



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



INSTITUT
PERE MATA



IISPV[®]
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

Estudio piloto del ADN mitocondrial en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con diagnóstico de esquizofrenia y sujetos control.

Jordi Mengual Martí

Trabajo Final de Grado Biotecnología



Directoras Científicas: Lourdes Martorell Bonet (PhD) y Bengisu Kevser Bulduk (BS) (MS). Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Hospital Universitari Institut Pere Mata (HUIPM) y Universitat Rovira i Virgili (URV).

Tutor Académico: Dr. Juan Bautista Fernández Larrea, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Universitat Rovira i Virgili

Junio 2022

GUÍA DE PREVENCIÓN DE PLAGIO

Yo, Jordi Mengual Martí, con DNI 48607606G, soy conecedor de la guía de prevención de plagio de la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada el julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>), y afirmo que este TFG es un trabajo original basado en el conocimiento existente y que no constituye ninguna de las conductas considerada como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de Junio de 2022



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Lourdes Martorell por la oportunidad de poder realizar las prácticas y el trabajo de final de grado en el grupo de investigación “Genètica i Ambient en Psiquiatria (GAP)”. Dándome la oportunidad de poder ver desde dentro como funciona un grupo de investigación y de poder trabajar en un campo tan interesante como el de la neurociencia. También agradecer todo su esfuerzo en la gran dirección de mi trabajo de final de grado, su trato cercano y su predisposición a ayudarme en todo momento, contagiándome de su ilusión y conocimiento. Por supuesto también dar las gracias a Gerard Muntané, por la oportunidad y por sus revisiones y comentarios que ayudaron a enriquecer el trabajo y del cual aprendí conocimientos sobre bioinformática, tratamiento de datos y estadística.

Me gustaría dar las gracias a mi supervisora Bengisu Kevser Bulduk, que me ha estado enseñando y ayudando desde mi llegada al grupo, una gran profesional sin la que no sería posible haber realizado este trabajo, y a la que estoy muy agradecido por haber depositado en mi su tiempo y su empeño y a quién considero como una mentora por todo lo que he aprendido de ella durante mi estancia en el grupo.

De igual forma, agradecer a todos los miembros del GAP por su recibimiento y su trato cercano, haciéndome sentir integrado desde el primer día y creando un ambiente de trabajo muy agradable.

Por último, agradezco profundamente a mi tutor Juan Bautista Fernández por su atención y su empeño a la hora de llevar a cabo mi trabajo de final de grado.

DATOS DEL CENTRO

Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV)

El Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV, iispv.cat) es una institución especializada en la investigación e innovación en el campo de la biomedicina en la provincia de Tarragona. La misión del IISPV es gestionar de forma eficiente los recursos y proporcionar el mejor servicio a los profesionales de la salud para que, a través de la promoción, la consolidación y la traslación de la investigación biomédica y sanitaria, mejore la salud y el bienestar de la población. Fundado en 2005, el IISPV cuenta con más de 400 profesionales; entre investigadores, técnicos, personal sanitario y personal de soporte. El instituto cuenta con 30 grupos de investigación en las siguientes áreas:

- Nutrición y metabolismo (17).
- Salud y medio ambiente (6).
- Neurociencias y salud mental (1).
- Grupos clínicos de investigación (6).

Grupo de Investigación “Genètica i Ambient en Psiquiatria”

La unidad de la que he formado parte durante mi estancia en prácticas y que me ha permitido realizar mi trabajo de fin de grado es el grupo “Genètica i Ambient en Psiquiatria” (GAP), del área de neurociencias y salud mental del IISPV.

El grupo de investigación está dirigido actualmente por la Dra. Elisabet Vilella y compuesto por biólogos (6), psiquiatras (7), psicólogos clínicos (6), enfermeros (2), psicólogos (2) y fisioterapeutas (1). La mayoría de ellos contratados por el “Hospital Universitari Institut Pere Mata” (HUIPM), vinculado al IISPV.

El GAP forma parte del Centro Nacional de Investigación Biomédica en Red en Salud Mental, CIBERSAM (código de grupo GCV19/1/SAM), y tiene la categoría de grupo de investigación consolidado por la Agencia de Gestión de Ayudas

Universitarias y de Investigación (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya (2017SGR444). Adicionalmente, forma parte de la red catalana de Innovación Tecnológica en Salud Mental 2018XARDI_00010 (TECSAM). La mitad de los miembros del GAP tienen el título de doctor y son profesores asociados en la Universitat Rovira i Virgili donde compaginan la docencia con la dirección de tesis. Además cabe mencionar la múltiple y repetida participación proactiva del grupo en actividades de divulgación científica, de empoderamiento de las mujeres y reivindicación de la investigación biomédica en salud mental.

Líneas de Investigación del GAP:

El grupo investiga los factores genéticos y ambientales y los mecanismos que intervienen en el desarrollo de los trastornos psiquiátricos y la discapacidad intelectual. Los investigadores llevan a cabo la investigación básica analizando los datos genéticos y genómicos obtenidos de los participantes en los proyectos que desarrollan y de los repositorios de datos de investigación. La investigación clínica se lleva a cabo mediante la evaluación psicopatológica, psicológica y neurocognitiva de pacientes con un trastorno psiquiátrico con o sin discapacidad intelectual. El objetivo es ayudar a mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la evolución de los trastornos psiquiátricos y mejorar su calidad de vida. A continuación, se mencionan las principales líneas de investigación que lleva a cabo y los trabajos publicados más representativos.

- ADN mitocondrial en Trastornos Psiquiátricos (PMIDs: 35085849; 32714204; 32327316; 31299996; 29340697; 28808499; 27989882; 25132006; 23355257).

- Implicación del gen *DDR1* en la esquizofrenia y el trastorno bipolar (PMIDs: 33942629; 31920096; 30597424; 22077590; 20380825; 18836851; 17440435).

- Pleiotropía genética entre los trastornos psiquiátricos y con otras condiciones de salud (PMIDs: 35013163; 34779080; 32772156).

- Estrés, maltrato infantil y biomarcadores en la psicosis temprana (PMIDs: 33866068; 33253486; 32528326; 31529601; 31388769; 31244371; 31103213; 30660810; 29775885; 27629407; 27572626; 25466832; 24495605; 17127037).

Índice

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Esquizofrenia	10
1.1.1 Predicción.....	10
1.1.2 Diagnóstico	11
1.1.3 Fases de la esquizofrenia.....	11
1.1.4 Incidencia, prevalencia y mortalidad	12
1.1.5 Tratamiento	12
1.1.6 Fisiopatología y factores de riesgo	13
1.2 Las mitocondrias	14
1.3 Genética mitocondrial	15
1.3.1 Características del ADN mitocondrial.....	15
1.3.2 Diferencias entre el ADN mitocondrial y el ADN nuclear	17
1.4 Enfermedades mitocondriales	20
1.4.1 Alteraciones del ADN mitocondrial que provocan enfermedades mitocondriales.....	20
1.5 Alteraciones del ADN mitocondrial en la esquizofrenia	21
1.6 Proyecto de investigación	21
1.6.1 Antecedentes	23
1.6.2 Investigaciones previas	23
1.6.3 Estado actual de la investigación sobre la esquizofrenia	24
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS	25
4.1 Diseño del estudio, participantes y consideraciones éticas	25
4.2 Métodos de secuenciación de nueva generación	27
4.2.2 Fragmentación del ADN y preparación de la librería.....	28
4.2.3 Cuantificación de la librería.....	28

4.3 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas por NGS	29
4.3.1 Pasos de control de calidad	29
4.3.2 Pasos de preprocesamiento	30
4.3.3 Análisis de datos de NGS	31
5. RESULTADOS	33
5.1 Análisis de deleciones del ADNmt con eKLIPse	33
5.2 Análisis de reordenamientos del ADNmt con MitoSAIt	33
5.3 Comparación entre los reordenamientos detectados por eKLIPse y MitoSAIt	34
5.4 Análisis de las variantes del ADN mitocondrial mediante MToolBox	34
6. DISCUSIÓN	34
6.1 Análisis de deleciones del ADNmt con eKLIPse y MitoSAIt	34
6.2 Análisis de la frecuencia de variantes patogénicas con MToolBox .	36
7. CONCLUSIONES	37
8. PERSPECTIVAS DE FUTURO	37
9. AUTOEVALUACIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DSM: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

DLPFC: Córtex prefrontal dorsolateral

ETC: Cadena de transporte de electrones

ADNmt: ADN mitocondrial

MitD: Enfermedades mitocondriales

SNV: Variante de un solo nucleótido

NGS: Secuenciación de nueva generación

RESUMEN

Antecedentes: En los últimos años se ha descrito ampliamente la disfunción mitocondrial en pacientes de esquizofrenia; sin embargo, el ADN mitocondrial (ADNmt), estrechamente relacionado y de vital importancia para el funcionamiento de las mitocondrias, ha sido muy poco estudiado en comparación al ADN nuclear. En investigaciones previas realizadas en muestras sanguíneas de pacientes con esquizofrenia, se encontraron mutaciones potencialmente patogénicas que no estaban presentes en los controles y, también, que los pacientes de esquizofrenia disponían de un menor número de copias de ADNmt, sugiriendo que podría ser un biomarcador para la esquizofrenia.

Objetivos: Comparar la presencia de mutaciones puntuales y de reordenamientos en el ADNmt en tejido *post mortem* del córtex prefrontal dorsolateral, entre pacientes con diagnóstico de esquizofrenia e individuos control.

Material y métodos: Se analizaron muestras de ADN de 6 pacientes y 6 controles. Las secuencias de ADNmt se obtuvieron mediante la técnica de secuenciación de nueva generación con el equipo Ion Torrent Personal Genome Machine. Se realizaron análisis bioinformáticos con las herramientas MitoSAlt, eKLIPse y MtoolBox para identificar reordenamientos, deleciones y variaciones de un único nucleótido (Single Nucleotide Variants, SNVs) del ADNmt.

Resultados: Se identificó una mayor presencia de deleciones del ADNmt en los individuos con esquizofrenia y ninguna diferencia significativa de frecuencia de SNVs entre los controles y los pacientes.

Conclusión: En futuros experimentos se prevé aplicar la misma metodología a un mayor número de muestras, aportando más información respecto a la frecuencia de deleciones y variantes patogénicas en pacientes de esquizofrenia e individuos control.

Palabras Clave: Esquizofrenia, ADN mitocondrial, heteroplasmia, deleción, tejido *post mortem*

ABSTRACT

Background: In recent years, mitochondrial dysfunction has been widely described in schizophrenia patients; however, mitochondrial DNA (mtDNA), closely related and vitally important for mitochondrial function, has been very little studied compared to nuclear DNA. Previous investigations in blood samples from patients with schizophrenia found potentially pathogenic mutations that were not present in controls and also that schizophrenia patients had lower mtDNA copy number, suggesting that it could be a biomarker for schizophrenia.

Objectives: To compare the presence of point mutations and rearrangements in mtDNA in postmortem tissue of the dorsolateral prefrontal cortex between patients diagnosed with schizophrenia and control individuals.

Material and methods: DNA samples from 6 patients and 6 controls were analyzed. The mtDNA sequences were obtained using the next generation sequencing technique with the Ion Torrent Personal Genome Machine. Bioinformatic analyses were performed with the MitoSAIt, eKLIPse and MtoolBox tools to identify mtDNA rearrangements, deletions and single nucleotide variations (SNVs).

Results: We identified an increased presence of mtDNA deletions in the schizophrenia individuals and no significant difference of SNV frequency between controls and patients.

Conclusion: In future experiments, the same methodology will be applied to a larger number of samples, providing more information regarding the frequency of deletions and pathogenic variants in schizophrenia patients and control individuals.

Keywords: Schizophrenia, mitochondrial DNA, heteroplasmy, deletion, postmortem tissue.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico crónico con una combinación heterogénea de síntomas, como alucinaciones, delirios, discurso desorganizado, anhedonia (incapacidad de sentir placer), aplanamiento afectivo y disfunción motivacional y cognitiva.

El inicio de la esquizofrenia se denomina fase prodrómica, que es el periodo previo a la manifestación del primer episodio psicótico, consistente en un declive del funcionamiento cognitivo y social, que generalmente comienza en la adolescencia temprana, y precede al inicio de los síntomas psicóticos en una media de unos diez años (Kahn & Keefe, 2013).

El desenlace de los pacientes con esquizofrenia puede variar desde una recuperación completa hasta una necesidad crónica de atención, y los pacientes no son atendidos en los servicios de salud mental hasta que se presenta la psicosis, en la adolescencia tardía o en la edad adulta temprana. Los pacientes con esquizofrenia generalmente experimentan déficits y deterioros en múltiples dominios de la vida cotidiana, incluyendo la capacidad de mantener relaciones sociales, mantener un empleo o vivir de forma independiente, y estos tienden a persistir después de que los pacientes logren la remisión de los síntomas psicóticos (Kahn et al., 2015).

1.1.1 Predicción

El inicio de los síntomas psicóticos suele ir precedido de cambios sutiles en las creencias, el pensamiento y la percepción que parecen representar formas atenuadas de delirios, trastorno formal del pensamiento o alucinaciones, respectivamente. Alrededor del 80-90% de los pacientes con esquizofrenia experimentan esta fase prodrómica, con una duración media de 52 semanas. Para el resto de los pacientes, los síntomas psicóticos surgen sin un pródromo perceptible. Para determinar un conjunto de síndromes prodrómicos o de alto riesgo clínico, los criterios se basan en la presencia de síntomas psicóticos atenuados, o en un historial familiar asociado a un deterioro reciente y significativo del funcionamiento (Kahn et al., 2015; Yung et al., 2005).

1.1.2 Diagnóstico

El diagnóstico de esquizofrenia se basa en criterios operativos, documentados en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM) o en la Clasificación Internacional y Estadística de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE). Estos criterios tienen en cuenta los síntomas característicos positivos (conductas y pensamientos no presentes normalmente), negativos (síndrome amotivacional) y cognitivos, junto con la duración de los síntomas, su efecto en el funcionamiento social y la posible contribución de otras condiciones psiquiátricas, como los trastornos del estado de ánimo y los problemas de abuso de sustancias (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la esquizofrenia. Adaptado del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, Quinta Edición (APA, 2013).

- A.** Dos (o más) de los siguientes síntomas durante un período de al menos un mes, salvo que se trate con éxito. Incluyen: delirios, alucinaciones, discurso desorganizado, comportamiento desorganizado o catatónico y síntomas amotivacionales, como aplanamiento afectivo, pérdida de iniciativa o avolición.
- B.** El nivel de funcionamiento está significativamente disminuido en el trabajo, las relaciones personales y/o los cuidados personales.
- C.** Los síntomas del trastorno persisten durante al menos 6 meses.
- D.** Exclusión de los trastornos esquizoafectivo, depresivo y bipolar.
- E.** Perturbación no atribuible al uso de fármacos, medicamentos o a otra condición médica.
- F.** En el caso de un trastorno del espectro autista preexistente, las alucinaciones o delirios prominentes tienen que estar presentes durante al menos 1 mes.

1.1.3 Fases de la esquizofrenia

Se hipotetiza que la esquizofrenia consta de cuatro fases. La etapa más temprana es la de riesgo, previa a los déficits detectables, y se basa en criterios genómicos y de exposición ambiental. La segunda fase establecida de la esquizofrenia, y también la anterior al inicio de la psicosis, es el pródromo, que se identifica en base a cambios en los pensamientos, aislamiento social y el deterioro del funcionamiento. La tercera fase es la psicosis aguda, que se

manifiesta con alucinaciones, delirios y desorganización del pensamiento y la conducta. Si no se alcanza la remisión, los individuos pasan a la cuarta y última fase de la esquizofrenia, que implica una discapacidad crónica (Insel, 2010).

Tabla 2. Fases de la esquizofrenia. Adaptado de (Kahn et al., 2015).

Fases	Características	Necesidades diagnósticas
Riesgo (I)	Vulnerabilidad genética Exposición al ambiente	Puntuación de riesgo poligénico
Pródromo (II)	Déficits cognitivos, sociales y de conducta	Biomarcadores predictivos
Psicosis Aguda (III)	Recaídas y remisiones, riesgo de suicidio Pensamiento y comportamiento anómalos	Intervenciones psicosociales
Psicosis Crónica (IV)	Complicaciones médicas Discapacidad	Rehabilitación y tratamiento de comorbilidades

1.1.4 Incidencia, prevalencia y mortalidad

Según el DSM-IV, la prevalencia media de la esquizofrenia es ligeramente inferior al 1%; sin embargo, esta tasa de prevalencia muestra una variación prominente de hasta cinco veces superior dependiendo de la región geográfica (McGrath et al., 2008). Además, la esperanza de vida de los pacientes con esquizofrenia se ve reducida en 20 años en comparación con la población general, siendo el suicidio el principal contribuyente al principio del curso de la enfermedad, y las enfermedades cardiovasculares el principal contribuyente en los años posteriores (McGrath et al., 2008).

1.1.5 Tratamiento

Para la esquizofrenia, los antipsicóticos son la piedra angular del tratamiento. Su acción consiste en bloquear los receptores de la vía dopaminérgica. Aunque también existen estrategias de tratamiento adicionales que difieren de la toma de antipsicóticos, como la terapia electroconvulsiva, las estimulaciones magnéticas transcraneales, o las intervenciones no farmacológicas.

El objetivo es la reducción de los síntomas agudos en al menos de un 20 a un 50%, la remisión se alcanza con la presencia de sólo síntomas positivos y negativos leves que se mantienen durante al menos 6 meses. Y, si la remisión se mantiene y se complementa con un adecuado cuidado personal y funcionamiento social y vocal durante al menos 2 años, se puede definir como recuperación (Kahn et al., 2015).

1.1.6 Fisiopatología y factores de riesgo

El desarrollo de la esquizofrenia se cree que es la consecuencia de una compleja interacción entre factores de riesgo genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo temprano del cerebro y en el curso de la adaptación biológica a las experiencias vitales (Howes & Murray, 2014).

Los estudios *post mortem* han contribuido a descubrir factores de riesgo genéticos, señalando posibles factores que podrían contribuir a la disfunción cerebral en la enfermedad, como la biología anormal de los oligodendrocitos (Uranova et al., 2020), la respuesta inflamatoria (Maes et al., 2021), y la expresión de genes asociados a la función sináptica (Hall & Bray, 2022).

La esquizofrenia es un trastorno altamente heredable, estimado en un 80%. (Gejman et al., 2010). Muchos estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado *loci* genómicos marcados por SNPs en común que estaban asociados con el riesgo de esquizofrenia. Examinando la expresión de los genes dentro de los *loci* genómicos de riesgo mostró su enriquecimiento para la expresión en el córtex prefrontal dorsolateral (dorsolateral prefrontal cortex, DLPFC) fetal en comparación con la postnatal. Estas variantes forman una red de coexpresión e interacción proteica en DLPFC fetal, lo que sugiere que el desarrollo cortical puede estar alterado durante la gestación en la esquizofrenia (Price et al., 2021).

Además, también se han relacionado factores de riesgo ambientales con la esquizofrenia, principalmente experiencias vitales tempranas, como: mujeres cuyas madres experimentaron un déficit nutricional severo durante el primer trimestre del embarazo (Susser & Lin, 1992), complicaciones obstétricas (Cannon et al., 2002) o vivir en un entorno urbano en los primeros años de vida

(Vassos et al., 2012). La combinación de los factores de riesgo ambientales con los genéticos puede amplificar enormemente el riesgo de esquizofrenia, incluso hasta cinco veces más (Price et al., 2021).

1.2 Las mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos unidos a la membrana que generan la mayor parte de la energía química necesaria para alimentar las reacciones bioquímicas de las células; energía que se almacena en forma de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). En cuanto a su estructura, importante para el desarrollo de sus funciones, las mitocondrias constan de dos membranas bicapa distintas (la membrana externa lisa y la membrana interna plegada) que separan la matriz mitocondrial del citosol, formando unas estructuras invaginadas llamadas crestas. En estas crestas tiene lugar la síntesis de ATP mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) a través de los complejos oxidoreductasa I-IV de la cadena de transporte de electrones (ETC) y la enzima ATP sintasa del complejo V (Formosa & Ryan, 2018).

Consideradas por mucho tiempo como el centro neurálgico de la célula, ahora se reconoce que las mitocondrias realizan múltiples funciones esenciales que van mucho más allá de la producción de energía. Las mitocondrias catabolizan nutrientes para obtener energía, pero también generan precursores biosintéticos para macromoléculas, compartimentan metabolitos para el mantenimiento de la homeostasis redox y actúan como puntos nodales para la gestión de residuos metabólicos, lo que destaca su papel regulador de procesos celulares relevantes para la diferenciación celular, la proliferación celular, la apoptosis y la respuesta inmunitaria (Spinelli & Haigis, 2018).

El origen de las mitocondrias se remonta a hace aproximadamente 2000 millones de años, debido a la asociación de una proteobacteria primitiva con una célula procariota. Tras la endocitosis, la proteobacteria se convirtió en un orgánulo citoplasmático de doble membrana que acabó pasando gradualmente material genético al núcleo. Con el tiempo, este proceso redujo el tamaño del genoma en el interior del orgánulo y consolidó la relación simbiótica entre el orgánulo y el núcleo de todas las células (Stewart & Chinnery, 2015).

1.3 Genética mitocondrial

A diferencia de otros orgánulos de las células animales, las mitocondrias llevan su propia información genética, denominada ADN mitocondrial (ADNmt). La genética de las mitocondrias es peculiar y compleja porque el ADNmt se hereda por vía materna y puede estar presente en decenas a decenas de miles de copias por célula. El proteoma mitocondrial se estima alrededor de unas 1.500 proteínas.

1.3.1 Características del ADN mitocondrial

El ADNmt humano consiste en una molécula de ADN circular (Figura 1), de 16.569 pares de bases (pb) cuya secuencia y organización génica fue publicada en 1981 (Anderson et al., 1981). Codifica 37 genes, incluyendo 13 subunidades proteicas de la cadena respiratoria, 2 unidades ribosomales (ARNr 12S y 16S) y 22 ARNs de transferencia (ARNt). El ADNmt también contiene una región de control no codificante, de aproximadamente 1200 pb de longitud, conocida como bucle de desplazamiento (D-loop), cuya función es regular la replicación y la transcripción del ADNmt. Las 13 proteínas resultantes codificadas en el ADNmt son cruciales para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria, aunque sólo representan una pequeña fracción de las aproximadamente 100 subunidades que constituyen los complejos I-V. El ADN mitocondrial está compuesto por ADN de doble cadena, que comprende una cadena pesada (H) y una cadena ligera (L). La cadena H, rica en guanina, codifica 28 genes, mientras que la cadena L, rica en citosina, codifica los 9 genes restantes (Valiente-Pallejà et al., 2022).

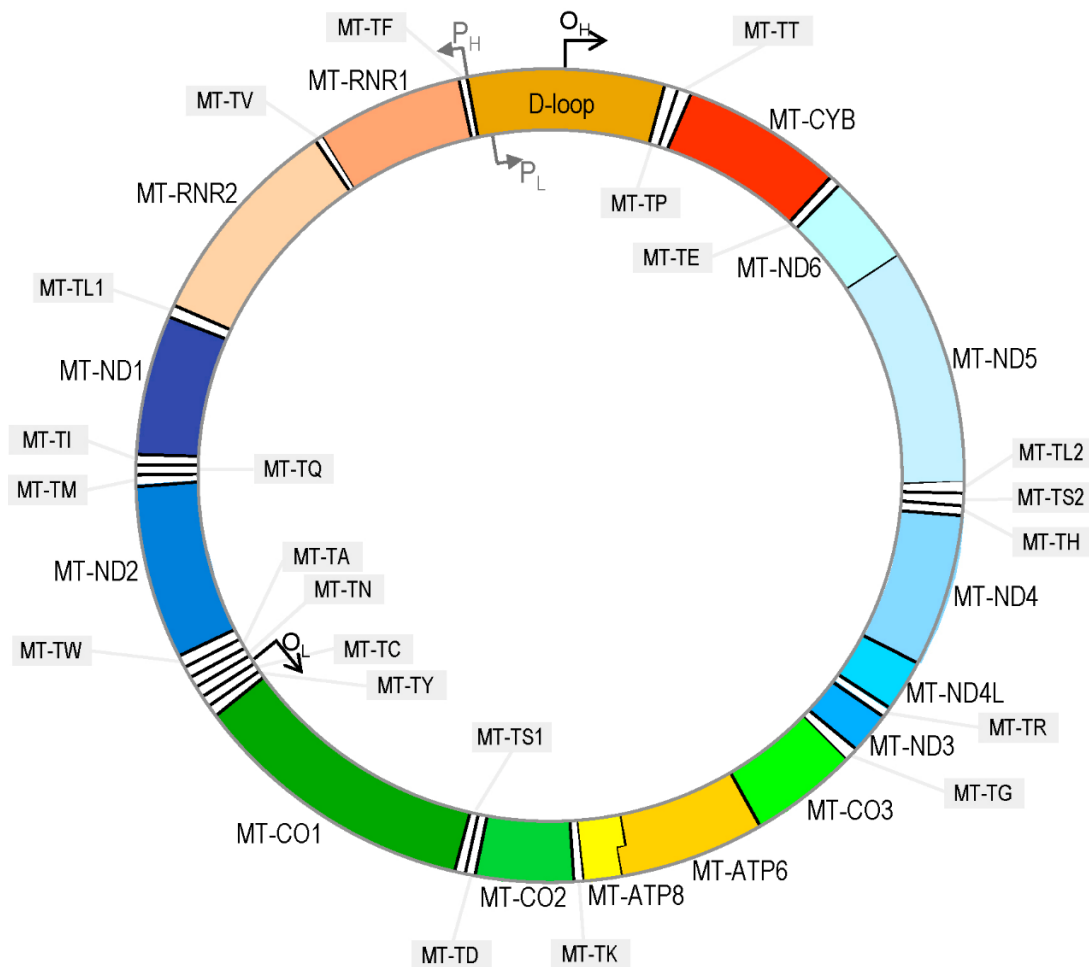


Figura 1. ADN mitocondrial humano (ADNm). *MT-RNR1* y *RNR2* son los genes del ARN ribosomal. En cuanto a los 13 genes polipeptídicos: *MT-ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* y *ND6* son genes que codifican subunidades de la NADH deshidrogenasa (complejo I); *MT-CYB* codifica el citocromo b oxidoreductasa (complejo III); *MT-CO1*, *CO2* y *CO3* codifican subunidades del citocromo c oxidasa (complejo IV); y *MT-ATP6* y *ATP8* son genes que codifican subunidades de la ATP sintasa. Por último, los nombres de los genes de los ARN de transferencia están sombreados en gris. La ubicación de los genes dentro o fuera del círculo depende de si están codificados en la cadena ligera o pesada, respectivamente. Adaptado de (Verge et al., 2011).

Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias del genoma del ADNmt. La cantidad total de ADNmt en una célula se conoce como contenido de ADNmt o número de copias (CN), y varía de cientos a miles de copias, dependiendo de la función celular y de la respuesta de la célula a los agentes endógenos y exógenos. Esto significa que los tejidos con mayor demanda energética contienen mayores cantidades de mitocondrias en sus células y, por tanto, un mayor CN de ADNmt. Los tejidos con mayores requerimientos energéticos son

el sistema nervioso central, los músculos cardíacos y esqueléticos, el sistema endocrino, el sistema renal y el hígado (El-Hattab et al., 2017).

1.3.2 Diferencias entre el ADN mitocondrial y el ADN nuclear

Diversos elementos difieren entre el genoma mitocondrial y el nuclear. El ADNm es circular, pequeño (16.569 pb), sin la presencia de intrones y no está envuelto por proteínas. En cambio, el ADN nuclear (ADNn) es lineal, tiene un mayor tamaño y número de nucleótidos (~3.300 millones de pb), contiene intrones y está empaquetado en la cromatina.

Una de las diferencias más notables entre el ADNmt y el ADNn es su herencia. Como es comúnmente conocido, el ADN nuclear sufre un proceso de recombinación y se hereda de forma biparental a sus descendientes. Una peculiaridad del ADN mitocondrial es que sólo se hereda por vía materna (Wei & Chinnery, 2020). Las mitocondrias paternas están presentes en el embrión pero se eliminan a medida que avanza el desarrollo embrionario. Se han propuesto diversos mecanismos para la eliminación del ADNmt paterno, como la degradación activa (incluyendo el sistema del proteasoma de ubiquitina, la autofagia o la vía endocítica) y la dilución pasiva (de Melo & Camargo, 2021).

En cuanto a la poliploidía, existen dos estados diferentes en las colecciones de copias de ADNmt en una mitocondria, célula, tejido u órgano. El estado se conoce como homoplasmia cuando existe una forma única de colección de copias de ADNmt, siendo todas las copias de ADNmt normales o todas las copias completamente mutantes, mientras que la heteroplasmia se refiere a diferentes proporciones de ADNmt normal y mutante. El nivel de heteroplasmia puede variar entre las células de un mismo tejido u órgano, de un órgano a otro dentro de la misma persona y entre los individuos de una misma familia (Stewart & Chinnery, 2015).

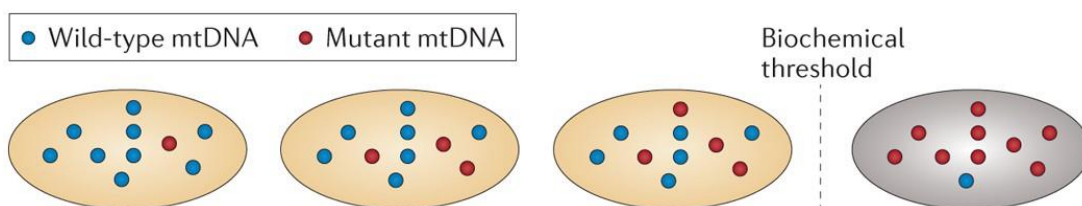


Figura 2. Heteroplasmia del ADNmt y efecto umbral (Stewart & Chinnery, 2015). Las mutaciones del ADNmt que se producen aproximadamente dentro de tres generaciones humanas suelen ser heteroplásmicas, y la misma célula puede contener proporciones variables de ADNmt mutado y silvestre. Si la mutación es patógena, la célula puede tolerar un alto nivel porcentual de esta variante antes de que se supere el umbral bioquímico, que suele estar en el 80%, y se detecte un defecto en la cadena respiratoria.

Para evaluar el posible origen de la heteroplasmia se han propuesto dos mecanismos: la exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a un daño oxidativo, y los errores de replicación del ADNmt, incluidos los errores de la polimerasa y el desequilibrio de nucleótidos (Casoli et al., 2015).

El ovocito de los mamíferos contiene cientos de miles de moléculas de ADNmt; además, en cada ovocito se puede heredar de las mitocondrias maternas una proporción diferente de ADNmt mutado (heteroplasmia). Cuando las células se dividen, los niveles de heteroplasmia en cada célula hija pueden aumentar, disminuir o permanecer aproximadamente iguales (Wei & Chinnery, 2020). Sin embargo, los ADNmt no se replican hasta la fase de blastocisto tras la fecundación, y entonces, los ADNmt del cigoto se distribuyen por las células del blastocisto. Como consecuencia, cada célula germinal primordial (PGC) femenina recibe un número limitado de copias de ADNmt. Esto se conoce como el efecto de cuello de botella (Figura 3), y provoca la deriva del genotipo del ADNmt, lo que significa que los ovocitos heteroplásmicos dan lugar a PGC con un nivel de heteroplasmia del ADNmt muy diferente (Wallace, 2018). Cuando una molécula de ADNmt mutante tiene una ventaja replicativa, su nivel de heteroplasmia aumentará, superando posiblemente el umbral bioquímico, y contribuyendo así a la disfunción celular y al proceso de envejecimiento. Normalmente, este umbral está por encima del 80% del contenido de ADNmt mutado, lo que sugiere que la mayoría de las mutaciones de ADNmt son haploinsuficientes o recesivas (Stewart & Chinnery, 2015).

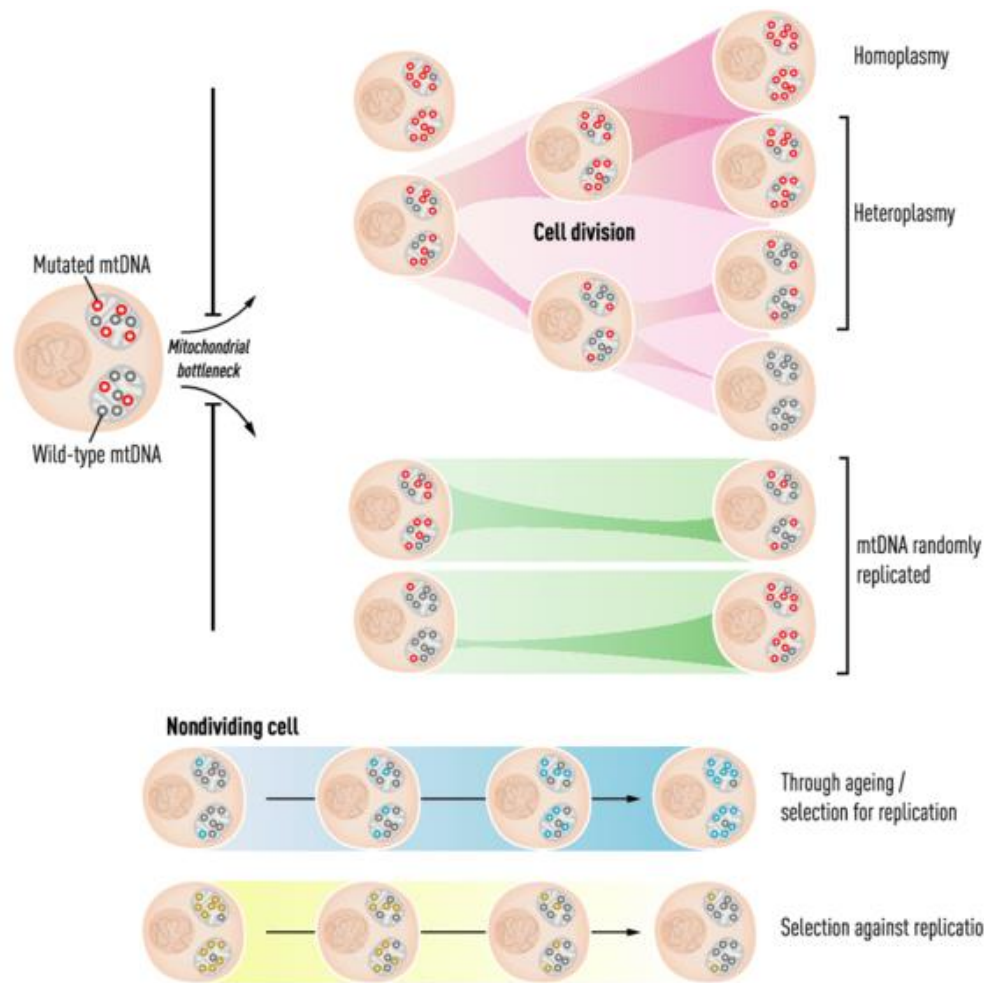


Figura 3. Cambios del ADNmt en la heteroplasmia y efecto cuello de botella (Wei & Chinnery, 2020). A medida que las células se dividen, el nivel de heteroplasmia cambia. Una vez heredadas, las mutaciones del ADNmt pueden propagarse clonalmente a lo largo de la vida, incluso en las células que no se dividen. Si un genotipo se copia con más frecuencia que otro, la proporción global dentro de la célula cambiará a lo largo del tiempo. La dirección de este cambio puede verse influida por la selección a favor o en contra de una variante concreta del ADNmt.

Aunque el ADNmt sigue las reglas universales de uso de codones para la traducción de secuencias en proteínas, existen algunas variaciones específicas en comparación con el ADNn: El codón UGA codifica el triptófano en lugar de un codón de terminación, AGA y AGG son los codones de terminación, y AUA (isoleucina en el ADNn) codifica la metionina, actuando como codón de inicio. (Chinnery & Hudson, 2013) Por último, la tasa de mutación del ADNmt, la velocidad a la que se introducen las mutaciones, es mucho mayor que la del ADNn. Se ha sugerido una tasa de mutación aproximadamente 10 veces mayor en el ADNmt (Valiente-Pallej et al., 2022).

1.4 Enfermedades mitocondriales

Debido a la naturaleza del material genético mitocondrial y a su doble control genómico, las alteraciones que se producen tanto en el ADNn como en el ADNmt pueden causar potencialmente defectos funcionales mitocondriales. Es sabido que algunas alteraciones en los genes mitocondriales causan enfermedades clínicamente heterogéneas, surgidas como resultado de la disfunción de la ETC, y se denominan enfermedades mitocondriales primarias (MitD). Se conocen al menos 300 genes nucleares causantes de MitD (Adam et al., 2000).

Los fenotipos de las MitD incluyen características clínicas como ptosis, cardiomiopatía, oftalmoplejía externa, sordera neurosensorial, atrofia óptica, retinopatía pigmentaria y diabetes *mellitus*. En lo que respecta al sistema nervioso central, los fenotipos incluyen encefalopatía fluctuante, convulsiones, demencia, migraña, episodios similares a un accidente cerebrovascular, ataxia y espasticidad. Algunos tipos de MitD afectan a un solo órgano, mientras que muchos implican a múltiples sistemas, presentando a menudo notables características neurológicas y miopáticas. Los órganos y tejidos más frecuentemente afectados en MitD son el cerebro y el músculo esquelético, pero también pueden estar implicados el corazón, el hígado, los nervios periféricos y el sistema endocrino (Adam et al., 2000).

1.4.1 Alteraciones del ADN mitocondrial que provocan enfermedades mitocondriales

Las variantes de nucleótido único patogénicas (pSNVs) del ADNmt pueden estar presentes en homoplasmia o heteroplasmia. Es sabido que las pSNVs de ADNmt causan encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS), epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF), neuropatía ataxia y retinitis pigmentosa (NARP) y síndrome de Leigh (LS). Además, las deleciones de ADNmt son siempre heteroplásmicas, ya que el ADNmt contiene sistemáticamente uno o más ARNt indispensables dentro de la región eliminada, esenciales para la traducción de los genes vitales del ADNmt asociados a proteínas. Los reordenamientos del ADNmt son responsables del síndrome de Kearns-Sayre (KSS), la oftalmoplejia externa progresiva (OEP) y el síndrome de Pearson (Valiente-Pallej et al., 2022).

Aparte de las enfermedades mitocondriales más típicas asociadas a las alteraciones del ADNmt, hay muchas otras enfermedades y características humanas relacionadas con variantes del ADNmt, como el envejecimiento, la diabetes o la hipertensión. Asimismo, varias afecciones se han asociado con aumentos o disminuciones del contenido de ADNmt (Malik & Czajka, 2013).

1.5 Alteraciones del ADN mitocondrial en la esquizofrenia

La investigación en neuropsiquiatría se ha centrado principalmente en la relación estructura-función y en la búsqueda de factores causantes de enfermedades que sean específicos del cerebro. Sin embargo, cabe señalar que los procesos biológicos no solo se definen por parámetros estructurales, sino también por el estado energético (Picard et al., 2016). El cerebro representa alrededor del 2-3% del peso del cuerpo humano, mientras que consume el 20% de la energía total, generada principalmente por las mitocondrias (Wallace, 2017). A diferencia de los músculos, el cerebro está siempre muy activo metabólicamente y, por tanto, es muy sensible al funcionamiento de las mitocondrias.

En los últimos años se ha sugerido que, si la energía disponible es limitada, quedando por debajo del umbral energético, pueden aparecer síntomas neurológicos; sin embargo, si el defecto bioenergético es más sutil, la falta de energía puede provocar la aparición de los síntomas propios del cerebro, los síntomas psiquiátricos (Wallace, 2017).

El proyecto del cual este trabajo constituye una parte se basa en este paradigma, con el objetivo de evaluar cómo las alteraciones del ADNmt que causan disfunción mitocondrial están relacionadas con el desarrollo de la esquizofrenia.

1.6 Proyecto de investigación

Título del proyecto: Implicación del ADN mitocondrial en la psicosis temprana: relación con el riesgo de enfermedad, estrés, rendimiento cognitivo, sintomatología clínica y síndrome metabólico.

El objetivo de este proyecto es comprender la contribución del ADNmt al desarrollo de los trastornos psicóticos (TP) mediante el estudio del ADNmt en los

leucocitos y en las células del córtex prefrontal dorsolateral (DLPFC) de pacientes e individuos control (C).

Los objetivos específicos del proyecto son:

- 1) confirmar la implicación de las variantes del ADNmt y del número de copias del ADNmt en el desarrollo de un TP incipiente (TPI);
- 2) comparar la presencia de variantes mitocondriales y el número de copias de ADNmt entre pacientes y controles en el ADNmt de leucocitos y en las células del DLPFC.
- 3) establecer la relación entre el ADNmt y el estrés, las características cognitivas, la sintomatología y el desarrollo del síndrome metabólico en TPI.

Para el proyecto, las muestras disponibles son: ADN de leucocitos (250 TPI y 250 C) y ADN de DLPFC (35 TP y 35 C).

La metodología requerida consiste en la secuenciación de próxima generación dirigida al ADNmt y el posterior análisis bioinformático; PCR cuantitativa (qPCR) y la cuantificación relativa (2-deltaCq). Las pruebas clínicas utilizadas en el ámbito clínico fueron: SCID, PANSS, CDS, MCCS y CTQ. Se obtuvieron datos biométricos y bioquímicos de los participantes. Análisis estadísticos: X², t-Student, modelo lineal general, correlación y análisis de regresión.

Tabla 3. Cronograma del proyecto.

TAREA	Año Mes	2019												2020												2021											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ED1. Coordinación	TA1.	[Barra verde]																																			
	TA2.	[Barra verde]																																			
	TA3.	[Barra verde]																																			
ED2. Obtención de datos y muestras (I)	TA4.	[Barra gris]																																			
	TA5.	[Barra gris]																																			
	TA6.	[Barra gris]																																			
ED3. Obtención de ADN y datos genéticos. Gestión de datos.	TA7.	[Barra naranja]																																			
	TA8.	[Barra naranja]																																			
	TA9.	[Barra rosa]																																			
	TA10.	[Barra naranja]																																			
	TA11.	[Barra naranja]												[Barra roja]																							
ED4. Análisis del ADNmt	TA12.																																				
	TA13.																									[Barra azul]											
	TA14.																									[Barra azul]											
ED5. Análisis de datos	TA15.													[Barra amarilla]												[Barra amarilla]											
ED6. Divulgación y publicación	TA16.																																				
	TA17.	[Barra morada]																																			
	TA18.	[Barra morada]																																			

Previamente a mi incorporación al GAP se recogieron las muestras y se completó la cuantificación del CN del ADNmt, junto con el enriquecimiento y la amplificación del ADNmt. Me uní al grupo de investigación durante un periodo de prácticas de 4 meses, y aprendí sobre la preparación de librerías de ADN y la técnica de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS). Mi trabajo se ha centrado principalmente en el análisis bioinformático, participando en la identificación de reordenamientos de ADNmt, así como en la identificación de SNVs de ADNmt en las muestras cerebrales de DLPFC disponibles, con el objetivo de comparar muestras de pacientes de esquizofrenia y de control.

1.6.1 Antecedentes

En la última década se han dedicado enormes esfuerzos al análisis de los trastornos neuropsiquiátricos mediante potentes técnicas genómicas, como los GWAS, la secuenciación del exoma completo (WES) y la secuenciación del genoma completo (WGS), con el fin de encontrar variantes genéticas causantes o asociadas a las enfermedades psiquiátricas. Esto ha permitido identificar un conjunto de variantes comunes, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), variantes del número de copias (CNV) y mutaciones causales que son muy raras pero tienen un gran impacto en el individuo portador. Sin embargo, aún se desconocen 2/3 de los factores genéticos, y todavía no se dispone de una etiología y fisiopatología consistentes.

Las causas de la esquizofrenia aún se desconocen, aunque existen evidencias desde diferentes enfoques de la disfunción mitocondrial (Konradi & Öngür, 2017). Sin embargo, sólo unos pocos estudios han analizado la implicación del ADN mitocondrial (ADNmt) en la esquizofrenia, a pesar de ser una molécula crucial para el correcto funcionamiento de las mitocondrias.

1.6.2 Investigaciones previas

El proyecto de investigación se basa en los resultados de un estudio previo (PS09/01052) en una muestra de 30 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia con aparente herencia materna de la enfermedad, 30 pacientes con diagnóstico

de esquizofrenia sin antecedentes familiares de psicosis y 30 sujetos control. En este estudio se identificó que los pacientes presentaban en comparación con los sujetos de control:

- 1) un mayor número de características clínicas asociadas a los trastornos mitocondriales;
- 2) un aumento significativo de los niveles de lactato al realizar una prueba de esfuerzo físico, indicativo de disfunción mitocondrial;
- 3) mutaciones potencialmente patogénicas (n=16), no presentes en controles;
- 4) menor CN de ADNmt en los leucocitos que en los sujetos control.

Es de interés señalar que el grupo ha encontrado resultados similares en el trastorno del espectro autista y la discapacidad intelectual (Valiente-Pallejà et al., 2018). Estos resultados sugieren que el ADNmt puede ser un biomarcador para los trastornos neuropsiquiátricos, en particular para la esquizofrenia.

1.6.3 Estado actual de la investigación sobre la esquizofrenia

Recientemente se ha revisado el papel de las mitocondrias y del metabolismo energético en la esquizofrenia. Entre ellos destacan los siguientes hallazgos: déficits mitocondriales con especial énfasis en las alteraciones del complejo I no causadas por la medicación, reducción del número de mitocondrias en varias regiones cerebrales en estudios *post mortem* y elevada presencia de síntomas psiquiátricos en pacientes con enfermedades mitocondriales, antes del diagnóstico de la enfermedad mitocondrial.

En cuanto al estudio del ADNmt, uno de los hallazgos más relevantes ha sido que las variantes del ADNmt contribuirían al riesgo y explicarían parte de la "heredabilidad perdida" de diferentes enfermedades complejas. Utilizando los datos del "Welcome Trust Case Control Consortium" (<https://www.wtccc.org.uk/>) se analizaron los SNPs del ADNmt en 51.106 sujetos, comparando pacientes con 11 enfermedades. (una de ellas la esquizofrenia, N=2.950) y tres grupos de controles. Los autores identificaron que las variantes m.3197, m.11299, m.13617, m.14793, m.15043 y m.15218 estaban asociadas a la esquizofrenia (Chinnery & Hudson, 2013).

2. HIPÓTESIS

Hipótesis general del proyecto: la presencia de variantes específicas y/o deleciones del ADNmt están implicadas en la disfunción mitocondrial en la esquizofrenia, contribuyendo a su sintomatología y a su aparición.

Hipótesis del trabajo de final de grado: las variantes y/o deleciones del ADNmt son más frecuentes en las muestras cerebrales *post mortem* de los pacientes con esquizofrenia que en los individuos control.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es investigar la implicación de las alteraciones del ADNmt en pacientes con esquizofrenia en células humanas del DLPFC.

Objetivo específico: evaluar las diferencias en la frecuencia de variantes patogénicas y reordenamientos del ADNmt en las células del DLPFC entre los pacientes con esquizofrenia y los individuos control.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio, participantes y consideraciones éticas

El cerebro está organizado funcionalmente de manera regional, donde cada región está asociada a un grupo relativamente específico de funciones. El córtex prefrontal dorsolateral (DLPFC) ocupa las áreas de Brodmann 9, 10 y 46 (Figura 4) y se asocia especialmente con funciones ejecutivas como la memoria de trabajo, la síntesis de la información sensorial, la atención, el razonamiento y el comportamiento dirigido a objetivos. Los tipos de células de las seis capas del DLPFC son innumerables, pero pueden distinguirse a grandes rasgos como neuronas y glía; las neuronas representan aproximadamente el 33-39% de las células del lóbulo frontal (Price et al., 2021).

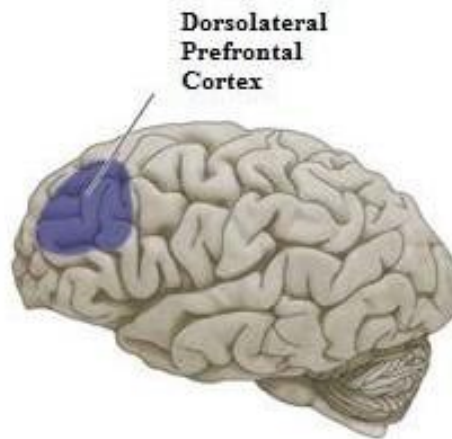


Figura 4. (Nelson, 2016) Diagrama de la localización del DLPFC en el cerebro.

Las muestras estudiadas son ADNs de tejidos *post mortem* del córtex prefrontal dorsolateral. Dada la naturaleza humana específica del órgano afectado en la esquizofrenia y las trayectorias de desarrollo de las regiones cerebrales afectadas, es fundamental realizar investigaciones con tejidos cerebrales *post mortem* humanos para determinar la naturaleza de la enfermedad.

Los datos clínicos de los pacientes con esquizofrenia y de los sujetos control han sido obtenidos por el Centro de Investigación Biomédica en Red en Salud Mental (CIBERSAM), G16, Universidad del País Vasco. Los tejidos proceden de la colección de muestras cerebrales de la Universidad del País Vasco, registradas con el número C35. Los pacientes son sujetos cuya causa de muerte es el suicidio y de los que se ha comprobado que tenían un trastorno psicótico previo según criterios DSM-V para la esquizofrenia. Los controles son sujetos emparejados por edad y sexo con los pacientes cuya causa de muerte no es el suicidio y que no tenían esquizofrenia. Se dispone de los datos clínicos, sociodemográficos y biométricos, así como del historial de enfermedades de los sujetos seleccionados.

4.2 Métodos de secuenciación de nueva generación

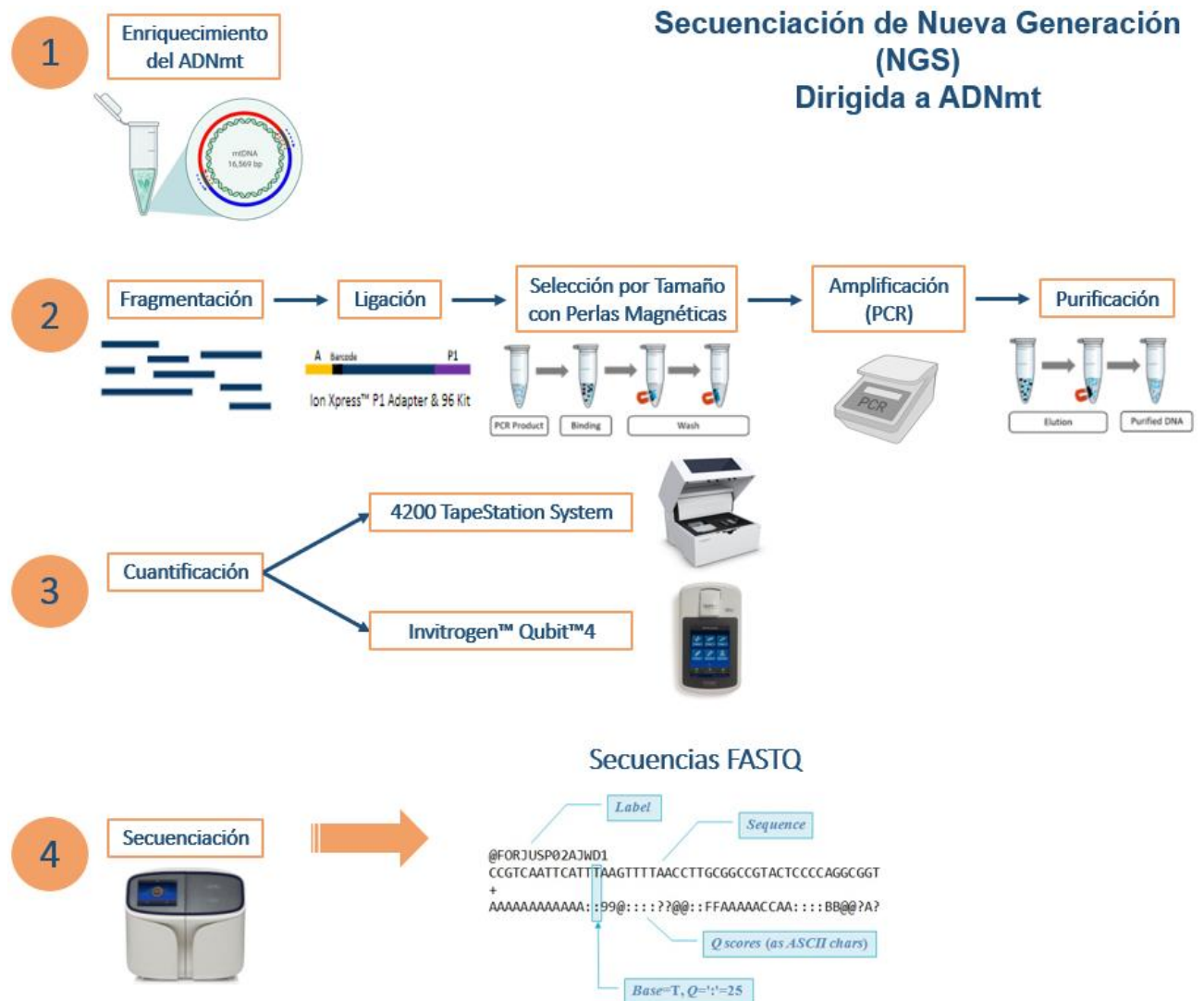


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología. 1: enriquecimiento del ADNmt, 2: preparación de la librería genética, 3: cuantificación de los productos de NGS, 4: proceso de secuenciación y obtención de secuencias FASTQ.

4.2.1 Enriquecimiento del ADNmt

Las muestras se amplificaron con 2 sets de primers, lo que permitió la amplificación de toda la molécula de ADNmt en dos fragmentos superpuestos (Tabla 3). Este protocolo fue optimizado para la versión TaKaRa LA Taq® Hot Start (RR042Q).

Tabla 4. Sets de primers para la amplificación del ADNmt en dos fragmentos.

Nombre	Secuencia 5'	Inversa Complementaria	Inicio	Final	Tamaño Fragmento
FampA	AAATCTTACCCCGCCTGTTT	AAACAGGCGGGGTAAGATTT	2480	2499	8379 pb
RampA	AATTAGGCTGTGGGTGGTTG	CAACCACCCACAGCCTAATT	10858	10839	
FampB	GCCATACTAGTCTTTGCCGC	GCGGCAAAGACTAGTATGGC	10653	10672	8567 pb
RampB	GGCAGGTCAATTTCACTGGT	ACCAGTGAAATTGACCTGCC	2688	2669	

4.2.2 Fragmentación del ADN y preparación de la librería

Este protocolo fue adaptado del *NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent* (E6285). El material inicial son 100ng de ADN. Para la preparación de la librería se necesitan dos selecciones por tamaño, realizadas mediante el uso de *AMPure XP Beads*, la primera selección permite la eliminación de fragmentos largos no deseados, y la segunda selección elimina los fragmentos pequeños, a la vez que une los fragmentos de ADN deseados. El último paso de la preparación de la librería es la limpieza y purificación de la librería amplificada, utilizando *AMPure XP Beads*.

4.2.3 Cuantificación de la librería

Después de la preparación de la librería, se requiere la cuantificación y el análisis de su calidad. La concentración de las librerías se cuantificó con el fluorómetro Qubit 4 utilizando el kit de ensayo *Qubit 1X dsDNA HS*. La distribución de la longitud de las librerías se determinó con el sistema *Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape*.

4.3 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas por NGS

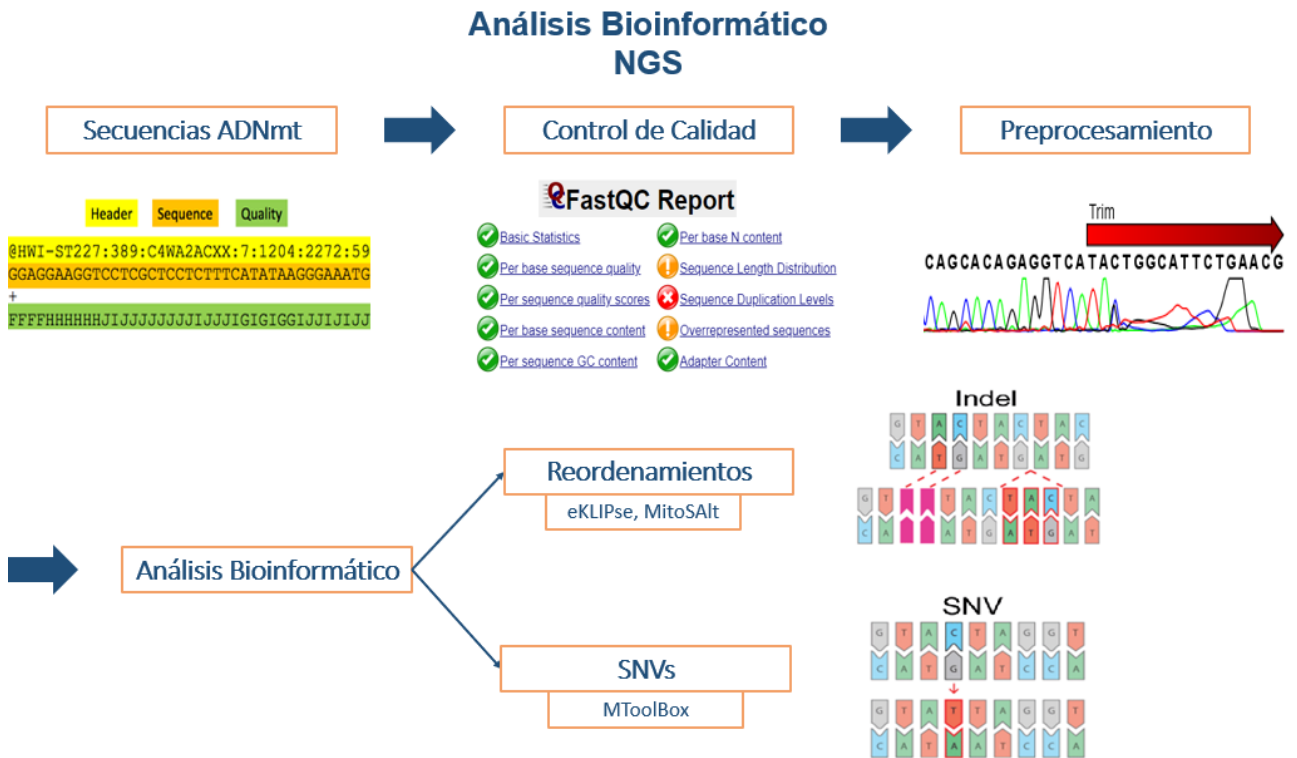


Figura 6. Diagrama de flujo del análisis bioinformático de las secuencias obtenidas por NGS.

4.3.1 Pasos de control de calidad

- **Profundidad de cobertura**

La profundidad de cobertura es el número de veces que una base concreta está representada en todas las lecturas de la secuenciación, para comprobar la profundidad de cobertura se utilizó la herramienta samtools v1.14 (Danecek et al., 2021). Una mayor profundidad de cobertura permite una mayor confianza en el análisis.

- **FastQC**

FastQC es la principal herramienta de control de calidad para datos de secuenciación de alto rendimiento (Andrews, 2010). Incluye 10 módulos diferentes relativos a la calidad de las secuencias, siendo algunos de los más relevantes: la calidad de la secuencia por base, el contenido de la secuencia

por base o las secuencias sobrerrepresentadas. La calidad de las muestras se comprobó con FastQC v0.11.9. FastQC asigna una marca a cada módulo: fallo, advertencia y correcto (Anexo 1). Sólo se consideraron aptas las muestras con menos de 3 advertencias o fallos en el análisis.

4.3.2 Pasos de preprocesamiento

Según los informes de FastQC, se aplicaron los siguientes pasos de preprocesamiento para mejorar la calidad de las secuencias.

- ***Trimming* de primers**

La eliminación de secuencias de primers, desde el inicio o el final de las lecturas, se realizó cuando las secuencias de primers se veían como "sobrerrepresentadas" en los informes de FastQC, o si las mayores profundidades de cobertura obtenidas procedían de sitios de unión de primers. Este proceso se llevó a cabo con la herramienta Cutadapt v3.7 (Martin, 2011).

- ***Trimming* por calidad**

Para mejorar la calidad general de las secuencias se realizó un segundo proceso de *trimming*, con los pasos:

- Se delimitó la longitud de las lecturas en un rango de mínimo 50 bases y máximo 300 bases. A causa de las limitaciones de la máquina *Ion Torrent Personal Genome Machine*, que sólo permite lecturas de hasta 400 pb.
- Las primeras bases y las últimas bases de la secuencia se recortaron para mejorar la calidad de la lectura. El número de bases recortadas depende de los informes de FastQC, en este caso se eliminaron 15 pb tanto del inicio como del final de las lecturas.
- Por último, se aplicó un *trimming* de calidad, proporcionado por cutadapt, para eliminar los extremos de baja calidad de las lecturas. El filtro utilizado fue 20 de calidad.

Todas las muestras se procesaron con los mismos filtros, para evitar sesgos en el análisis. Después de todos los procesos de *trimming* se realizó otro

análisis con FastQC para confirmar que la calidad de las secuencias había mejorado y para determinar qué muestras eran aptas para el análisis.

4.3.3 Análisis de datos de NGS

Análisis bioinformático con eKLIPse

eKLIPse es una herramienta sensible que permite detectar y cuantificar las deleciones de ADN mitocondrial, así como sus puntos de rotura, posición en el genoma y porcentaje de heteroplasmia (Goudenège et al., 2019). Los siguientes módulos y herramientas son necesarios para eKLIPse: python 2.7, biopython, tqdm, samtools, blastn & makeblastdb y circus.

eKLIPse proporciona: un archivo.csv que contiene todas las deleciones predichas y sus puntos de ruptura, un archivo .csv que resume las deleciones acumuladas por gen de ADNmt y un gráfico circular creado por alineamiento de secuencias (Figura 7).

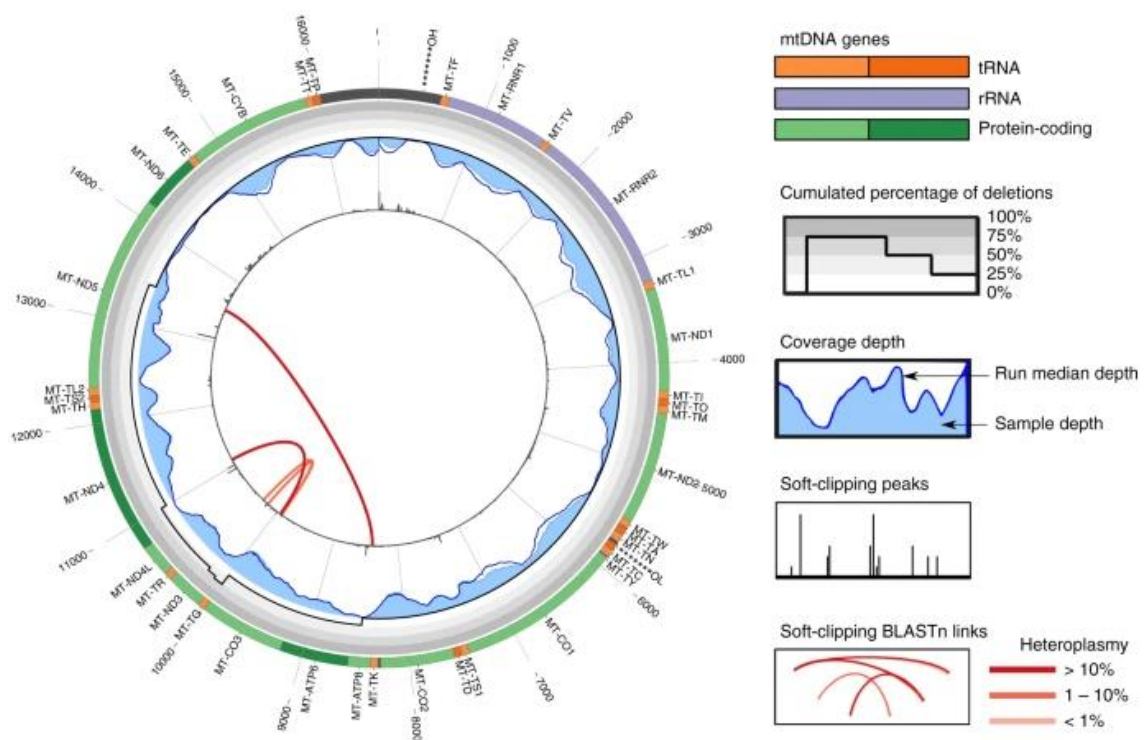


Figura 7. Diagrama circular generado por eKLIPse. En el círculo exterior se representa el genoma mitocondrial, mostrando los ARNt (naranja), los ARNr (púrpura), los genes codificantes de proteínas (verde) y las regiones no codificantes (negro). El gradiente de grises permite estimar el porcentaje acumulado de deleciones, representado por una línea negra para cada posición del ADNmt. La profundidad de cobertura en cada base se muestra como un área azul, mientras que

la media de todas las muestras se representa como una línea azul oscuro. Los picos de *soft-clipping* se muestran como barras negras dentro del círculo interior, Los enlaces BLAST se representan mediante arcos rojos con intensidades proporcionales al nivel de heteroplasmia de las deleciones de ADNmt que representan. Adaptado de (Goudenège et al., 2019).

Análisis bioinformático con MitoSAlt

MitoSAlt es un método computacional adecuado para la identificación precisa, la cuantificación y la visualización de deleciones y duplicaciones de ADNmt a partir de datos de secuenciación genómica (Basu et al., 2020). MitoSAlt también se ejecuta en una distribución de linux, que requiere Perl y R, que suelen estar preinstalados. También se requieren varios programas externos, que se instalan ejecutando el script "setup.sh" en el directorio de MitoSAlt.

Los resultados de MitoSAlt consisten en archivos bam y bigwig para visualizar la cobertura de las lecturas junto con la ubicación de los puntos de ruptura. El *output* se pasa a un script R "delplot.R" que filtra las deleciones/duplicaciones predichas basándose en su heteroplasmia, los datos filtrados finales se presentan en forma de tabla junto con un gráfico circular que muestra las duplicaciones y deleciones predichas (Figura 8).

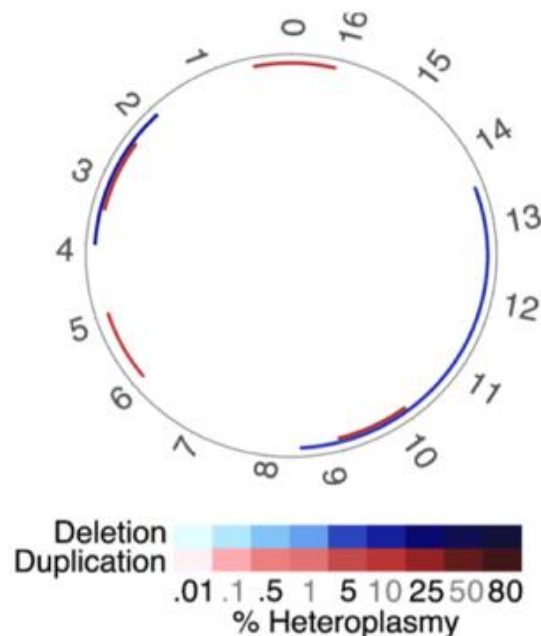


Figura 8. Diagrama circular generado por MitoSAlt. El gráfico circular muestra los segmentos eliminados (en azul) o duplicados (en rojo). Las intensidades de los segmentos rojos y azules (de claro a oscuro) son directamente proporcionales al nivel de heteroplasmia (%).

Análisis bioinformático con MtoolBox

MtoolBox es programa altamente automatizado y adecuado para la anotación de heteroplasmia y el análisis de variantes mitocondriales humanas en datos de secuenciación de alto rendimiento (Calabrese et al., 2014). MtoolBox se ejecuta también en una distribución de linux, requiriendo Anaconda para su instalación, y algunos softwares externos instalados ejecutando el "install.sh script".

Los resultados proporcionados por MToolBox incluyen puntuaciones de patogenicidad, perfiles de variabilidad del genoma y asociaciones de enfermedades para variantes mitocondriales, y también niveles de heteroplasmia específicos de los alelos.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de deleciones del ADNmt con eKLIPse

Los análisis con eKLIPse se realizaron utilizando los parámetros pertinentes (Anexo 2) para detectar la mayoría de las deleciones de ADNmt, incluso aquellas tan cortas como 100 pares de bases. Como resultado del análisis, se crearon 12 gráficos con eKLIPse, que representan el mapa de ADNmt de cada muestra y sus deleciones (Figuras 9 y 10).

Los resultados de este trabajo son confidenciales y forman parte del proyecto general.

5.2 Análisis de reordenamientos del ADNmt con MitoSAIt

Los análisis de MitoSAIt se realizaron utilizando sus parámetros por defecto, y proporcionaron resultados similares a los creados por eKLIPse. Es decir, gráficos que muestran los mapas del genoma del ADNmt y la distribución de los reordenamientos (Figura 11). A diferencia de eKLIPse, MitoSAIt no creará un gráfico para una muestra si no hay reordenamientos detectados en esa muestra.

5.3 Comparación entre los reordenamientos detectados por eKLIPse y MitoSAIt

5.4 Análisis de las variantes del ADN mitocondrial mediante MToolBox

Con el uso de MtoolBox, se encontraron 118 variantes de ADNmt (Tabla 6).

Tabla 6. Número de variantes patogénicas por muestra.

MToolBox		
Grupo	Muestra	Nº Variantes
Controles	C1	3
	C2	14
	C3	16
	C4	15
	C5	7
	C6	4
Pacientes	P1	5
	P2	6
	P3	12
	P4	4
	P5	17
	P6	15
	TOTAL	118

La información sobre variantes patogénicas y los genes más implicados es confidencial.

6. DISCUSIÓN

6.1 Análisis de deleciones del ADNmt con eKLIPse y MitoSAIt

El objetivo de este trabajo fue investigar la frecuencia de variantes y reordenamientos del ADNmt en muestras cerebrales *post mortem* de esquizofrenia, y su comparación con individuos control. Una de las primeras consideraciones que merece la pena mencionar es relativa al número de muestras. Para este estudio había 14 muestras disponibles, con una profundidad de lectura media de 1627,4. Sólo 12 pasaron el filtro de calidad y fueron adecuadas para el análisis. Debido al limitado número de muestras, se requieren más estudios y análisis para confirmar los resultados y validarlos. Este trabajo es una parte de un proyecto que aún está en proceso y que tomará el relevo de

los resultados de este estudio y se centrará en determinar la implicación de reordenamientos y variantes específicas del ADNmt en la disfunción mitocondrial en la esquizofrenia.

La determinación del número de deleciones en las muestras de ADNmt postmortem se realizó utilizando la herramienta bioinformática eKLIPse. Al final, se identificaron 52 deleciones en las muestras, 45 de ellas se encontraron en las muestras de esquizofrenia, mientras que sólo 7 de ellas se encontraron en las muestras de control. Este resultado parece indicar: la baja presencia de deleciones en los ADNmt de los individuos de control y, la mayor frecuencia de deleciones de ADNmt en los pacientes con esquizofrenia que en los individuos de control.

Con el mismo propósito se realizó un análisis de las mismas muestras utilizando MitoSAIt, que al igual que eKLIPse, representa el número de deleciones en las muestras de ADNmt, pero también proporciona el número de duplicaciones. Con MitoSAIt se identificaron 135 deleciones: 13 de ellas pertenecientes a muestras de control y 122 a muestras de esquizofrenia. En cuanto a las duplicaciones, se encontraron 193: 38 de ellas en muestras de control y las 155 restantes en muestras de esquizofrenia. De estas 155 duplicaciones encontradas en las muestras de esquizofrenia, 116 se encontraron en una sola muestra, la mayoría de ellas cerca de los sitios de unión de los primers. A pesar de este resultado, y a la espera de futuros experimentos, se observa que las muestras de individuos control contienen menos alteraciones en el ADNmt que las muestras *post mortem* de esquizofrenia. Otro de los factores que se valorará al realizar análisis con un mayor número de muestras es la edad de los individuos. Puesto que con la edad las mutaciones se van acumulando y por tanto podría encontrarse un mayor número de deleciones en los sujetos de avanzada edad. Con el reducido número de muestras del trabajo no se puede determinar esta relación, pero de todos modos, se aprecia en el caso de los controles una mayor frecuencia de deleciones en los individuos de mayor edad (Anexo 3).

Dado que la mayoría de las alteraciones totales encontradas por eKLIPse y MitoSAIt tenían un bajo nivel de heteroplasma, se aplicó un filtro, fijando el umbral en el 0,5% de heteroplasma. Esto fue necesario debido al sesgo inevitablemente causado por la técnica de PCR en el paso de preparación de la

librería, donde no todos los fragmentos de la mezcla se amplifican con la misma eficiencia, dependiendo de su contenido de bases. Los fragmentos con un contenido de GC neutro suelen amplificarse con mayor eficiencia que los fragmentos ricos en GC o AT, por lo que estos fragmentos pueden quedar subrepresentados o incluso perderse durante la preparación de la biblioteca, mientras que otros fragmentos son más detectados por el instrumento de NGS (Van Dijk et al., 2014), lo que conduce a una mayor profundidad de lectura y a un análisis más sensible de estas regiones. Esto explica porque una de las muestras tenía un número tan alto de duplicaciones y también explica por qué algunos reordenamientos se detectan con un bajo nivel de heteroplasmia (1 en 1000 lecturas) y no pueden ser tomados en consideración, ya que se espera que todas las muestras contengan al menos unos pocos reordenamientos y podrían no estar relacionados con casos patogénicos.

6.2 Análisis de la frecuencia de variantes patogénicas con MToolBox

El último análisis realizado trató de evaluar la frecuencia de las variantes patogénicas del ADNmt de las muestras de control y de esquizofrenia. Para este experimento se utilizó MtoolBox, y sólo se tuvieron en cuenta las variantes reconocidas como patogénicas. De las 118 pSNVs del ADNmt que se encontraron, 59 de ellas pertenecían a muestras de control y las otras 59 a muestras de pacientes. Dado que la frecuencia de SNVs era la misma en ambos casos, se enfocó el análisis en determinar los genes más afectados por estas sustituciones.

Ya se ha sugerido la existencia de una disfunción mitocondrial en la etiopatología de la esquizofrenia, que incluye una alteración del metabolismo mitocondrial, déficits bioenergéticos y una reducción del número de mitocondrias en diversas regiones del cerebro. (Valiente-Pallejà et al., 2020). En consecuencia, se ha propuesto que las anomalías mitocondriales desempeñan un papel fundamental en la alteración del funcionamiento del cerebro en la esquizofrenia (Pei & Wallace, 2018).

7. CONCLUSIONES

Se encontraron variaciones significativas en la frecuencia de deleciones y duplicaciones entre los sujetos de control y los de esquizofrenia en las muestras de ADNmt de las células del DLPFC. Se detectó un número mucho mayor de alteraciones en las muestras de los pacientes que en las de los individuos de control.

En cuanto a los SNVs, no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de variantes entre pacientes y controles. Sin embargo, los genes más representados en las variantes patogénicas encontradas eran elementos codificantes de la ETC, cuyo funcionamiento alterado podría contribuir a la disfunción mitocondrial en la esquizofrenia.

8. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los resultados obtenidos en este trabajo son parte de un proyecto más amplio: Implicación del ADN mitocondrial en la psicosis temprana: relación con el riesgo de enfermedad, estrés, rendimiento cognitivo, sintomatología clínica y síndrome metabólico. La principal limitación de este informe fue el reducido número de muestras disponibles, en futuros experimentos está previsto aplicar la misma metodología a una población amplia y, el resultado global del mismo, aportará más información respecto a la frecuencia de deleciones y variantes patogénicas en pacientes e individuos control. Los datos obtenidos en este informe también contribuirán a una posible optimización de los protocolos.

Este proyecto se llevó a cabo con el objetivo de encontrar la contribución del ADNmt al desarrollo de los trastornos psiquiátricos y las características clínicas presentes en el inicio temprano de la psicosis. Además de los tejidos *post mortem* del DLPFC, el proyecto también trabajará con muestras de leucocitos y se centrará en nuevas comparaciones de la frecuencia de las variantes patogénicas, los haplogrupos y la variación del número de copias.

Ya se han comprobado los cambios en el CN del ADNmt de los grupos, sin que se hayan encontrado aún pruebas significativas sobre las diferencias del CN del

ADNmt, pero el proyecto sigue en marcha y el resultado global aportará más información al campo de la genética de los trastornos psiquiátricos.

9. AUTOEVALUACIÓN

Tras realizar mi estancia en prácticas y mi trabajo de final de grado en el grupo de investigación “Genètica i Ambient en Psiquiatria” me he familiarizado con las funciones y el trabajo de los investigadores, así como la dinámica de trabajo en el laboratorio. He tenido la oportunidad de aprender mucho en el campo de la bioinformática, participando en obtenciones de datos, procesos de mejora de calidad y análisis bioinformáticos entre otros. Desde el primer momento mi ilusión por participar en un grupo de investigación era muy grande, pero formar parte de este proyecto ha superado con creces mis expectativas, y ha despertado mucho más mi interés por el mundo de la investigación biomédica.

He podido poner en práctica los conocimientos aprendidos durante estos 4 años de carrera, tanto conocimientos teóricos, especialmente en el campo de la genética y la biomedicina, como otras competencias, ya sea el trabajo en equipo, ser resolutivo y eficiente.

El trabajo de final de grado me ha servido a nivel global para acercarme a la realidad de formar parte de un experimento, formando parte de un largo proceso a través del cual he ido aprendiendo y formándome. Desde el planteamiento de una hipótesis para los análisis con las muestras disponibles, tener que obtener las muestras y procesarlas, hasta los propios análisis y evaluación de los resultados, realizando diferentes reuniones con los miembros del grupo para discutir sobre los avances y evaluando los siguientes pasos a realizar conocimientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, M. P., Ardinger, H. H., & Pagon, R. A. (2000). *Primary Mitochondrial Disorders Overview*.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5) (American Psychiatric Publishing, 2013).
- Anderson, S., Bankier, A., Barrell, B. et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457–465.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at:
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Basu, S., Xie, X., Uhler, J. P., Hedberg-Oldfors, C., Milenkovic, D., Baris, O. R., Kimoloi, S., Matic, S., Stewart, J. B., Larsson, N. G., Wiesner, R. J., Oldfors, A., Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, E. (2020). Accurate mapping of mitochondrial DNA deletions and duplications using deep sequencing. *PLoS genetics*, 16(12), e1009242.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009242>
- Calabrese, C., Simone, D., Diroma, M. A., Santorsola, M., Guttà, C., Gasparre, G., Picardi, E., Pesole, G. & Attimonelli, M. (2014). MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing.. *Bioinform.*, 30, 3115-3117.
- Cannon, M., Peter Jones, Mrcp. B., & Psych Robin Murray, M. M. (2002). Reviews and Overviews Obstetric Complications and Schizophrenia: Historical and Meta-Analytic Review. In *Am J Psychiatry* (Vol. 159, Issue 7).
- Casoli, T., Spazzafumo, L., Di Stefano, G., & Conti, F. (2015). Role of diffuse low-level heteroplasmy of mitochondrial DNA in Alzheimer's disease neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(JUL).
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00142>
- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. In *British Medical Bulletin* (Vol. 106, Issue 1, pp. 135–159).

<https://doi.org/10.1093/bmb/ldt017>

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 10(2).

<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>

de Melo, K. P., & Camargo, M. (2021). Mechanisms for sperm mitochondrial removal in embryos. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1868, Issue 2). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118916>

El-Hattab, A. W., Craigen, W. J., & Scaglia, F. (2017). Mitochondrial DNA maintenance defects. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1863, Issue 6, pp. 1539–1555). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.017>

Formosa, L. E., & Ryan, M. T. (2018). Mitochondrial OXPHOS complex assembly lines. *Nature Cell Biology*, 20(5), 511–513.

<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0098-z>

Gejman, P. V., Sanders, A. R., & Duan, J. (2010). The role of genetics in the etiology of schizophrenia. In *Psychiatric Clinics of North America* (Vol. 33, Issue 1, pp. 35–66). <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.12.003>

Goudenège, D., Bris, C., Hoffmann, V., Desquiret-Dumas, V., Jardel, C., Rucheton, B., Bannwarth, S., Paquis-Flucklinger, V., Lebre, A. S., Colin, E., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G., & Procaccio, V. (n.d.). *eKLIPse: a sensitive tool for the detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data*.

<https://doi.org/10.1038/s41436-018>

Hall, J., & Bray, N. J. (2022). Schizophrenia Genomics: Convergence on Synaptic Development, Adult Synaptic Plasticity, or Both? In *Biological Psychiatry* (Vol. 91, Issue 8, pp. 709–717). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.10.018>

Howes, O. D., & Murray, R. M. (2014). Schizophrenia: An integrated sociodevelopmental-cognitive model. *The Lancet*, 383(9929), 1677–1687.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62036-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62036-X)

- Insel, T. R. (2010). Rethinking schizophrenia. In *Nature* (Vol. 468, Issue 7321, pp. 187–193). <https://doi.org/10.1038/nature09552>
- Kahn, R. S., & Keefe, R. S. E. (2013). Schizophrenia is a cognitive illness: Time for a change in focus. *JAMA Psychiatry*, *70*(10), 1107–1112. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.155>
- Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., O'Donovan, M., Correll, C. U., Kane, J. M., Van Os, J., & Insel, T. R. (2015). Schizophrenia. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.67>
- Konradi, C., & Öngür, D. (2017). Role of mitochondria and energy metabolism in schizophrenia and psychotic disorders. *Schizophrenia Research*, *187*, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.07.007>
- Maes, M., Plaimas, K., Suratane, A., Noto, C., & Kanchanatawan, B. (2021). First episode psychosis and schizophrenia are systemic neuro-immune disorders triggered by a biotic stimulus in individuals with reduced immune regulation and neuroprotection. *Cells*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/cells10112929>
- Malik, A. N., & Czajka, A. (2013). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*, *13*(5), 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.10.011>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, *17*(1), pp. 10-12. doi:<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- McGrath, J., Saha, S., Chant, D., & Welham, J. (2008). Schizophrenia: A concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiologic Reviews*, *30*(1), 67–76. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxn001>
- Pei, L., & Wallace, D. C. (2018). Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders. In *Biological Psychiatry* (Vol. 83, Issue 9, pp. 722–730). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.018>
- Picard, M., Wallace, D. C., & Burrelle, Y. (2016). The rise of mitochondria in

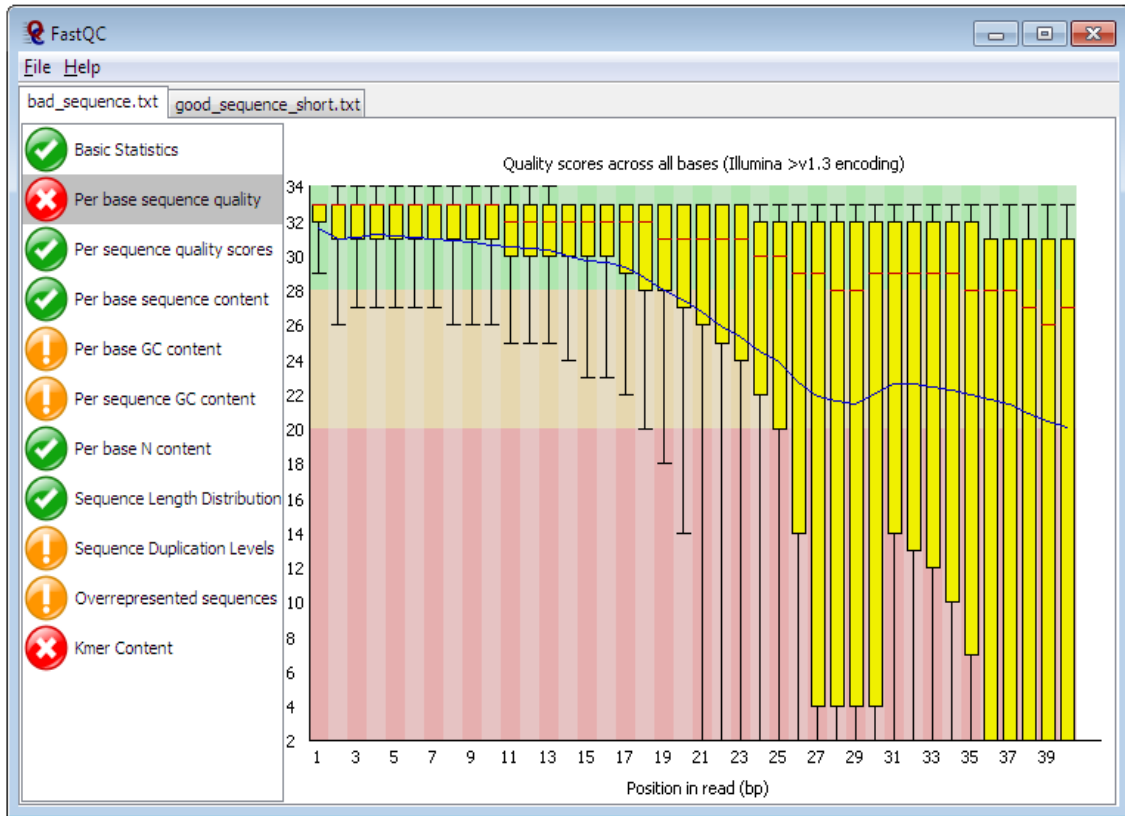
- medicine. In *Mitochondrion* (Vol. 30, pp. 105–116). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.003>
- Price, A. J., Jaffe, A. E., & Weinberger, D. R. (2021). Cortical cellular diversity and development in schizophrenia. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 26, Issue 1, pp. 203–217). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0775-8>
- Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. In *Nature Cell Biology* (Vol. 20, Issue 7, pp. 745–754). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Issue 9, pp. 530–542). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3966>
- Susser, E. S., & Lin, S. P. (1992). *Schizophrenia After Prenatal Exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945*. <http://archpsyc.jamanetwork.com/>
- Uranova, N. A., Vikhreva, O. V., Rakhmanova, V. I., & Orlovskaya, D. D. (2020). Dystrophy of Oligodendrocytes and Adjacent Microglia in Prefrontal Gray Matter in Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00204>
- Valiente-Pallej, A., Tortajada, J., Bulduk, B. K., Vilella, E., Oria Garrabou, G., Muntan, G., & Martorell, L. (2022). *Comprehensive summary of mitochondrial DNA alterations in the postmortem human brain: A systematic review*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Valiente-Pallejà, A., Torrell, H., Alonso, Y., Vilella, E., Muntané, G., & Martorell, L. (2020). Increased blood lactate levels during exercise and mitochondrial DNA alterations converge on mitochondrial dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 220, 61–68.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.03.070>
- Valiente-Pallejà, A., Torrell, H., Muntané, G., Cortés, M. J., Martínez-Leal, R., Abasolo, N., Alonso, Y., Vilella, E., & Martorell, L. (2018). *Genetic and*

clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy009/4798839>

- Van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. In *Experimental Cell Research* (Vol. 322, Issue 1, pp. 12–20). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.008>
- Vassos, E., Pedersen, C. B., Murray, R. M., Collier, D. A., & Lewis, C. M. (2012). Meta-analysis of the association of urbanicity with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 38(6), 1118–1123. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs096>
- Verge, B., Alonso, Y., Valero, J., Miralles, C., Vilella, E., & Martorell, L. (2011). Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. In *European Psychiatry* (Vol. 26, Issue 1, pp. 45–56). <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2010.08.008>
- Wallace, D. C. (2017). A mitochondrial etiology of neuropsychiatric disorders. In *JAMA Psychiatry* (Vol. 74, Issue 9, pp. 863–864). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.0397>
- Wallace, D. C. (2018). Mitochondrial genetic medicine. In *Nature Genetics* (Vol. 50, Issue 12, pp. 1642–1649). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0264-z>
- Wei, W., & Chinnery, P. F. (2020). Inheritance of mitochondrial DNA in humans: implications for rare and common diseases. *Journal of Internal Medicine*, 287(6), 634–644. <https://doi.org/10.1111/joim.13047>
- Yung, A. R., Yung, A. R., Pan Yuen, H., McGorry, P. D., Phillips, L. J., Kelly, D., Dell'olio, M., Francey, S. M., Cosgrave, E. M., Killackey, E., Stanford, C., Godfrey, K., & Buckby, J. (2005). Mapping the Onset of Psychosis: The Comprehensive Assessment of At-Risk Mental States. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 39(11–12), 964–971. <https://doi.org/10.1080/j.1440-1614.2005.01714.x>

ANEXOS

Anexo 1. Interfaz del programa de control de calidad FastQC y listado de módulos (Andrews, 2010).



Anexo 2. Interfaz del programa eKLIPse y selección de parámetros para la detección de deleciones en el ADNmt (Goudenège et al., 2019).

The screenshot displays the eKLIPse web interface with the following sections and controls:

- Title** and **Path** fields at the top.
- Alignment (BAM/SAM)** section with buttons for **ADD**, **DEL**, and **TEST**.
- Reference genome** section with radio buttons for **CRS**, **rCRS**, **Mouse**, and **Other**.
- Results directory** section with a text input field containing `/home/dooguy/eKLIPse_42f64cd87ae9` and a search icon.
- Advanced parameters** section with a dropdown arrow and a table of settings:

eKLIPse temp directory	<input type="text" value="/tmp/eKLIPse_42f64cd87ae9"/>	<input type="text" value="4"/>	
Downsampling threshold	<input type="text" value="100000"/>	Number of Threads	
Minimum read quality	<input type="text" value="20"/>	Deletion position shift	<input type="text" value="5"/>
Mapped part length	<input type="text" value="10"/>	Soft-clip min length	<input type="text" value="15"/>
Blast %id threshold	<input type="text" value="80"/>	Blast %cov threshold	<input type="text" value="70"/>
Blast gap open cost	<input type="text" value="0"/>	Blast gap ext. cost	<input type="text" value="2"/>
Min deleted mtDNA length	<input type="text" value="100"/>		

At the bottom center, there is a large circular **START** button.

Anexo 3. Representación de los grupos control y pacientes de esquizofrenia, su edad y número de deleciones detectadas. Incluyendo las 2 muestras control que no pasaron el filtro de calidad.

GROUP	SUBJECT_ID	Age	Gender	Read Depth	Detected Deletion #	Min freq	Max freq
Control	175533	37	Male	773,619289	0	-	-
Control	H-206091	34	Male	1390,965297	1		0,1486465031
Control	H-137694	29	Male	1469,061138	5	0,04504162966	0,3083528493
Control	B-242088	73	Male	1053,24226	20	0,06538153653	1,358637625
Control	168654	44	Male	1418,751886	16	0,05113348531	1,646128952
Control	95754	46	Male	1327,338222	0	-	-
Control	71457	56	Male	2083,052206	1		0,08261713638
Control	B-81897	52	Female	87,57203211	0	-	-
SCZ	60051	46	Female	2237,203573	0	-	-
SCZ	126330	32	Male	1299,958054	5	0,2378709374	0,5906003396
SCZ	F-133221	37	Male	2288,985274	39	0,02052676377	0,2988558619
SCZ	F-17112	72	Male	808,2199288	0	-	-
SCZ	G-61218	26	Male	594,8095238	0	-	-
SCZ	G-77409	29	Male	1423,189571	1	0,1672105542	
Media:				1303,997732		0,1	0,6
Total:					88		

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Jordi Mengual Martí

Nom i Cognoms del Tutor/a: Juan Bautista Fernández Larrea

Data de la entrevista amb l'alumne: Dimarts 3 de Maig de 2022, i comunicacions via correu electrònic.

Recomanacions durant el seguiment:

Reestructurar la introducción añadiendo el contexto más general al inicio, y explicando los conceptos justos y necesarios para entender el objetivo, los resultados y las conclusiones. Hacer el *power point* a la vez que la memoria escrita y utilizar en ella figuras que estén en la memoria escrita. Correlacionar el número de objetivos y con el de conclusiones. Titular los resultados asertivamente, informando en el título del resultado, en lugar de informar sobre el método utilizado.

Observacions:

El alumno ha tomado la iniciativa en contactar con el tutor y ha propuesto la estructura inicial de la memoria escrita; ha consultado varias veces sobre la forma y contenido de los distintos apartados de la memoria y ha seguido las recomendaciones del tutor.

Observacions Darrera revisió:

Hemos acordado en revisar la versión más avanzada de la memoria escrita el martes 31 de mayo de 2022.

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 25 de Mayo de 2022