



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“La mutación G14459A del mtDNA asociada al
síndrome de Leigh en familia mexicana”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ALEJANDRO GUTIÉRREZ GARCÍA

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue publicado en la Revista de Neurología 2009, Vol. 49 No. 5; y se desarrolló en el laboratorio 8, de la Unidad de investigación multidisciplinaria, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Agradecimientos

Porque sin las personas que menciono a continuación; no solo este trabajo sino mi vida, no sería lo que agradezco es ahora...y será.

A mi Mamá y mi Papá por su amor, guía, confianza, por el esfuerzo en criarme para ser quien soy, por sus desvelos, preocupaciones, sacrificios, y por todos los hermosos momentos de nuestra familia.

A mi abue por su sabiduría, experiencia, cariño y por consentirme, gracias.

A mis hermanos Carlos y Dey, por ser mis amigos y compañeros desde siempre y para siempre.

A mis amigos y compañeros de la FES-C: Angie, Itzmel, Clau, Lety, Pili, Franchini, Aris, Paty, Airolg Jacqueline por su amistad y por haber compartido esta etapa de mi vida, haciéndola extraordinaria e irrepetible, gracias a ustedes.

Al Dr. Francisco Montiel por la oportunidad de ser parte del equipo que encabeza y guía; por el apoyo, las enseñanzas, su tiempo y su amistad.

A Daniela, por tu maravillosa compañía, tus miradas y tu amor.

A mi Mamá, a mi Papá, y a mi abue por todas sus enseñanzas, comprensión, apoyo, por ser un ejemplo de vida, por su sabiduría, y todo su cariño y amor.

A mis hermanos por estar conmigo siempre y brindarme su amistad en este camino que nos toca recorrer juntos.

Contenido

Contenido	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mitocondria	1
1.1.1 El sistema OXPHOS	2
1.2 Genética mitocondrial	4
1.2.1 Características	6
1.3 Enfermedades mitocondriales	7
1.3.1 Antecedentes	8
1.3.2 Clasificación	9
1.3.3 Síndrome de Leigh	11
1.3.4 Diagnóstico de mitocondriopatías	12
1.3.4.1 Pruebas clínicas e imágenes	13
1.3.4.2 Diagnóstico genético molecular	15
1.3.4.3 PCR-RFLP y secuenciación	16
1.3.4.4 PCR	16
1.3.4.5 RFLP	18
1.3.4.6 Secuenciación	18
1.3.5 Tratamiento y prevención	20
1.3.5.1 Tratamiento farmacológico	20
1.3.5.2 Terapia génica	22
1.3.5.3 Prevención	22
1.4 Haplogrupos mitocondriales	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos particulares	24

3. METODOLOGÍA	26
3.1 Materiales y equipos	26
3.1.1 Extracción de DNA total a partir de sangre	26
3.1.2 Extracción de DNA total a partir de biopsia muscular	26
3.1.3 Cuantificación de concentración y pureza del DNA	26
3.1.4 Amplificación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
3.1.5 Electroforesis horizontal en gel agarosa	27
3.1.6 RFLP	27
3.1.7 Purificación	27
a) Con kit QIAquick PCR Purification	27
b) Con ExoSAP-IT	27
3.2 Métodos	28
3.2.1 Extracción de DNA total a partir de sangre	28
3.2.2 Extracción de DNA total de músculo	29
3.2.3 Cuantificación de concentración y pureza del DNA	30
3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
3.2.5 Electroforesis horizontal en gel de agarosa	31
a) Preparación	31
b) Carga y corrida	31
3.2.6 RFLP	32
3.2.7 Purificación del producto de PCR	32
a) Con el kit QIAquick PCR Purification de Quiagen.	32
b) Con ExoSAP-IT	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSIÓN	38
6. CONCLUSIONES	40
7. PERSPECTIVAS	42
8. REFERENCIAS	43

Índice de figuras

1.1 Estructura y función mitocondrial	2
1.2 Los complejos de la cadena respiratoria	4
1.3 Umbral para la expresión fenotípica y cuello de botella	5
1.4 Mapa del genoma mitocondrial humano	6
1.5 Replicación asincrónica del genoma mitocondrial humano	7
1.6 Resonancia magnética cerebral con lesiones clásicas del síndrome de Leigh	13
1.7 Algoritmo de diagnóstico para encefalomiopatías mitocondriales	15
1.8 Ciclo de amplificación de PCR	17
4.1 Genealogía parcial de la familia en estudio	34
4.2 Gel de agarosa (0.7%) que muestra los amplificadores de la paciente y sus familiares	35
4.3 Gel de agarosa (3%) del RFLP para la mutación G14459A	35
4.4 Genealogía parcial de la paciente con porcentajes de heteroplásmia encontrados	36
4.5 Gel de agarosa (3%) comparación y confirmación de haplogrupo	36
4.6 Electroferograma con la mutación G14459A	37

Índice de tablas

1.1 Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	3
1.2 Clasificación de enfermedades mitocondriales por modo de herencia	10
1.3 Mutaciones puntuales del mtDNA asociadas al síndrome de Leigh	12
3.1 Composición de la mezcla de para PCR	30
4.1 Concentración de DNA total y relación de pureza de muestras analizadas	35

Resumen

En los años sesenta se describieron cuadros clínicos asociados con algún tipo de disfunción mitocondrial y fue en 1988 que se describió la primera enfermedad mitocondrial debido a una mutación del mtDNA. El síndrome de Leigh es una enfermedad neurodegenerativa, debida a mutaciones, que alteran la cadena de fosforilación oxidativa, lo que provoca una deficiencia en la producción de ATP. Aparece típicamente en la infancia y se caracteriza por crisis convulsivas, retraso psicomotor, atrofia óptica, hipotonía, debilidad, letargia, vómitos, ataxia, oftalmoplejía externa, pérdida de visión, lesiones características en el ganglio basal y anormalidades respiratorias. Se ha asociado a diversas mutaciones puntuales del mtDNA, entre ellas están la T8993G/C, A8344G, T9176C, T12706C, T14487C y G14459A entre otras. La mutación G14459A se ha asociado recientemente al síndrome de Leigh, y anteriormente con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON). En México no son abundantes las fuentes de información que traten sobre estas patologías, además no se han reportado casos de este síndrome causados por esta mutación.

Este trabajo buscó coadyuvar en el diagnóstico del síndrome de Leigh en una paciente mexicana y su familia, además de divulgar a la comunidad formada por los profesionales de la salud de nuestro país, acerca de estas patologías y la importancia de esta mutación como causante de la enfermedad. Asimismo, se contribuye de manera discreta para, en un futuro, saber si existe relación entre el fondo genético (haplogrupo), y esta patología; ya que hasta ahora no existe información publicada que notifique el haplogrupo en el Síndrome de Leigh causado por esta mutación.

La demostración de la presencia de la mutación, G14459A en la paciente y su madre por PCR-RFLP; resulta de gran importancia para realizar un diagnóstico preciso, que permitirá un óptimo manejo de la paciente y su familia (consejo genético), recordando el tipo de herencia materno de estas patologías. En este caso el haplogrupo de la paciente, determinado también por PCR-RFLP además de secuenciación de un fragmento que contiene la región hipervariable y mostró ser H.

1. Introducción

1.1 Mitocondria

Las mitocondrias son organelos intracelulares que ocupan hasta el 25% del volumen del citoplasma con una gran variedad de funciones en el metabolismo, su tamaño es de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$, y pueden tomar diversas formas en función del tejido en el que se encuentren, lo cual también afecta su número. (*Vázquez-Memije y Tuena de Gómez, 2002*) Las mitocondrias están constituidas por dos membranas que difieren en composición y funciones: la interna y la externa, mismas que delimitan el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La membrana externa contiene porinas que le otorgan permeabilidad y está compuesta por aproximadamente la mitad de proteínas y la mitad de lípidos, permite el paso de varias sustancias iones y pequeñas moléculas, además de contener los receptores para la importación de proteínas. Por otra parte la membrana interna es altamente impermeable a la mayoría de las sustancias y está constituida por alrededor de 20% de lípidos y 80% de proteínas; una proporción de proteínas más alta que en otras membranas celulares. Su superficie se encuentra incrementada en gran medida debido a que presenta un gran número de invaginaciones o plegamientos hacia la matriz que forman las crestas mitocondriales, y es aquí donde se encuentran alojados los complejos proteicos multiméricos que se encargan de la fosforilación oxidativa OXPHOS; así como varias proteínas acarreadoras como el transportador de ATP/ADP que media el transporte de metabolitos dentro y fuera de la matriz mitocondrial.

(Figura 1.1). (*Zeviani y Di Donato, 2004*)

La matriz mitocondrial es el espacio que contiene un gran número de enzimas solubles que participan en procesos metabólicos de gran importancia, como el ciclo de Krebs, la oxidación de ácidos grasos (beta oxidación) y el metabolismo del piruvato. Las proteínas de la matriz también comprenden enzimas involucradas en la síntesis o el metabolismo de aminoácidos, cetonas, urea, pirimidinas, nucleótidos y el grupo hemo. En la matriz se encuentra presenta material genético propio de la mitocondria además de la maquinaria necesaria para su replicación y transcripción así como para la síntesis de proteínas. (*Hofmann y Bauer, 2005*)

La presencia del material genético, además de otras evidencias, apoya la teoría propuesta por Margulis en la que se plantea que en algún momento de la evolución de los seres vivos, las

mitocondrias tuvieron vida extracelular e independiente al igual que los cloroplastos, es decir que fueron endosimbiontes de un organismo que ya tenía núcleo; y posteriormente el endosimbionte se hizo dependiente del huésped, convirtiéndose en un organelo. Entre otras evidencias que apoyan esta teoría están; la posesión de una doble membrana, la reproducción binaria independiente, su sensibilidad y toxicidad a algunos antimicrobianos como el cloramfenicol y el que los ribosomas del organelo tienen un tamaño semejante al de las bacterias. Estudios posteriores indicaron que las mitocondrias se originaron a partir de un ancestro de las bacterias del género *Rickettsia*. (Gray et al., 2001)

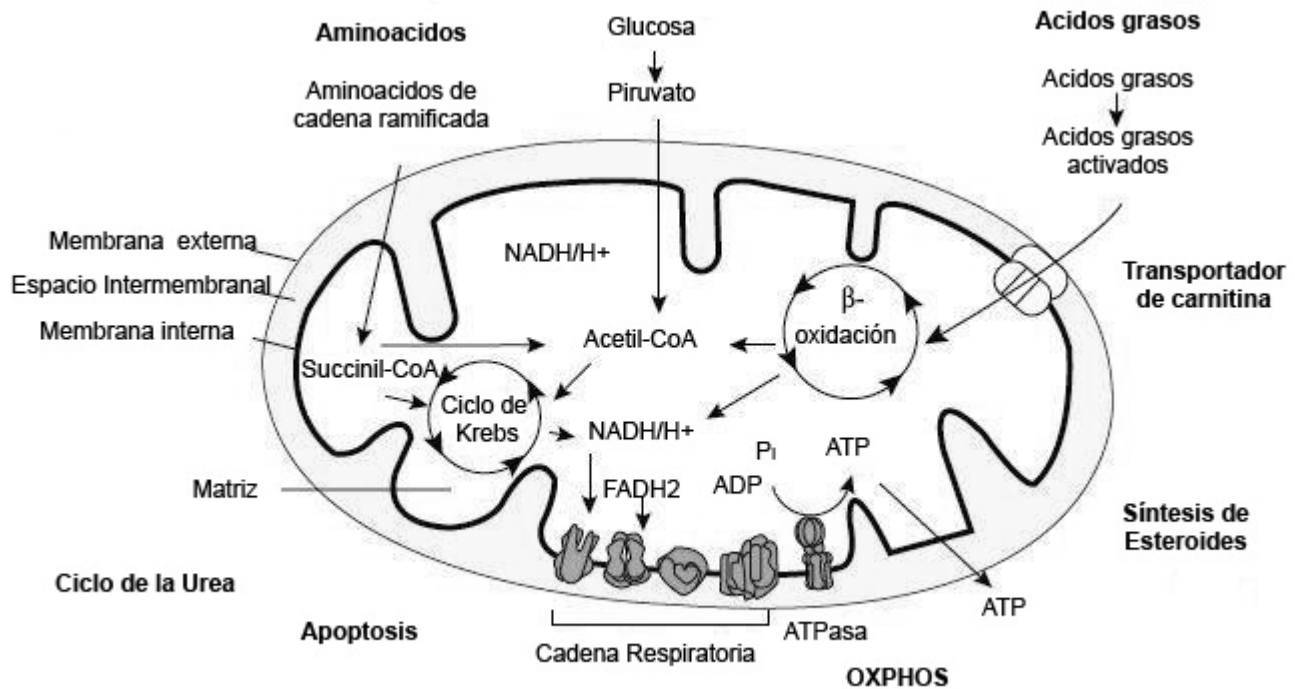


Figura 1.1 Estructura y función mitocondrial. (Modificado de Hofmann y Bauer, 2005)

Las mitocondrias tienen un papel esencial en muchos aspectos del metabolismo celular, pero su función principal es la síntesis de trifosfato de adenosina o ATP por medio de la fosforilación oxidativa.

1.1.1 El sistema OXPHOS

Es uno de los principales sistemas que posee la mitocondria, se encarga de la producción de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (P_i). La cadena respiratoria está compuesta de cinco complejos enzimáticos (I, II, III, IV y V); (Tabla 1.1) que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria y cuya síntesis requiere tanto de DNA mitocondrial (mtDNA) como DNA nuclear (nDNA)

y de los cuales solo el complejo II se sintetiza sin mtDNA implicado. De hecho la mayoría de las proteínas que forman el sistema OXPHOS se sintetizan en el citoplasma con nDNA y se importan a la mitocondria, lo cual no resta importancia a la participación del mtDNA; ya que las subunidades codificadas por este genoma son esenciales para el correcto funcionamiento de los complejos que forman el sistema OXPHOS. Los complejos I, III y IV actúan como bombas de protones generando un gradiente electroquímico a través de la membrana interna, que posteriormente es utilizado por el complejo de la F_0F_1 ATPasa (Complejo V) para generar ATP a partir de ADP y fósforo, (Figura 1.2). (Zeviani y Di Donato, 2004; Smeitink et al., 2001)

Tabla 1.1 Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, número de constituyentes y actividad que realizan. Entre paréntesis se muestra el número de componentes codificados por el mtDNA.

Complejo	Nombre	Constituyentes	Acción
I	NADH-CoQ oxidoreductasa	25 polipéptidos (7)	Oxidación NADH
II	Succinato CoQ oxidoreductasa	5 polipéptidos (0)	Oxidación sustratos FADH ₂ dependientes
III	QH ₂ citocromo C oxidoreductasa	11 subunidades (1)	Oxidación sustratos NADH y FADH ₂ dependientes
IV	Citocromo C oxidasa	13 subunidades (3)	Transfiere equivalentes reductores del citocromo C al oxígeno molecular
V	ATP sintasa	2 subunidades 12-14 polipéptidos (2)	Convierte gradiente transmembrana en energía (ADP pasa a ATP)

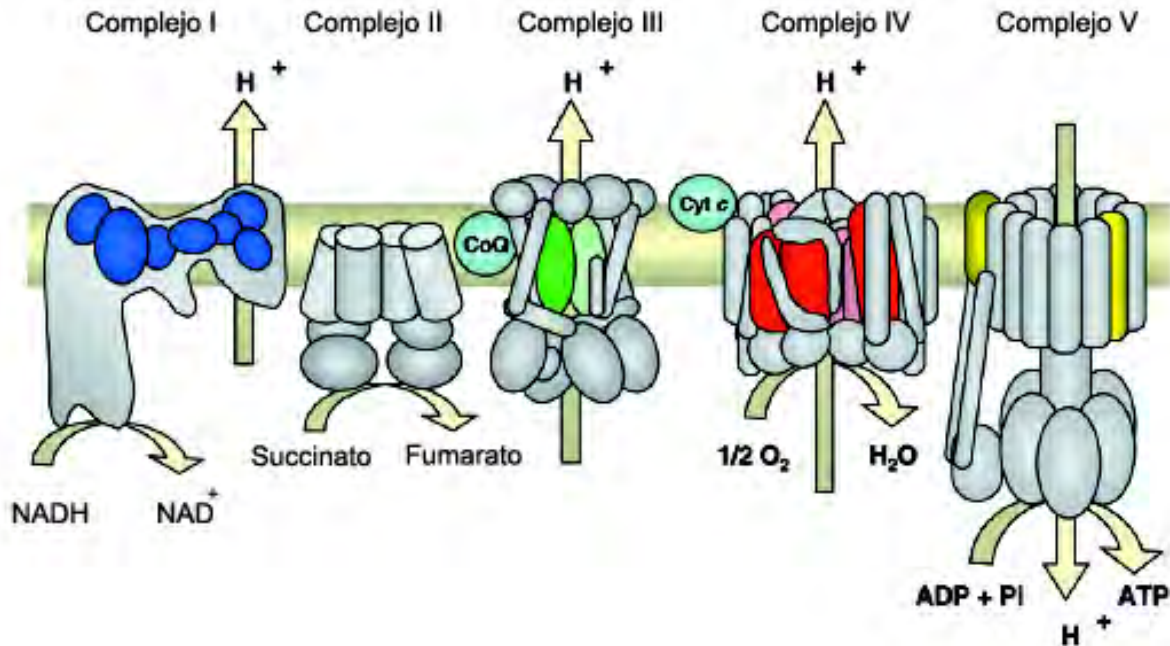


Figura 1.2. Los complejos de la cadena respiratoria. La cadena se encuentra en la membrana interna mitocondrial y esta formada por cinco complejos (I, II, III, IV y V). Se muestran de color azul las subunidades codificadas por el mtDNA en el complejo I, verde en el complejo III; rojo en el VI y amarillo en el complejo V. (Modificada de Zeviani y Di Donato, 2004)

1.2 Genética mitocondrial

Las mitocondrias además de los cloroplastos, son organelos que poseen información genética, característica que como ya se mencionó, es importante evidencia de su origen bacteriano. Esta información se transmite casi exclusivamente por vía materna, aunque se han encontrado casos en los que DNA mitocondrial paterno se encuentra presente. (Schwartz y Vissing, 2002).

Este DNA frecuentemente presenta mutaciones espontáneas, algunas de las cuales son neutrales, es decir no se asocian con patologías y tienden a perpetuarse en el individuo e incluso en poblaciones étnicas; a ese tipo de mutaciones inocuas se les denomina polimorfismos, son homoplásmicas y tienen características antropológicas regionales. Las mutaciones patológicas del mtDNA generalmente son heteroplásmicas, es decir se encuentra presente una mezcla de genoma mutante y normal o silvestre; y puede ser de dos tipos: por la pérdida de un segmento o depleción de las cadenas del genoma, lo que generalmente se presenta de forma esporádica y de tipo puntual donde solo se sustituye una base por otra. Estas mutaciones son por lo regular de herencia materna. (Medina-Crespo et al., 2004)

Un fenómeno que existe en estas patologías ocurre cuando la cantidad de mtDNA mutado llega a sobrepasar la cantidad de mtDNA normal en la llamada segregación replicativa, (heteroplásmia con mutación), lo que da lugar a una alteración en la función celular (Figura 1.3 izquierda). Esta alteración puede permanecer subclínica hasta que se rebase este umbral que es específico del tejido y para determinado momento o edad del individuo afectado. Al rebasarse el umbral aparecen las características clínicas que pueden llegar a ser fenotípicas de una mitocondriopatía. El efecto de cuello de botella se da durante la producción de las células germinales primordiales (oocitos primarios), ya que un selecto número de moléculas de mtDNA se transfieren a cada oocito de manera azarosa y la maduración del oocito esta asociada con la replicación del mtDNA. (Figura 1.3 derecha) Esto puede provocar un cambio aleatorio en la carga de mtDNA mutado entre las generaciones; lo que causa la variabilidad de este genoma entre madres afectadas con mutaciones patogénicas y su progenie. (Taylor y Turnbull, 2005)

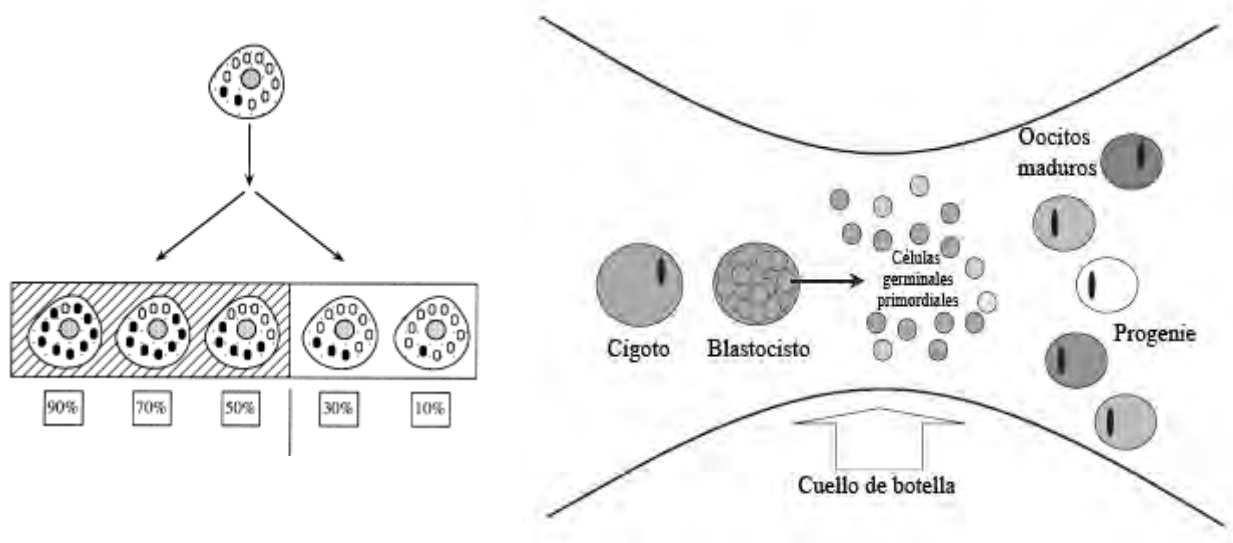


Figura 1.3. Izquierda. Umbral para la expresión fenotípica. Las figuras oscuras representan las mitocondrias mutantes mientras que las claras a las normales; como se observa en este ejemplo al sobrepasar el 50% de mitocondrias mutantes, se tiene una expresión fenotípica; este umbral puede verse modificado según el tipo de enfermedad mitocondrial y el tejido del que se trate. Derecha. Cuello de botella. Durante la ovogénesis las células son aleatoriamente segregadas con mtDNA que puede o no ser mutado; de modo que los oocitos maduros pueden resultar homoplásmicos sin mutación (blanco), homoplásmicos con mutación (gris oscuro) o heteroplásmicos (gris claro). Siendo común un aumento en la carga de la mutación en la prole.

1.2.1 Características

Las mitocondrias poseen una molécula de DNA circular de 16559 pb, compuesta de dos cadenas complementarias llamadas ligera y pesada. La cadena pesada es rica en guanina mientras que la ligera lo es en citosina. El mtDNA está presente en múltiples copias en cada célula y el número de ellas varían en función del tipo de tejido y la demanda de energía del mismo. El mtDNA es compacto y por consecuencia no posee intrones; la única región no codificante es la de control mayor, denominada D-loop, que mantiene una cadena corta naciente en el origen de replicación de la cadena líder, es decir la cadena pesada (Figura 1.4). Mide aproximadamente 1kb y además contiene los promotores de la replicación de la molécula; que ocurre de forma independiente al del DNA nuclear. (*Anderson et al., 1981; Zeviani y Di Donato, 2004*)

El mtDNA humano contiene 37 genes, que codifican los componentes de RNA del aparato traduccional de la mitocondria, compuesto por 22 RNA de transferencia (tRNA) y dos RNA ribosomales (12S rRNA y 16S rRNA), además de 13 polipéptidos, todos ellos son subunidades esenciales de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS. (*Hofmann y Bauer, 2005*)

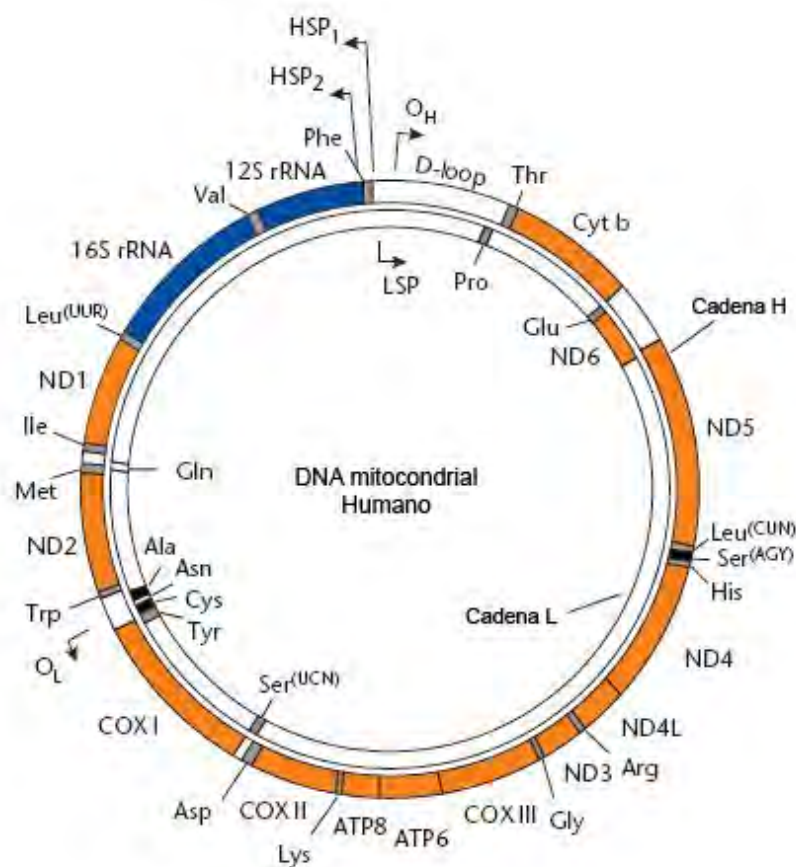


Figura 1.4. Mapa del genoma mitocondrial humano. (*Hofmann y Bauer, 2005*)

El mtDNA humano tiene una replicación semejante en parte a la de los procariontes porque es autónoma. La molécula de DNA mitocondrial de los mamíferos presenta dos orígenes de replicación (O_H y O_L); el origen de replicación de la cadena ligera (O_L) se localiza a dos tercios del genoma corriente abajo. La replicación del mtDNA ocurre de manera independiente a la fase del ciclo celular y de la replicación del DNA nuclear. Esta inicia con la síntesis de la cadena pesada a partir de su sitio de origen (O_H) en el D-Loop mediante un iniciador y se extiende en sentido de las manecillas del reloj recorriendo el mtDNA para decrecer el número de nucleótidos y desplazar la cadena parental H, como una horquilla de cadena sencilla. Después de atravesar dos tercios del genoma, se expone el origen de replicación de la cadena ligera (O_L) y se inicia la síntesis de la cadena ligera. La replicación de la cadena ligera se realiza en sentido opuesto a lo largo del DNA libre de la cadena pesada; de esta manera la síntesis de cada cadena ocurre de manera bidireccional pero asincrónica desde los dos orígenes de replicación separados (Figura 1.5). (Vázquez-Memije y Tuena de Gómez, 2002; Taylor y Turnbull, 2005)

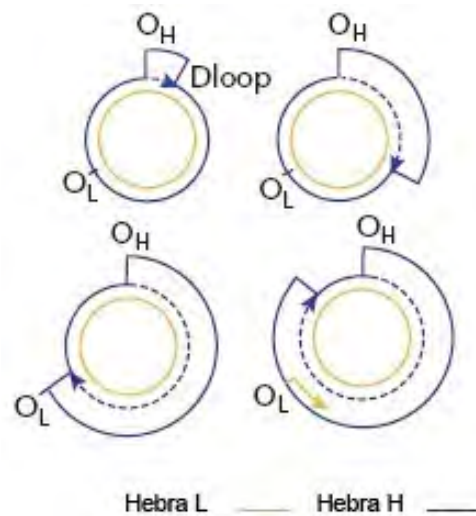


Figura 1.5. Replicación asincrónica del genoma mitocondrial humano.

1.3 Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de padecimientos que anteriormente se conocían como encefalomiopatías, afectan a varios órganos y sistemas de manera única o simultánea; sus manifestaciones son heterogéneas y se presentan a cualquier edad. Se describieron en un principio de manera bioquímica, esto es, identificando a la proteína defectuosa. Con la obtención de la secuencia completa del genoma, el campo de estudio de las mitocondriopatías se amplió enormemente, ya que permitió aislar el genoma mitocondrial de los pacientes y encontrar el sitio de mutación y por lo tanto el gen mutado. (Medina-Crespo *et al.*, 2004).

Estas patologías son variables y clínicamente difíciles de definir, lo que provoca que la estimación de su frecuencia o prevalencia sea dificultosa; no obstante se cuenta con algunas estimaciones. Por ejemplo la incidencia del síndrome de Leigh en Australia es de por lo menos 1 en 70,000, probablemente más cercana a 1 en 44,000. La proporción de pacientes cuya diabetes tipo 2 es causada por la mutación 3243, varía del 2 a 6% en Japón; pero es menor al 0.5% en el Reino Unido. La prevalencia de esta mutación es cerca de 1 en 6000 en Finlandia, aunque muchos de estos individuos son asintomáticos. La mutación 1555 puede servir de base a tanto, como al 27% de la sordera familiar (sordera sin otros problemas) en España. (*Poulton y Bindoff, 2001*).

1.3.1 Antecedentes

En un principio, una de las características distintivas de estas enfermedades fue la acumulación de ácido láctico. Las miopatías eran descritas como enfermedades en las que se presentaban cambios estructurales y funcionales en las mitocondrias, y se clasificaron en dos grandes grupos: el primero se asignó a hipermetabolismo y el segundo tipo presentaba mitocondrias desacopladas y con alteraciones en la estructura membranal. También se observó que los pacientes con hipoxia, sufren particularmente de isquemia en cerebro, riñón, corazón e hígado. La isquemia producía una patología especial en el músculo en la cual las fibras degeneraban y sufrían la acumulación de mitocondrias anormales. El progreso en el reconocimiento y descripción de las miopatías ha ido de la mano con el estudio cada vez más profundo, de las funciones de las proteínas y genes que se encuentran en la mitocondria.

El concepto de enfermedad mitocondrial fue introducido por Luft en 1962 al describir un caso de una mujer joven con hipermetabolismo, con mitocondrias de músculo anormales y pérdida de acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación. En 1963 Engel y Cunningham modificaron la técnica de Gomori con la que pudieron observar en el microscopio de luz la presencia de fibras con acumulación patológica de mitocondrias (fibras rojo rasgadas). En los setenta se introdujo el término “encefalomiopatía mitocondrial” para acentuar la especial vulnerabilidad del músculo y el cerebro a defectos del metabolismo oxidativo. En los años ochenta se hizo una clasificación bioquímica de estas enfermedades con gran atención a las características básicas del sistema genético mitocondrial que se descubrieron y no fue hasta 1988 que Wallace describió la primera enfermedad mitocondrial debido a una mutación del mtDNA en pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber, la mutación 11778 del mtDNA que se encuentra localizado en el gen de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa;

desde entonces el número de mutaciones asociadas a patologías ha crecido de manera espectacular. (Solano *et al.*, 2001; Vázquez-Memije y Tuena de Gómez, 2002)

1.3.2 Clasificación

Existen diversas clasificaciones para las enfermedades mitocondriales obedeciendo la perspectiva con la que se trata, por ejemplo se hacen desde un punto de vista genético, bioquímico y también por su modo de herencia; pero es difícil una clasificación que correlacione más de uno de estos enfoques por los siguientes motivos:

1. Un mismo defecto bioquímico o molecular se asocia con diferentes fenotipos y manifestaciones clínicas.
2. Un mismo fenotipo clínico puede deberse a anomalías bioquímicas o moleculares distintas.
3. La severidad de la afectación clínica no se correlaciona con la intensidad del déficit bioquímico.
4. Un órgano bioquímica o molecularmente afectado, aunque clínicamente silente en un momento determinado puede manifestar su disfunción con la evolución de la enfermedad.
5. El descubrimiento continuo de nuevas expresiones clínicas y de nuevos fundamentos genético-moleculares. (Puñal *et al.*, 2008)

Clasificación genética de las enfermedades mitocondriales, (entre paréntesis se menciona el modo de herencia, siendo: AR autosómica recesiva, AD autosómica dominante y XR ligado al X recesivo).

- Alteraciones del ADNmt
- Deleciones únicas (habitualmente esporádicas)
- Duplicaciones o duplicaciones/deleciones. (herencia materna o esporádicas)
- Mutaciones puntuales (herencia materna)
- Alteraciones del nDNA
- Alteraciones de los genes que codifican proteínas mitocondriales
 - Mutaciones en genes para subunidades de la CRM (complejos I y II) (AR)
 - Mutaciones en proteínas ancilares (complejos III, IV y V) (AR)
- Alteraciones en la importación de proteínas mitocondriales (AR)
- Alteraciones en la comunicación intergenómica
 - Deleciones múltiples del ADNmt (AR,AD)
 - Depleción del ADNmt (AR)
 - Defectos en la traducción del ADNmt (AR)

- Alteraciones en el medio lipídico
 - Síndrome de Barth (XR)
- Alteraciones en la motilidad/fusión/fisión mitocondrial
 - Atrofia óptica (AD)
 - CMT 2A
 - Paraplejía espástica familiar (AR) (*Puñal et al., 2008; Smeitink et al., 2001*)

Bioquímica o por defectos del metabolismo energético.

- Defectos de la oxidación de los ácidos grasos
- Defectos del metabolismo del piruvato
 - Déficit de piruvato carboxilasa (PC)
 - Déficit de piruvato deshidrogenasa (PDH)
- Defectos del ciclo de Krebs
- Defectos en el acoplamiento oxidación-fosforilación
- Defectos de la cadena respiratoria mitocondrial
 - Déficit de complejos I-V
 - Deficiencia primaria de coenzima Q10

Por modo de herencia

Tabla 1.2. Clasificación de las enfermedades mitocondriales por modo de herencia. (*Poulton y Bindoff, 2001*)

Modo	Defecto del DNA	Ejemplo de la enfermedad	Proteína/mecanismo involucrado
Esporádica	Rearreglos de mtDNA	KSS, CPEO, Pearson	Proteínas de la síntesis de mtDNA
Materna	Mutaciones puntuales de mtDNA	MELAS, MERRF, NARP, LS, LHON	Proteínas de la síntesis de mtDNA
Autosómica dominante	Homeostasis del mtDNA	Deleciones múltiples, depleción de mtDNA	Regulación de la replicación
Autosómica recesiva	Defectos de ensamblaje, homeostasis de mtDNA	Complejo II, Complejo IV/COX, MNGIE	NDUFV1, NDUFS4, Flavoproteína SDHFp, Timidina fosforilasa
Ligada al X		Deficiencia de PD	Complejo de la PD

1.3.3 Síndrome de Leigh

El síndrome de Leigh fue descrito en 1951 por Leigh como una encefalomiopía necrotizante subaguda. En el cerebro del paciente se encontraron lesiones necróticas subagudas simétricas bilaterales que se extendían desde el tálamo hasta el puente tronco encefálico (pons). (*Leigh, 1951*)

Es un desorden neurodegenerativo de inicio temprano con una neuropatología característica que consiste en lesiones bilaterales focales en diversas áreas del sistema nervioso central incluyendo; tallo cerebral, tálamo, ganglios basales, cerebelo, y espina dorsal. Las lesiones son áreas de desmielinización, gliosis, necrosis, y proliferación capilar. Los síntomas clínicos dependen de en que áreas del SNC están involucradas. La causa más común de este trastorno es un defecto en la fosforilación oxidativa, principalmente en el complejo I (*Dahl, 1998; Rahman et al., 1996*).

El síndrome de Leigh es genéticamente heterogéneo, causado por mutaciones tanto en el genoma nuclear (*Loeffen et al., 1998*) como en el mitocondrial; e igualmente puede ser causado por depleciones de mtDNA (*Filiano et al., 2002*); por lo que puede presentar diversos tipos de herencia. Existe evidencia de que el síndrome puede ser causado por mutaciones que se encuentran relacionadas a otras patologías, como la mutación 8344, comúnmente relacionada a MERRF (*Sweeney et al., 1994*); así como la transición G13513A que además es causa del síndrome MELAS (*Shanske et al., 2008*). Del mismo modo la heterogeneidad de la enfermedad se puede hacer notar por ejemplo al observar que la mutación T8993G, puede causar el Síndrome de Leigh cuando la carga de la mutación es alta (*Tatuch et al., 1992*); o que se han dado casos donde la mutación T8993C ha sido origen de las patologías NARP y MILS (Síndrome de Leigh de herencia materna) en la misma generación de una familia (*Sciacco et al., 2003*). Existen mutaciones mitocondriales (G13513A), que ocasionan patologías con más frecuencia cuando están combinadas con otros defectos, como actividad reducida del complejo I, atrofia óptica y/o síndrome de Wolff-Parkinson-White. (*Ruiter et al., 2007*)

Estas alteraciones dan lugar a defectos en las vías metabólicas, con marcado efecto en el sistema de fosforilación oxidativa, lo que trae como consecuencia una deficiencia en la producción de ATP. Las deficiencias tienen diversas manifestaciones; afecta a varios órganos, aparece típicamente en la infancia y se caracteriza por crisis convulsivas, retraso psicomotor, atrofia óptica, hipotonía, debilidad, letargia, vómitos, ataxia, oftalmoplejía externa, pérdida de visión y anormalidades respiratorias. (*Mallo et al., 2005*)

El síndrome de Leigh se ha asociado a diversas mutaciones puntuales del genoma mitocondrial, entre ellas están la T8993G/C, A8344G, T9176C, T14487C, entre otras. Algunas de ellas son de reciente descripción mientras que otras como la T8993G/C son claramente relacionadas a la enfermedad; sin embargo solo las mutaciones T12706C, G13513A del gen ND5 y G14459A del mtDNA del gene ND6 respectivamente han sido asociadas con deficiencia del complejo I y Síndrome de Leigh. (Rojo, *et al.*, 2006; Taylor y Turnbull, 2002; Kirby, *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Kirby *et al.*, 2003; Ugalde *et al.*, 2003)

Tabla 1.3 Mutaciones puntuales del mtDNA asociadas al Síndrome de Leigh.

Mutación	Referencia
T8993G/C	Rojo <i>et al.</i> , 2006; Santorelli <i>et al.</i> , 1993
A8344G	Rahman <i>et al.</i> , 1996
A3243G	Rahman <i>et al.</i> , 1996
T14487C	Wang <i>et al.</i> , 2008; Ugalde <i>et al.</i> , 2003
G13513A	Shanske <i>et al.</i> , 2008; Brautbar <i>et al.</i> , 2008
G14459A	Kirby <i>et al.</i> , 2000
T12706C	Taylor y Turnbull, 2002

La mutación G14459A del mtDNA se ha asociado recientemente al síndrome de Leigh, y anteriormente con la neuropatía óptica de Leber (LHON), ya que presentan algunos síntomas similares, a excepción de la distonia y la repentina aparición de ceguera que presenta ésta última; y sumado a que esta mutación presenta variabilidad en su manifestación clínica. (Kirby *et al.*, 2000; Gropman *et al.*, 2004).

1.3.4 Diagnóstico de mitocondriopatías

El diagnóstico de diversas enfermedades de origen genético podría dividirse en dos partes; en la primera se hacen todas las evaluaciones clínicas y estudios de gabinete, con los que el médico infiere que existe una enfermedad de este tipo, y en la segunda parte se realizan estudios de confirmación diagnóstica, en los que se incluyen: tinciones histoenzimáticas específicas, microscopía electrónica, determinación de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y por último un estudio genético molecular para corroborar el diagnóstico.

1.3.4.1 Pruebas clínicas e imágenes

Existen un gran número de pruebas clínicas que pueden hacerse a un paciente con sospecha de patología mitocondrial, pero dentro de las pruebas clínicas más útiles para el diagnóstico de las mitocondriopatías en general, se encuentra la medición de los niveles de lactato en sangre; ya que con pocas excepciones el incremento de lactato es una de las características más constantes de estas enfermedades. Generalmente esta elevación se detecta primero en el líquido cefalorraquídeo y tiempo después en el plasma sérico.

Se fundamenta en la sospecha clínica, sugerida por los datos de anamnesis y exploración física y apoyada inicialmente por los resultados de exploraciones complementarias generales y más adelante, específicas de disfunción mitocondrial. Una posible herencia materna puede sugerirse por la presencia de “signos blandos”, como talla corta, sordera y migrañas en miembros de la rama materna. Las exploraciones habitualmente necesarias para establecer el alcance del proceso a estudio incluyen el examen de fondo de ojo, EEG, potenciales evocados auditivos, potenciales somatosensoriales, potenciales evocados visuales, electroretinograma, EMG y estudio electroneurográfico así como pruebas de neuroimagen, en concreto TAC cerebral y, especialmente, RM cerebral, pudiendo ser muy útil la RM espectroscópica. Señales hiperintensas bilaterales en los núcleos de la base son típicas de síndrome de Leigh (Figura 1.6); lesiones tipo infarto en los hemisferios cerebrales posteriores están presentes en el MELAS, mientras que señales difusamente anormales de la sustancia blanca cerebral se visualizan en el síndrome de Kearns-Sayre. (Puñal *et al.*, 2008)

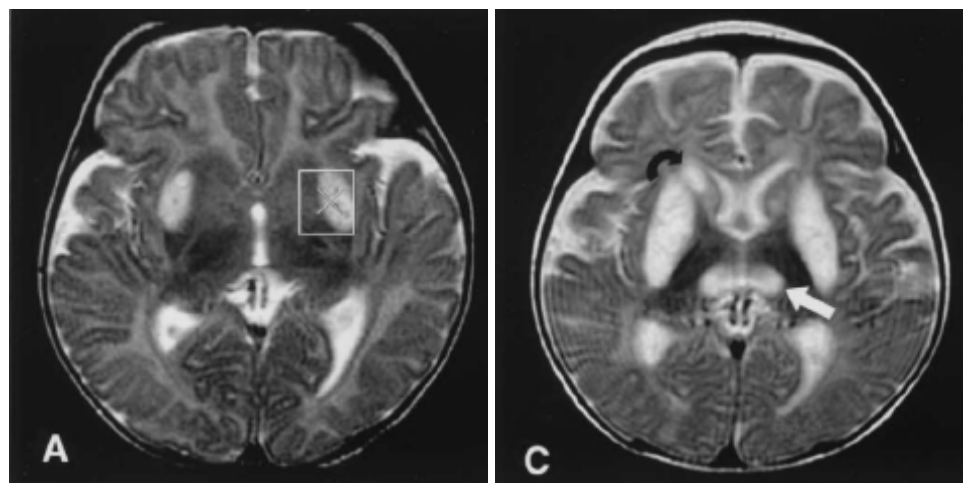


Figura 1.6. Resonancia magnética cerebral con lesiones clásicas del Síndrome de Leigh. Corte axial: aumento de intensidad en T2 bilateral y simétrica de la sustancia blanca periventricular y núcleos de la base (tálamos y lenticular).

El estudio metabólico se orientará a la demostración de una alteración en el estado de oxidorreducción plasmática, evidenciable en la mayoría de los casos y constara de:

a) Determinación de ácido láctico y pirúvico en sangre y, eventualmente, en especial si predomina la afectación del SNC, en LCR. Una muestra aislada normal en ayunas no descarta una disfunción mitocondrial y es preferible la valoración del comportamiento del ácido láctico tras maniobras de provocación como: a) una hora después de la ingesta del desayuno habitual; b) tras la administración de 1,5 g/Kg de glucosa por vía oral o, c) tras la realización de un ejercicio físico leve-moderado (20 minutos de ejercicio, con una FC de 130-140 latidos por minuto, pueden triplicar el lactato basal en condiciones normales, multiplicándose por 10 en algunos casos de disfunción mitocondrial).

b) Relación lactato/piruvato. Un valor inferior a 20 puede indicar defectos a nivel del complejo piruvato deshidrogenasa o de las enzimas gluconeogénicas, mientras que un cociente sostenidamente elevado (mayor de 20 y especialmente de 25) sugerirá una deficiencia de piruvato carboxilasa o un defecto de la cadena respiratoria mitocondrial.

d) Concentración plasmática de carnitina y sus fracciones. Un incremento en la forma esterificada con descenso de la forma libre puede ser reflejo de un deficiente metabolismo intramitocondrial de los ácidos grasos.

e) Cuantificación de aminoácidos en sangre. Una alanina elevada en sangre y/o LCR se encuentra en especial en los déficits de PDH.

f) Ácidos orgánicos en orina. Puede poner de manifiesto la existencia de aciduria dicarboxílica.

Las pruebas de confirmación diagnóstica tienen un doble objetivo, la demostración del defecto enzimático (aislado o combinado de complejos de la CRM, de piruvato deshidrogenasa o piruvato carboxilasa etc.) y la confirmación genético molecular de mutaciones, deleciones o depleción del mtDNA y de las alteraciones que se evidencien en el nDNA.

El tejido de elección es el cultivo de fibroblastos para los trastornos de la betaoxidación y del metabolismo del piruvato, mientras que en las citopatías mitocondriales lo es el músculo esquelético, por su accesibilidad y su elevada actividad enzimática oxidativa. Deben obtenerse varios fragmentos, de los que dos o al menos uno deben de congelarse inmediatamente a -70 a -80 °C, previo paso por nitrógeno líquido.

La tinción tricrómica de Gomori modificado, puede poner de manifiesto la existencia del marcador principal, las fibras rojo rasgadas o desestructuradas (RRF), indicativas de proliferación

mitocondrial; sin olvidar el hecho de que algunos procesos como NARP o LHON pueden cursar sin RRF.

La microscopía electrónica puede demostrar cambios estructurales en las mitocondrias aún en ausencia de RRF. Los hallazgos más sugestivos incluyen un incremento en el número y tamaño de las mitocondrias, crestas anómalas e inclusiones paracristalinas. También pueden observarse inclusiones lipídicas o de glucógeno. Su normalidad no excluye una citopatía mitocondrial. (Puñal et al., 2008)

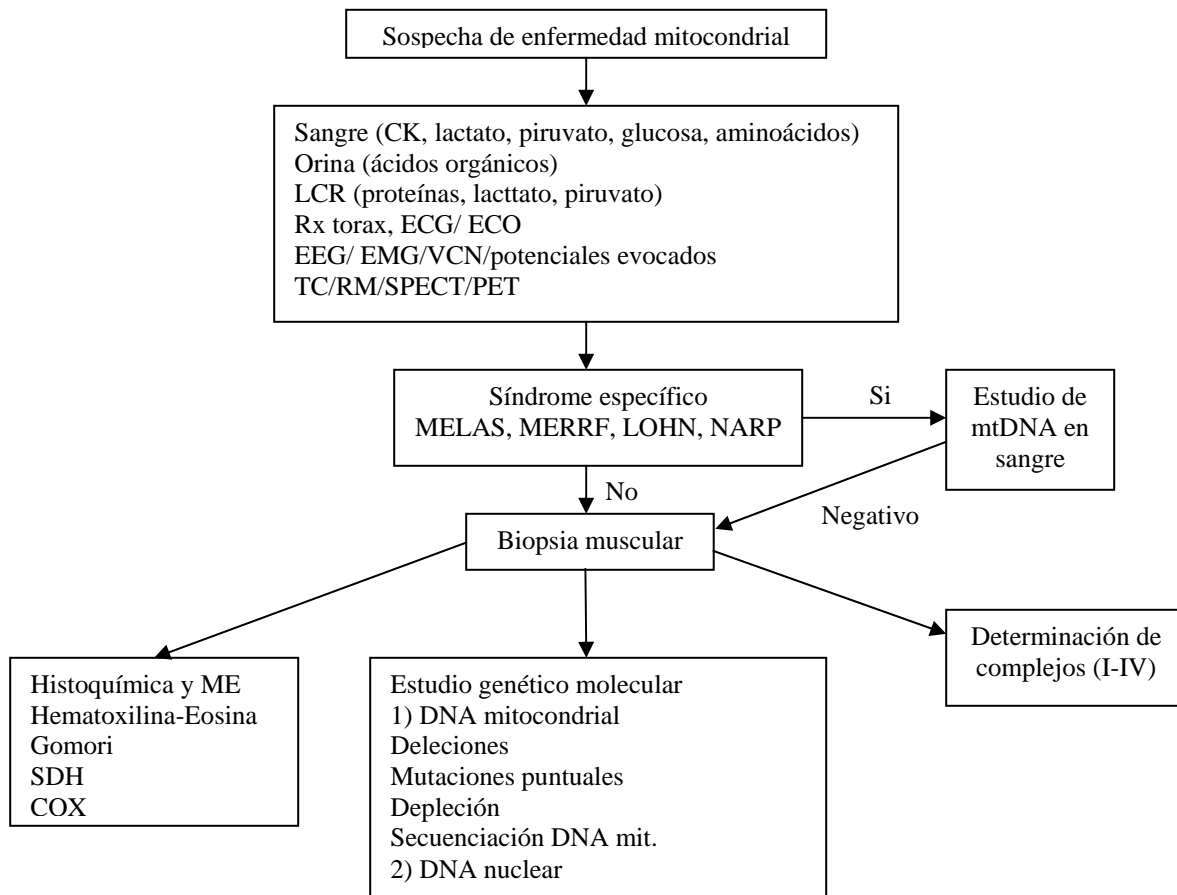


Figura 1.7. Algoritmo de diagnóstico de las encefalomiopatías mitocondriales

1.3.4.2 Diagnóstico genético molecular

Esta enfocado a la demostración de alteraciones en el mtDNA. Los casos de transmisión materna deben de investigarse en búsqueda de mutaciones puntuales del mtDNA, los casos esporádicos pueden estar en relación con deleciones-duplicaciones. Cuando la transmisión es dominante pueden existir de base deleciones múltiples, mientras que si es recesiva hay que descartar una posible depleción del mtDNA. Para ello se emplean estrategias como PCR-RFLP y secuenciación, la primera en casos específicos cuando se sospecha de una patología en particular y el segundo para buscar en fragmentos grandes del genoma mitocondrial o incluso en su totalidad. (Puñal et al., 2008)

1.3.4.3 PCR-RFLP y secuenciación

Para este tipo de determinación, el DNA de un individuo se extrae y es amplificado usando la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa o PCR, luego tratado con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de DNA de diferentes longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa, lo que proporciona un patrón de bandas que es único para un DNA en particular.

1.3.4.4 PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es una técnica elegante pero simple para la amplificación *in Vitro* de un fragmento de DNA; empleando una DNA polimerasa y dos oligonucleótidos específicos o primers que flanquean la región de interés. Es un proceso cíclico que consta de la separación de las hebras de DNA por desnaturalización con calor, hibridación o alineación específica de oligonucleótidos o primers a la cadena sencilla de DNA blanco; y posteriormente la síntesis de una nueva cadena por una DNA polimerasa (*Taq polimerasa*). Cada ciclo duplica la región delimitada por los primers. Por la repetición secuencial del proceso, la reacción genera exponencialmente varios millones de copias de la secuencia blanco en solo unas horas. (Figura 1.8).

La especificidad de la PCR es altamente dependiente del diseño cuidadoso de los primers con respecto al genoma bajo investigación y la composición de nucleótidos de las secuencias de los primers. Existen algunas sencillas reglas para el diseño de secuencias de primers que trabajen bien. Los primers deben tener entre 18 y 25 nucleótidos de largo; tener aproximadamente un número igual de los cuatro nucleótidos, y mostrar una composición G+C de 50-60%. Una variedad de programas de computadora están disponibles para seleccionar secuencias a partir de una región blanco, pero la inspección manual del oligonucleótido sigue siendo necesaria para maximizar el éxito de las aplicaciones de PCR. Las concentraciones de los ingredientes de la reacción son también importantes para el producto en específico, la fidelidad y el rendimiento. Además de la *Taq* DNA polimerasa y los primers, la mezcla de reacción contiene el ion magnesio (Mg^{2+}) como cofactor, los cuatro 2'-desoxirribonucleósidos-5' trifosfatos (dNTPs) y el buffer.

El número óptimo de ciclos depende de la concentración inicial del DNA blanco y típicamente esta entre 25 y 35 ciclos. Demasiados ciclos incrementará significativamente la cantidad de productos de PCR no específicos.

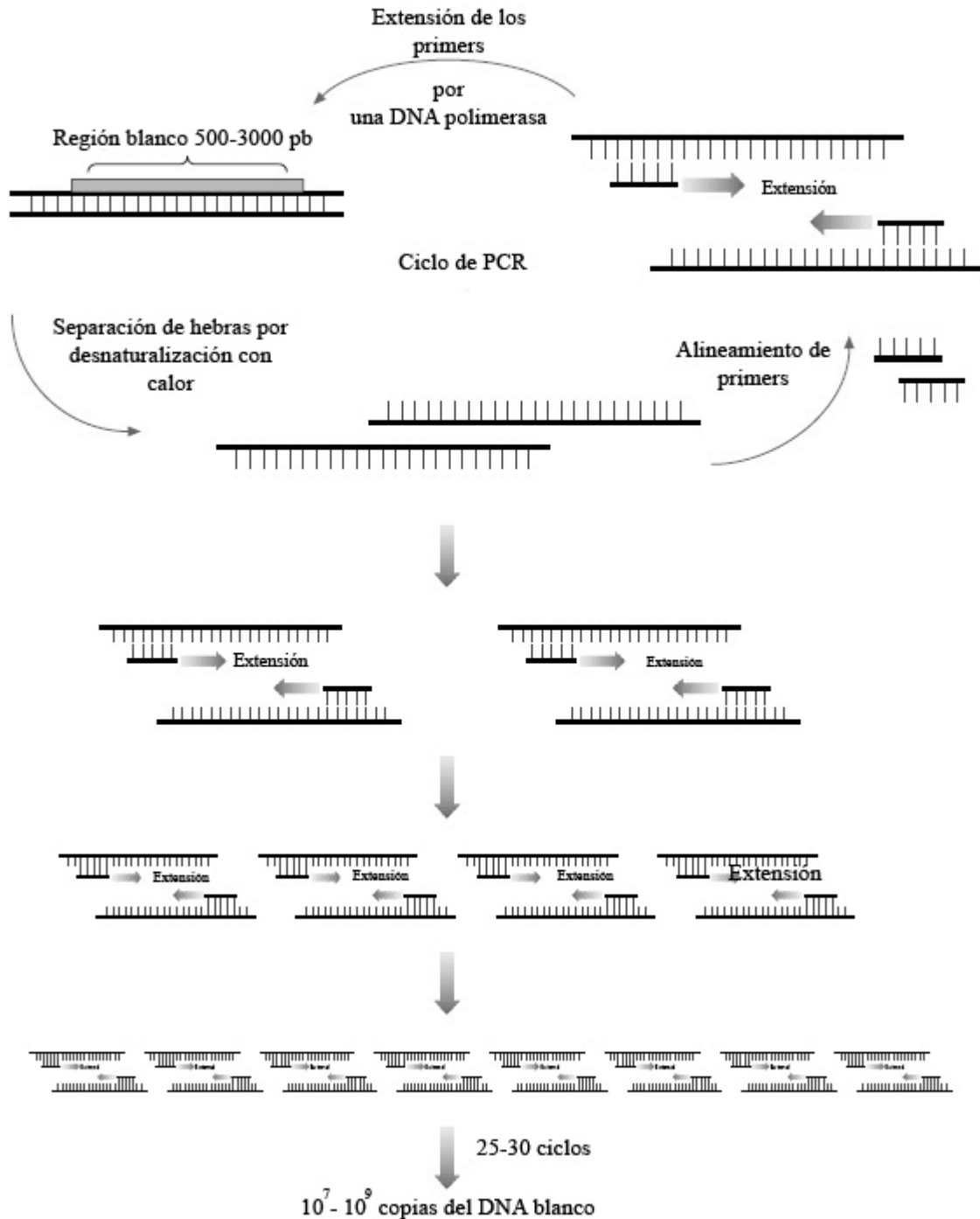


Figura 1.8. Ciclo de amplificación de PCR, se observan las etapas de desnaturalización, alineamiento de los primers, extensión de la secuencia por los primers, la renaturalización y nuevamente la desnaturalización, y así sucesivamente.

Las condiciones de alineamiento, son dependientes de la concentración, la composición de bases y la longitud del oligonucleótido y típicamente se encuentra entre los rangos de 55 y 68°C por 30-60 seg. La longitud del amplificado es directamente proporcional al tiempo de extensión del primer.

La extensión de los primers es realizada entre 68 y 78 °C por regla general de 60 segundos por cada kilobase. Extractos crudos de sangre, fluido cerebroespinal, orina, raspados bucales, colonias bacterianas, etc. son utilizadas rutinariamente como fuentes de DNA para PCR. (Metzker y Caskey, 2001)

1.3.4.5 RFLP

El término polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el DNA que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción y que varían entre los individuos de diferentes especies o de la misma. Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el DNA de diferentes individuos de una población, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción. La técnica RFLP se usa como marcador para identificar grupos particulares de personas con riesgo a contraer ciertas enfermedades genéticas, en ciencia forense, en pruebas de paternidad y en otros campos como el diagnóstico de enfermedades. (Luque y Herráez, 2001)

1.3.4.6 Secuenciación

El método de Sanger es la base de las variantes más utilizadas para la secuenciación. En este método, se acude a la interrupción controlada de la síntesis de una hebra complementaria durante la replicación *in Vitro*, por una DNA polimerasa. Como éste método emplea una polimerasa para sintetizar hebras complementarias a las que se quiere secuenciar, una primera característica del método es la necesidad de un cebador o primers para que se hibride con el extremo 3' de la región que se quiere secuenciar. La segunda característica del método es el uso de didesoxinucleótidos, análogos estructurales de los desoxinucleótidos que provocan la detención de la reacción de síntesis de DNA. Por ello también se conoce a este método como secuenciación didesoxi. Posteriormente se separan los fragmentos amplificados y se analizan.

El proceso se describe de la siguiente manera. Se parte de una hebra sencilla de DNA, bajo condiciones adecuadas de desnaturalización, a la que se hibrida un primer o cebador en la zona que se va a secuenciar. La mezcla anterior se divide en cuatro partes y a las cuatro se añaden los sustratos para la síntesis de una nueva hebra (dNTPs). Pero a cada tubo se le añade uno solo de los didesoxinucleótidos (ddNTPs) inhibidores de la síntesis. Ajustando la proporción entre ddNTPs y dNTPs (es decir, usando una cantidad suficientemente baja de ddNTPs), se consigue que la interrupción de la síntesis por incorporación del ddNTP tenga lugar no inmediatamente, sino a una

cierta distancia que varía de manera aleatoria. Se consigue así en cada tubo de la reacción una mezcla de hebras nuevas de longitud variada. Todas ellas comienzan en el mismo lugar donde el cebador se unió (en 5'), y terminan en 3' con un mismo nucleótido, el ddNTP incluido en cada reacción. Reflejan, por lo tanto, todas las posiciones del nucleótido complementario en la secuencia de la hebra de partida.

El siguiente paso es el de la separación de los fragmentos y análisis. El resultado de cada una de las cuatro reacciones (cada una es una mezcla de fragmentos terminados en el mismo nucleótido) se separa por electroforesis en gel y se detecta por un método adecuado al marcaje introducido (por ejemplo fluorescencia). En un gel de poliacrilamida (entre 6 y 8 %) se pueden observar las diferencias de longitud de un solo nucleótido. Con urea 6-8 M y manteniendo el gel a 40-50°C (condiciones desnaturizantes) se impide que se formen los puentes de hidrógeno entre sí. El revelado (detección de la fluorescencia de los cuatro fluorocromos) muestra solo una de las hebras nuevas.

El análisis de bandas es el último paso. Cada banda corresponde a un fragmento, marcado, cuyo nucleótido 3' terminal es el didesoxi usado en esa muestra (carril del gel). La posición de la banda corresponde a la longitud del fragmento (tomando en cuenta la calibración del gel).

Puesto que todos tienen en extremo 5' común, (por el cebador), la longitud coincide con la posición del nucleótido terminador (ddNTP). En conclusión, los fragmentos ordenados de mayor a menor (de abajo a arriba) corresponden a la secuencia de la hebra nueva, leída de 5' a 3'. La secuencia del DNA de partida será la complementaria.

La posibilidad de usar un fluorocromo distinto en cada uno de las cuatro reacciones de síntesis permite automatizar el método, de forma que se “lean” simultáneamente las hebras marcadas componentes de las cuatro mezclas. Además, esta lectura de la fluorescencia se puede hacer en continuo, con lo que la electroforesis sigue transcurriendo, las moléculas de menor tamaño, ya detectadas, se salen por el extremo inferior del gel, y se sigue consiguiendo la separación de moléculas mayores, de modo que se amplía el número de nucleótidos que se pueden secuenciar en un solo experimento. (Luque y Herráez, 2001)

1.3.5 Tratamiento y prevención

No existe un tratamiento específico curativo para las enfermedades mitocondriales; sin embargo existen medidas de apoyo como el mejoramiento de la nutrición, la corrección quirúrgica de ptosis, tratamiento de los episodios epilépticos y otras complicaciones, pueden aminorar problemas específicos y mejorar la calidad de vida en algunos casos. Estas medidas dependen del entendimiento del tipo de genética y por lo tanto del defecto bioquímico; pueden subdividirse en medidas generales y terapia farmacológica principalmente.

Entre las medidas generales están la evitación de estrés térmico (fiebre o temperaturas bajas) y evitar ejercicio físico intenso, aunque, el ejercicio aeróbico puede mejorar la capacidad energética muscular. Si existe mioglobinuria inducida por ejercicio o fiebre se proveerá una adecuada hidratación y alcalinización urinaria.

1.3.5.1 Tratamiento farmacológico

Se debe evitar la administración de fármacos depresores de la cadena respiratoria (fenitoína, barbitúricos), inhibidores de la síntesis de proteínas mitocondriales (cloranfenicol, tetraciclinas), fármacos que ocasionan la depleción del mtDNA (ciprofloxacino), que inhiben el metabolismo de la carnitina oxidación de ácidos grasos y también la cadena espiratoria (ácido valproico). Este último, comúnmente utilizado para tratar la epilepsia, que como se mencionó, es un síntoma común de estas enfermedades. *(Taylor y Turnbull, 2005)*

Suplementar componentes de la cadena respiratoria

La coenzima Q10 (ubiquinona) es un potente antioxidante que transfiere electrones desde los complejos I y II al citocromo C. Pacientes con deficiencia documentada de coenzima Q10 responden al reemplazamiento de este cofactor. También es utilizada ampliamente para otras enfermedades mitocondriales y aunque parece tener efectos poco medibles, los pacientes regularmente tienen mejora sintomática, que aunado con la ausencia de efecto secundarios, han propiciado su uso por lo menos como terapia paliativa. Sería aconsejable su determinación previa, indicándolo sólo en casos de déficit. Dosis moderadas parecen prevenir el daño oxidativo y podrían mejorar la tasa de oxidación del NADH, por lo que su indicación principal sería en los defectos del complejo I. La idebenona es un análogo de la CoQ10 de cadena más corta. Atraviesa la barrera hematoencefálica y tiene poder antioxidante. Se recomienda su uso en asociación a la CoQ10 en dosis crecientes, en las formas encefalopáticas; y parece mejorar la cardiomiopatía hipertrófica en la ataxia de Friedreich.

Remover metabolitos dañinos.

La acidosis láctica es una consecuencia importante de un defecto de la cadena respiratoria, y ocurre porque el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) es sensible al estado redox de la célula. Como la concentración de NADH aumenta, una cinasa que esta asociada con la PDH “apaga” progresivamente al complejo. El dicloroacetato sódico actúa en la cinasa terminando con la inhibición y permitiendo al piruvato ser metabolizado posteriormente a acetil coenzima A y no a lactato; favoreciendo el descenso de ácido láctico en sangre y LCR, lo que mejora el metabolismo oxidativo cerebral. A la dosis de 25-50 mg/kg/día, inhibe la síntesis hepática de glucosa y estimula su utilización por los tejidos periféricos, se debe usar en asociación a tiamina.

En algunos casos se han ensayado la creatina y la asociación parenteral de citocromo C con flavin mononucleótido y fosfato de tiamina. (*Poulton y Bindoff, 2001; Puñal et al., 2008*)

Eliminación de radicales libres

La cadena respiratoria genera especies altamente reactivas (radicales libres) incluso bajo condiciones normales; el razonamiento para el uso de agentes antioxidantes como la vitaminas C, E y coenzima Q esta basado en que cada vez son mayores las evidencias de la existencia de un estrés oxidativo, tanto en las encefalomiopatías mitocondriales como en las enfermedades neurodegenerativas que se presentan en la tercera edad. (*Poulton y Bindoff, 2001; Vázquez-Memije y Tuena de Gómez, 2002*).

Administración de metabolitos o cofactores.

La administración de vitaminas, principalmente tiamina y riboflavina como cofactores de enzimas mitocondriales, es una práctica común para pacientes con citopatías mitocondriales. En la deficiencia del complejo I se han usado altas dosis de riboflavina y de succinato sódico. En las deficiencias del complejo II, el tratamiento con vitamina K3 y C mejora la fosforilación oxidativa. En las demás alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial se han comunicado observaciones aisladas de mejoría clínica y bioquímica mediante la administración de otras vitaminas, como tiamina, niacinamida y riboflavina, debido a que actúan como cofactores en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En la deficiencia del complejo IV puede ser eficaz el ácido lipóico al aumentar la síntesis de ATP celular y facilitar la utilización y oxidación de la glucosa. L-carnitina si se asocia deficiencia y/o insuficiencia de carnitina plasmática, mejora la debilidad muscular, la cardiomiopatía y ocasionalmente la encefalopatía. Los corticosteroides e inhibidores de la monoaminoxidasa pueden ser eficaces, debido a que inhiben la peroxidación y a que protegen las membranas. El L-triptófano puede

ocasionalmente ejercer mejoría del mioclonus y de la ventilación en algunos pacientes con MERRF. (Puñal *et al.*, 2008; Vázquez-Memije y Tuena de Gómez, 2002).

1.3.5.2 Terapia génica

Un número de estrategias experimentales están siendo perseguidas. Estas incluyen la introducción de genes modificados o productos de los mismos en la mitocondria vía la maquinaria de importación de proteínas; y la inhibición de la replicación de mtDNA mutante por ácidos nucleicos antigenómicos de secuencia específica. Estos acercamientos no son clínicamente relevantes aún. (Zeviani y Di Donato, 2004; Taylor y Turnbull, 2005).

1.3.5.3 Prevención

El asesoramiento genético es primordial cuando se tienen antecedentes familiares de estas patologías, cuando se conoce el gen o la afectación es posible realizar diagnóstico prenatal en algunos desórdenes mitocondriales, por ejemplo en la deficiencia de piruvato deshidrogenasa y el Síndrome de Leigh con deficiencia generalizada de citocromo c oxidasa es posible medir la actividad enzimática directamente en las vellosidades coriónicas. Se han reportado casos de diagnóstico prenatal buscando la mutación y los porcentajes de heteroplasmia en vellosidades coriónicas y muestras obtenidas por amniocentesis de mutaciones como la T8993G causante del Síndrome de Leigh, con resultados alentadores hasta el momento. (Taylor y Turnbull, 2005; Pettman *et al.*, 2007)

En otras enfermedades mitocondriales cuando la alteración reside en el DNA nuclear (deleciones múltiples, alteraciones en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, alteraciones en el medio lipídico y alteraciones en la motilidad/fusión/fisión mitocondrial), la herencia es mendeliana; para las deleciones múltiples puede ser autosómica recesiva o dominante y para el resto autosómica recesiva. En algunos casos si no se conoce específicamente la alteración solo podrá alertarse de la existencia del riesgo. Mujeres con enfermedades debidas a mutaciones del mtDNA, pueden evitar la transmisión del defecto por donación de óvulos de una persona no afectada. (Puñal *et al.*, 2008)

1.4 Haplogrupos mitocondriales

Como se menciono anteriormente el mtDNA presenta mutaciones espontáneas, algunas de las cuales son neutrales o silenciosas, cuando el nucleótido que se modifica no altera el funcionamiento del producto de la traducción; es decir no se asocian con patologías y tienden a perpetuarse en el individuo e incluso en poblaciones étnicas. A ese tipo de mutaciones inocuas se les denomina polimorfismos, son homoplásmicas y tienen características antropológicas regionales. Son de interés desde el punto de vista evolutivo, debido a que se ha observado que existe una correlación entre el número de nucleótidos modificados del genoma con el paso del tiempo transcurrido, cuando se comparan las mismas secuencias de DNA en organismos de la misma o diferentes especies. (*Vázquez-Memije y Tuena de Gómez, 2002*)

Se han encontrado variaciones de mtDNA en humanos de distintas poblaciones y algunos correlacionaron el tipo de mutación con el origen étnico y geográfico. Cann y colaboradores estudiaron 147 muestras de mtDNA de individuos provenientes de cinco poblaciones geográficamente separadas. De acuerdo con los resultados, los autores propusieron que todos los mtDNAs provienen de un grupo de mujeres que vivió en África hace aproximadamente 200 000 años, y de ahí se extendió al resto de los continentes mediante múltiples migraciones. (*Cann et al., 1987*)

Pero las mutaciones que dan forma a los haplogrupos mitocondriales también tienen influencia en diversos fenotipos patológicos y no patológicos; por ejemplo algunos linajes de mtDNA específicos a ciertos continentes, son más propensos a manifestar síntomas clínicos de LHON que otros, cuando presentan esta enfermedad. (*Wallace et al., 1999*). Asimismo se conoce el impacto de los haplogrupos en la región de control del mtDNA. (*Suissa et al., 2009*). En otros aspectos se sabe que los haplogrupos tienen influencia en la severidad de la lipoatrofia que se presenta, en pacientes con SIDA, después de terapia antirretroviral altamente activa o (HAART) por sus siglas en inglés; dada la toxicidad en la mitocondria de esta terapia farmacológica, se descubrió que el genotipo mitocondrial tiene un papel en la susceptibilidad de este efecto adverso. (*Hendrickson et al., 2009*).

Se conoce relativamente poco de la asociación de los haplogrupos mitocondriales con fenotipos específicos causados por mutaciones en el mtDNA, sin embargo ya se han realizado trabajos que buscan despejar esta incógnita (*Delgado et al., 2007*); y en el futuro se contarán con mas información para tratar de correlacionar estas variantes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Realizar el análisis genético de la probable encefalomiopatía mitocondrial necrotizante infantil subaguda, (síndrome de Leigh); en una paciente pediátrica mexicana y su familia, utilizando las técnicas de biología molecular PCR y RFLP, para complementar el diagnóstico y permitir un mejor manejo terapéutico del paciente; además de dar a conocer a la comunidad de profesionales de la salud de México, sobre la identificación y determinación molecular de este síndrome poco conocido. Además de contribuir discretamente para saber si existe relación entre el fondo genético (haplogrupo) y esta enfermedad.

2.2 Objetivos particulares

1.- Extraer el DNA total de una muestra de biopsia muscular, perteneciente a una paciente con probable enfermedad de Leigh, y de sus familiares, a partir de sangre, por medio de metodologías establecidas; además de cuantificar la concentración y pureza de las mismas, con espectrofotometría, para cerciorarse que tenga las condiciones óptimas para su análisis molecular.

2.- Efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador programado previamente, a fin obtener un número adecuado de copias del fragmento de mtDNA para analizar; asimismo asegurarse de la correcta amplificación del fragmento de mtDNA y la concentración del mismo, mediante electroforesis en gel de agarosa y cuantificación por espectrofotometría, después de su purificación con Kits comerciales, para los posteriores análisis.

3.- Analizar el amplificado, mediante la técnica de RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), realizando digestiones de los amplificados con la enzima de restricción Mae III y realizando una electroforesis, para evidenciar la presencia o ausencia de la mutación según el patrón de bandas.

4.- Determinar el porcentaje de heteroplasmia encontrado de la mutación, mediante su análisis con software especializado, para correlacionarlo con la sintomatología observada.

5.- Identificar el haplogrupo mitocondrial del paciente mediante secuenciación de la región hipervariable I y por PCR-RFLP específicos, para contribuir de manera discreta a saber si existe relación entre el fondo genético (haplogrupo), y esta patología

3. Metodología

3.1 Materiales y equipos

La muestra estudiada fue facilitada por el Jefe de Neurología Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

3.1.1 Extracción de DNA total a partir de sangre.

- Tubos eppendorf de 1.5 ml. (2)
- Termomixer a 56°C, vortex y micropipetas.
- Microcentrífuga
- Kit de extracción QIAamp DNA Mini Blood (Proteinasa K, soluciones buffer AL, AW1, AW2, AE, etanol absoluto y columna QIAamp Spin con tubo colector).

3.1.2 Extracción de DNA total a partir de biopsia muscular.

- Tubos eppendorf de 1.5 ml. (2)
- Termomixer a 56°C, vórtex y micropipetas.
- Microcentrífuga
- Kit de extracción DNeasy Blood & Tissue (Proteinasa K, soluciones buffer AL, AW1, AW2, AE etanol absoluto y columna QIAamp Spin con tubo colector).

3.1.3 Cuantificación de concentración y pureza del DNA.

- Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000
- Micropipeta de 0.5 – 10 µL.
- Agua libre de nucleasas.

3.1.4 Amplificación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Solución Master Mix de Promega (*Taq polimerasa*, DNTP's, MgCl₂, Buffer).
- Agua libre de nucleasas y muestra de DNA.
- Tubos de 200 µL.
- Juego de Micropipetas.
- Termociclador.

3.1.5 Electroforesis horizontal en gel de agarosa.

- Matraz erlenmeyer 125 ml y probeta de 100 ml.
- Balanza analítica y horno de microondas.
- Parafilm, Micropipetas y vórtex.
- Cámara horizontal de electroforesis y fuente de poder.
- Agarosa y buffer TAE 1x.
- Bromuro de etidio (0.5µg/µL) y buffer de carga (loading dye)
- Marcador molecular 1 kb Promega.
- Fragmento de mtDNA amplificado (producto de PCR)
- Fotodocumentador Microdoc System de Cleaver Scientific modelo DI-HD

3.1.6 RFLP.

- Producto de PCR.
- Enzima de restricción (*Mae III*).
- Tubo de 0.2 ml y Micropipetas.
- Termomixer a 55°C.
- Software analizador de imágenes GeneTools (Syngene, Beacon House, Nuffield Road, Cambridge Inglaterra)

3.1.7 Purificación.

a) Con kit QIAquick PCR Purification

- Producto de PCR.
- Tubos eppendorf de 1.5 ml y micropipetas.
- Microcentrífuga y Vórtex
- Kit de soluciones de QIAquick PCR Purification (soluciones buffer PBI, PE, EB y columna QIAquick con tubo colector).

b) Con ExoSAP-IT

- Producto de PCR.
- Tubo de 0.2 ml.
- Solución ExoSAP-IT
- Hielo triturado y Termomixer a 37°C.

Métodos

Con el propósito de realizar el análisis molecular del mtDNA, primero se requiere extraer una muestra que puede ser de sangre, orina, raspado del interior de la mejilla (epitelio) o biopsia muscular en este caso fueron sangre y músculo. Posteriormente se extrae el DNA total con un equipo y protocolos comerciales; se amplifica mediante PCR para obtener un amplificado de 151pb; se verifica el proceso anterior con electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Se purifica empleando también módulos comerciales. Posteriormente se realiza un análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima MaeIII, cuyo sitio de restricción permite la identificación de la mutación G14459A; generándose en el caso de que sea positiva 3 fragmentos. A continuación se cuantifica el porcentaje de heteroplasmia presente con el sistema de fotodocumentación y el programa de análisis de imágenes. La determinación del haplogrupo, se hizo mediante la secuenciación de la región hipervariable I y RFLPs específicos para polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que también determinan los haplogrupos en un nivel más definido. (*Jun et al., 1994*), (*Copeland., 2001*), (*Sambrook y Russel, 2001*)

3.2.1 Extracción de DNA total a partir de sangre:

Antes de comenzar revisar los siguientes puntos:

- Realizar todas las centrifugaciones a temperatura ambiente (15°-25°C).
- Si es necesario redissolver cualquier precipitado de las soluciones buffer AL.
- Asegurarse de que el etanol haya sido añadido a las soluciones AW1 y AW2.
- Precalentar termomixer a 56°C.

1. Colocar 200 µl de la muestra de sangre en un tubo eppendorff.
2. Añadir 20 µl QIAGEN Proteasa (o Proteinasa K).
3. Agitar con el tubo en vortex por no menos de 15 segundos.
4. Adicionar 200 µl del buffer AL.
5. Mezclar perfectamente en vortex por 15 segundos.
6. Incubar a 56°C por 10 minutos.
7. Centrifugar rápidamente para retirar las gotas que hayan quedado en la tapa.
8. Adicionar 200 µl de etanol absoluto al tubo con la muestra y mezclar nuevamente en vortex por 15 segundos, centrifugar brevemente (un pulso).

-
9. Transferir la muestra a una columna QIAamp Spin en un tubo de 2 ml, sin mojar el borde, y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
 10. Extraer la columna del tubo y colocarla en un tubo colector de 2 ml nuevo. Desechar el tubo que contiene el filtrado.
 11. Abrir cuidadosamente la columna y adicionar 500 µl de buffer AW1 sin mojar el borde y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml y desechar el filtrado y el tubo.
 12. Abrir cuidadosamente la columna y adicionar 500 µl de buffer AW2. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. Colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y desechar el filtrado y el tubo.
 13. Abrir la columna y adicionar 200 µl de buffer AE o agua libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

En el paso anterior, es importante adicionar el buffer en el centro de la columna. Incubar por 5 minutos normalmente incrementa el rendimiento

3.2.2 Extracción de DNA total de músculo

Antes de comenzar revisar los siguientes puntos:

- Realizar todas las centrifugaciones a temperatura ambiente (15°-25°C).
- Si es necesario redissolver cualquier precipitado de los soluciones buffer ATL y AL.
- Asegurarse de que el etanol haya sido añadido a las soluciones AW1 y AW2.
- Precalentar termomixer a 56°C.
- Si se utiliza tejido congelado, equilibrar la muestra a temperatura ambiente.

1. Cortar el tejido (hasta 25 mg) en fragmentos pequeños y colocarlos en un tubo de 1.5 ml, adicionar 180 µl de buffer ATL.
2. Adicionar 20 µl de proteinasa K, mezclar con vortex e incubar a 56°C hasta el lisado total. Mezclar con vortex ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra o colocar en un termomixer.
3. Mezclar por 15 segundos, adicionar 200 µl de buffer AL a la muestra y mezclar totalmente. Después adicionar 200 µl de etanol (96-100%). Mezcle totalmente otra vez.
4. Pipetear la mezcla a una columna DNeasy mini spin en un tubo de 2 ml y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Deseche el filtrado y el tubo colector.

5. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml, adicionar 500 µl de buffer AW1. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el filtrado y el tubo.
6. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y adicionar 500 µl de buffer AW2. Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm. Descartar el filtrado y el tubo.
7. Situar la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml y adicionar 200 µl de buffer AE o agua libre de nucleasas para eluir. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm para eluir el DNA.
8. En el paso anterior, es importante adicionar el buffer en el centro de la columna. Incubar por 5 minutos normalmente incrementa el rendimiento.

3.2.3 Cuantificación de concentración y pureza del DNA

1. Enchufar el espectrofotómetro (Nanodrop), abrir el programa en la computadora y seleccionar: cuantificación de ácidos nucleicos.
2. Levantar el brazo del espectrofotómetro y colocar 2-1.5 µl de agua libre de nucleasas, bajar el brazo y presionar “enter” para iniciar el equipo.
3. Levantar el brazo y limpiar con papel absorbente, colocar 2 µl de la solución blanco (agua libre de nucleasas) y presionar “leer blanco”.
4. Limpiar con papel absorbente, colocar 2 µl de la muestra problema bajar el brazo y presionar “F1” o “read” (leer).

Nota: En cada lectura se debe observar que se forma un “hilo” de solución entre el brazo del espectrofotómetro y el sitio donde se coloca la muestra.

3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Preparar tubos conforme a la siguiente tabla:

Tabla 3.1 Composición de la mezcla de PCR, para un volumen total de 25 µl.

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
PCR Master mix (kit)	12.5 µl	1X
Primer L7L 5' atg cct cag gat act cct caa tag ccg tc (14430)	0.5µl	0.1-1.0µM
Primer L7H 5' ttg att gtt agc ggt gtg tgg t (14580)	0.5µl	0.1-1.0µM
DNA	1 µl	<250ng
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 µl	-----

Se utilizan los oligonucleótidos L7L y L7H, el primero lleva incluido un desapareamiento (misspairing) en la posición 14456 para generar un sitio de restricción para la enzima Mae III.

Del mismo modo se prepara un tubo blanco (control negativo) sustituyendo el DNA por agua. Se agitan los tubos perfectamente, se centrifugan rápidamente (un pulso) y se colocan dentro del termociclador previamente programado a: 94°C, 2' (precalentamiento); 94°C, 30'' (desnaturalización), 57°C, 30'' (alineamiento), 72 °C, 1' 30'' (elongación) [35 ciclos]; 72 °C, 5'; 4 °C ∞ (incubación).

3.2.5 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

a) Preparación del gel de agarosa al 0.7% y 3% (según se requiera)

1. Se pesan 0.35g o 1.5g, según corresponda, de agarosa, se colocan en un matraz Erlenmeyer y se adicionan 50 ml de TAE 1X.
2. Calentar en horno de microondas, hasta que se disuelva.
3. Agregar una gota de bromuro de etidio (BrEt 0.5µg/µL) y mezclar bien.
4. Cerrar los extremos del soporte del gel, colocar los peines adecuados y colocarlo en una superficie nivelada.
5. Verter la mezcla en el soporte evitando la formación de burbujas.
6. Cuando haya solidificado, se retira el peine y se coloca el gel en la dirección correcta en la cámara de electroforesis.
7. Se adiciona TAE 1X a la cámara hasta el nivel indicado.

b) Carga y corrida del gel

1. Se colocan 3 µl de buffer de carga (loading dye) por cada muestra a cargar, incluyendo el blanco, en un pedazo de parafilm.
2. Del mismo modo se sitúan 3 µl de BrEt diluido (0.01µg/ml) junto a cada gota colocada en el paso anterior.
3. Posteriormente se colocan 5 µl de muestra y blanco y se mezclan con los otros elementos, se toma la mezcla utilizando la micropipeta y se deposita cuidadosamente en el pocillo correspondiente. En el primer carril se colocan 5 µl de marcador de peso molecular, ya que este no requiere buffer de carga y bromuro de etidio.
4. Se cierra la cámara y se conecta a la fuente de poder (~90V). El cátodo se conecta en el extremo cercano a los pocillos, de modo que la molécula de DNA migre hacia el ánodo.

5. Se deja migrar las muestras, hasta que el frente de la corrida (colorante amarillo) se visualice cerca del extremo contrario del gel o hasta donde se requiera.
6. Por ultimo, se emplea el sistema de fotodocumentación, para fotografiar y visualizar el gel.

3.2.6 RFLP

1. La digestión con la enzima Mae III tiene el siguiente procedimiento:
2. Colocar el tubo con el amplificado en el termomixer a 55°C.
3. Se colocan 5 µl del amplificado en un tubo de 200 µl y se adiciona 2µl de la enzima Mae III además de 1 µl de buffer y 2 µl de H₂O a 55°C.
4. Se coloca el tubo en el termomixer a 55°C y se deja incubar durante 1 hr.
5. Se prepara un gel de agarosa al 3% como en los procedimientos anteriormente descritos para correr la muestra.
6. Se recurre al sistema de fotodocumentación Microdoc System para fotografiar el gel y documentar si hay corte de la enzima y por consiguiente se localiza la mutación buscada.

3.2.7 Purificación del producto de PCR

a) Con el kit QIAquick PCR Purification de Quiagen.

Antes de comenzar revisar los siguientes puntos:

- Adicionar etanol (96-100%) al buffer PE antes de usarse, si se trata de la primera ocasión.
 - Todos los pasos de centrifugación son llevados a 13000 rpm en una centrífuga convencional a temperatura ambiente.
1. Adicionar 5 volúmenes del buffer PBI a un volumen del producto de PCR y mezclar cerciorarse que el color de la mezcla sea amarillo.
 2. Colocar una columna QIAquick en un tubo colector de 2 ml.
 3. Para unir el DNA, coloque la muestra en la columna y centrifugue por 30-60segundos. Descarte el filtrado y coloque la columna de regreso en el mismo tubo.
 4. Para lavar, agregue 0.75 ml de buffer PE a la columna y centrifugue por 30-60 segundos. Descarte el filtrado y coloque la columna de regreso en el mismo tubo.
 5. Centrifugar la columna en un tubo colector de 2 ml por 1 minuto.
 6. Coloque la columna en un tubo limpio de 1.5 ml.

7. Para eluir el DNA, adicione 50µl del buffer EB o agua libre de nucleasas al centro de la membrana y centrifugue la columna por un minuto. Para incrementar la concentración de DNA, adicione solo 30µl de buffer EB o agua.

b) Con ExoSAP-IT

- El reactivo utilizado (ExoSAP-IT) requiere estar en hielo mientras se realiza el procedimiento.
1. Mezclar 2 µl de ExoSAP-IT y 5 µl del producto de PCR para un volumen total de reacción de 7 µl.
 2. Incubar a 37°C por 15 minutos para degradar los remanentes de primers y nucleótidos.
 3. Incubar a 80°C por 15 minutos con el fin de inactivar ExoSAP-IT.
 4. El producto de PCR esta purificado y es adecuado para la secuenciación de DNA.

4. Resultados

Conjuntamente a la muestra de la paciente; se estudiaron muestras pertenecientes a miembros de línea materna de la misma, (mama, dos tías y abuela), con muestras de sangre y saliva. En la paciente, las pruebas fueron realizadas con muestra de músculo. En seguida se muestra la genealogía de la paciente en estudio y los resultados de la cuantificación de DNA obtenidos.

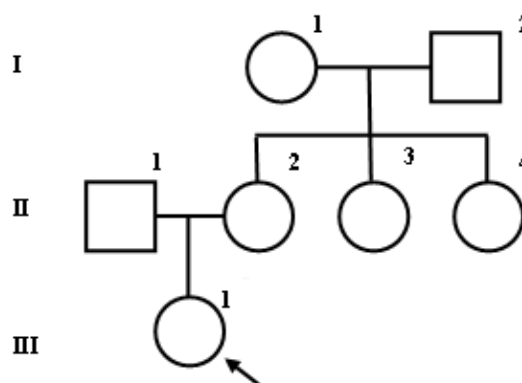


Figura 4.1 Genealogía parcial de la familia en estudio. Los círculos representan a familiares mujeres de línea materna a las que también se realizó el análisis. I-1 abuela; II- 2 Madre; II-3 y II-4 Tías; III-1 Probando.

Tabla 4.1 Concentración de DNA total (ng/μl) y relación de pureza de las muestras de la paciente y su familia correspondiente con la genealogía anteriormente indicada. La letra S indica que se trato de una muestra de saliva (células epiteliales).

Muestra	Concentración (ng/μl)	Relación 260/280
I-1	544.56	1.78
I-1 S	538.2	1.79
II-2	540.84	1.78
II-2 S	561.3	1.81
II-3	535.79	1.79
II-3 S	537.06	1.78
II-4	542.82	1.79
II-4 S	551.71	1.78
III-1	539.98	1.80

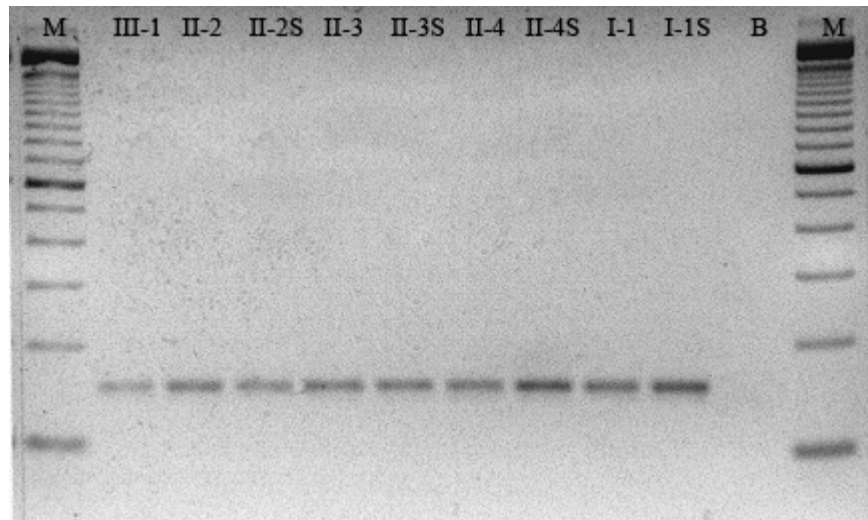


Figura 4.2 Gel de agarosa que muestra los amplificados de la paciente y sus familiares. Se puede observar un amplificado de 151pb. Se trata de un gel al 0.7%. M: marcador 1Kb; B: blanco; la letra S indica DNA extraído de saliva.

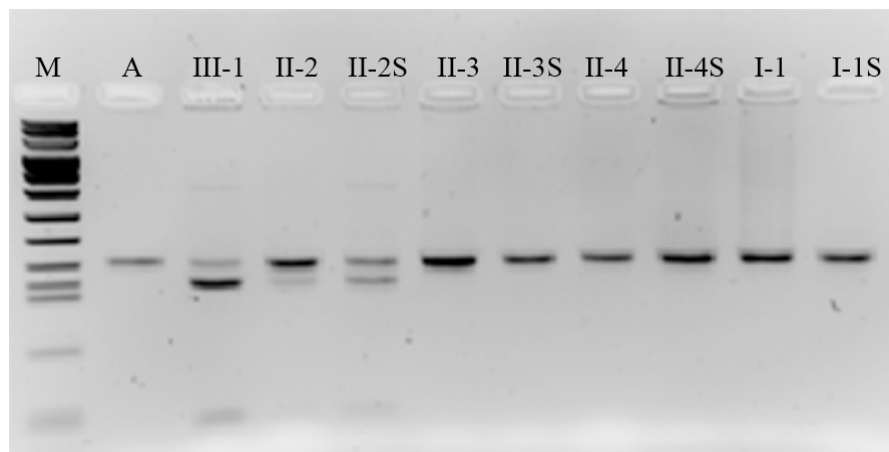


Figura 4.3 Gel de agarosa (3%) del análisis de polimorfismos longitud de fragmentos de restricción para la mutación G14459A, con la enzima MaeIII, al realizar el análisis de las bandas por densitometría se aprecia un 95% de heteroplasmia. M: marcador; A: amplificado; la letra S indica DNA extraído de saliva.

El análisis de la imagen anterior se realizó por densitometría utilizando el fotodocumentador Microdoc System de Cleaver Scientific modelo DI-HD y el analizador de imágenes GeneTools (Syngene, Beacon House, Nuffield Road, Cambridge Inglaterra); y mostró que la mutación se encontraba en un 95% en la paciente y en un 5% en su madre. No se encontró algún otro miembro de la familia con la mutación en muestra de sangre o saliva.

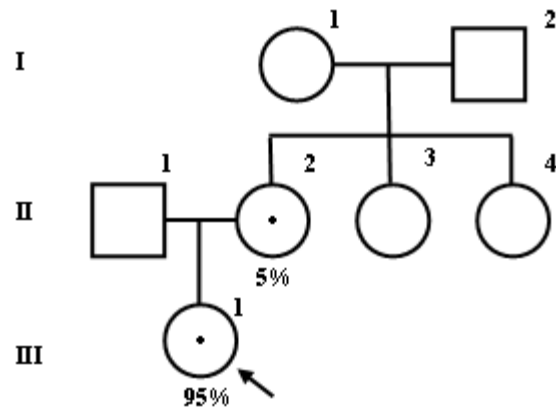


Figura 4.4 Genealogía parcial de la paciente, indicando los porcentajes de heteroplásmia de la mutación encontrados. Como puede observarse, la abuela y las tías de la paciente no presentan la mutación en sangre o células del epitelio bucal.

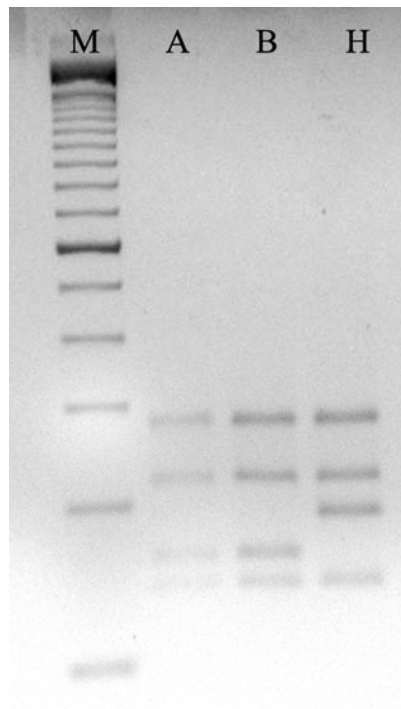


Figura 4.5 Gel de agarosa (3%) que muestra la comparación de dos muestras con haplogrupo conocido A y B en los primeros carriles y el de la paciente H; que posee el polimorfismo C7028T que confirma el haplogrupo como H y que produce un patrón de bandas diferente.

Asimismo se secuenciaron diversos fragmentos del mtDNA de la paciente y los resultados de la secuenciación mostraron la presencia de las mutaciones C10315T; T14447A; **G14459A**; A15326G y C16536G.

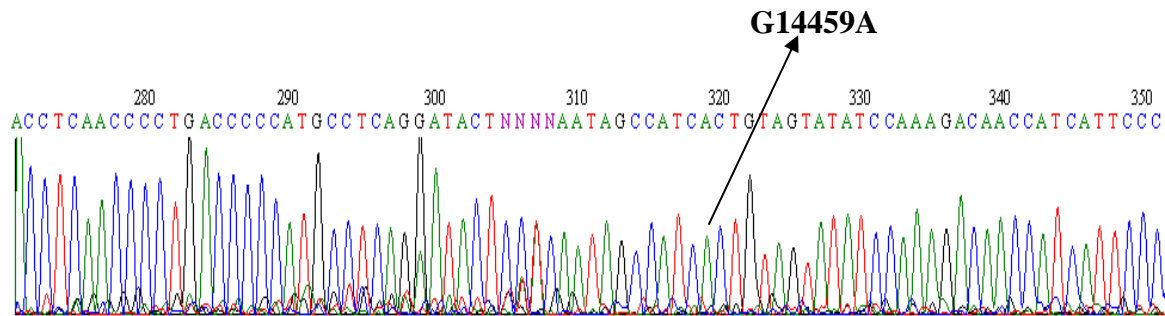


Figura 4.6 Se observa parte del electroferograma de la secuenciación del fragmento F7, secuenciado con el primer 14130L, donde se destaca la mutación relevante.

En el electroferograma, se muestra que la mutación parece ser homoplásmica, como lo reveló el RFLP.

Previamente en este trabajo, se buscaron mutaciones más comunes causantes del síndrome de Leigh; las mutaciones **T8993G/C**, **T9176C** y **A8344G**, fueron examinadas por PCR-RFLP sin localizarse. Posteriormente se prosiguió con la búsqueda de la mutación G14459A que es menos frecuente.

5. Discusión

El Síndrome de Leigh es una enfermedad devastadora, presenta una variabilidad clínica heterogénea con alteraciones tanto neuromusculares como no-neuromusculares y que pueden asociarse tanto a mutaciones en el DNA mitocondrial como nuclear. La mutación G14459A del gen *ND6* del mtDNA, ocasiona una sustitución de una alanina por una valina en la posición 72 de la secuencia de aminoácidos en una de las regiones evolutivamente más conservadas de la subunidad ND6. Esta región presenta mutaciones asociadas con el Síndrome de Leigh y MELAS y corresponde a una “zona caliente” para mutaciones asociadas a otras enfermedades mitocondriales. (*Chinnery et al., 2001*)

El estudio genético molecular puso de manifiesto la presencia de la mutación G14459A en forma heteroplásmica en una proporción del 95%. Este porcentaje de moléculas mutadas es considerablemente alto a pesar de que se trata de una muestra de músculo. Con excepción de la madre, la mutación no se encuentra presente en los miembros de la familia relacionados por vía materna y como puede apreciarse, la madre solamente presenta un 5% de moléculas de mtDNA mutadas en sangre, lo que da una idea de que esta mutación se creó en la rama de la madre del paciente, aunque no se puede saber si estaba en el óvulo o se generó después (*Playán et al., 2002*). Como es frecuente, el porcentaje de la mutación aumenta en la siguiente generación (*Chinnery et al., 2000*), (*Wong et al., 2002*)

La subunidad *ND6* es esencial para el ensamblaje correcto del complejo I (*Bai et al. 1998*). Una reducción severa en el ensamblaje del complejo I, fue encontrado en líneas celulares con alta carga de la mutación, lo que sugiere que la mutación desestabiliza el complejo totalmente ensamblado o interfiere con su ensamblaje, lo que ocasiona un defecto catalítico (*Kirby et al., 2003*). En este caso, no ha sido posible analizar el ensamblaje de los complejos, ni la actividad de la cadena respiratoria, pero es muy posible que tanto el ensamblaje del complejo como la actividad estén afectados debido al alto porcentaje de la mutación en la paciente. Anteriormente, la mutación G14459A ha sido asociada y descrita en tres casos de síndrome de Leigh (*Kirby et al., 2000*) y, previamente se había mostrado, utilizando híbridos transmitocondriales, que provoca un defecto de la actividad del complejo I (*Jun et al., 1996*).

El mtDNA de estudio corresponde a una paciente mexicana que, tras la secuenciación de la región hipervariable I de su mtDNA, no mostró ninguna diferencia con la secuencia de referencia de Cambridge y su revisión posterior (*Anderson et al., 1981*), (*Andrews et al., 1999*) que, junto con la determinación de determinados polimorfismos de la zona codificante, permitió concluir que pertenecía al haplogrupo H de origen europeo, (*Wallace et al., 1999*). En trabajos previos se han reportado presencia de enfermedad mitocondrial en pacientes mexicanos pertenecientes a haplogrupos nativoamericanos (*Delgado-Sánchez et al., 2007*), sin embargo en este caso se trata de paciente mexicana perteneciente al haplogrupo europeo H. Cada vez son más los casos descritos de asociación de haplogrupos mitocondriales y fenotipos de importancia clínica. Sin embargo, de los casos descritos de Síndrome de Leigh, es escasa la información publicada en la que se haya determinado el haplogrupo mitocondrial al que corresponde, lo que dificulta buscar posibles asociaciones del fenotipo y el fondo genético mitocondrial.

La mutación G14459A reúne los criterios de patogenicidad para mutaciones puntuales descritos por Montoya y se considera que es la causa del Síndrome de Leigh que padece la paciente. Este resultado, junto con los publicados anteriormente (*Kirby et al., 2000*), sugiere que esta mutación debe de estudiarse en pacientes con Síndrome de Leigh que no presenten las mutaciones puntuales mas comunes (*Montoya et al., 2009*).

El estudio de las patologías mitocondriales y sus causas así como asociaciones con el fondo genético, permitirán lograr un mejor diagnóstico y tratamiento de los pacientes y con ello una mejor calidad de vida. Existen ya, pruebas para evaluar cantidades mayores de genoma mitocondrial (microarreglos), estos estudios serán importantes para la explicar la extrema heterogeneidad clínica de los desordenes mitocondriales; y el papel de la mitocondria en los desórdenes neurodegenerativos (*Alesci et al., 2006*) y la acumulación de mutaciones del genoma mitocondrial como causa de envejecimiento (*Krishnan et al., 2007*)

6. Conclusiones

Se realizó el análisis genético de la probable encefalomiopatía mitocondrial necrotizante infantil subaguda, (síndrome de Leigh); en una paciente pediátrica mexicana y su familia, con lo que se corroboró molecularmente el diagnóstico preliminar del médico. Lo que promueve que la terapia aplicada a la paciente sea más específica. Además, se dio a conocer a la comunidad de profesionales de la salud de México, sobre la identificación y determinación molecular de este síndrome poco conocido y la importancia de esta mutación como causante de esta enfermedad. Asimismo se contribuyó de manera discreta a saber si existe relación entre el fondo genético (haplogrupo), y esta patología. En este caso el haplogrupo de la paciente, determinado también por PCR-RFLP y secuenciación de un fragmento que contiene la región hipervariable mostró ser H.

Se consiguió extraer el DNA total a partir de una muestra de biopsia muscular, y de sangre de familiares; además la concentración del DNA extraído, mostró ser óptima, alrededor de los 500 ng/ μ l y la pureza del mismo también, con una relación 260/280, entre 1.78 y 1.81 en todas las muestras extraídas con lo que se llevaron a cabo los análisis correspondientes.

Se logró la correcta amplificación de los fragmentos deseados del mtDNA, con lo que se obtuvo un número adecuado de copias para analizar; y se ratificó la correcta amplificación del fragmento de mtDNA (151pb) y después de purificar con kits comerciales, la adecuada concentración del mismo.

Se evidenció la existencia de la mutación G14159A en el mtDNA de la paciente y en su madre, analizando patrón de bandas del amplificado digerido con la enzima Mae III mediante la técnica de RFLP.

El porcentaje de heteroplásmia de la mutación se relaciona directamente con la severidad de la enfermedad; ya que en la madre de la paciente no se muestran síntomas (5%), en tanto que la paciente con una carga de mtDNA mutado tan elevada (95%) la severidad es más que evidente.

El haplogrupo de la paciente y por lo tanto de su madre es H; con esto se contribuye con un dato hasta ahora no publicado, para ayudar a conocer en el futuro, si existe relación entre el fondo genético y esta patología, debido a que son necesarios mas datos.

7. Perspectivas

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, el Síndrome de Leigh es causado también por mutaciones en el DNA nuclear; por ejemplo, mutaciones en el gen SURF-1 están asociadas con el síndrome de Leigh por deficiencias en el ensamble de la citocromo C oxidasa (COX), en el cromosoma 9. (Tiranti *et al.*, 1998; Yao y Shoubridge, 1999). Del mismo modo, mutaciones en el gen NDUFA2 en el cromosoma 5, causan una reducción en la actividad del complejo I y alteran su ensamble (Hoefs *et al.*, 2008) Igualmente se sabe de mutaciones en el gen NDUFS8 que modifican la actividad del complejo I al codificar para una de sus subunidades; pero en este caso se trata de una subunidad altamente conservada entre procariotas y eucariotas, y que involucra sitios de unión hierro-azufre.

Todas estas mutaciones del genoma nuclear además de otras (Rossi *et al.*, 2003; Gerards *et al.*, 2009) inducen a que el estudio de las causas de las enfermedades mitocondriales sea mas importante que nunca antes, considerando que estas patologías están subdiagnosticadas (Kirby *et al.*, 1999).

La pregunta de si existe una existencia simultánea o solapamiento entre mutaciones del genoma mitocondrial y nuclear, considerando la complejidad en las manifestaciones clínicas y las múltiples mutaciones causantes del síndrome de Leigh; lleva a la búsqueda de mutaciones en este último, de manera que se busque responder esta incógnita. En un trabajo posterior, se tratará de investigar esta posible asociación.

8. Referencias

1. Alesci S., Manoli I., Michopolous V., Brouwers F., Le H., Gold P., Blackman m., Rennert O., Su Y. y Chrousos G. “Development of a human mitochondria-focused cDNA microarray (hMitChip) and validation in skeletal muscle cells: implications for pharmaco- and mitogenomics” *The Pharmacogenomics Journal*. 2006; **6**: 333-342.
2. Anderson S., Bankier A., Barrell B., De-Bruijn M., Coulson A. y Drouin J. “Sequence and organization of the human mitochondrial genome”. *Nature*. 1981; **290**: 427-65.
3. Andrews R., Kubacka I., Chinnery P., Lightowlers R., Turnbull D. y Howell N. “Reanalysis and revisión of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA”. *Nature genetics*. 1999; **23**: 147.
4. Brandon M., Baldi P. y Wallace D. “Mitochondrial mutations in cancer” *Oncogene*. 2006; **25**: 4647-4662.
5. Brautbar A., Wang J., Abdenur J., Chang R., Thomas J., Grebe T., Lim C., Weng S., Graham B. y Wong L. “The mitochondrial G13513A mutation with Leigh disease phenotypes independent of complex I deficiency in muscle”. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2008; **94**: 485-490
6. Cann L., Stoneking M. y Wilson A. “Mitochondrial DNA and human evolution”. *Nature*. 1987; **325**: 31-36
7. Chinnery P., Brown D., Andrews R., Singh-Kler R., Riordan-Eva P., Lindley J., Applegarth D., Turnbull D. y Howell N. “The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber’s hereditary optic neuropathy”. *Brain*. 2001; **124**: 209-18.
8. Chinnery P., Thorburn D., Samuels D., White S., Dahl H., Turnbull D., Lightowlers R. y Howell N. “The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?”. *Trends Genetics*. 2000; **16**: 500-505.
9. Copeland W. (Editor). 2002. “Methods in molecular biology, Mitochondrial DNA, Methods and Protocols”. Humana Press. Totowa, E.U.A. pp. 65-70.
10. Dahl H. “Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome”. *American Journal of Human Genetics*. 1998; **63**:1594-1597.
11. Delgado-Sánchez R., Zárata-Moysén A., Monsalvo A., Herrero M., Ruiz-Pesini E., López-Pérez M., Montoya J., Montiel-Sosa J. “Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes

cerebrovasculares (MELAS) con la mutación A3243G en el gen del ARNt Leu (UUR) del MtDNA en haplogrupo B2 nativoamericano”. *Revista de Neurología*. 2007; **44**:1: 18-22.

12. Filiano J., Goldenthal M., Mamourian A., Hall C. y Marín-García J. “Mitochondrial DNA depletion in Leigh syndrome”. *Pediatric Neurology*. 2002; **26**:3: 239-342.

13. Gerards M., Sluiter W., van den Bosch B., de Wit E., Calis C., Frentzen M., Akabari H., Schoonderwoerd K., Scholte H., Jongbloed R., Hendrickx A., de Coo I y Smeets H. “Defective complex I assembly due to C20orf7 mutations as a new cause of Leigh syndrome”. *Journal of Medical Genetics*. doi: 10.1136/jmg.2009.067553.

14. Gray M., Burger G. y Lang B. “The origin and early evolution of mitochondria” *Genome Biology*. 2001; **2**:6: 1018.1-1018.5.

15. Gropman A., Chen T., Perng C., Krasnewich D., Chernoff E., Tiftt C., Wong L. “Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation”. *American Journal of Medical Genetics*. 2004; **124A**:4: 177-182.

16. Gutiérrez A., Saldaña-Martínez A., García-Ramírez R., Rayo-Mares D., Carreras M., López-Pérez M., Ruiz-Pesini E., Montoya J. y Montiel-Sosa J. “Síndrome de Leigh causado por la mutación G14459A del ADN mitocondrial en una familia mexicana”. *Rev. de Neurología*. 2009; **49**:5: 248-250.

17. Hendrickson S., Kingsley L., Ruiz-Pesini E., Poole J., Jacobson L., Palella F., Bream J., Wallace D. y O'Brien S. “Mitochondrial DNA haplogroups influence lipoatrophy after highly active antiretroviral therapy.” *Journal of Acquire Immune Deficit Syndrome*. 2009; **51**:2: 111-116.

18. Hoefs S., Dieteren C., Distelmaier F., Janssen R., Epplen A., Swarts H., Forkink M., Rodenburg R., Nijtmans L., Willems P., Smeitink J. y van den Heuvel L. “NDUFA2 Complex I mutation leads to Leigh disease”. *The American Journal of Human Genetics*. 2008; **82**: 1306-1315.

19. Hofmann S. y Bauer M. 2005. “Mitochondrial disorders”. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons.

20. Jun A., Trounce I., Brown M., Shoffner J. y Wallace D. “Use of transmitochondrial cybrids to assign a complex I defect to the mitochondrial DNA-encoded NADH dehydrogenase subunit 6 gene mutation at nucleotide pair 14459 that causes Leber hereditary optic neuropathy and dystonia”. *Molecular Cell Biology*. 1996; **16**: 771-777.

21. Jun A., Brown M. y Wallace D. “A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia” *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994; **91**: 6206-6210.

-
22. Kirby D., Boneh A., Chow C., Ohtake A., Ryan M., Thyagarajan D., Thorburn D. "Low mutant load of mitochondrial DNA G13513A mutation can cause Leigh's disease". *Annals of Neurology*. 2003; **54**: 4: 473-478.
23. Kirby D., Crawford M., Cleary M., Dahl H., Dennett X. y Thorburn D. "Respiratory chain complex I deficiency, an underdiagnosed energy generation disorder". *Neurol.* 1999; **52**:6: 1255-1264.
24. Kirby D., Kahler S., Freckmann M., Reddihough D., Thorburn D. "Leigh disease caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in unrelated families". *Ann. Neurol.* 2000; **48**:1: 102-104.
25. Krishnan K., Greaves L., Reeve A. y Turnbull D. "The ageing mitochondrial genome". *Nucleic Acid Research*. 2007; **35**:22: 7399-7405.
26. Leigh D. "Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1951; **14**: 216-221.
27. Loeffen J., Smeitink J., Triepels R., Smeets R., Schuelke M., Sengers R., Trijbels F., Hamel B., Mullaart R. y van den Heuvel L. "The first Nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome". *American Journal of Human Genetics*. 1998; **63**: 1598-1608
28. López E. 2007 "Defectos en el DNA mitocondrial asociados a enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa". Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
29. Luque J y Herráez A. 2001. "Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética" Ediciones Harcourt. Madrid, España.
30. Mallo J., Castañón L., Herrero B., Robles B. y Goded F. "Síndrome de Leigh con déficit de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial". *Ann. de Pediatría*. 2005; **62**:2: 161-165.
31. Medina-Crespo V., Vázquez-Memije M., Vázquez-Acevedo M., Vela-Amieva M., Pérez-Andrade M. y González-Halphen D. "Bases para el diagnóstico de las citopatías mitocondriales. Antecedentes históricos, bases genéticas y bioquímicas". *Acta Pediátrica Mex.* 2004; **25**:4:244-256.
32. Metzker M. y Caskey T. 2001. "Polymerase Chain Reaction (PCR)" *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons.
33. MITOMAP: A human mitochondrial genome database. Disponible en <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>
34. Montoya J., López-Gallardo E., Díez-Sánchez C., López-Pérez M. y Ruiz-Pesini E. "20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; **1787**: 476-483.

-
35. Pettman R., Hurley T., Addis J., Robinson B., Scott H. y Kronick B. "Prenatal diagnosis by amniocentesis and chorionic villus biopsy of mtDNA mutation T8993G". *Journal of Inherited Metabolism Disorders*. 2007; **30**: 404.
36. Playán A., Solano-Palacios A., González de la Rosa J., Merino-Arribas J., Andreu A., López-Pérez M. y Montoya J. "Síndrome de Leigh producido por una mutación de novo T8993G en el ADN mitocondrial". *Revista de Neurología*. 2002; **34**:12 1124-1126.
37. Poulton J. y Bindoff L. 2001. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons
38. Puñal J., Gómez C., Blanco M. y Castro-Gago M. 2008 "Protocolos de diagnóstico terapéuticos de la AEP: Neurología pediátrica". Asociación española de pediatría.
39. Rahman S., Blok R., Dahl H., Danks D., Kirby, D., Chow C., Cristodoulou J., y Thorburn D. "Leigh syndrome: Clinical features and biochemical and DNA abnormalities". *Annals of Neurology*. 1996; **39**: 343-351.
40. Rojo A., Campos Y., Sánchez J., Bonaventura I., Aguilar M., García A., González L., Rey M., Arenas J., Olivé M. y Ferrer I. "NARP-MILS syndrome caused by T8993G mitochondrial DNA mutation: a clinical, genetic and neuropathological study". *Acta Neuropathol*. 2006; **111**: 610-616.
41. Rossi A., Biancheri R., Bruno C., Di Rocco M., Calvi A., Pessagno A. y Tortori-Donati P. "Leigh syndrome with COX deficiency and SURF1 gene mutations: MR Imaging findings. *American Journal of Neuroradiology*. 2003; **24**: 1188-1191.
42. Ruiten M., Siers M., van den Elzen C., van Engelen B., Smeitink J., Rodenburg R. y Hol F. "The mitochondrial G13513A a mutation is most frequent in Leigh syndrome combined with reduced complex I activity, optic atrophy and/ or Wolff-Parkinson-White" *European Journal of Human Genetics*. 2007; **15**: 155-161.
43. Sambrook J. y Russel D. 2001. "Molecular cloning, A laboratory manual". EUA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Santorelli F., Shanske S., Macaya A., DeVivo D. y DiMauro S. "The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome." *Ann. of Neurology*. 1993; **34**: 827-834.
45. Schwartz M. y Vissing J. "Paternal inheritance of mitochondrial DNA". *The New England Journal of Medicine*. 2002; **347**:8 576-580.
46. Sciacco M., Prella A., D'Adda E., Lamperti C., Bordoni A., Rango M., Crimi M., Comi G., Bresolin N. y Moggio M. "Familial mtDNA T8993C transition causing both the NARP and the MILS phenotype in the same generation". *Journal of Neurology*. 2003; **250**: 1498-1500.

-
47. Shanske S., Coku J., Lu J., Ganesh J., Krishna S., Tanji K., Bonilla E., Naini A., Hirano M. y DiMauro S. "The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome". *Archives of Neurology*. 2008; **65**: 3: 368-372.
48. Smeitink J., van der Heuvel L. y DiMauro S. "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation". *Nature Reviews*. 2001; **2**: 342-352.
49. Solano A., Playán A., López-Pérez M. y Montoya J. "Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano". *Salud Pública de México*. 2001; **43**:2: 151-161.
50. Suissa S., Wang Z., Poole J., Wittkopp S., Feder J., Shutt T., Wallace D., Shadel G. y Mishmar D. "Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication". *PLoS Genetics*. 2009; **5**:5. Publicación electrónica.
51. Sweeney M., Hammans S., Duchon L., Cooper J., Schapira A., Kennedy C., Jacobs J., Youl B., Morgan-Hughes J. y Harding A. "Mitochondrial DNA mutation underlying Leigh's syndrome: clinical, pathological, biochemical, and genetic studies of a patient presenting with progressive myoclonic epilepsy". *Journal of the Neurological Sciences*. 1994; **121**: 57-65.
52. Taylor R., Morris A., Hutchinson M. y Turnbull D. "Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation". *European Journal of Human Genetics*. 2002; **10**:141-144.
53. Taylor R. y Turnbull D. "Mitochondrial DNA mutations in human disease". *Nature Reviews*. 2005; **6**: 389-402.
54. Tarnopolsky M., Baker S., Myint T., Maxner C., Robitaille J., Robinson B. "Clinical variability in maternally inherited Leber Hereditary Optic Neuropathy with the G14459A mutation". *American Journal of Medical Genetics*. 2004; **4**:124A: 372-376.
55. Tatuch Y., Christodoulou J., Feigenbaum A., Clarke J., Wherret J., Smith C., Rudd N., Petrova-Benedict R. y Robinson B. "Heteroplasmic mtDNA mutation (T-to-G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high." *Am. J. of Human Genetics*. 1992; **50**: 852-858.
56. Tiranti V., Hoertnagel K., Carrozzo R., Galimberti C., Munaro M., Granatiero M., Zelante L., Gasparini P., Marzella R., Rocchi M., Bayona-Bafaluy P., Enriquez J., Uziel G., Bertini E., Dionisi-Vici C., Franco B., Meitinger T. y Zeviani M. "Mutations of SURF-1 Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency". *American Journal of Human Genetics*. 1998; **63**: 1609-1621.
57. Ugalde C., Triepels R., Coenen M., van den Heuvel L., Smeets R., Uusimaa J., Briones P., Campistol J., Majamaa K., Smeitink J., Nijtmans L., "Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene". *Ann. Neurol*. 2003; **54**: 665-669.

-
58. Vázquez-Memije M. y Tuena de Gómez Puyou. 2002. “Mitocondria una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos”. Editorial Prado. México DF.
59. Wallace D., Brown M. y Lott M. “Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease”. *Gene*. 1999; **238**: 211-230.
60. Wang J., Brautbar A., Chan A., Dzwiniel T., Li F., Waters P., Graham B. y Wong L. “Two mtDNA mutations T14487C (M63V, ND6) and T12297C (tRNA Leu) in a Leigh syndrome family”. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2008; **96**: 59-65.
61. Wong L., Wong H. y Liu A. “Intergenerational transmission of pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA”. *Genet. Medicine*. 2002; **4**: 78-83.
62. Yao J. y Shoubridge E. “Expression and functional analysis of SURF-1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency”. *Human Molecular Genetics*. 1999; **8**:13: 2541-2549.
63. Zeviani M. y Di Donato S. “Mitochondrial disorders”. *Brain*. 2004; **127**:10: 2153-2172.