

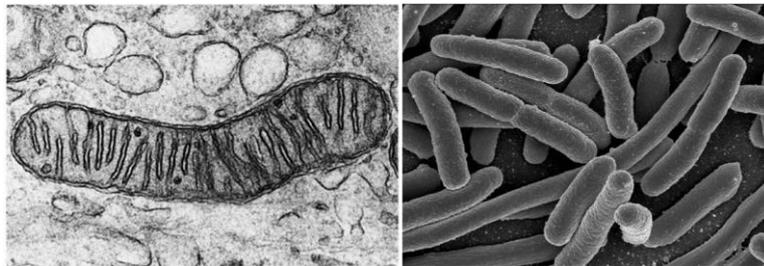
## Indagando en el origen de las mitocondrias

Alejandro Martorell Riera

Actualmente hay pocos grupos de investigación que se dedican al estudio del origen de las mitocondrias. Todas las aportaciones que se dan a la teoría endosimbiótica o a la teoría que apunta que las mitocondrias provienen de una especialización del retículo endoplasmático, provienen del trabajo elaborado con el fin de comprender distintos aspectos de estos orgánulos. Estos pueden ser el estudio de nuevos fármacos contra el cáncer, la búsqueda de terapias alternativas contra enfermedades neurodegenerativas o la simple investigación de la propia mitocondria para comprender su genética y biología molecular.

En la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona encontramos varios grupos que trabajan en las mitocondrias, estos son los dirigidos por el Dr. Manuel Reina/Dr. Francesc Soriano, Dr. Eduardo Soriano y el Dr. Francesc Villaroya, entre otros.

Este artículo va dirigido a todas las personas que, con muchas horas de dedicación y esfuerzo invertido, van aportando, poco a poco, sus granitos de arena que ayudan a que la comunidad científica se dibuja un lienzo sobre el origen evolutivo de las mitocondrias.



Comparación entre la forma de una mitocondria (izquierda) con las bacterias (derecha)

### ¿Qué son las mitocondrias?

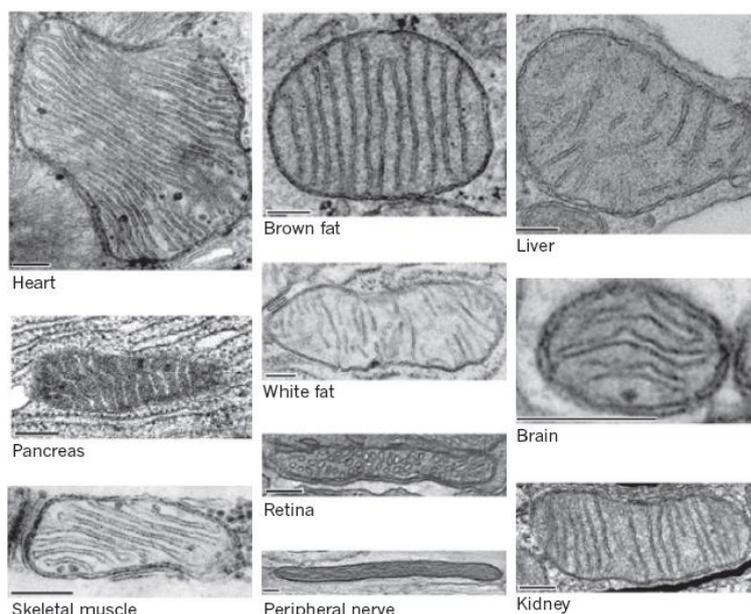
Si cerramos los ojos y pensamos en las mitocondrias, inevitablemente tenderemos a imaginar una estructura en forma de judía con cierto aspecto bacteriano, concretamente parecido a un bacilo. Ésta imagen no se aleja nada de la realidad ya que es exactamente como las vemos al microscopio. De hecho, el origen de la palabra mitocondria proviene del alemán '*Fadenkörper*' (cuerpos de hilos) y del griego '*mitos*' (hilos) y '*chondrion*' (granos pequeños), siendo éste último el que arraigó en la comunidad científica. Concretamente fue acuñado en 1898 por el microbiólogo Carl Benda, refiriéndose al aspecto que presentaban las mitocondrias observadas durante la espermatogénesis, mecanismo encargado de la producción de espermatozoides.

Las mitocondrias son, quizás, los orgánulos más fascinantes de la célula y también los que nos plantean todavía muchas preguntas por resolver. Forman una vasta red intracelular que está en perpetua comunicación con el núcleo, el retículo endoplasmático, el citoesqueleto, los peroxisomas, entre otras estructuras. Las mitocondrias no son entes marginados, si no que su

estado es continuamente evaluado y corregido cuando es necesario. De hecho, están permanentemente fusionándose y fisionándose. Estos procesos se están estudiando con gran esmero y reciben el nombre de dinámica mitocondrial. La comprensión de la maquinaria involucrada en el buen funcionamiento de estos orgánulos, ayudará a comprender muchas enfermedades afectadas directamente por el estado de las mitocondrias

### Historia e interés médico

Su aspecto no ha sido lo único que nos ha atraído sobre estos orgánulos tan característicos. Durante los últimos 150 años, la investigación de las mitocondrias ha influenciado en numerosas disciplinas científicas. En 1890, el patólogo e histólogo alemán Richard Altmann fue el primero en atreverse a describir las mitocondrias como '*elementary organism*' que vivían dentro de las células y eran responsables de ciertas funciones vitales. El estudio de estos orgánulos fue enfocado desde una perspectiva fisiológica a través de la cual se fue comprendiendo qué papel ocupaban las mitocondrias en las células eucariotas. Las primeras funciones básicas en describirse fueron el ciclo de Krebs (ruta metabólica que forma parte de la respiración celular), la fosforilación oxidativa (proceso metabólico que acaba produciendo ATP, la principal molécula de intercambio de energía de la célula), el metabolismo de ciertos aminoácidos y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (dos vías involucradas en la obtención final de ATP). Las primeras imágenes sobre su estructura aparecieron en los años cincuenta con el uso del microscopio electrónico. Estos fueron los trabajos desarrollados por el biólogo rumano George Palade y el físico e histólogo sueco Fritiof Sjöstrand en los que observaron distintos elementos estructurales de estos orgánulos como la membrana externa, la membrana interna y las crestas mitocondriales (**Figura 1**). A diferencia del microscopio convencional que utiliza luz para funcionar, los microscopios electrónicos utilizan electrones. Su funcionamiento se basa en un cañón de electrones que expulsa electrones que son acelerados por un alto voltaje y focalizados sobre la muestra que quieres observar mediante lentes magnéticas. Diez años después de Palade y Sjöstrand, en 1960, se descubrió el ADN mitocondrial, lo que impulsó un interesante debate ya iniciado años atrás sobre el origen de las mitocondrias. Finalmente,



otros descubrimientos como la importación de proteínas desde el citoplasma a las mitocondrias y el papel de estos orgánulos en el control de la apoptosis (muerte celular programada), han promovido de forma considerable el interés hacia su investigación.

**Figura 1.** Heterogeneidad mitocondrial en distintos tejidos (Vafai SB, and Mootha VK, 2012).

La técnica del *live cell imaging* es el estudio de células vivas a tiempo real. Es decir, se utiliza un cierto tipo de microscopio que van equipados con un incubador que mantiene la temperatura a 37°C y a un 5% de CO<sub>2</sub>, las condiciones idólicas para la mayoría de tipos celulares. Mientras mantienes el cultivo vivo, puedes estudiar distintos aspectos como el comportamiento de las mitocondrias bajo el efecto de un cierto componente. Los avances en esta técnica han ayudado a comprender que las mitocondrias son orgánulos complejos que se organizan formando redes interconectadas entre ellas. Forman un sistema extremadamente dinámico que se adapta según las necesidades celulares. El equilibrio bioenergético de la célula está estrechamente relacionado con la buena disposición y regulación de la red mitocondrial.

El interés en el estudio y la comprensión de las mitocondrias desde una perspectiva médica empezó en 1959 cuando Rolf Luft, un endocrinólogo sueco, describió el caso de una mujer joven con un metabolismo acelerado, que se caracteriza por sudoración profusa y pérdida de peso junto a un alto consumo de calorías. Las pruebas demostraron un desacoplamiento de las mitocondrias en el paciente. Actualmente se conocen más de 150 síndromes genéticos distintos relacionados con las mitocondrias. En los últimos años se ha relacionado la mala regulación de la dinámica mitocondrial con múltiples patologías de índole muy diversa como enfermedades neurodegenerativas crónicas (Alzheimer, Parkinson, Huntington y ELA) y agudas (ictus, ataques epilépticos y traumatismos craneales), trastornos multifactoriales comunes (diabetes), cáncer, sida, etc.

## Teoría endosimbiótica

### *Vestigios de una Tierra ancestral*

Remontémonos al pasado. Nos encontramos en una Tierra “parecida” a la actual, con tres partes de agua y una de masa terrestre formada por grandes masas continentales. Hace más de 1000 millones de años nuestro planeta era testigo del cambio atmosférico acaecido por la masiva acumulación de oxígeno.

A medida que el oxígeno atmosférico aumentaba, aparecieron bacterias no fotosintéticas que respiraban y que dependían completamente del oxígeno para su metabolismo. Esas bacterias aeróbicas de vida libre, que tenían mecanismos respiratorios parecidos a las mitocondrias, establecieron asociaciones con organismos anaeróbicos más grandes. Estas asociaciones primero fueron casuales, después se volvieron más estables y, finalmente, permanentes. Ésta permanencia fue debida al éxito que se estableció entre ambos organismos. De tal modo que, en la actualidad, una célula eucariota, pasando por las levaduras y nuestras propias células, no podrían vivir sin estos orgánulos y, de forma inversa, las mitocondrias no serían capaces de sobrevivir sin el cobijo de un huésped.

### *Principios de evolución*

El trabajo de síntesis de Darwin nos demostró que la evolución de la vida en la tierra está gobernada por causas que son comprensibles para la mente humana. Gracias a él ahora sabemos que toda esta diversidad no apareció de golpe y que no es debida simplemente al azar, sino que es principalmente el resultado de un proceso gradual de adaptación de los seres vivos a la diversidad de medios que se encuentran en la naturaleza.

Jean-Baptiste-Pierre-Antoine de Monet, Caballero de Lamarck o popularmente conocido como Lamarck (1744 – 1829) fue el primer evolucionista recordado como tal. Siempre se le presenta y recuerda como el científico equivocado y como el malo de la película. Por el otro lado aparece Charles Robert Darwin (1809 – 1882), el héroe. Según Lamarck, existe una tendencia innata en todos los organismos para hacerles más complejos. Una tendencia regida por las condiciones locales del ambiente que inducen cambios o adaptaciones. En su obra *Filosofía zoológica* expone que cuando el ambiente cambia, éste produce cambios coordinados en los animales, que se traducen en alteraciones de su ‘actividad, esfuerzo y costumbres’. De forma resumida se conoce como la teoría de la herencia de los caracteres adquiridos. Darwin, basándose en la hipótesis del uniformitarismo de James Hutton (1726 – 1797) llegó a la conclusión que las variaciones dentro de cada especie eran más que pequeños ajustes adaptativos a las condiciones locales. De aquí substrajo los principios de descendencia y modificación con los que defendió que las especies actuales eran las descendientes de las fósiles, las cuales, a lo largo del tiempo, se habían modificado para adaptarse a las condiciones cambiantes del medio.

Parece ser que lo que más se asemeja a la realidad son las teorías de Darwin. En cierto modo estaría en lo cierto: la selección natural es una verdad fundada en sólidos pilares de experimentación. Por ello se olvidan las teorías de Lamarck. Realmente, la obra de Darwin es un excelente trabajo de síntesis dónde se recogen todas las ideas de la época y se mezclan con armonía para extraer la teoría de la que todos hemos oído hablar. A pesar de ello, no hay que olvidar todas las demás personalidades (muy pocas han sido citadas aquí) que aportaron todo su saber. Una de ellas fue Alfred Wallace (1823 – 1913) quién, aunque parezca increíble, dedujo el mecanismo de la selección natural en 1858 y se lo comunicó a Darwin por manuscrito. Éste se encontraba por la mitad de su ahora famosísimo libro *Sobre el origen de las especies mediante la selección natural* (1859); que en realidad es un resumen de lo que pensaba escribir. Lo curioso es que ambos publicaron un artículo sobre ello en la revista de la Sociedad Linneana ese mismo año.

El lamarckismo, por tanto, se equipara con al error. Pero las corrientes científicas han cambiado. Cada vez más se está comprobando que la unificación de sinergias entre disciplinas están favoreciendo la investigación y aportan muchos más datos que antaño. Un ejemplo de ello es el estudio de las mitocondrias y su increíble relación y adaptación a la célula. En defensa de todo lo anterior se quiere destacar lo que la bióloga Lynn Margulis junto a su hijo Dorian Sagan reflejaron en su libro *Captando genomas* que nos haría de hacer pensar si la película sobre la evolución incluía dos protagonistas buenos en vez de un villano y un héroe:

*“Jean-Baptiste Lamarck estaba en lo cierto: la herencia de características adquiridas ocurre, pero tan sólo cuando dichas características están determinadas por los genomas de organismos adquiribles. Charles Darwin también tenía razón: las nuevas especies aparecen cuando los organismos nuevamente adquiridos son integrados, dejan descendencia, y son perpetuados por la selección natural. El origen simbiogenético de las especies se basa firmemente en el trabajo de ambos, Darwin y Lamarck”*

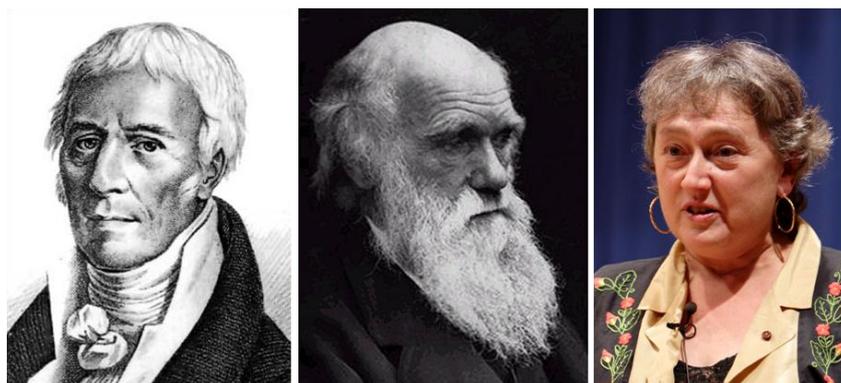


Figura 2. Lamarck, Darwin y Margulis, en este orden.

A lo largo de la historia sabemos que el azar ha jugado un papel crucial en la evolución, dando lugar a mutaciones o variaciones que han promovido la adquisición de nuevos caracteres, tanto de índole metabólica como adaptacional, suscitando la selección natural.

Es posible que la aparición de las mitocondrias también se haya regido por estos principios. En la introducción se ha comentado como Altmann describía con sus propias palabras el origen simbiótico de las mitocondrias clasificándolas como '*elementary organism*'. De hecho, más adelante otros investigadores como el ruso K. S. Mereskovski (1909), el francés P. Portier (1919) y el americano I. Wallin (1927), se arriesgaron a afirmar una teoría complicada en terreno pantanoso. No fue hasta 80 años después de Altmann que Lynn Margulis publicara su revelador artículo que impactó a toda la comunidad científica asentando, de una vez por todas, los principios teóricos sobre la simbiosis de las mitocondrias y también los cloroplastos.

Margulis defiende la herencia de los caracteres adquiridos postulada por Lamarck, pero a diferencia de este, considera que no son rasgos lo que se heredan, sino genomas o conjuntos de genomas adquiridos en vida por los individuos debido a la simbiogénesis. ¿No son las mitocondrias, por tanto, un ejemplo de evolución por caracteres adquiridos? En el siguiente apartado se volverá a hablar sobre este concepto y se destacará el papel de la Genómica para sacar luz al posible origen de las mitocondrias y la transferencia de información al núcleo.

### ***La Genómica en defensa de la simbiosis***

Las mitocondrias son unos orgánulos semi-autónomos y parecen retener muchos vestigios de sus posibles ancestros bacterianos. Miles de millones de años de evolución expansiva y reductiva han anclado las mitocondrias dentro de las células eucariotas de una forma sumamente eficiente. Las principales similitudes son las siguientes:

- El tamaño de las mitocondrias medida en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), 1 metro son 1 millón de micrómetros, es muy parecido al de las bacterias.
- Las mitocondrias se dividen y fusionan creando una compleja red interconectada, también como hacen ciertos tipos de bacterias.
- En la célula hay unos complejos moleculares encargados de sintetizar proteínas a partir de la información genética llamados ribosomas. Éstos se encuentran por todo el citoplasma o interior de la célula y están formados de proteínas y ARN ribosómico (ARNr). Cuando la información genética abandona el núcleo en forma de ARN mensajero (ARNm), éste es captado por los ribosomas y, con la participación del ARN de transferencia (ARNt), se sintetizan las proteínas siguiendo un código pre-establecido, el famoso código genético. El código fue descrito por el bioquímico estadounidense Marshall Nirenberg junto a sus colegas Har Khorana y Robert Holley. Sus investigaciones fueron compensadas con el Premio Nobel de Medicina en 1968. Ellos establecieron que el código genético representaba cómo la información de nuestro ADN podía traducirse a proteínas. Como la secuencia del ADN se compone de cuatro tipos distintos de moléculas llamadas bases nitrogenadas (A, T, C y G), vieron que cada grupo de tres de estas moléculas (llamado codón) daban lugar a un aminoácido, la molécula más simple que, encadenada, forma la estructura de las proteínas (**Figura 3**). Esta traducción ocurre en los ribosomas de la célula pero, como se ha comentado en la introducción, en 1960 se descubrió que las mitocondrias tenían su propio ADN. Las investigaciones permitieron descubrir que también tienen sus propios ribosomas que son de un tamaño prácticamente igual que el de las bacterias y

más pequeños que los del citoplasma celular. Además, los ribosomas mitocondriales son sensibles a los mismos antibióticos que se utilizan para inhibir los ribosomas de ciertos tipos de bacterias que causan enfermedad.

**Figura 3.** Representación del código genético. Cada tres bases se forma un codón que da lugar a un tipo de aminoácido.

		Segunda base				
		U	C	A	G	
P r i m e r a  b a s e	U	UUU } Fen	UCU } Ser	UAU } Tir	UGU } Cis	U C A A G
		UUC } Fen	UCC } Ser	UAC } Tir	UGC } Cis	
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } Alto	UGA } Alto	
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } Alto	UGG } Trp	
C	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U C A A G
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Glu	CGA } Arg	
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Glu	CGG } Arg	
A	A	AUU } Ile	ACU } Tre	AAU } Asn	AGU } Ser	U C A A G
		AUC } Ile	ACC } Tre	AAC } Asn	AGC } Ser	
		AUA } Ile	ACA } Tre	AAA } Lys	AGA } Arg	
		AUG } Met inicio	ACG } Tre	AAG } Lys	AGG } Arg	
G	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gli	U C A A G
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gli	
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gli	
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gli	

- Otra similitud a destacar es que las mitocondrias, al tener su propio ADN, también tienen sus propias ADN polimerasas, unas proteínas que intervienen en el proceso de replicación o copia del ADN. Las polimerasas mitocondrias, a diferencia de las que se hallan en el núcleo de la célula, se asemejan a un antepasado viral.

El genoma o ADN mitocondrial (ADNmt) más pequeño que se conoce tiene un tamaño de alrededor de 6 kb, es el de las mitocondrias del *Plasmodium falciparum*. Solamente codifica para 3 proteínas, 2 ARNr y ningún ARNt. En contrapartida, hay muchas especies de plantas terrestres donde el ADNmt se ha expandido en tamaño y alcanzan una media de 200 kb. El ADNmt más grande que se conoce, con un tamaño superior a los 11000 kb, corresponde a *Silene conica*, una especie de planta con flores de la familia de las cariofiláceas.

En humanos, el ADNmt es de origen materno y solamente codifica 13 proteínas, 22 ARNt y los 2 ARNr requeridos para la traducción. Se ha calculado que los genes del resto del proteoma mitocondrial, es decir, el conjunto total de proteínas que componen y se hallan en la mitocondria (unas 1100), se han transferido al núcleo de la célula. ¿No es, sin duda, un ejemplo claro de transferencia de caracteres, tal como defendía Lynn Margulis, siendo estos los genes mitocondriales pasados al núcleo de la célula?

El hilo histórico para explicar el origen de estas 1100 proteínas es bastante complejo. Para ello debemos centrarnos en los múltiples trabajos desarrollados por M.W. Gray y sus colegas que quedan resumidos en un artículo de 2012. La bioinformática es una nueva disciplina de hace pocos años que ha promovido la sinergia o unificación de la biología y la informática. Se han desarrollado multitud de software distinto capaz de procesar cantidades ingentes de información. El primer genoma que se secuenció fue de la bacteria *Haemophilus influenzae*, la causante de la meningitis, la neumonía y otras infecciones. Secuenciar es una técnica que permite conocer todo el material genético de un individuo letra por letra (A, T, G y C). Desde el año 2001 contamos con la primera secuencia del Genoma Humano y después de ésta han ido viniendo la de muchísimas especies más como hongos, plantas, bacterias y animales. Además de secuenciar el ADN genómico, es decir, el que se haya en el núcleo de la célula, también se pueden secuenciar todos los tipos de ARN. Se han creado bases de datos enormes donde se

puede tener acceso a toda la información que se ha codificado y obtenido. A raíz de ello, han aparecido potentes programas que permiten establecer conexiones entre secuencias y estudiar el grado de similitud entre ellas. Por ejemplo, si un laboratorio secuencia el ADN genómico de una bacteria recogida en una muestra de agua, le interesa saber si esa secuencia ya se ha obtenido con anterioridad por otros científicos o, por el contrario, es nueva. Para ello, cogen su nueva secuencia y gracias a estos programas, la comparan con todas las bases de datos existentes de secuencias de ADN. En unos segundos podrá saber el resultado. Lo que hizo Gray y sus colegas fue utilizar herramientas bioinformáticas para el alineamiento de las secuencias de los ARNr mitocondriales elucidando de esta forma la similitud de éstos con el dominio Bacteria, concretamente se ha apuntado a las  $\alpha$ -Proteobacterias, y no con el Arquea o el Eucariota.

El sistema de clasificación de todos los organismos en tres dominios (Bacteria, Arquea y Eucariota), fue establecido por el microbiólogo estadounidense Carl Woese en 1977 (Figura 4). Para esta clasificación se basó justamente en las diferencias encontradas en la secuencia del ARN ribosómico. El dominio Bacteria son microorganismos unicelulares procariontes, las bacterias comunes. Las bacterias que pertenecen al dominio Arquea se las considera un grupo independiente debido a su historia evolutiva y sus muchas diferencias bioquímicas que tienen en comparación con el dominio Bacteria. Las arqueas son, en general, más cercanas a las células de los organismos del dominio Eucariota (donde estamos nosotros mismos). La principal característica de las arqueas con todos los demás organismos, es que pueden sobrevivir en ambientes extremos de altas o bajas temperaturas, grandes concentraciones de sal o ciertos metales, etc.

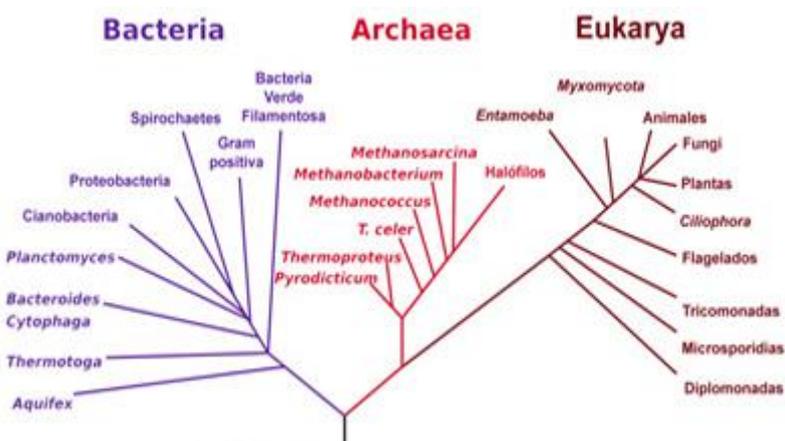


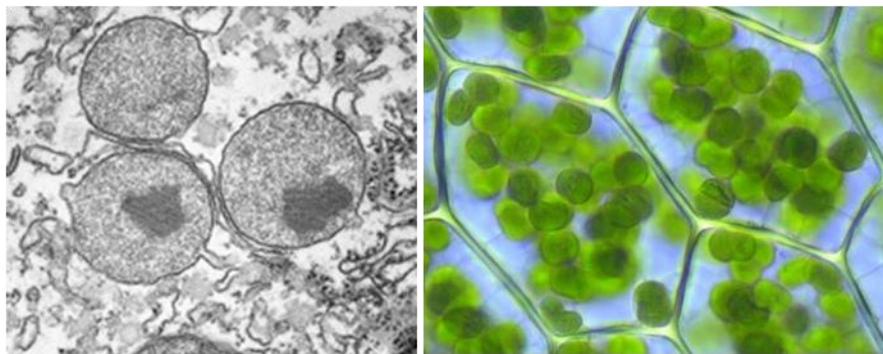
Figura 4. Árbol filogenético de la vida donde se representan los tres dominios (Bacteria, Arquea y Eucariota).

Posteriores análisis fueron los responsables de señalar incluso que la especie bacteriana más parecida a las mitocondrias es *Rickettsia prowazekii*. Las bacterias del género *Rickettsia* son parásitos intracelulares obligados y contienen un pequeño genoma que transcribe 834 genes. Por eso se utilizó como candidato para secuenciar y alinear con el ADNmt de los protozoos *Reclinomonas americana* (el genoma mitocondrial considerado más bacteriano). Las conclusiones de los estudios han llegado a señalar que, de las 1100 proteínas mitocondriales, unas 400 tienen un origen proteobacteriano relacionado con *R. prowazekii*. Alrededor de otras

400 proteínas debieron ser adquiridas de otros organismos bacterianos (estimado por estudios de homología de secuencias con otros procariontes). El resto, 300 proteínas, no presentan ninguna homología con ningún genoma bacteriano secuenciado hasta el día de hoy y se cree que son genes innovados por el propio huésped para poder albergar al simbiote. A pesar de las muchas similitudes a nivel funcional que presentan las mitocondrias y *R. prowazekii*, lógicamente hay aspectos discordantes entre una y otra derivados de los distintos caminos evolutivos que han seguido hasta el día de hoy, por lo que el estudio sigue abierto.

En el reino de las plantas nos encontramos con un panorama algo más complejo. Se han descrito muchas diferencias que atañen al número y a las características de las mitocondrias. Por ejemplo, análisis proteómicos de mitocondrias aisladas demostraron variaciones entre órganos y diferentes tipos de tejidos.

Los peroxisomas son otro tipo de orgánulos de la célula que contienen un cierto tipo de proteínas enzimáticas encargados del metabolismo de los lípidos. Los cloroplastos, por otro lado, solo se encuentran en el interior de las células eucariotas de plantas y ciertas algas. Son los orgánulos encargados de la fotosíntesis, la reacción química que utilizan estos organismos para convertir la materia inorgánica en materia orgánica gracias a la energía que aporta la luz. Los cloroplastos son los encargados de dar la tonalidad de color verde a las plantas y las algas por la clorofila que contienen, una familia de pigmentos. Además, igual que las mitocondrias, los cloroplastos también tienen su propio material genético y, por tanto, se cree que también aparecieron por endosimbiosis. En la **Figura 5** se representa la estructura de peroxisomas y un conjunto de células vegetales llenas de cloroplastos.



**Figura 5.** En la fotografía de la izquierda se representan peroxisomas observados por microscopía electrónica y a la derecha varias células de planta llenas de cloroplastos.

En relación con lo anterior cabe recalcar que en las últimas décadas se ha demostrado que una cierta variedad de proteínas son compartidas entre las mitocondrias y los peroxisomas (20 proteínas) y con los cloroplastos (100 proteínas). Estas proteínas engrosarían las 1100 codificadas en el núcleo. En plantas, esta dirección dual de proteínas es realmente importante en la biogénesis mitocondrial durante la germinación ya que el significado biológico reside en que muchas de estas proteínas están involucradas en el metabolismo del ADN y el ARN de ambos orgánulos. Se ha observado que durante la germinación, el crecimiento y la división de los cloroplastos y las mitocondrias están teniendo lugar al mismo tiempo. Concretamente, se vio que en las primeras fases de la germinación, tanto las mitocondrias como los cloroplastos

presentan tamaños pequeños y disminuyen en número, y hacia el final de la germinación son a la vez más numerosos y más grandes, recuperando sus morfologías características. Por lo tanto, un papel que se atribuye a estas proteínas compartidas es que pueden coordinar la biogénesis de ambos orgánulos durante el desarrollo de la planta.

### ***Composición lipídica de las mitocondrias y su similitud con bacterias***

En 2006 se describió por primera vez el papel de una enzima fosfolipasa en la regulación de las mitocondrias. Se trata de la fosfolipasa D mitocondrial (MitoPLD), una proteína de membrana de estos orgánulos que promueve la adherencia de las membranas de dos mitocondrias mediante la hidrólisis de la cardiolipina para generar ácido fosfatídico. El análisis filogenético reveló que MitoPLD es un miembro divergente y ancestral más similar a la familia de la cardiolipina sintasa bacterianas y a Nuc, una endonucleasa bacteriana que también es miembro de la superfamilia de PLD. Los lípidos cardiolipina son bacterianos, pero también se encuentran en las membranas de las mitocondrias. Nuevamente se hace hincapié en el origen simbiótico de estos orgánulos.

La importancia de estas fosfolipasas de origen bacteriano o MitoPLD reside en que si se elimina su expresión se promueve que las mitocondrias se fragmenten, mientras que su sobre-expresión genera una red de mitocondrias sobre-fusionadas. Además, se ha detectado que MitoPLD debe interactuar con la principal proteína de fusión mitocondrial, mitofusina 2, para llevar a cabo su función.

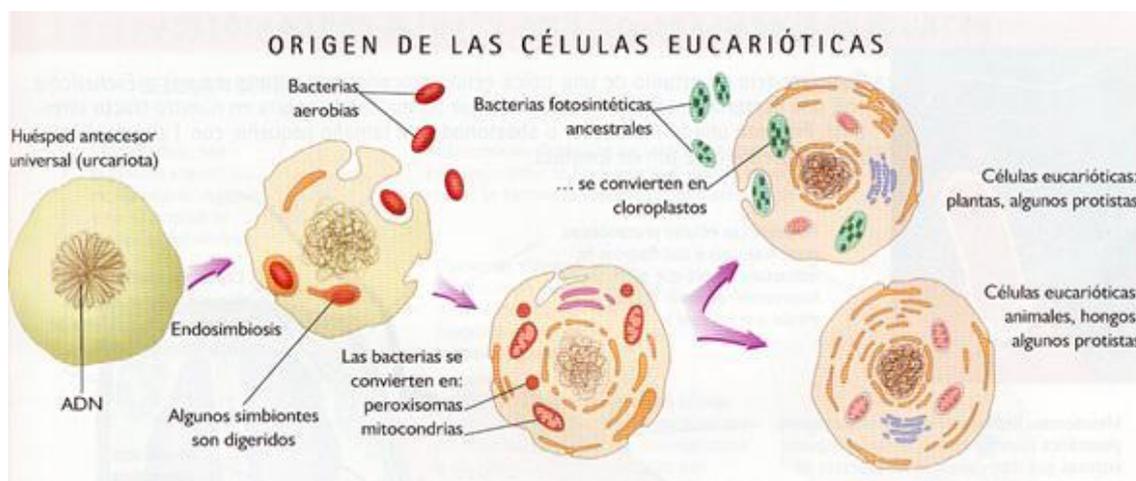
Para entender este apartado, lo básico que debemos conocer sobre dinámica es que las mitocondrias son unos orgánulos que continuamente se están fusionando y fisionando. El equilibrio en esta red es muy importante para el buen funcionamiento tanto del orgánulo como de la célula. Las principales proteínas son las mitofusinas (Mfn) que llevan a cabo la fusión de las membranas externas de las mitocondrias y Drp1, que se encarga de fisionar/dividir las mitocondrias. La función de estas dos proteínas se ha comparado con otros sucesos que ocurren en la célula y se han encontrado similitudes. Las mitofusinas llevan a cabo la fusión de una forma muy similar a los complejos proteicos llamados SNARE que se encargan de fusionar membranas en, por ejemplo, la exocitosis (el proceso celular por el cual las vesículas del citoplasma de la célula se liberan al exterior). Por otro lado, Drp1 trabaja de forma análoga a las dinaminas celulares que se encargan de los procesos de endocitosis (mecanismo por el que la célula introduce moléculas recubriéndolas con una vesícula).

Como se ha mencionado anteriormente, la cardiolipina se encuentra exclusivamente en las mitocondrias. En concreto, el 10-20% de este lípido se halla en la membrana externa de los orgánulos, particularmente en los puntos donde las membranas externa e interna están más próximas, dando a pensar en su importancia para el proceso de fusión. En células COS7 (fibroblastos de riñón de mono), se ha calculado que cada 24 minutos se genera una fusión y 1,3 minutos después tiene lugar una fisión. Esto demuestra que algo que ocurre durante el proceso de fusión debe inducir o promover poco después un proceso de fisión.

Se cree que esta regulación debe residir en la señalización de los lípidos de membrana. La microscopía electrónica reveló que el efecto de la inmovilización o acercamiento mitocondrial crea una interfaz en la que las mitocondrias adyacentes están separadas por 16 nm. La sobreexpresión de MitoPLD también genera una yuxtaposición de las mitocondrias. Sin embargo, en este caso las mitocondrias están separadas por solo 6 nm. Por lo tanto, se propuso que el evento impulsado por la unión de las Mfn conduce a que MitoPLD produzca PA en las membranas externas mitocondriales estrechando la yuxtaposición entre dos mitocondrias, lo que provoca un acercamiento aún más estrecho de las membranas para facilitar la actividad de fusión de las mitofusinas. Finalmente, como el PA es convertido a DAG mediante la acción de las unas enzimas específicas llamadas lipinas, el proceso de fusión promovido por PA se interrumpe y se cree que promueve la fisión.

### Modelos de simbiosis

Actualmente se barajan dos posibles modelos teóricos para explicar el proceso de simbiosis (Figura 6). Estos son el *symploysis scenario* y el *archezoan scenario*. El primero de ellos incluiría una célula arquea huésped que albergaría por simbiosis a una  $\alpha$ -Proteobacteria que generaría las mitocondrias. A lo largo de la evolución aparecerían los distintos compartimentos celulares y el núcleo para dar lugar a la célula eucariota que todos conocemos. El segundo escenario haría referencia a una célula eucariota primitiva que haría de huésped de una proto-mitocondria.



**Figura 6.** Esquema resumen del proceso de simbiosis que dio lugar a las células eucariotas actuales con mitocondrias y cloroplastos, éste último en el caso de plantas y algas.

El *archezoan scenario* se apoya en los análisis comparativos de secuencias que han revelado que algunas de las maquinarias moleculares claves de los eucariotas, y no sólo los que están directamente involucrados en el procesamiento de la información, pueden ser derivadas de ancestros arquea. De todos modos, la comunidad científica parece declinarse más por el *symploysis scenario*. Para empezar, en el *archezoan scenario*, no hay fuerza selectiva plausible detrás de la evolución del núcleo, y, en particular, la elaborada estructura del complejo del poro nuclear. Este complejo proteico permite la comunicación entre el interior y exterior del núcleo celular. Por el contrario, la hipótesis del *symploysis scenario* ofrece un

factor selectivo plausibles: la defensa contra la invasión del genoma huésped, una característica típica y abundante en las  $\alpha$ -Proteobacterias, que podría haber sido desencadenado como consecuencia de la exposición del genoma del huésped arquea al ADN endosimbionte bacteriano.

Para terminar este apartado, en enero de 2014 le pregunté al Dr. Toni Gabaldón, investigador del Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona, cuál es su opinión sobre el posible origen evolutivo de las proteínas apoptóticas y qué nos ha mostrado el estudio de los genomas y los proteomas sobre el origen endosimbiótico de las mitocondrias. Agradeciéndole enormemente su aportación, contestó lo siguiente basado en sus años de profesionalidad y estudio sobre estos orgánulos:

*“Las mitocondrias juegan un papel central en la apoptosis. El origen evolutivo de algunas de las proteínas implicadas puede trazarse hasta el ancestro bacteriano de estos orgánulos. Por otro lado, las investigaciones más recientes nos muestran que la muerte celular programada también aparece en varios organismos unicelulares. Todo esto sugiere que los mecanismos más básicos de muerte celular programada existían en organismos bastante primitivos y que el origen de la multicelularidad resultó en una complejificación de las rutas de señalización por medio de la diversificación y la duplicación de componentes existentes y reclutamiento de nuevos”*

Biografía e intereses científicos del Dr. Toni Gabaldón:

1997-2001 Investigador en el departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universitat de València.

2001-2005 Doctorado en Bioinformática, en los centros CMBI y NCMLS en la Universidad de Nijmegen (Países Bajos).

2005-2007 Beca Postdoctoral de EMBO en el Departamento de Bioinformática del CIPF en (Valencia).

2007-2008 Investigador FIS en el Departamento de Bioinformática del CIPF en (Valencia). Desde septiembre de 2008 Jefe de Grupo en el Programa de Bioinformática y Genómica, en el CRG.

El interés de la investigación principal del grupo es entender las complejas relaciones entre las secuencias del genoma y los fenotipos y cómo estas dos características se desarrollan a través de las especies. Por lo general, utilizan enfoques de filogenia de gran escala que permiten mirar la evolución de los genomas desde la perspectiva de la totalidad de sus genes, y estos análisis se aplican a una variedad de cuestiones biológicas relacionadas con la evolución y la función de los orgánulos, vías, y las familias de proteínas. Tienen un especial interés en la comprensión de los procesos relacionados con la patogénesis humana (aparición de enfermedades infecciosas y enfermedades genéticas relacionadas orgánulo).

## Teoría origen eucariota

Lynn Margulis tuvo una visión polémica acerca de cómo funciona la evolución, haciendo hincapié en la importancia de las relaciones simbióticas y de cooperación sobre la competencia. Este concepto de la evolución inspiró lo que hoy se reconoce como la más notable idea, la noción de que las mitocondrias eucariotas fueron adquiridas en virtud de un suceso de endosimbiosis. Pero no es la única teoría vigente.

En 2010, Nick Lane y Bill Martin publicaron en la revista *Nature* un estudio donde explicaban que la transición de procariontes a eucariotas es imposible sin una gran cantidad de energía ya que se trataba del mayor evento de adquisición de genes de la historia de la vida en la Tierra. Las bacterias por sí mismas, no pudieron aportar tal cantidad de energía.

Uno de los principales argumentos que se utilizan para la endosimbiosis es que el genoma de las mitocondrias es circular. A pesar de esta generalidad, se han encontrado casos en los que las mitocondrias eucariotas tienen genomas lineales con telómeros eucariotas. En el caso de los cromosomas lineales, las enzimas ADN polimerasa son incapaces de replicarse hasta el final del cromosoma. Esto significa que la transición de la circularidad genómica a la linealidad debe suceder en concierto con la evolución de un mecanismo para evitar el acortamiento cromosómico progresivo. Defienden que tal transición evolutiva está lejos de ser trivial.

Generalmente se afirma con frecuencia que la doble membrana de las mitocondrias proporciona evidencias de su origen endosimbiótico. A pesar de ello, existen ciertas diferencias entre ellas. Las mitocondrias no presentan ningún vestigio de pared bacteriana. Parece prácticamente imposible cambiar todos los rasgos fundamentales de la membrana bacteriana y reemplazarlos sin perder la integridad de ella misma. Las diferencias entre las membranas de las mitocondrias y las paredes celulares de las bacterias hacen la teoría endosimbiótica mecánicamente difícil.

La extensa transferencia de genes que se necesita en la teoría endosimbiótica causaría estragos en un genoma complejo, ya que la inserción de piezas al azar de ADN mitocondrial podría perturbar las funciones existentes causando mutaciones. Para que la transferencia de genes sea satisfactorio, es necesario que se cumplan ciertos puntos: los genes necesitan ser movidos al núcleo, el código genético de las mitocondrias es diferente, los genes deben ser expresados correctamente y las proteínas han de poderse volver a importar a la mitocondria con el fin de ser funcionales.

Los científicos seguidores de esta teoría apuntan que las mitocondrias provienen de una larga y costosa especialización del retículo endoplasmático. Por eso, la comunicación entre ambos orgánulos es tan íntima y está implicada en tantos procesos.

## Entrevistas

Para las entrevistas se ha contado con la participación del Dr. Guillermo López y el Dr. Román Serrat.

**Guillermo López** hizo el doctorado en el laboratorio del Dr. Eduardo Soriano en el Parque Científico de Barcelona (PCB). Empezó el curso 2003/2004 y acabó en el 2009. Previamente estuvo dos años como alumno interno en este laboratorio cuando aún estudiaba Bioquímica. Del trabajo de tesis se publicaron dos artículos sobre las proteínas Alex y la dinámica mitocondrial. Cuando defendió la tesis se quedó un año y medio más en el mismo laboratorio y luego, a principios de 2011, se fue a Londres donde aún sigue. Pronto llevará tres años en el laboratorio del Dr. Josef Kittler donde continúa investigando sobre el tráfico y la dinámica mitocondrial, esta vez con las proteínas Miro en el punto de mira.

**Román Serrat** también realizó su tesis doctoral en el laboratorio del Dr. Eduardo Soriano. Obtuvo una beca FPU que le permitió realizar tanto el proyecto del Máster de Neurociencias como la propia tesis desde enero de 2007 hasta diciembre de 2010. Al final de este periodo tuvo la oportunidad de realizar una estancia de 4 meses en el laboratorio de Carlos Lois en la *University of Massachusetts Medical School* y al volver se quedó un tiempo más en el laboratorio durante los que finalizó la tesis doctoral (junio de 2011). En la actualidad y desde julio de 2013, se encuentra en el laboratorio de Giovanni Marsicano en el *Institut national de la santé et de la recherche médicale* de Burdeos donde profundiza en la relación del receptor de los cannabinoides CB1 con las mitocondrias.

**Pregunta (P): La teoría de la endosimbiosis es la más respaldada en la actualidad. ¿Estáis de acuerdo con ella o creéis que debe haber algo más?, ¿Os parece incompleta o ilógica?**

**Guillermo López (GL):** A nivel personal, la teoría endosimbiótica me parece válida. Es coherente con muchas de las particularidades de las mitocondrias, aunque desde luego yo no sé si con todas.

**Román Serrat (RS):** Para mí, la grandeza de la teoría endosimbiótica radica en haber sabido explicar de manera aceptable el origen de las mitocondrias. Hasta la fecha es la más respaldada y permite explicar muchos de las peculiaridades de este orgánulo como es la presencia de DNA circular o la estructura de doble membrana. Debido al origen temprano de las mitocondrias en la célula eucariota, durante nuestra investigación no nos encontramos con aspectos ilógicos al aceptar esta teoría.

**P: ¿Pensáis que una teoría que habla de que el origen de las mitocondrias proviene del retículo endoplasmático es un disparate?**

**GL:** Por otra parte, una teoría que sitúe al retículo endoplasmático (RE) como origen de las mitocondrias no me parecería un disparate en absoluto, de hecho el RE y las mitocondrias están muy íntimamente ligadas, tanto estructural como funcionalmente.

Estoy interesado en aspectos funcionales de las mitocondrias y cómo estos aspectos están integrados en un contexto celular. Lo que puedo decir es que las cosas funcionan por un motivo y ese motivo es que dan una ventaja. Si algo es inútil no se conserva. Y me pregunto cuantas cosas no habrán desaparecido desde el inicio de la evolución, sin dejar pista alguna, y que van a hacer que el tener una película perfecta (fotograma a fotograma) de toda la evolución sea algo del todo imposible. Así que en mi opinión, sí, ambas teorías me parecen validas y merecedoras de consideración, ambas son coherentes con los sistemas biológicos y con las bases de la biología celular, pero yo tendría muy presente que ambas tendrán puntos débiles y lagunas difíciles de solucionar simplemente porque no puede uno ir al laboratorio y experimentar con millones de años de evolución.

**RS:** Tampoco se puede considerar descabellado ni incoherente un origen a partir del RE, entre otras cosas debido a la alta interconexión de estos dos orgánulos, aunque seguro deberá enfrentarse con ciertas dificultades y también tendrá sus puntos débiles que deberán aclararse si quiere ser ampliamente aceptada

**P: Un día cualquiera, cuando os acercáis al microscopio de fluorescencia o confocal y fijáis vuestra mirada en las mitocondrias de algún tipo celular, ¿qué se os pasa por la cabeza?, ¿os recuerdan a bacterias?**

**RS:** Al trabajar con cultivos primarios de neuronas en ocasiones te encuentras con alguna contaminación bacteriana. Desde luego por su tamaño y por su forma puedes llegar a pensar que estas son mitocondrias moviéndose libremente como lo hacen las mitocondrias en el interior del axón (sin contaminación, claro). Sin embargo, cuando cambias de modelo celular y observas intrincadas redes mitocondriales, te das cuenta de las grandes diferencias que existen en la actualidad puesto que la mitocondria se ha convertido en una estructura altamente especializada. Tanto si queda algo de una bacteria o de un posible origen del RE parece difícil que se puedan encajar todas las piezas después de tanto tiempo y por ello ambas teorías pueden, por lo menos, ser posibles.

**P: En vuestro trabajo demostráis la implicación de los genes *Armcx* y la proteína *Alex3* en la regulación de la motilidad mitocondrial, ¿cómo podría *Alex3* estar promoviendo la agregación de mitocondrias?, ¿se conoce algún homólogo a nivel génico o proteico de *Armcx* y *Alex3*, respectivamente, en bacterias?, ¿por qué los genes *Armcx* son exclusivos de los mamíferos placentarios?**

**GL:** Acerca de *Alex3* no, no hay homólogo en bacterias. Los genes *Alex* aparecen en mamíferos placentarios a partir de duplicaciones repetidas de una retrotransposición del gen *Armc10* al cromosoma X. *Armc10* es una proteína de dominios armadillo y uno podría pensar que todas las proteínas con estos dominios tienen un origen común. Desconozco si en bacterias existen proteínas con dominios armadillo, o para ser más correcto con algo que fuera el ancestro de un dominio armadillo, pero podría ser. De todas formas, *Alex3* es de origen nuclear y es, funcionalmente hablando, algo que la célula usa para regular la distribución de sus

mitocondrias, así que dudo que una bacteria tenga algo funcionalmente similar ya que no tiene esa necesidad.

**RS:** En cuanto a las proteínas Alex, nos llamó mucho la atención que solo se encontraran en mamíferos placentarios pues esto puede indicar nuevas regulaciones de la dinámica mitocondrial en este tipo de organismos. Durante el estudio de la familia Alex, también identificamos que el ancestro de esta familia, Armc10, también se encuentra en las mitocondrias. En este caso esta proteína está presente en todos los animales vertebrados que investigamos. De la misma manera, proteínas de dominios Armadillo como las Alex se han descrito en animales invertebrados (como por ejemplo el homólogo de beta-catenina), pero en este caso su implicación con dinámica mitocondrial sería indirecta. Si existe un homólogo de estas proteínas en bacterias lo desconozco pero su función me parecía, en todo caso, muy diferente.

**P: ¿Qué pensáis sobre la motilidad mitocondrial y sus orígenes evolutivos, le encontráis algún significado o explicación?**

**GL:** Acerca del origen evolutivo de la motilidad mitocondrial, las cosas aparecen (y se mantienen/seleccionan) cuando cumplen una función. La célula es una estructura enormemente dinámica en su interior y yo diría que la motilidad intracelular (véase cualquier tipo de motilidad: vesículas, endosomas, RE, núcleo, etc.) fue una de las primeras características que adquirió una eventual protocélula ya que permitió la comunicación entre sus diferentes componentes. Sería como construir las carreteras de un país. La motilidad mitocondrial apareció en cuanto las mitocondrias aparecieron, sea por la asociación con bacterias intracelulares o por la adquisición de un retículo endoplasmático especializado.

**RS:** En las células eucariotas unicelulares primitivas, la motilidad mitocondrial posiblemente sería bastante sencilla (aunque no inexistente) entre otras razones porque estos organismos no tendrían la complejidad y compartimentalización de por ejemplo células neuronales y la simple difusión de ATP podría ser suficientes para muchos de los procesos de estas células.

**Bibliografía:**

- Altmann, R. (1890) Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Veit, Leipzig.
- Andersson, SG. et al. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396:133-140.
- Barona, T. et al. (2005) Diacylglycerol induces fusion of nuclear envelope membrane precursor vesicles. *J Biol Chem*, 280:41171-41177.
- Benda, C. (1898) *Arch. Anal. Physiol.* 393-398.
- Bossard, C. et al. (2007) Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN. *J Cell Biol*, 179:1123-1131.
- Carrie, C. et al. (2009) Protein transport in organelles: dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS J*, 276:1187-1195.
- Carrie, C. et al. (2013) How do plants make mitochondria? *Planta*, 237:429-439.
- Chan, DC. (2012) Fusion and fission: interlinked processes for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*, 46:265-287.
- Cockcroft, S. (2009) Phosphatidic acid regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochem Biophys Acta*, 1791(9):905-912.
- Choi, SY. et al. (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Bio*, 8(11):1255-1262.
- Ernster, L. and Schatz, G. (1981) Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol*, 91:227s-255s.
- Feagin, JE. (2000) Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol*, 30:371-390.
- Fontdevila, A. and Moya A. (2003) Evolución: origen, adaptación y divergencia de las especies. Editorial Síntesis.
- Gao, Q. and Frohman, MA. (2012) Roles for the lipid-signaling enzyme MitoPLD in mitochondrial dynamics, piRNA biogenesis and spermatogenesis. *BMB reports*, 45(1):7-13.
- Gray, MW. (1998) *Rickettsia*, typhus and the mitochondrial connection. *Nature*, 396:109-110.
- Gray, MW. et al. (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology*, 2(6):1018.1-1018.5.
- Gray, MW. (2012) Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4:a011403.
- Guo, T. et al. (2007) A signal from inside the peroxisome initiates its division by promoting the remodeling of the peroxisomal membrane. *J Cell Biol*, 177:289-303.
- Huang, H. and Frohman, MA. (2009) Lipid signaling on the mitochondrial surface. *Biochim Biophys Acta*, 1791(9):839-844.
- Koonin, EV. (2010) The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biology*, 11:209.
- Koshiba, T. et al. (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305:858-862.
- Lane, N. and Martin, W. (2010) The energetic of genome complexity. *Nature*, 467:929-934.
- Law, SR. et al. (2012) Nucleotide and RNA metabolism prime translational initiation in the earliest events of mitochondrial biogenesis during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol*, 158:1610-1627.
- Lee, CP. et al. (2008) Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic *Arabidopsis* metabolism. *Mol Cell Proteomics*, 7:1297-1316.
- Lee, CS. et al. (2006) The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol*, 8:477-484.
- Liu, JH. et al. (2003) Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function and apoptotic response. *Molecular Cancer Research*, 1:278-284.
- Martin, W. and Koonin, EV. (2006) Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentation. *Nature*, 440:41-45.
- Martin, W. and Koonin, EV. (2006') A positive definition of prokaryotes. *Nature*, 442:868.
- Margulis, L. et al. (1967) On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.*
- Margulis, L. (1970) Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, CT.
- Margulis, L. and Sagan, D. (2003) Captando genomas. Editorial Kairós.
- Margulis, L and Dolan, MF. (2006) Els inicis de la vida. Edicions Bromera, Càtedra de Divulgació de la Ciència, Universitat de València – Servei de Publicacions.

- Monod, J. (1981) El azar y la necesidad. Editorial Tusquets.
- Pagliarini, DJ. et al. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134:133-140.
- Peters, K. et al. (2012) Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 79:273-284.
- Rycovska, A. et al. (2004) Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 150(5):1571-1580.
- Sharma, MR. et al. (2003) Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 115:97-108.
- Shutt, TE. and Gray, MW. (2006) Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet*, 22:90-95.
- Sloan, DB. et al. (2012) Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *Plos Biol*, 10:e1001241.
- Stuckey, JA. and Dixon, JE. (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nature Struct. Biol*, 6:278-284.
- Vafai, SB. and Mootha, VK. (2012) Mitochondrial disorders as Windows into an ancient organelle. *Nature Review*, 491:374-383.
- Vitale, N. et al. (2004) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J*, 20:2424-2434.
- Yang, D. et al. (1985) Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci*, 82:4443-4447.
- Yutin, N. et al. (2009) The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct*, 4:9.

#### **Bibliografía de figuras:**

- **Figura portada:** <http://jindetres.blogspot.com.es/2011/09/la-mitocondria-que-te-pario-o-quien-era.html> y <http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria>
- **Figura 1:** Vafai SB, and Mootha VK, 2012.
- **Figura 2:** <http://bibliotecadeinvestigaciones.wordpress.com/biologia/>, <http://www.4a.uchile.cl/citasanimalistas/charlesdarwin.htm> y <http://ca.wikipedia.org/wiki/Mitocondri>
- **Figura 3:** [http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Genetica/codigo\\_genetico.htm](http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Genetica/codigo_genetico.htm)
- **Figura 4:** [http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81rbol\\_filogen%C3%A9tico](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81rbol_filogen%C3%A9tico)
- **Figura 5:** <http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogeo/recursos/Apuntes/ApuntesBioBach2/3-MorfoCelular/Peroxisoma.htm> y <http://ies.rayuela.mostoles.educa.madrid.org/deptos/dbiogeo/recursos/Apuntes/ApuntesBioBach2/3-MorfoCelular/Cloroplasto.htm>
- **Figura 6:** <http://www.biologiasur.org/apuntes/base-fisico-quimica/organizacion-y-fisiologia-celular/celula-procariotica-y-eucariotica.html>