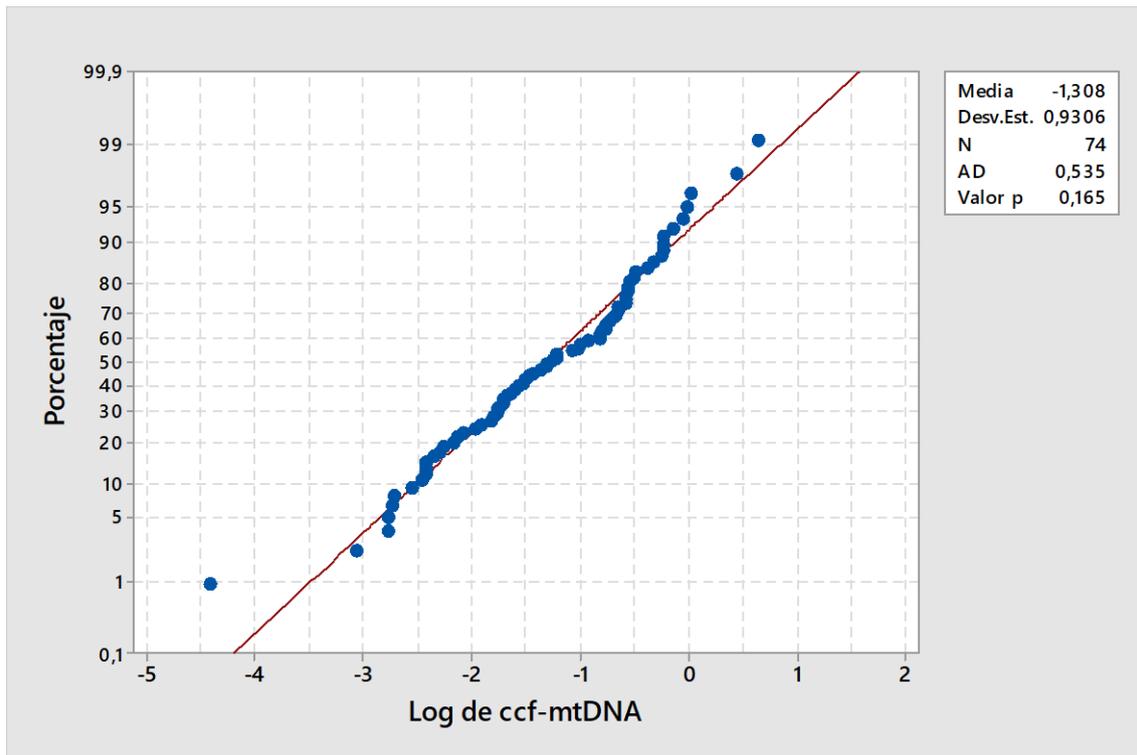


Figura 5. Gráfica de probabilidad normal de los datos de ccf-mtDNA transformados

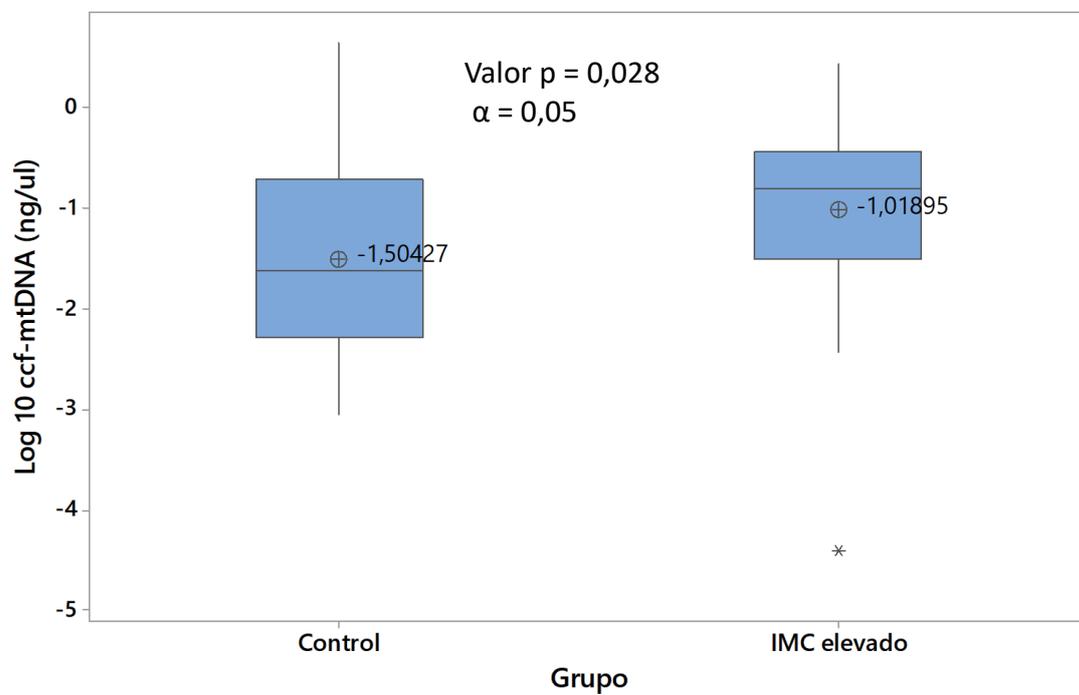


Figura 6. Comparación de los niveles de ccf-mtDNA entre el grupo control y los adultos con IMC elevado

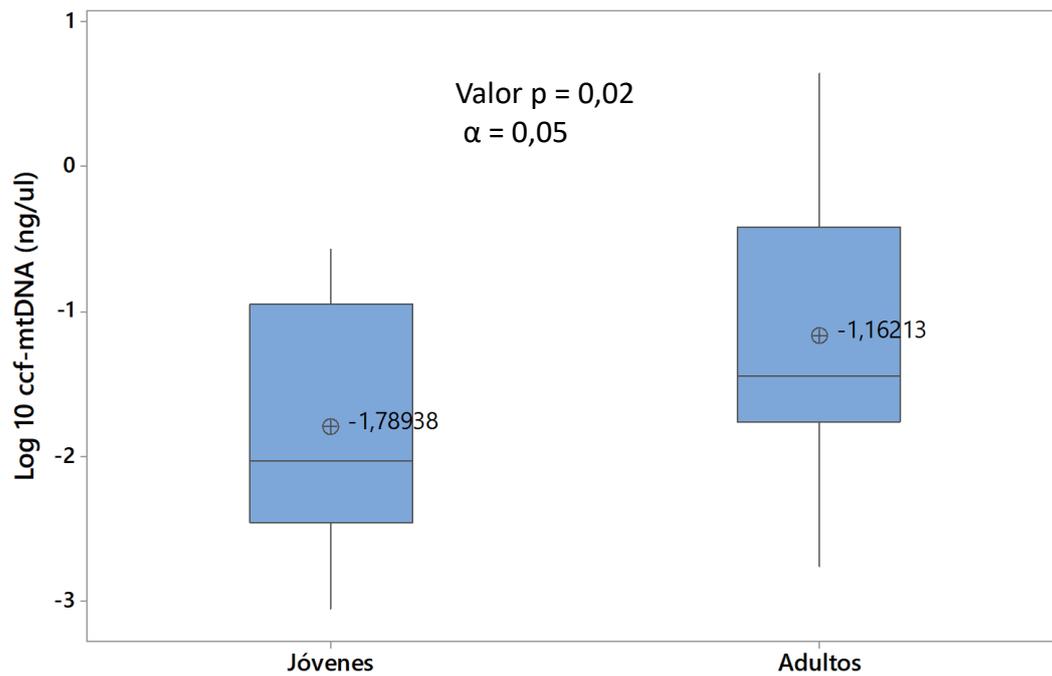


Figura 7. Comparación de los niveles de ccf-mtDNA entre jóvenes y adultos del grupo control

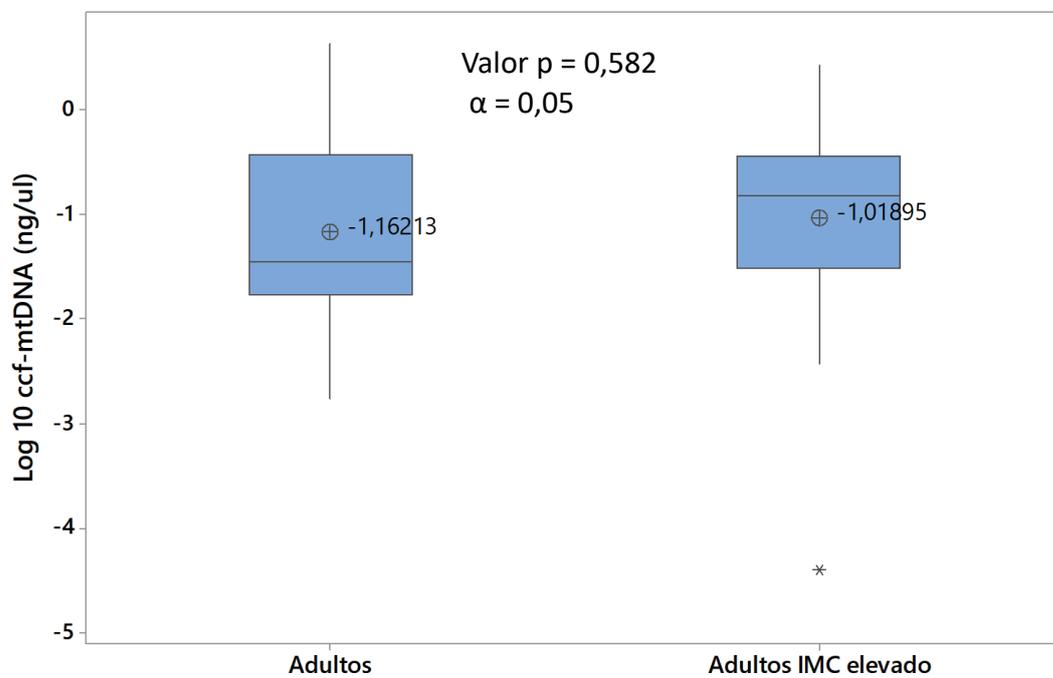


Figura 8. Comparación de los niveles de ccf-mtDNA entre adultos del grupo control y adultos con IMC elevado

ccf-mtDNA			
IMC	0,267		IMC
	0,021		
Glucosa	0,143	0,549	
	0,228	0,000	Glucosa
Edad	0,281	0,493	0,607
	0,018	0,000	0,000

Contenido de la celda: Correlación de Pearson
Valor p

Figura 9. Análisis de correlación de Pearson entre todas las variables de estudio

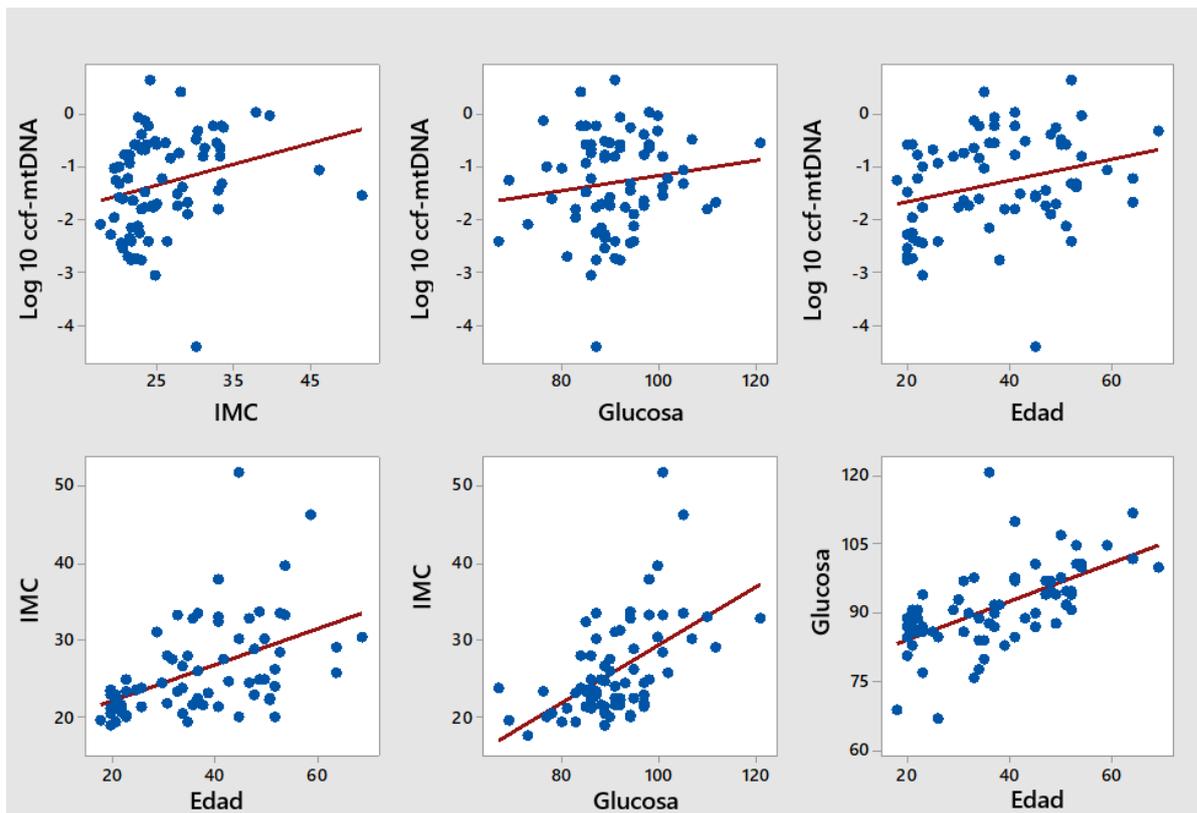


Figura 10. Gráficas de dispersión con regresión lineal de cada variable analizada

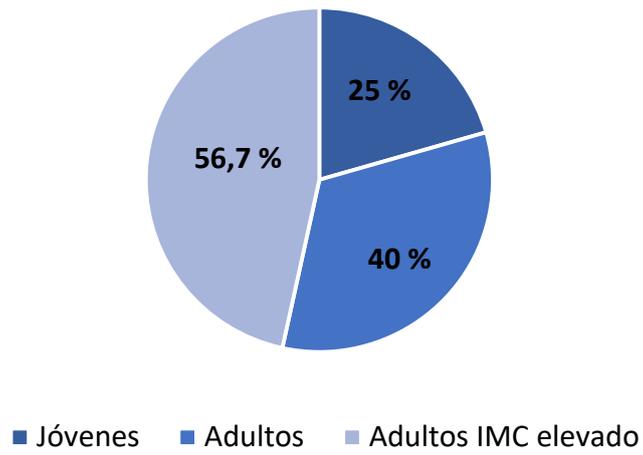


Figura 11. Proporción de individuos con un nivel de ccf-mtDNA mayor a 0.1 ng/μl