

MATERIALES Y MÉTODOS

11. Materiales y métodos

11.1. *Pacientes y controles*

Las muestras recogidas para la realización de los estudios recopilados de en esta memoria procedían de pacientes con EA de tipo esporádico. Las muestras disponibles se dividen en dos grupos según su origen. Por un lado se ha trabajado con muestras procedentes de sangre de pacientes con EA y de controles y por otro lado, se obtuvieron muestras de tres regiones cerebrales de pacientes y de controles. Estos dos tipos de muestra pertenecían a grupos de individuos independientes. No se pudo obtener muestra de sangre y de cerebro de un mismo individuo en ningún caso.

11.1.1. Tipos de muestras

El protocolo para realizar los diferentes estudios incluidos en esta memoria fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínic y los pacientes y/o familiares que participaron en los estudios dieron su consentimiento.

El Banc de Teixits Neurològics de la Universitat de Barcelona proporcionó muestras de necropsia de tres regiones cerebrales: cerebelo, hipocampo y córtex frontal de individuos con EA y de controles. Los análisis anatomopatológicos de estas necropsias corroboraron la presencia de placas y ovillos en los casos de EA. En el análisis de los individuos control, los cuales no presentaban historial de ninguna enfermedad neurológica, se descartó la presencia de los depósitos extra e intracelulares de material fibroso insoluble (placas y ovillos) característicos de la EA.

Para los estudios con muestras de sangre se recogían entre 15 y 20 ml en tubos heparinizados, a partir de la cual se realizaba el aislamiento de linfocitos para estudios bioquímicos y la extracción de DNA y RNA para estudios genéticos. Estos pacientes con EA eran diagnosticados según criterios neurológicos estándar (McKhann *et al.* 1984). La confirmación definitiva de EA sólo es posible por el momento a través de la comprobación de la existencia de placas y ovillos. El propósito del estudio de muestras de sangre de pacientes con EA era tratar de hallar algún marcador mitocondrial que facilitara el diagnóstico de EA y también la realización de un estudio longitudinal para realizar un seguimiento de la dinámica de esos marcadores (en caso de identificarlo) con el paso del tiempo. Lamentablemente, el suministro de muestras se vio interrumpido y sólo se pudo obtener una única muestra de cada paciente y control.

Las muestras cerebrales de pacientes en los que se confirmó la EA resultan especialmente valiosas en comparación a las muestras de sangre, puesto que en estas últimas no se tiene absoluta certeza de estar tratando con un paciente de EA. A pesar de que las pruebas actuales que se realizan en personas vivas ayudan a diagnosticar a un paciente como enfermo de Alzheimer, también es

frecuente confundirla con otro tipo de demencias y enfermedades neurológicas. No obstante, los estudios con linfocitos de pacientes diagnosticados con EA probable son los únicos que se pueden realizar en muchas ocasiones, puesto que recopilar un grupo de muestras de cerebro humano habitualmente es complejo. En el caso de los estudios realizados existe una complicación adicional: en muchas de las enfermedades en las que hay implicación mitocondrial es muy importante poder trabajar con muestras que del tejido diana afectado en la enfermedad. Por lo tanto, disponer de necropsias de cerebro representa satisfacer dos requisitos necesarios para estudiar la implicación mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer: disponer de pacientes con EA histopatológicamente confirmada y de tejido diana de la enfermedad.

11.1.1.1. Tejidos cerebrales

La dificultad para disponer de un amplio número de muestras procedentes de tejidos cerebrales humanos ha supuesto una limitación para establecer conclusiones de mayor peso estadístico en los estudios. Se recogieron necropsias de cerebelo y de córtex frontal de 12 individuos con EA, además se pudo obtener el hipocampo de 7 de estos pacientes. El grupo control estaba formado por 7 individuos, de los cuales solamente se pudo obtener el hipocampo de cuatro de ellos. El período de tiempo post-mortem hasta la extracción de la necropsia y congelación a -80°C fue en todos los casos inferior a 12 horas, límite a partir del cual los procesos necróticos post mortem pueden afectar los estudios a realizar.

	CEREBELO	HIPOCAMPO	CÓRTEX FRONTAL
PACIENTES	12	7	12
CONTROLES	7	4	7

11.1.1.2. Sangre

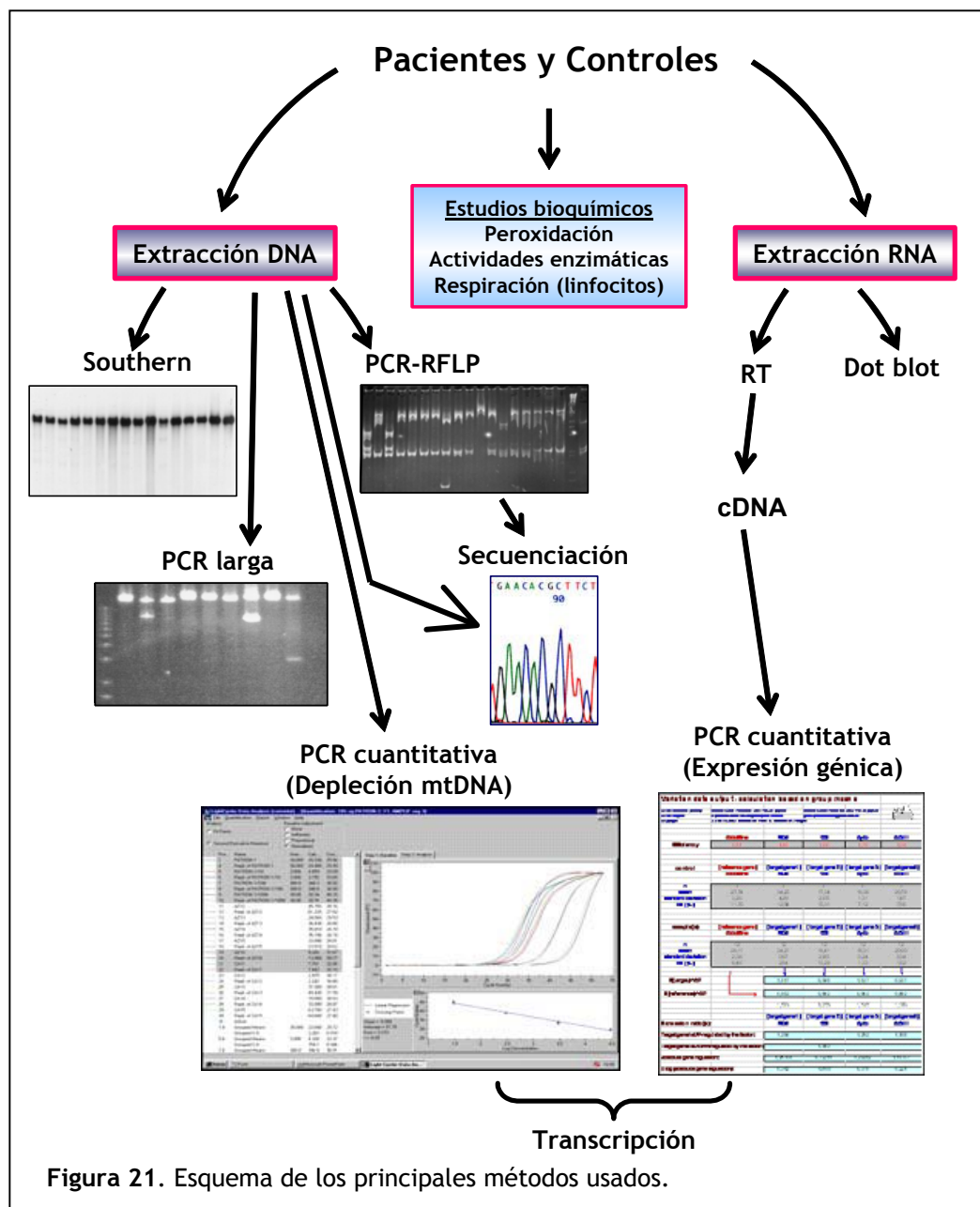
El número de muestras procedentes de linfocitos analizado varía en los diferentes artículos publicados por nuestro grupo ya que la recolección de muestras de sangre se realizó en diferentes etapas. Asimismo tampoco coincide el número de muestras de DNA y de RNA con el número de individuos que participaban. Problemas en las extracciones de alguno de los ácidos nucleicos o bien la escasez de volumen de sangre recogido hacían imposible la extracción de DNA y RNA. Cuando el volumen de sangre era limitado se daba prioridad a la extracción de DNA.

	LINFOCITOS
PACIENTES	26
CONTROLES	17

11.2. Métodos

11.2.1. Esquema general

En la **figura 20** se puede observar el procedimiento general seguido para analizar las muestras que llegaron al laboratorio del grupo de genética mitocondrial. Los estudios bioquímicos se realizaron en el laboratorio del Dr. Cardellach en el Hospital Clínic de Barcelona bajo la supervisión del Dr. Casademont.



11.2.2. Manipulación del DNA

11.2.2.1. Extracción de DNA

A partir de sangre

Si la muestra de sangre no se va a procesar inmediatamente después de su recepción, se guarda en una nevera a 4°C hasta el momento de la extracción.

1) Aislamiento de linfocitos

- En un tubo de 50 mL se vierte la sangre (15-20 mL). Los tubos donde estaba la sangre se lavan con solución salina que también se vierte en tubo de 50 mL. El tubo se rellena hasta 50 mL con solución salina.
- Se centrifuga a 4°C durante 5 minutos a 2.500 rpm.
- El sobrenadante es desechado absorbiendo con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío. La capa celular se conserva y se le añade solución de lisis de eritrocitos recién preparada hasta rellenar el tubo de 50 mL. Se agita suavemente el tubo hasta disolver totalmente la mezcla. A continuación se centrifuga el tubo a 4°C durante 15 minutos a 3.500 rpm.
- Se decanta el tubo procurando no perder el precipitado que contiene los linfocitos y se repite el centrifugado con lisis de eritrocitos.
- Se decanta el tubo para eliminar el sobrenadante y se le añade tampón fosfato salino (PBS). Se mezcla por inversión procurando que el sedimento quede lo más limpio posible. Se centrifuga el tubo a 4°C durante 10 minutos a 2.500 rpm.
- Se decanta el PBS, el precipitado que se obtiene son los linfocitos a partir de los cuales se puede realizar la extracción de DNA. Si no se desea seguir el protocolo de extracción de DNA se puede guardar este sedimento a -20 o -80°C hasta el momento de seguir el proceso.

Solución de lisis de eritrocitos
5,4 g sacarosa
0,5 mL Tris-HCl (pH 7,5)
0,25 mL MgCl₂ 1M
0,5 mL Tritón
H₂O destilada hasta volumen de 50 mL

2) Digestión proteica

- A los linfocitos aislados se añaden con 3 mL de solución de lisis de leucocitos, 0,2 mL de SDS 10% y 0,5 mL de solución de proteinasa K. El tubo se mezcla muy bien con el vórtex y se incuba a 37°C con agitación durante una noche.

Solución de lisis de leucocitos pH 8,2
NaCl 0,4 mol/L
Tris 0,1mol/L
EDTA 0,002 mol/L

Solución de proteinasa K
Proteinasa K 0,2%
SDS 1%
EDTA 0,002 mol/L

3) Precipitación del DNA (método manual de las sales)

- Al tubo con la mezcla turbia digerida durante la noche se le añade 1 mL de NaCl saturado a ~5,5 mol/L. Se agita con el vórtex y se centrifuga a 4°C 15 minutos a 3500 rpm.
- Se traspasa cuidadosamente la fase superior a un tubo nuevo de 50 ml y se vuelve a centrifugar a 4°C 15 minutos a 3500 rpm para desechar el exceso de sales. Este paso se repite las veces necesarias en caso de que sigan apareciendo muchas impurezas (proteínas y sal) en el sedimento.
- Se le añade un volumen de cloroformo y se agita manualmente. Centrifugar a 4°C durante 15 minutos a 3500 rpm.

- Se traspasa cuidadosamente la fase superior a otro tubo, poniendo atención en no llevarse las fases intermedia e inferior.
- Se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto. Se agita suavemente hasta observar la aparición de la medusa de DNA. Esta medusa se recoge y se lava por inmersión en un tubo con etanol al 70%, se seca el exceso de etanol pasando la medusa por las paredes secas del tubo.
- La medusa se coloca en un tubo de 2mL y se añade 0,5 mL de tampón Tris 0,01 mol/L, EDTA 0,001mol/L, pH 7,2 (TE). La medusa se disuelve mediante agitación a 37°C. Si la solución queda muy viscosa se puede añadir más TE.

A partir de tejido cerebral

Las muestras de tejido cerebral permanecían congeladas a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

1) Digestión.

- Con dos hojas de bisturí se corta ~30 mg de tejido congelado sobre una placa de Petri que se encuentra sobre un recipiente con hielo.
- Se coloca la muestra cortada en un tubo de 1,5 ml y se añade 0,75 mL de tampón de lisis con urea y 0,05 mL de solución de proteinasa K a 10 g/L. El tubo se mantiene durante 18-24 horas a 50°C para efectuar la digestión.

Tampón de lisis con urea pH 8,0
 Urea 48 g/L
 NaCl 0,3 mol/L
 EDTA 0,01 mol/L
 Tris 0,01 mol/L
 SDS 2%

2) Purificación.

- Se añade un volumen de fenol-cloroformo isoamílico (25:24:1) a la muestra digerida. Después de mezclar bien se centrifuga 8 minutos a 14.000 rpm.
- El sobrenadante se traspasa a un tubo nuevo de 1,5 ml y se le añade un volumen de cloroformo. Se mezcla convenientemente y se centrifuga el tubo 3 minutos a 14.000 rpm.
- En un tubo nuevo se traspasa el sobrenadante y se añade 1 µl de solución de SDS al 10% y 0,01 mL de enzima RNAasa libre de DNAasa (Roche). Esta mezcla se incuba durante una hora a 37°C y seguidamente se repiten los pasos de purificación con fenol-cloroformo isoamílico y cloroformo.
- El sobrenadante final se traspasa a un tubo nuevo y se centrifuga 1 minuto a 14.000 rpm.

3) Precipitación.

- El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se le añaden 0,04 mL de acetato sódico 3 mol/L y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (guardado a -20°C). Se mezcla suavemente y se centrifuga 15 minutos a 14.000 rpm.
- Se decanta el tubo para conservar el precipitado. El precipitado se lava 2 veces con 0,5 mL de etanol 70%, a continuación se centrifuga 20 minutos a 14.000 rpm.
- Se deja secar el exceso de etanol y el sedimento se resuspende con 0,1 mL de TE.

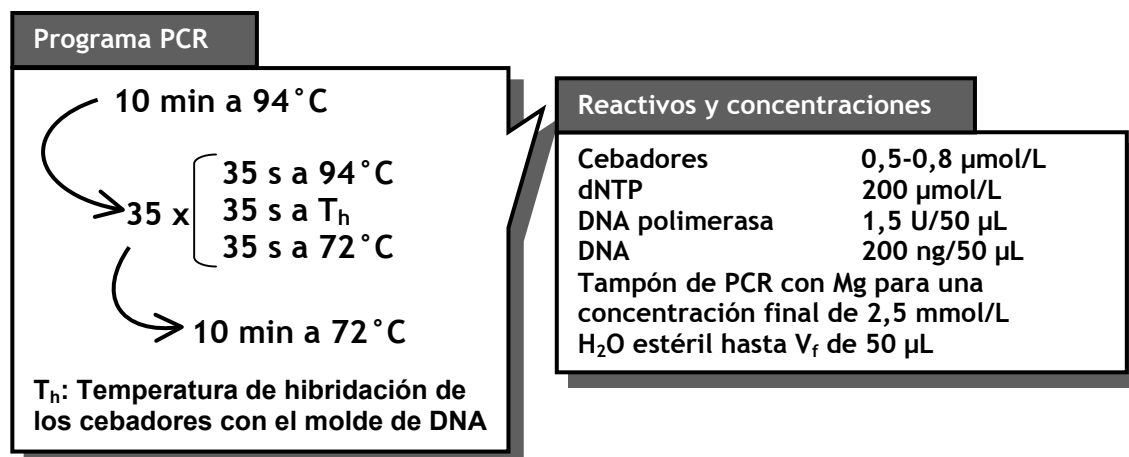
11.2.2.2. PCR

Estudio de mutaciones y polimorfismos: PCR-RFLP

El estudio de polimorfismos y mutaciones como los descritos en detalle en el artículo editado por la Revista de Neurología se realizó a través del análisis de fragmentos de restricción de longitud

materiales y métodos

polimórfica (RFLP). El programa básico de PCR usado para la obtención de los fragmentos y la concentración de los reactivos usados se muestra a continuación



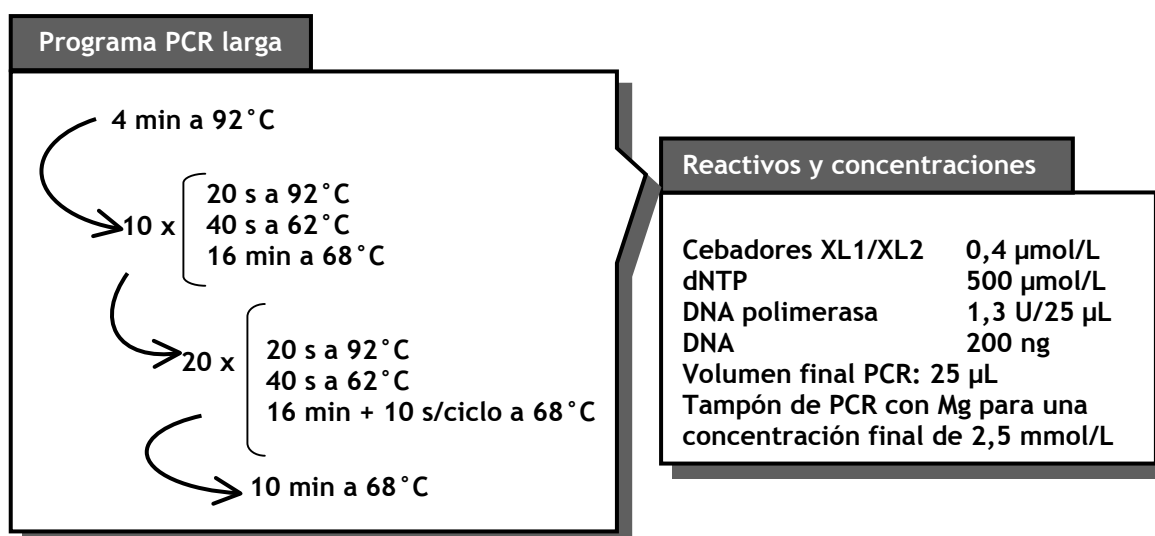
Los fragmentos obtenidos mediante PCR eran digeridos con una enzima de restricción diferente según el cambio que se quería analizar. En la **tabla 11** Se encuentran las condiciones para el estudio de los 4 cambios del mtDNA relacionados con la EA más citados en la literatura.

TABLA 11. CONDICIONES PCR-RFLP PARA DETECCIÓN MUTACIONES				
	G3196A	A3397G	A4336G	G5460A/T
Cebadores	L-leu1/H363		L401/H479	F2/R2*
T _h	56°C		51°C	59°C
Tamaño fragmento			785 bp	458 bp
Enzima	<i>Dde</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Nla</i> III	<i>Hha</i> I/ <i>Alu</i> I
Efecto mutación	Pérdida diana <i>Dde</i> I	Pérdida diana <i>Rsa</i> I		*

* El segundo cebador contiene un “*mismatch*” que provoca la aparición de una nueva diana *Hha* I en un fragmento salvaje. Una A o una T en la posición 5460 impide la aparición de esa diana, una T crea una diana *Alu* I. La secuencia de los cebadores se puede encontrar en la **tabla 12**, al final del capítulo, junto a la de otros cebadores utilizados en esta tesis.

Amplificación de fragmentos grandes: PCR larga

La PCR larga es una técnica que permite la amplificación de toda la molécula de mtDNA. El programa de PCR y las concentraciones de reactivos son los siguientes:



Con esta técnica se puede observar de una forma rápida la integridad del mtDNA y podría servir de sustituta del Southern, sin embargo según la experiencia en nuestro laboratorio la PCR larga no permite establecer conclusiones definitivas debido a que posee algunos problemas técnicos.

Los cebadores XL-1 y XL-2 hibridan con zonas del mtDNA en las que se ha descrito alguna deleción muy raramente. Esta técnica se efectuó siguiendo las recomendaciones del fabricante de la enzima usada (Expand 20 kb^{plus} PCR system de Roche), excepto en el volumen final de la reacción: 25 μL en lugar de 50. Los tubos de PCR usados eran de pared fina (0,2 mm) y la composición de la reacción final era el resultado de dos mezclas: una con la mezcla de la enzima más tampón y la otra con el DNA molde, dNTP y cebadores. Esta maniobra evita tener que realizar *hot start* y la degradación de los cebadores y el DNA molde.

El problema de la PCR larga reside en que frecuentemente aparecen bandas de tamaño inferior a 16,5 kb (lo cual puede hacer interpretar que hay una deleción) que mediante el uso de técnicas de *Southern blot* o de secuenciación no son confirmadas. Estos errores de interpretación en la PCR larga ha provocado que en los estudios realizados para esta tesis el uso de esta técnica sea complementado con las técnicas de Southern para establecer definitivamente si hay o no deleciones en las muestras disponibles. En general después de la extracción de DNA se realizaba una PCR larga para detectar de forma rápida posibles reordenamientos. En caso de visualizar alguna banda anómala se efectuaba el *Southern blot* de las muestras sospechosas.

11.2.2.3. Detección del genotipo APOE

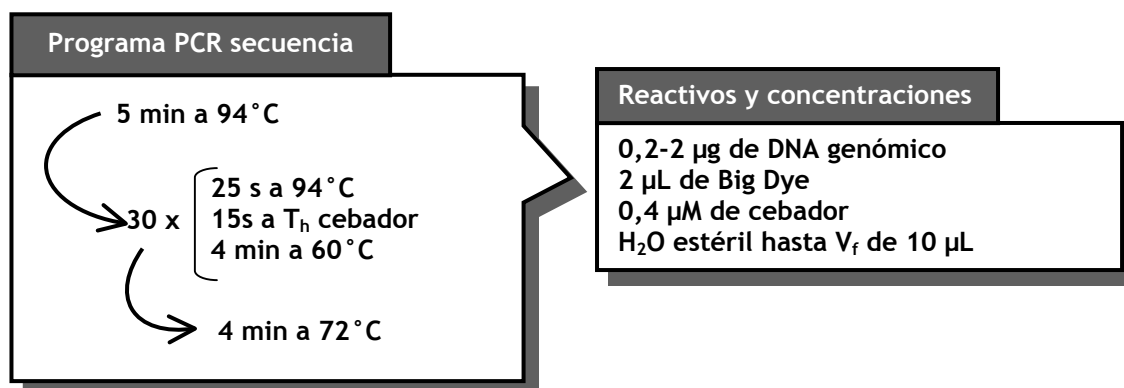
La detección del genotipo APOE en las muestras se realizó con el producto *LightCycler - Apo E Mutation Detection Kit* (Roche) con el equipo de PCR *LightCycler* (Roche) de acuerdo con las instrucciones que acompañan al producto. Este método permite la discriminación de las combinaciones alélicas que dan lugar a los genotipos E2, E3, E4 mediante la hibridación de sondas específicas. Después del programa de amplificación de PCR en tiempo real se pasa a un programa de

materiales y métodos

curvas de fusión que permite diferenciar el genotipo del DNA analizado en función de la temperatura a la que se desnaturaliza el producto amplificado. Las sondas se unen en función del genotipo de la muestra, el cual se visualiza a través de las curvas de fusión específicas para cada alelo de APOE.

11.2.2.4. Secuenciación

Para identificar los cambios en el mtDNA que daban patrones de bandas anómalos que no correspondían a las mutaciones a estudiar al realizar el análisis mediante PCR-RFLP se realizó un análisis de secuencia: El producto de PCR del fragmento con patrón irregular se purificó mediante columna (Qiagen). La PCR de secuencia se realizó con el kit *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados se recogieron y analizaron con los programas de ordenador del equipo *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems) y el programa *Sequencher* (Gene Codes Corporation) para compararla con la secuencia de Cambridge (Andrews *et al.* 1999).



11.2.2.5. Southern blot

La técnica de Southern permite demostrar si hay reordenamientos en el mtDNA con mayor seguridad que la PCR larga. El uso de sondas específicas permite detectar poblaciones de mtDNA de diferente tamaño al salvaje. Los inconvenientes de esta técnica son que requiere mayor cantidad de DNA y es más laboriosa que la PCR larga, pero no produce los artefactos que ocasionan errores de interpretación de la última.

1) Digestión DNA

- Se incubó la siguiente mezcla a 37 °C durante 6 horas:

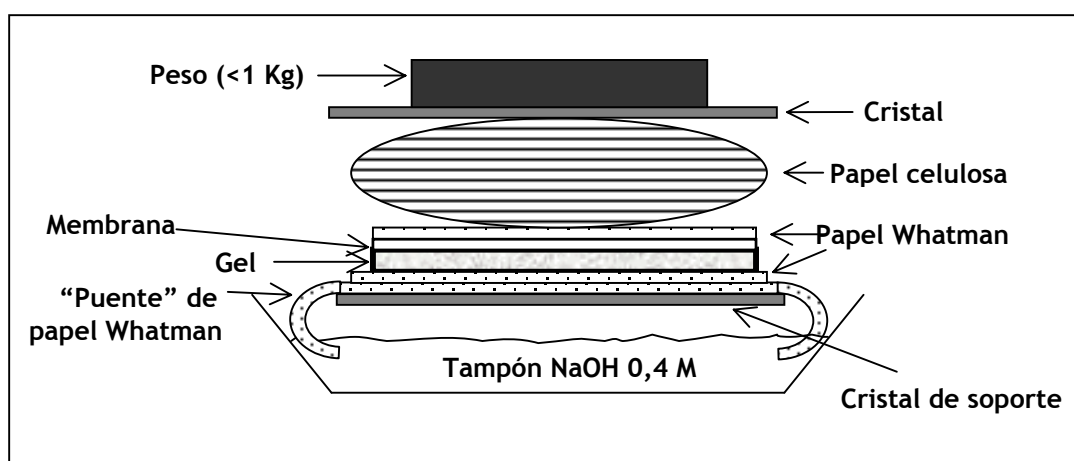
DNA	4 µg
<i>Pvu</i> II	1 U/µg DNA
Tampón enzima	4,5 µL
BSA (1mg/ml)	2,7 µL
H ₂ O estéril hasta	50 µL

2) Electroforesis

- Se preparan 500 mL de agarosa al 0,8 % para elaborar el gel. Es conveniente dejar enfriar el gel en el molde muy bien antes de quitar el peine que delimita los pocillos.
- Se aplica a cada pocillo la mezcla de digestión a la que se le ha añadido 8 μ L de tampón de carga. También se carga en otro pocillo el marcador de 1-Kb.
- La electroforesis se efectúa a 65 V durante 15 horas para favorecer la separación de los fragmentos de DNA digeridos con *Pvu* II.

3) Transferencia (método alcalino)

- El gel se tiñe con bromuro de etidio y se le hace una fotografía colocando una regla al lado que servirá de referencia. Se recortan los márgenes superior y laterales del gel, incluido el marcador. A continuación se mide el tamaño del gel y se corta una esquina para tener una referencia de la posición de los carriles del gel.
- Se coloca el gel en una bandeja, se cubre con HCl 0,25 M y se mantiene en agitación hasta que el colorante azul del tampón de carga vire a verde. Entonces se espera 10 min más y se lava el gel en H₂O.
- Se neutraliza el gel sumergiéndolo en solución NaOH 0,4M, hasta que el color verde vuelva a virar.
- Se monta la transferencia como en el dibujo siguiente:



- El contorno alrededor del gel se precinta con papel de plástico de cocina para facilitar que la absorción del tampón NaOH se realice a través del gel y así evitar interferencias en la transferencia. Este montaje se mantiene durante 12 horas para realizar la transferencia del DNA que hay en el gel de agarosa a la membrana de nitrocelulosa Hybond+ (Amersham).

4) Fijación DNA

- Después de la transferencia se deshace el montaje y se lava la membrana colocándola en una bandeja en agitación con solución SSC 2x, esto eliminará los restos de agarosa. Por su parte, el gel se lava con H₂O destilada y se tiñe de nuevo para comprobar la correcta transferencia del DNA.
- La membrana húmeda con SSC 2x se seca sobre papel de filtro y se guarda envuelta en un sobre con el papel. Este "sobre" se incuba 2 horas en la estufa de 80 °C para fijar el DNA.

5) Pre-hibridación

- La membrana se hidrata con SSC 2x y se coloca en el tubo de hibridación con la superficie que tiene el DNA mirando a la luz del tubo y

Tampón fosfato + SDS 14%, (1:1)

Tampón fosfato, pH 7

177,99 g Na₂HPO₄·2H₂O

137,99 g NaH₂PO₄·H₂O

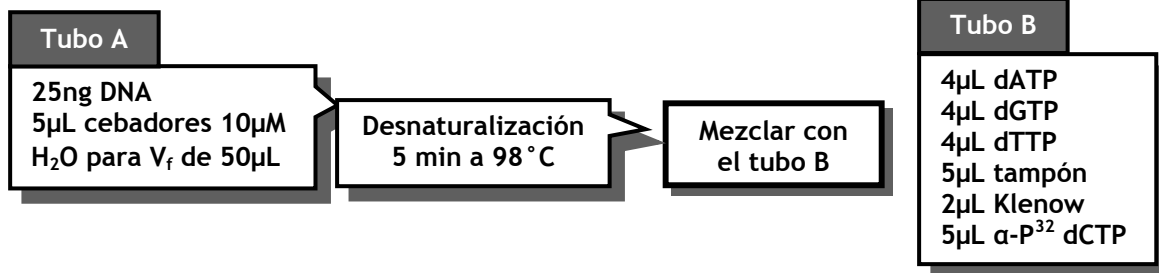
materiales y métodos

procurando que no haya burbujas entre la membrana y la pared del tubo.

- Se añade al tubo solución de pre-hibridación pre-calentada a 65°C; 0,2 mL por cada cm² de membrana. También se añade DNA de esperma de salmón desnaturalizado (5 min a 98°C) para evitar uniones inespecíficas al DNA.
- Se coloca el tubo en el horno de hibridación al menos durante 2 horas.

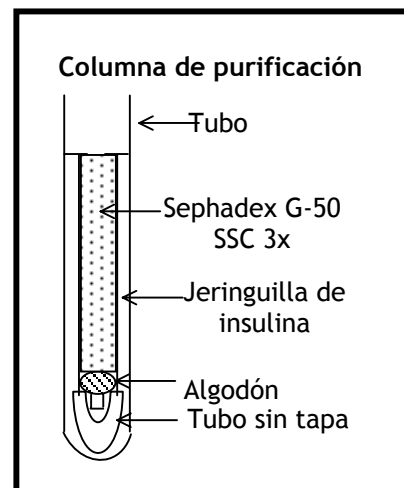
6) Marcaje de la sonda (Kit Megaprime DNA labelling system RPN 1605, Amersham)

- El DNA se marca radioactivamente con el siguiente procedimiento:
- La mezcla se incuba a 37°C durante 15 min.



7) Purificación de la sonda

- La sonda recién marcada se purifica mediante una columna como la del dibujo.
- Se llena la jeringuilla de insulina con Sephadex G-50 equilibrado en SSC 3X, se deja reposar y se sigue llenando hasta que quede la columna compacta.
- Se centrifuga la columna 4 min a 1800 rpm.
- Se añade a la sonda 50 µL de SSC 3x. Se echa la sonda a la columna y se centrifuga 4 min a 1800 rpm. El volumen se recoge en el Eppendorf.
- Se toman 2 µL para valorar el marcaje en el contador de centelleo.



8) Hibridación

- Se desnaturaliza la sonda, 4 min a 98°C.
- Se echa en el tubo de hibridación la cantidad de sonda suficiente que contenga 10⁶ cpm por cada mL de solución de pre-hibridación usado.
- Se mantiene el tubo de hibridación rotando a 65°C durante 12-16 horas.

9) Lavado de la membrana

- Se realizan 4 lavados en los que la astringencia va creciendo progresivamente. Todos los lavados se efectúan en baño húmedo a 65°C durante 30 min. Después de cada lavado se examina la radioactividad.
- Si después del último lavado aún hay exceso de radioactividad, se repite éste último lavado. También se puede aumentar la proporción de SDS 10%.
- Hay que procurar que la membrana no se seque en ningún momento del proceso.

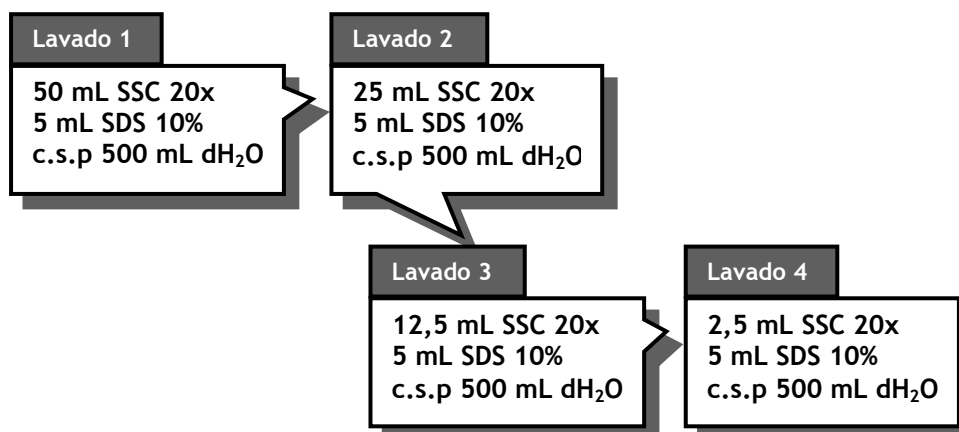
10) Auto-radiografía

- La membrana se coloca sobre una superficie lisa con papel de plástico y se envuelve procurando no arrugarla y que no queden burbujas de aire.
- Se coloca la membrana envuelta en un chasis de auto-radiografía con una película fotográfica sobre ella para que se exponga a la radioactividad. El tiempo de exposición es de 7-8 horas y se puede guardar el chasis en un congelador de - 80°C para acelerar el proceso.

11) Deshibridación

Este proceso se efectúa cuando se quiere reutilizar una membrana hibridada para otros experimentos con sondas distintas. El protocolo es el siguiente:

- Se prepara solución de lavado 4, se calienta hasta la ebullición y se echa en un recipiente que contiene la membrana a deshibridar.
- Para comprobar la deshibridación se mide la radioactividad con un contador Geiger, para asegurarse definitivamente se expone la membrana con una película. La membrana puede guardarse a 4°C ligeramente húmeda y envuelta en papel de plástico.



11.2.2.6. Cuantificación relativa del mtDNA: Estudios de depleción

La cantidad de mtDNA de las muestras disponibles ha sido analizada mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La estrategia que se siguió tuvo como objetivo final la obtención del ratio relativo mtDNA/nDNA que normalmente se usa para los estudios de cuantificación del mtDNA. En el método tradicional el ratio se obtiene mediante técnicas habituales: transferencia por Southern, hibridación específica con dos sondas (mitocondrial y nuclear), análisis densitométrico de las bandas resultantes. En este trabajo se ha conseguido el mismo ratio a partir de la cuantificación del mtDNA normalizada con el gen nuclear ribosómico 18S pero con un método más rápido y usando menor cantidad de DNA que en un Southern. Es una cuantificación relativa porque la señal o resultado obtenido de la cuantificación del mtDNA se normaliza con el resultado de la cuantificación del DNA nuclear.

En el artículo presentado en el apartado resultados y discusión se encuentra el método que se puso a punto por primera vez para obtener ese ratio mediante técnicas de PCR cuantitativas en tiempo real (Rodríguez-Santiago *et al.* 2001). El fundamento de esta técnica consiste en la incorporación de una molécula que emite fluorescencia (*SYBR Green I*) cuando el producto amplificado se encuentra en forma de doble cadena. La acumulación de copias del molde de DNA que se produce a medida que avanzan los ciclos de PCR provoca que también se incorporen más moléculas de fluorescencia. La acumulación de esas moléculas permite determinar el número de ciclo en el que se inicia la fase exponencial de la PCR. Este ciclo inicial o “*crossing point*” depende directamente de la cantidad de molde de DNA inicial que había en la muestra usada para la reacción

de PCR. Cuánta más cantidad de molde haya en una muestra más bajo será el valor del “*crossing point*”. Cuánto menos molde de DNA haya, la reacción de PCR necesitará más ciclos para iniciar la fase exponencial y por lo tanto el “*crossing point*” será mayor. El equipo usado (*LightCycler*, Roche) incluye la programación informática necesaria para calcular el valor de “*crossing point*” y también permite identificar la especificidad del producto amplificado mediante el análisis de las curvas de fusión.

Las curvas de fusión se obtienen después del programa de PCR. El producto de PCR amplificado se incuba unos segundos a una temperatura ligeramente superior a la temperatura de hibridación de los cebadores para asegurar que se encuentra en forma de doble cadena. Entonces se hace aumentar la temperatura a una velocidad lenta (0,1°C/s por ejemplo) hasta llegar a una temperatura final de 95°C y se ordena al aparato que recoja en todo momento la fluorescencia que emiten las moléculas *SYBR Green I*. En el momento en que la temperatura de incubación coincida con la temperatura de desnaturalización del producto amplificado se producirá la separación de la doble cadena de DNA. Esta separación provoca la pérdida de emisión de fluorescencia de las moléculas *SYBR Green I* y por lo tanto una caída en la cantidad de fluorescencia que recoge el aparato. Esta temperatura es específica para cada fragmento de DNA de doble cadena y permite identificar el número de productos amplificados en la reacción de PCR. El objetivo es que haya un único producto y que además sea el adecuado (**figura 22**). Para confirmar esto último, después de los primeros experimentos de PCR fluorescente debe separarse el producto en un gel de agarosa y comprobar que posee el tamaño esperado de acuerdo con los cebadores utilizados en la reacción. En los siguientes experimentos la temperatura de desnaturalización proporcionada por el aparato bastará para identificar el producto específico.

11.2.3. Manipulación del RNA

11.2.3.1. Extracción de RNA

El protocolo que se ha usado para la extracción de RNA está basado en el método clásico ideado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski *et al.* 1987). La obtención de los linfocitos para la extracción de RNA se efectúa de manera distinta a cuando se quiere extraer DNA.

El material usado en la extracción de RNA fue tratado para evitar la acción de las RNAasas presentes en el ambiente. El material de vidrio fue horneado al menos 2 horas a 200°C y se usaron puntas de filtro. Los productos usados y/o preparados deben estar libres de RNAasas.

Aislamiento de linfocitos para extracción de RNA

- En un tubo de 50 ml se vierten 10 mL de *Ficoll* (Farmacia).
- Con una pipeta Pasteur de plástico se recogen 10-15 mL de sangre, procurando mezclar la fase celular y la fase de plasma en caso de que se haya producido sedimentación.
- Apoyando la pipeta Pasteur en la pared interior del tubo de 50 mL se va derramando la sangre poco a poco para que quede sobre el *Ficoll*.

- Se centrifuga el tubo a 2000 rpm durante 20 min a una temperatura de 20°C.
- Procurando no mezclar las fases que resultan se recoge el anillo intermedio que es el que contiene los linfocitos y se vierte en un nuevo tubo de 50 mL.
- En el tubo se echa PBS 1X hasta un volumen final de 50 mL y se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C.
- Se decanta el PBS. Si los linfocitos aislados no se procesan inmediatamente se pueden guardar a -80°C.

Purificación RNA

1) Homogeneización muestra.

- Linfocitos: Se añade 1 mL de *Tripure Isolation Reagent* (Roche) y se pipetea repetidas veces para conseguir una mezcla del lisado celular.
- Tejido cerebral congelado: Se corta un trozo de 30-50 mg y en un tubo adecuado se echa 1mL de Tripure. Antes de que se descongele se tritura el tejido con un homogeneizador comercial (Polytron) hasta obtener una mezcla lisada.

2) Separación de fases.

- La mezcla se incuba durante 5 min a temperatura ambiente para asegurar la completa disociación de los complejos nucleo-proteicos. Se traspasa el producto a un tubo de 2 mL para continuar la extracción.
- Se añaden 200 µL de cloroformo y se mezcla por inversión.
- Se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se centrifuga a 4°C durante 20 minutos a una velocidad de 12.600 rpm.
- Se recoge el sobrenadante (incolore) y se deposita en un tubo de 2 mL nuevo.

3) Precipitación.

- Se añaden 500 µL de isopropanol y se mezcla por inversión.
- Se incuba durante 10 min a 4°C.
- Se centrifuga a 12.600 rpm durante 10 min a 4°C.
- Se decanta el sobrenadante.
- Para lavar el precipitado se echa etanol 75% hasta un volumen de 2mL y se invierte el tubo para separarlo de las paredes del tubo. A continuación se centrifuga a 9.000 rpm durante 5 min a 4°C.
- Decantar el etanol y eliminar los restos que queden para añadir 35-50 µL (según tamaño del precipitado) de agua sin RNAsas y mezclar hasta lograr la solución de RNA.

4) Comprobación.

- Se alicuotan 2 µL de la solución de RNA extraído para verificar su pureza y estado de degradación. La integridad del RNA se comprueba mediante electroforesis de un gel de agarosa y la pureza y concentración puede ser medida mediante la lectura de la densidad óptica en un rango de longitudes de onda de 320 a 260 nm.

11.2.3.2. Transcripción inversa (RT)

Se ha utilizado el *First Strand cDNA Synthesis Kit* de Amersham para realizar la transcripción inversa de cada RNA extraído.

- Se alicuotan 2 µg de RNA total en un tubo de 500 µl y se lleva a un volumen final de 8 µl con agua libre de RNAasas. Este tubo se incuba durante 10 minutos a 65°C.
- Se coloca el tubo en hielo y se le añade:

materiales y métodos

- 5 μL de *Bulk First Strand cDNA Mix*
- 1 μL de DTT
- 1 μL de “*random hexamers*” pd(N)₆
- o La mezcla se incubaba a 37°C durante 1 hora.

11.2.3.3. RT-PCR en tiempo real para estudiar la expresión génica

Los estudios de expresión se realizaron mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa en el aparato de PCR en tiempo real *LightCycler* (Roche). Los cDNA de pacientes y controles obtenidos en la reacción RT fueron utilizados para realizar la cuantificación de diferentes transcritos mitocondriales. De cada RNA se realizaron dos RT y los cDNA obtenidos eran sometidos a una reacción de PCR específica para el gen del que interesaba analizar su expresión. Gracias a las características del aparato de PCR usado se podía medir la cantidad inicial de cDNA presente, esta cantidad de cDNA detectada depende de la cantidad de RNA que se haya expresado en la muestra.

Para la estrategia utilizada es necesario calcular la eficiencia de cada PCR para cada pareja de cebadores que se use. Si se tienen muestras de diferentes tejidos, se debe calcular la eficiencia para cada uno de ellos. Para hallar la eficiencia se debe hacer un tubo “*pool*”: Se junta 1 μg de cada RNA paciente y control del mismo tejido en un solo tubo y se realiza la reacción RT (Pfaffl 2001; Pfaffl *et al.* 2002). Ese producto de RT se usó para calcular la eficiencia mediante una PCR con las siguientes cantidades de cDNA en los capilares: 375; 75; 15; 3 y 0,6 ng. La eficiencia se debe calcular para cada gen y tejido que se vaya a analizar. Se hacen 3 réplicas de la PCR que servirá para calcular la eficiencia.

Mezclas de reacción PCR *LightCycler*

En paréntesis se indica la concentración final en la reacción:

- 1,6 μL MgCl₂ (3mM) para los genes ND4, 12S, COX II y ND6 o 0,8 μL MgCl₂ (2mM) para Cit b y 18S
- 0,5 μL cebador directo (0.25 μM), 0,5 μL cebador inverso (0,25 μM)
- 2 μL *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I*
- Agua suficiente para completar 18 μL de volumen de reacción en el capilar
- 75 ng de cDNA

El volumen final en el capilar es de 20 μL

Los CP que proporciona el equipo *LightCycler* se usan para el análisis y cálculo de la expresión gracias a los programas EXCEL y REST (*Relative expression software tool*) (Pfaffl 2001; Pfaffl *et al.* 2002). Con el programa EXCEL se calculan las medias de las réplicas de las eficiencias y de los CP de las muestras analizadas. Estas medias se introducen en la aplicación REST que calcula las posibles diferencias en la expresión de los transcritos analizados.

Las curvas de fusión que proporciona el equipo de PCR informan sobre la especificidad: si hay un único pico (un solo producto) y si el pico corresponde al producto esperado (en las primeras PCR de cada gen analizado, se realizaba una electroforesis del producto en un gel de agarosa, una vez

comprobado que es el producto específico de la pareja de cebadores usada, la temperatura de fusión sirve para identificar el producto en las siguientes PCR).

Solución desnaturalizante
500 μ L Formamida
162 μ L Formaldehido 12,3 M
100 μ L MOPS

Resumen de réplicas hechas

- 2 RT de cada RNA de pacientes y controles
- 2 RT del *pool*
- 3 PCR en tiempo real para determinar las eficiencias en cada gen y tejido usando las diluciones seriadas (x2 RT= 6 réplicas)
- 2 PCR en tiempo real de cada muestra individuo o control (x2 RT = 4 réplicas de cada individuo por gen)

Solución pre-hibridación/hibridación
SSC 5x
Solución Denhardt 5x
Formamida 50% (w/v)
SDS 1% (w/v)
Añadir 100 μ g/mL de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado

Los valores de los CP obtenidos a partir de las diluciones seriadas y de los cDNA de las muestras de pacientes y de controles se introducen en la herramienta informática REST (Pfaffl 2001; Pfaffl *et al.* 2002). El programa REST calcula las eficiencias y valores de expresión génica normalizados con el gen de referencia 18S. También realiza las comparaciones entre los grupos paciente y control y determina si hay diferencias significativas mediante una prueba estadística (Pfaffl *et al.* 2002).

11.2.3.4. Dot blot

1) Preparar el colector de muestras:

- Limpiar con NaOH 0,1M. Aclarar con H₂O destilada.
- Cortar una pieza de membrana de nylon del mismo tamaño que la superficie del aparato de *dot blot* (BioRad). En una bandeja de vidrio se echa SSC 10x y se coloca la membrana encima del líquido y se dejar que se sumerja. Dejar durante 10 minutos.
- Colocar la membrana en el aparato de *dot blot*. Llenar cada pocillo con SSC 10x. Asegurarse que no hay escapes de aire en el montaje final.

2) Desnaturalización las muestras de RNA:

- Añadir 3 volúmenes de solución desnaturalizante a un tubo con 1 μ g de RNA.
- Incubar 15 minutos a 65°C, luego colocar en hielo.
- Mezclar con vórtex, hacer *un pulso* breve de centrifuga e incubar 1 hora a 50°C.
- Añadir 2 volúmenes de SSC 20x frío a cada muestra.

3) Transferencia:

- Poner en marcha la succión del aparato de *dot blot* y dejar que el SSC 10x del final de la etapa 1) se filtre a través de él. Dejar la succión en marcha.
- Aplicar en los pocillos la muestra de RNA desnaturalizada y permitir el filtrado, con cuidado de no tocar la membrana con la punta de la pipeta.
- Añadir 1mL de SSC 10x a cada pocillo y filtrar a través del aparato. Repetir.

materiales y métodos

- Deshacer el montaje, colocar la membrana en una hoja de papel Whatman 3MM y dejar que se seque.

4) Inmovilización del RNA en la membrana:

- Colocar la membrana entre 2 hojas de pael de filtro Whatman 3MM y ponerla en en un horno a 80°C durante 2 horas

5) Hibridación:

- Preparar la sonda marcada con una actividad específica $>10^8$ dpm/ μ g y los nucleótidos no incorporados eliminados. El marcaje de la sonda es similar al que se realiza para el *Southern blot*.
- Humedecer con SSC 6x la membrana con el RNA fijado.
- Colocar la membrana con el RNA cara arriba en el tubo de hibridación y añadir 1 mL de solución pre-hibridación/hibridación de formamida por cada 10 cm² de membrana.
- Colocar el tubo en el horno de hibridación e incubar 3 horas a 42°C (sondas de DNA) con rotación continua.
- Si la sonda es de doble cadena: desnaturalizarla calentando al baño María o en un incubador durante 10 minutos a 100°C. Poner en hielo.
- Pipetear el volumen deseado de sonda en el tubo de hibridación y continuar incubando con rotación 8-12 horas a 42°C. La concentración de la sonda en la solución de hibridación debe ser 10 ng/mL si la actividad específica es de 10^8 dpm/ μ g o 2 ng/mL si esta actividad es de 10^9 dpm/ μ g.

6) Lavado de la membrana y autoradiografía.

- Poner la solución de hibridación en un tubo de 50 mL y añadir al tubo un volumen equivalente de SSC 2x/SDS 0,1%. Incubar con rotación 5 minutos a temperatura ambiente, cambiar la solución de lavado y repetir. Para reducir el ruido de fondo puede ser útil doblar el volumen de las soluciones de lavado
- Sustituir la solución de lavado con un volumen equivalente de SSC 0,2x/SDS 0,1%. Incubar en agitación 5 minutos a temperatura ambiente, cambiar la solución de lavado y repetir (este es un lavado de baja estringencia).
- Si se desea, realizar 2 lavados más con SSC 0,2x/SDS 0,1% pre-calentado (42°C) durante 15 minutos cada uno a 42°C (lavado de estringencia moderada).
- Si se desea, realizar 2 lavados más con SSC 0,1x/SDS 0,1% pre-calentado (68°C) durante 15 minutos cada uno a 68°C (lavado de estringencia elevada).
- Desechar la solución final de lavado y aclarar la membrana en SSC 2x a temperatura ambiente. Quitar el líquido en exceso y cubrir con papel plástico transparente. No permitir que la membrana se seque si se quiere re-hibridar.
- Realizar autoradiografía.

11.2.4. Oligonucleótidos usados

En la **tabla 12** se muestra la secuencia de los oligonucleótidos usados como cebadores para las distintas reacciones de PCR utilizadas en los experimentos de la tesis.

TABLA 12. SECUENCIAS 5'-3' DE LOS CEBADORES USADOS	
Mutaciones G3196A y A3397G	L-leu-1: CCT TCC CCC GTA AAT GAT AT H363: GGC TAG AGG TGG CTA GAA TA
Mutación A4336G	L401: 5'CCT CAC CAC TAC AAT CTT3' H479: 5'GGG CTA TTC CTA GTT TTA TT3'
Mutación G5460A/T	F2: CAT TCC TCC CCA CAC TCA G [*] C R2: CGG TCG GCG AAC ATC AGT GG <i>*mismatch</i>
PCR larga	XL-1: CCC ACA GTT TAT GTA GCT TAC CTC CTC A XL-2: TTG ATT GCT GTA CTT GCT TGT AAG CAT G
mtND2 Cuantificación DNA	L456: GCC CTA GAA ATA AAC ATG CTA H479: GGG CTA TTC CTA GTT TTA TT
r18S Cuantificación DNA	18SFOR: ACG GAC CAG AGC GAA AGC AT 18SREV: GGA CAT CTA AGG GCA TCA CAG AC
Cit b Cuantificación cDNA	L1517: GGG GCC ACA GTA ATT ACA AA H1537: GGG GGT TGT TTG ATC CCG TTT
COX II Cuantificación cDNA	790F: CTG AAC CTA CGA GTA CAC CG 822R: TTA ATT CTA GGA CGA TGG GC
12S Cuantificación cDNA	L95: CCT CCC CAA TAA AGC TAA AA H105: GCT ATT GTG TGT TCA GAT AT
ND4 Cuantificación cDNA	Leb3: AAG TCA TCA AAA AGC TAT TA Leb5: CTT ACA TCC TCA TTA CTA TTC
ND6 Cuantificación cDNA	L4139: ACA CTC AAC AAG ACC TCA ACC H1451: TAG TTT TTT TAA TTT ATT TAG GGG GAC T
18S Cuantificación cDNA	5F: GCG AAA GCA TTT GCC AAG AA 7R: CAT CAC AGA CCT GTT ATT GC
Secuenciación fragmento mtDNA 3.330-3.637	L333: CCT CAT TGT ACC CAT TCT AA H363: GGC TAG AGG TGG CTA GAA TA
Secuenciación fragmento mtDNA 13.473-13.970	PR3.1: ATT AGC AGG AAT ACC TTT CCT CA PR3.2: CTC GTA AGA AGG CCT AG
Secuenciación fragmento mtDNA 15.701-16.039	PR4.1: CCA CTA AGC CAT TCA CTT TAT TGA PR4.2: CTT CCC CAT GAA AGA ACA GAG AA
Secuenciación CR	L111: ACC CTA TGT CGC AGT ATC TG H725: GGT GAA CTC ACT GGA ACG L571: CCC ACA GTT TAT GTA GCT TAC CTC H1220: TAT CGA TTA CAG AAC AGG CTC

11.2.5. Estudios bioquímicos de la cadena respiratoria mitocondrial

Los análisis polarográficos y espectrofotométricos constituyen una herramienta poderosa para caracterizar la función mitocondrial de un tejido y para establecer el lugar de la CRM donde se produce el defecto de esa función. Los métodos usados para estos análisis se detallan en los artículos presentados en esta tesis (Casademont *et al.* 2003; Casademont *et al.* en prensa).

Este tipo de análisis permite detectar si existe una deficiencia en algún complejo de la CRM a partir de las tasas de oxidación de los sustratos suministrados en el experimento. Una deficiencia específica del complejo I se puede detectar mediante una tasa de oxidación de sustratos asociados a la molécula NAD^+ (piruvato o glutamato) reducida, con una tasa normal para el succinato. El uso de dos sustratos diferentes permite excluir un defecto primario en el transportador del ácido tricarbóxico o de la deshidrogenasa. El defecto se confirma espectrofotométricamente con la medida de la actividad NADH-CoQ reductasa sensible a rotenona. Un defecto específico del complejo II se caracteriza polarográficamente por una tasa de oxidación del succinato disminuida, y espectrofotométricamente por una disminución de la actividad de la enzima succinato-CoQ reductasa. Una deficiencia del complejo III muestra en polarografía una disminución de la tasa de oxidación del piruvato, glutamato y succinato, pero una utilización del oxígeno normal a partir del ascorbato y la molécula tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD). El análisis enzimático de la ubiquinol-citocromo c reductasa es necesario para localizar el defecto en el complejo III. Un defecto en el complejo V supone una tasa reducida de oxidación del ascorbato en presencia de TMPD y una actividad de la citocromo oxidasa deficiente.

Los estudios bioquímicos de la CRM se realizaron a partir de células intactas de linfocitos y a partir de homogeneizados de las necropsias cerebrales. La preparación del homogeneizado se realizó de la siguiente forma:

- ✓ Se homogeneizó un trozo de necropsia congelado (3,5% w/v) con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), cloruro potásico 100 mM, sulfato de magnesio 5 mM y ácido etilen-diaminotetraacético 1 mM.
- ✓ La mezcla homogeneizada se filtró y se centrifugó a 2.300 rpm durante 3 minutos.
- ✓ El precipitado se descartó y el sobrenadante se usó para los estudios bioquímicos. El contenido proteico del sobrenadante se midió siguiendo el método de Bradford.

11.2.5.1. Análisis polarográficos

El análisis polarográfico de la función mitocondrial únicamente se puede realizar a partir de mitocondrias o células intactas recién aisladas. En los estudios de esta tesis sólo se pudo realizar a partir de linfocitos aislados de sangre de pacientes y controles. La medida de la tasa de oxidación en presencia de una variedad de sustratos, naturales y/o artificiales, permite analizar diversas funciones mitocondriales. La oxidación en la mitocondria de sustratos (piruvato-malato, glutamato-malato, acetilcarnitina-malato, succinato, ascorbato-TMPD, etc) no sólo requiere una cadena respiratoria y un sistema de fosforilación oxidativa normales, sino que también requiere otros sistemas mitocondriales tales como transportadores normales (de ácidos mono- y dicarbóxicos), flavoproteína transferidora de electrones, translocador ADP/ATP, deshidrogenasas primarias

(piruvato y glutamato deshidrogenasas, glutamato-oxalacetato transaminasas) y enzimas para los ácidos tricarboxílicos.

Estos estudios se realizan en una sola cámara si ésta es de vidrio. Si es de metacrilato es imprescindible el uso de dos cámaras diferentes, una de ellas reservada para los estudios que requieran de rotenona. Esta molécula (inhibidora específica del complejo I) es muy hidrofóbica y tiende a unirse al plástico, por lo que puede estar presente de forma residual si utilizamos la misma cámara para todos los estudios y puede alterar el resultado en los que no es necesaria.

Procedimiento:

- Los linfocitos se aislaron mediante un gradiente de Ficoll y se cuantificó la concentración de proteína de acuerdo con el método de Bradford.
- El consumo de oxígeno de células intactas (linfocitos) se midió polarográficamente con un electrodo de oxígeno Clark en una microcámara (Hansatech Instruments Limited) con 250 μL de un medio estándar (manitol 300 mM, KH_2PO_4 10 mM (pH 7,2), KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM y BSA 1 g/L), agitación magnética y a 37°C de temperatura.
- A continuación las células se permeabilizaron para ácidos orgánicos mediante la adición de digitonina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se procedió a realizar las diferentes medidas de la tasa de oxidación de forma similar a otros trabajos previamente descritos (Rustin *et al.* 1994). Con las células permeabilizadas se realizaron los siguientes experimentos:
 - ✓ Oxidación de succinato (10 mM) en presencia de rotenona (3 μM) y ATP (130 μM). La comparación de las tasas de oxidación del succinato en ausencia y presencia de digitonina (0,01% w/v) proporciona una buena estimación de la integridad celular.
 - ✓ Inhibición del complejo II (y, por tanto, de la oxidación del succinato) con malonato (10 mM) y se mide la oxidación a cargo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa añadiendo gliceraldehído-3-fosfato (20 mM). Esta enzima contenedora de FAD es una enzima asociada a la MMI que cede electrones al complejo III de la CRM.
 - ✓ Después de inhibir la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa con gliceraldehído-3-fosfato (10 mM) se puede medir la oxidación a cargo de la enzima DQH_2 (0,6 mM) que a su vez puede inhibirse con antimicina (1 μM)
 - ✓ Oxidación de piruvato (8 mM) y malato (0,2 mM), seguida de la oxidación de glutamato (15 mM). Esta reacción se inhibe con KCN (700 μM)

(Las concentraciones corresponden a la concentración final en la cubeta de medida)

11.2.5.2. Análisis espectrofotométricos

Las actividades específicas de los cinco complejos de la CRM y del sistema OXPHOS se analizaron individualmente con un espectrofotómetro UVIKON 922 equipado con un termostato modelo 900 (Kontron Instruments). El análisis enzimático de estos complejos implica de forma invariable la presencia de dadores y/o aceptores artificiales de electrones, que normalmente se saturan para dar actividades máximas ($V_{\text{máx}}$).

La medida de las actividades de los complejos en muestras procedentes de linfocitos y de homogeneizados de cerebro se realizó en condiciones de $V_{\text{máx}}$ y pH óptimo. Los experimentos se

realizaron en una cubeta de 1 mL a 37°C siguiendo la metodología descrita en los artículos de nuestro grupo (Casademont *et al.* 2003; Casademont *et al.* en prensa) que se basa en artículos publicados previamente (Rustin *et al.* 1994; Miro *et al.* 1998; Jarreta *et al.* 2000).

Medida relativa de las actividades enzimáticas: citrato sintasa

La citrato sintasa es una enzima del ciclo de Krebs independiente de la CRM que se usa como marcador del número de mitocondrias presente en el homogeneizado de tejido.

- La medida de la actividad de la citrato sintasase realiza con una longitud de onda de 412 nm siguiendo la reducción de 5,5'-di-tio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) en presencia de acetilCoA 0,01 mM y ácido oxalacético 12 mM en 1 mL de un medio que contiene KH₂PO₄ 10 mM (pH 7,8; 37°C), EDTA 2 mM, BSA 1 mg/mL y Triton X-100 0,1%.

11.2.5.3. Medida de la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales

Las muestras homogeneizadas de cerebro (100 µg de proteína) se marcaron con ácido cis-parinámico (5µM) (Molecular Probes, Eugene) en una cubeta con 3 mL de PBS nitrogenado. Después se incubaba 1 hora a 37°C y sin luz. Durante esa hora la fluorescencia de las muestras se leyó cada 3 minutos a 318 nm de excitación y 410 nm de emisión, tal y como se ha descrito previamente (Hedley *et al.* 1992). La pérdida de fluorescencia del ácido cis-parinámico se usa como indicador del proceso químico de la peroxidación lipídica (a mayor pérdida, mayor es la peroxidación).

11.2.6. Estadística y programas informáticos

Para manejo de datos y cálculos estadísticos: EXCEL (Microsoft) y SPSS 8.0 (SPSS).

Cuantificación relativa de DNA y RNA: *LightCycler* Software (Roche) y REST (Pfaffl 2001; Pfaffl *et al.* 2002).

Análisis de secuencias: DNA strider (programa libre) y Sequencher (Gene Codes).

11.2.7. Direcciones de internet

Base de datos de mutaciones en los genes *PPA*, *PSEN1*, *PSEN2*

<http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations>

Información sobre la EA: <http://www.alzforum.org>

Bases de datos sobre la mitocondria y el mtDNA (MITOMAP):

<http://www.mitomap.org>

Base de datos sobre cuantificación de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real fluorescente:

<http://www.gene-quantification.info>