



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“Diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales:
confirmación de la mutación A3243G en el ADN
mitocondrial, asociada a la patología MELAS por medio de
PCR-RFLP en familias mexicanas”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANGÉLICA SALDAÑA MARTÍNEZ

ASESORES: Dr. José Francisco Montiel Sosa
M. en C. Idalia Carmen Ávila Miyazawa



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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales: confirmación

de la mutación A3243G en el ADN mitocondrial, asociada a la patología
MELAS por medio de PCR-RFLP en familias mexicanas.

que presenta la pasante: Angélica Saldaña Martínez

con número de cuenta: 403079311 para obtener el título de :

Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de abril de 2009

PRESIDENTE

Dr. José Francisco Montiel Sosa

VOCAL

QFB. María Esther Revuelta Miranda

SECRETARIO

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

PRIMER SUPLENTE

QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz

SEGUNDO SUPLENTE

QFB. Maritere Domínguez Rojas

GRACIAS...

A DIOS por amarme, cuidarme y no dejarme... Porque todo cuanto soy y cuanto tengo, sé que es obra tuya... Por poner en mi camino a las personas correctas en las que te descubro día con día... Por mirarme y bendecirme siempre... Por brindarme tu mano para levantarme en cada tropiezo y tener la seguridad de que estás conmigo a dondequiera que vaya... Por la paz y tranquilidad que me hacen continuar y ser feliz. Ahora sé que sin Tí nada soy, pero contigo todo lo puedo.

*Ni siquiera el más perfecto de los hombres,
será algo sin la sabiduría que viene de tí (Sab. 9,6).*

A mis padres Gilberta y Eduardo por quererme, entenderme, creer en mí y apoyarme siempre... Su amor incondicional es mi más grande regalo y doy gracias a Dios por ello. Sé que no soy muy expresiva y que tal vez mis palabras los tomen por sorpresa, pero deben saber que los admiro muchísimo y espero nunca fallarles. Gracias a los dos por su fortaleza, su ejemplo y por inculcar en mí el espíritu de lucha. Por la alegría de tenerlos y disfrutarlos cada día. Por sus consejos, por sus regaños, por sus desvelos y preocupaciones, no me alcanzaría la vida para pagarles siquiera un poco lo que han hecho por mí. Los amo!

A mis hermanitos Víctor y Lalo por quererme y apoyarme sin cuestionarme. Por la alegría que dan a mi vida con sus ocurrencias. Por la confianza, los buenos consejos, y hasta por los regaños... Los quiero muchísimo!

A mis padrinos Adela y Aniceto por apoyarme, aconsejarme y consentirme en cada oportunidad.

A mis primas Adriana y Claudia por su amistad y confianza.

A todos aquellas personas que me han brindado su valiosa amistad: Itzmel, Anabell, Alejandro GG, Franchini, Pilar, Lety, Clausen, Dalis, Dany. Gracias por compartir conmigo experiencias tanto de felicidad como de traumas académicos.

Al Dr. Francisco Montiel por la confianza que me brindó para llevar a cabo este proyecto y por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Por el tiempo invertido, por las enseñanzas, por su paciencia y sencillez. Por favor ¡nunca cambie Doc!.

A Josefina Moreno por la amistad y consejos, por las palabras de aliento.

A la Maestra Idalia Ávila por su asesoría y consejos además del tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rubén García Ramírez, jefe del Servicio de Neurología Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, por el apoyo, colaboración, compromiso y confianza que depositó en mí, al otorgarme las muestras empleadas para el desarrollo del presente trabajo.

Al Ing. Omar Agni García Hernández por el apoyo, tiempo y disposición invertidos en la edición de imágenes.

Dedico este trabajo a mi papá y a mi mamá como un pequeño triunfo en retribución a sus grandes esfuerzos y sacrificios para brindarme la mejor de las herencias, mi formación académica; pero sobre todo, por la educación que ustedes mismos me han dado en casa: los valores, con los que hoy han logrado que yo pueda ser una persona íntegra. Y a mis hermanos, por ser parte fundamental de este logro.

= Índice general =

Índice general	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	v
Abreviaturas	vi
1. GENERALIDADES	1
1.1 Genoma Mitocondrial	1
1.1.1 Origen y función de la mitocondria	1
1.1.2 Estructura y función del DNA mitocondrial	3
1.1.3 Organización, replicación y transcripción	4
1.1.4 Regulación de la expresión genética del mtDNA	7
1.1.5 Heteroplasmía y efecto umbral	8
1.1.6 Segregación mitótica	9
1.1.7 Modo de herencia	9
1.1.7.1 Efecto cuello de botella	9
1.2 Enfermedades mitocondriales	10
1.2.1 Clasificación	11
1.2.2 Diagnóstico	17
1.2.3 Tratamiento	18
1.2.4 MELAS	24
1.3 Haplogrupos mitocondriales	26
1.3.1 Asociación entre genotipo y fenotipo mitocondrial	31
1.4 Métodos para localizar polimorfismos o mutaciones	32
1.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
1.4.2 Secuenciación	34
1.4.3 Polimorfismo en los Fragmentos Largos de Restricción (RFLP)	35
2. OBJETIVOS	36
a. Objetivo general	36
b. Objetivos particulares	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Materiales y equipos	37
3.1.1 Extracción de DNA a partir de sangre completa	38
3.1.2 Extracción de DNA a partir de biopsia muscular	38
3.1.3 Cuantificación y pureza de DNA	38

3.1.4	Amplificación de la región específica por PCR	39
3.1.5	Electroforesis en gel de agarosa	39
3.1.6	Polimorfismo en los fragmentos largos de restricción (RFLP)	39
3.1.7	Purificación	39
	i) Con Kit QIAquick PCR purification	39
	ii) Con ExoSAP-IT	40
3.2	Métodos	40
3.2.1	Extracción de DNA a partir de sangre completa	40
3.2.2	Extracción de DNA a partir de biopsia muscular	41
3.2.3	Cuantificación y pureza de DNA	42
3.1.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	42
3.2.5	Electroforesis	42
	i) Preparación del gel de agarosa	43
	ii) Carga y corrida del gel	43
3.2.6	Polimorfismo en los fragmentos largos de restricción (RFLP)	43
3.2.7	Purificación	44
	i) Con Kit QIAquick PCR purification	44
	iii) Con ExoSAP-IT	44
4.	RESULTADOS	45
5.	DISCUSIÓN	51
6.	CONCLUSIONES	54
7.	BIBLIOGRAFÍA	55

= Índice de figuras =

Figura 1.1. Esquema de reacciones enzimáticas en la mitocondria para obtener ATP a partir de glucógeno y ácidos grasos	2
Figura 1.2. Mapa del genoma mitocondrial humano	3
Figura 1.3. Cuello de botella genético	9
Figura 1.4. Mapa de enfermedades mitocondriales indicando el gen causante	14
Figura 1.5. Complejos de la cadena respiratoria del I al IV y la fosforilación	15
Figura 1.6. Nivel al que actúan los fármacos en la cadena respiratoria	19
Figura 1.7. Terapia génica	23
Figura 1.8. Mutaciones patológicas en el tRNA ^{Leu(UUR)}	24
Figura 1.9. Migración del DNA mitocondrial humano	30
Figura 1.10. Diagrama tiempo-temperatura en un programa de PCR	33
Figura 4.1. Árbol genealógico de la paciente no.1 (III.5)	45
Figura 4.2. Árbol genealógico del paciente 2 (II.C)	45
Figura 4.3. Gel de agarosa que muestra el amplificado de 654 pb de la paciente III.5 y sus familiares	47
Figura 4.4. Gel de agarosa al 0.7% que muestra el amplificado de 654 pb a partir de DNA extraído de saliva de los familiares de la paciente III.5	47
Figura 4.5. Gel de agarosa al 2% que muestra los RFLP's con la enzima <i>Apa I</i> en los amplificados de 654 pb de la paciente III.5 y sus familiares	47
Figura 4.6. Gel de agarosa al 3% que muestra los RFLP's en los amplificados de 654 pb del paciente II.C y sus familiares, además de la paciente E	48
Figura 4.7. Árbol genealógico de la paciente III.5 donde se muestran los porcentajes de heteroplasmia determinados en muestras sanguíneas	49
Figura 4.8. Árbol genealógico del paciente II.C donde se observan los porcentajes de heteroplasmia de la mutación A3243G en músculo	49
Figura 4.9. Gel de agarosa al 2% que muestra el corte con la enzima <i>Hae III</i> , que confirma haplogrupo A del paciente II.C	50
Figura 4.10. Comparación de las secuencias de los pacientes III.5 (12L_12F) y E	

(12E_12F) con la secuencia de referencia	50
--	----

= Índice de tablas =

Tabla 1.1. Código genético mitocondrial de mamíferos	5
Tabla 1.2. Diferencias entre el código genético universal y el mitocondrial	6
Tabla 1.3. Fármacos empleados en la terapia paliativa de las enfermedades OXPHOS ..	20
Tabla 1.4. Mutaciones relacionadas con MELAS	25
Tabla 1.5. Haplogrupos nativo-americanos	31
Tabla 3.1. Resumen de las historias clínicas de los pacientes con probable enfermedad mitocondrial	37
Tabla 3.2. Preparación de una PCR para un volumen de reacción de 25 μ l	42
Tabla 4.1. Resultados obtenidos de la cuantificación de DNA por espectrofotometría de los pacientes y sus familiares	46
Tabla 4.2. Resultados obtenidos para el cálculo del porcentaje de heteroplasmia en los pacientes (en blanco) y sus familiares	48
Tabla 4.3. Haplogrupos determinados mediante secuenciación parcial de las muestras de los pacientes estudiados	50

= Resumen =

Las patologías mitocondriales constituyen un problema tanto para su diagnóstico como para su tratamiento, debido a su variedad fenotípica y genotípica. La complejidad de este tipo de padecimientos y sus consecuencias no sólo en el paciente sino también en la familia del mismo, han estado en continuo estudio a fin de lograr comprender cuál o cuáles son los mecanismos de patogénesis que se desarrollan de acuerdo cada una de las afecciones del genoma mitocondrial y/o nuclear que se presentan y que conllevan a las diferentes manifestaciones clínicas de los síndromes mitocondriales. El diagnóstico de las enfermedades mitocondriales en México, sólo se ha llevado a cabo por los médicos basándose en la sintomatología multisistémica, con resultados de laboratorio como son los valores de lactato, piruvato y lactato/piruvato en sangre y líquido cefalorraquídeo, citología microscópica, además de tomografías computarizadas donde observan los infartos cerebrales que sufren los pacientes. En este trabajo se buscó sustentar la sospecha del médico ante la presencia de una mitocondriopatía como MELAS a nivel molecular en tres pacientes mexicanos (III.5, II.C y E), los cuales presentaron afectaciones multisistémicas. Se procedió a la extracción del DNA total, seguida de la amplificación del fragmento de 654 pb tanto de pacientes como familiares de los mismos para posteriormente realizar el RFLP que permitió evidenciar y determinar el porcentaje de heteroplasmia de la mutación A3243G en cada uno. Se encontró que los tres pacientes estudiados presentan diferentes porcentajes de la mutación A3243G en el mtDNA al igual que algunos miembros de sus familias por línea materna. Con ello se logró identificar de manera anticipada, a miembros de la familia con porcentajes altos de la mutación lo cual alertó tanto al médico como a su familia ante la presentación de los síntomas que caracterizan a la enfermedad. Además, se informó al médico de aquellos familiares que aunque presentaron niveles bajos de la mutación, pueden fácilmente heredarla modificando los porcentajes y predisponiendo a la descendencia.

Por otro lado, el haplogrupo de los pacientes, se determinó mediante la secuenciación de la región hipervariable I y/o RFLP, encontrándose de manera interesante, que la mayoría pertenece al haplogrupo B, lo cual sugiere una posible asociación entre la prevalencia de la mutación A3243G presente en los pacientes de MELAS y el haplogrupo al que pertenecen.

= Abreviaturas =

ANT1	Isoforma del transportador de nucleótidos de adenina.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BrEt	Bromuro de etidio.
dGK	Deoxiguanosina quinasa.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Desoxirribonucleosidos trifosfato.
HVS	Región hipervariable.
IQ	Coficiente intelectual.
IRM	Imagen de resonancia magnética.
kb	Kilobase.
KSS	Síndrome de Kearns-Sayre.
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber.
MDa	Milidaltones.
MELAS	Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro vasculares.
MERRF	Epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas.
MILS	Síndrome materno hereditario de Leigh.
MNGIE	Encefalopatía mitocondrial nuerogastrointestinal.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
MRPRNasa	Endonucleasa procesadora de RNA mitocondrial.
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
mTERF	Factor de terminación.
mtSSB	Proteínas de unión a monocadena.
NADH	Dinucleotido de nicotinamida y adenina reducido.
NARP	Neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa.
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear.
O _H	Origen de replicación de la cadena H.
O _L	Origen de replicación de la cadena L.
OXPHOS	Fosforilación oxidativa.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDH	Piruvato deshidrogenasa.

POE	Oftalmoplegía externa progresiva.
POLG	DNA polimerasa gamma.
POLRMT	RNA polimerasa mitocondrial.
RFLP	Polimorfismo en los fragmentos largos de restricción.
RM	Resonancia magnética.
RRF	Fibras rojo rasgadas.
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal.
TCG	Crisis tónico clónico generalizadas.
TFAM	Factor de iniciación de la transcripción.
TFB1	Factor de transcripción B1.
TFB2M	Factor de transcripción B2.
TK2	Timidina quinasa 2.
TOP1	Topoisomerasa 1.
TP	Timidina fosforilasa.
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia.
tRNA ^{Leu}	RNA de transferencia para leucina.
tRNA ^{Phe}	RNA de transferencia para fenilalanina.
tRNA ^{Ser}	RNA de transferencia para serina.
tRNA ^{Val}	RNA de transferencia para valina.

1. GENERALIDADES

1.1 Genoma Mitocondrial

1.1.1 Origen y función de la mitocondria

Se cree que la mitocondria (orgánulo que aporta el 90% de la energía que necesitan las células) surgió al acumularse el oxígeno en la atmósfera terrestre. Posiblemente la mitocondria y el núcleo de la célula eucariota se crearon a la vez, al incorporarse por endocitosis células procariotas aeróbicas al interior de la célula eucariótica anaeróbica y fusionarse ambas. Con el tiempo, la mayoría de los genes procarióticos (genes protomitocondriales) se integraron en el genoma nuclear, con lo que el eucariota primitivo anaeróbico ya podía vivir en una atmósfera aeróbica, rica en oxígeno; sólo una pequeña fracción del genoma procariótico primigenio permaneció en la mitocondria (Luque *et al.*, 2001). Recientes resultados en genética molecular han confirmado el origen bacteriano de las mitocondrias eucariotas, como remanentes de protobacterias que colonizaron células anaeróbicas nucleadas hace millones de años, donde la relación entre los dos organismos se volvió simbiótica, el huésped eucariota proporcionaba alimento y protección, y la bacteria detoxificaba la célula del dañino oxígeno (Andreu *et al.*, 2004). Los estudios indican que las mitocondrias se originaron a partir de un ancestro de las bacterias del género *Rickettsia* (Gray *MW*, 1993).

De manera general, la función de la mitocondria se resume en la Figura 1.1 donde se muestra que: los equivalentes reducidos en el ciclo de Krebs y en la β -oxidación pasan a través de complejos proteínicos incrustados en la membrana mitocondrial interna (cadena transportadora de electrones) que consiste de 4 complejos multiméricos (I al IV) más 2 pequeños acarreadores de electrones, coenzima Q (ubiquinona) y citocromo C. La energía generada por las reacciones de la cadena transportadora de electrones es usada para bombear protones de la matriz mitocondrial dentro del espacio entre las membranas mitocondriales interna y externa. Esto crea un gradiente electroquímico de protones el cual es utilizado por el complejo V (o ATP sintasa), una fina maquina que funciona como una turbina rotatoria que genera ATP como consecuencia del flujo de protones que regresa a la matriz a través de la subunidad F₀ que esta asociada a la membrana interna de la mitocondrial (DiMauro *et al.*, 2005).

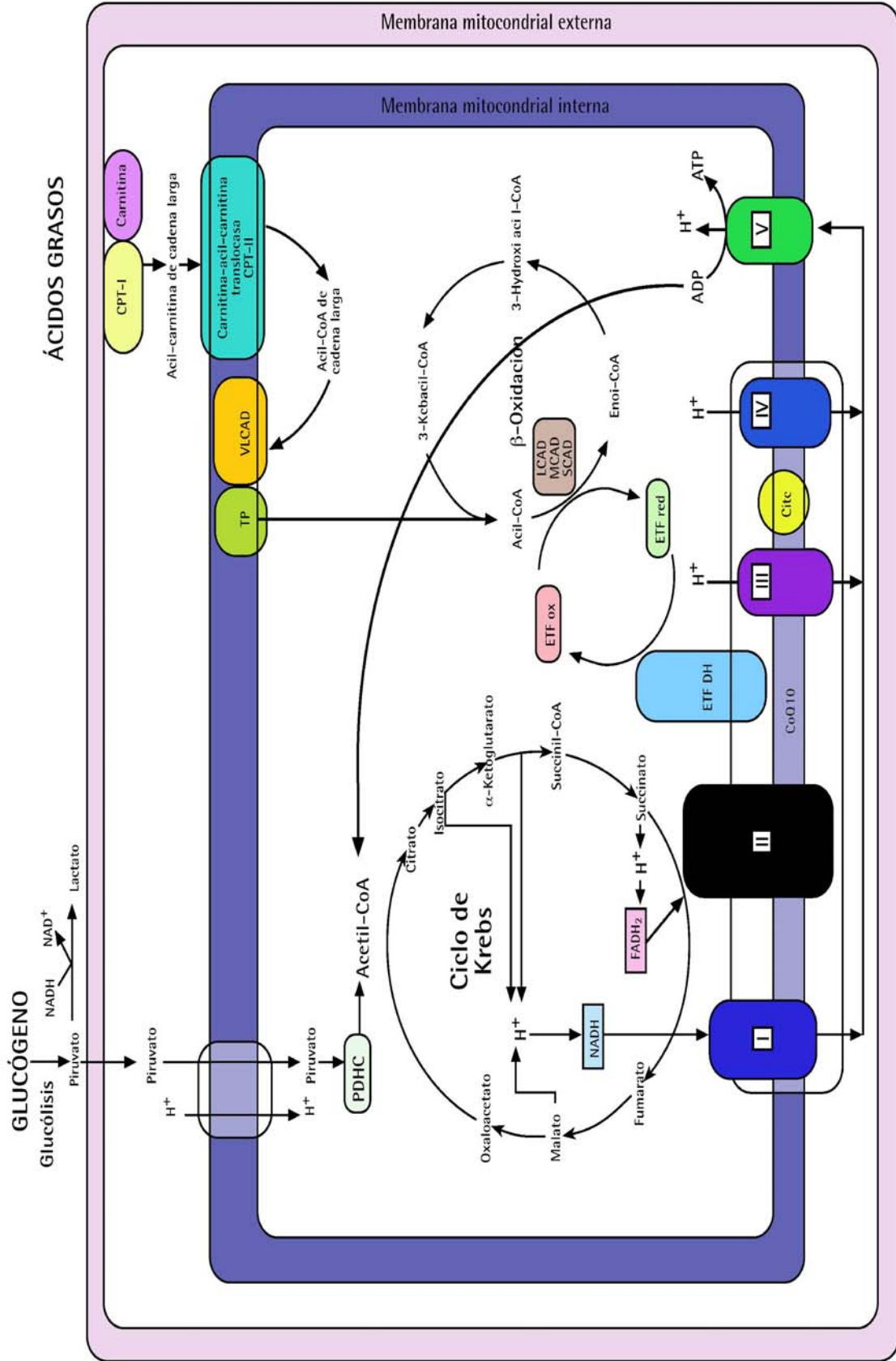


Figura 1.1. Esquema de reacciones enzimáticas que tienen lugar en la mitocondria para obtener ATP a partir de glucógeno y ácidos grasos. Independientemente del origen del sustrato utilizado el paso final siempre es la cadena de transporte electrónico. (Andreu et al., 2004)

1.1.2 Estructura y función del DNA mitocondrial

Las células poseen un número muy variable de mitocondrias, dependiendo del tejido. Cada mitocondria posee varias copias de un único cromosoma, situadas en la matriz mitocondrial y ancladas a la membrana interna. En consecuencia, el número de copias de mtDNA en una célula oscila entre 200 y 100,000. El cromosoma mitocondrial es bicatenario y circular, como el de procariontes, aunque de tamaño muy inferior: 16569 pb en humanos, con una longitud de 5 μm y una masa molecular de 10 MDa; esto es unas 3000 veces menos que la longitud del cromosoma nuclear más pequeño. El DNA mitocondrial total, dependiendo del tejido, se calcula entre un 0,05 y un 20% del DNA total de la célula (Luque *et al.*, 2001); una de las hebras posee un mayor contenido en bases purínicas, por lo que se conoce como hebra pesada o H (heavy), mientras que la otra es la hebra ligera o L (light) es abundante en citosina (Strachan *et al.*, 2004).

El ácido desoxirribonucleico mitocondrial humano contiene información para 37 genes (Figura 1.2): dos que codifican para ácidos ribonucleicos ribosómicos (rRNA), 22 para tRNA y 13 para polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS), etapa terminal de la ruta de producción de ATP. Estos péptidos corresponden a siete subunidades (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH): ubiquinona óxido-reductasa (complejo I); una subunidad (cyt b) de la ubiquinol: citocromo c óxido-reductasa (complejo III); tres subunidades (CO I, II, III) de la citocromo c oxidasa (complejo IV), y dos subunidades de la ATP sintetasa (complejo V). El resto de los polipéptidos componentes de estos complejos, así como el complejo II completo, están codificados en el DNA nuclear. La biogénesis de este sistema constituye un caso único en la célula ya que para su formación se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos (Solano *et al.*, 2001).

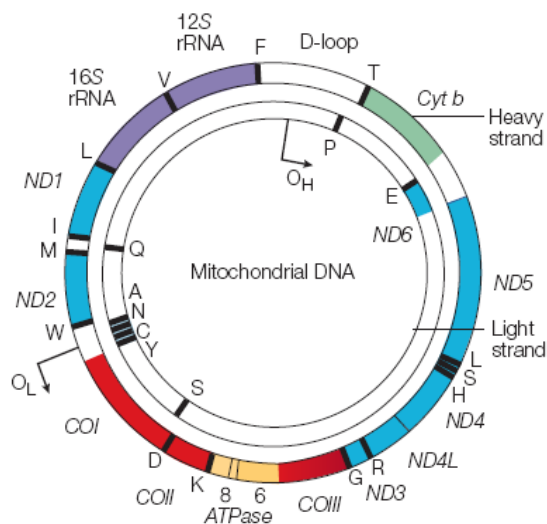


Figura 1.2. Mapa del genoma mitocondrial humano. Los genes que codifican las subunidades del complejo I (ND1-ND6 y ND4) se muestran en azul; los de citocromo C oxidasa (COI-COIII) en rojo; el del citocromo b perteneciente al complejo III en verde; y los genes de las subunidades de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8) están en amarillo. Los 2 rRNAs (12S y 16S) se muestran en púrpura, también se muestran los 22 tRNAs (necesarios para la síntesis proteica) se indican con líneas negras y denotados por su código de una letra. La región control no codificante llamado bucle de desplazamiento (D-loop) contiene secuencias que son necesarias para la iniciación tanto de la replicación como la transcripción del mtDNA, incluyendo el origen de replicación de la cadena pesada (O_H). El origen de replicación de la cadena ligera se muestra como O_L . (Taylor *et al.*, 2005)

1.1.3 Organización, replicación y transcripción.

Organización

El genoma mitocondrial humano es muy compacto. Alrededor de 93% de las secuencias de DNA representa secuencias codificantes. Los 37 genes mitocondriales carecen de intrones y están empacados de forma estrecha (en promedio uno por 0.45 kb). Las secuencias codificantes de algunos genes como los que codifican las subunidades seis y ocho de la ATPasa mitocondrial muestran cierta superposición y en casi todas las demás secuencias codificantes de genes están contiguas o separadas por una o dos bases no codificantes. Algunos genes carecen incluso de codones de terminación y para superar esta deficiencia tienen que introducirse codones UAA a nivel postranscripcional (poliadenilación de los mRNAs). La única región que carece de DNA codificante corresponde al 7% de la molécula, es la región de desplazamiento del asa (D) en la que se genera una estructura de DNA de cadena triple debido a la síntesis duplicada de una pieza corta de DNA de cadena H (DNA 7S) (*Strachan et al., 2004*). Aún sin ser una región codificante, en ella se encuentran los promotores de transcripción y los elementos reguladores de la expresión del DNA, por lo que a esta zona se le conoce como región control. Otra característica distintiva de la organización genética mitocondrial es que los genes de los tRNAs se sitúan separando los genes de los rRNA y los genes codificantes de proteínas (disposición importante para el procesamiento del RNA) (*López, 2007*).

El código genético mitocondrial (Tabla 1.1) se usa para decodificar los transcritos de cadenas pesada y ligera a fin de proporcionar un total de sólo 13 polipéptidos. Hay 60 codones mitocondriales de sentido, uno menos que en el código universal, y cuatro codones de terminación, dos de los cuales, UAA y UAG, sirven asimismo como codones de terminación en el universal, pero los otros dos son AGA y AGG y especifican arginina en éste último. UGA codifica triptófano en lugar de servir como codón de detención y AUA especifica metionina no isoleucina. Las diferencias entre el código genético universal y el mitocondrial se especifican en la Tabla 1.2.

		Segunda posición								
		U		C		A		G		
Primera posición (extremo 5')	U	UUU	Phe			UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	(GAA)†	UCC	Ser	UAC	(GUA)	UGC	(GCA)	C
		UUA	Leu	UCA	(UGA)	UAA	stop	UGA	Trp	A
		UUG	(UAG)	UCG		UAG	stop	UGG	(UCA)	G
	C	CUU		CCU		CAU	His	CGU		U
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	(GUG)	CGC	Arg	C
		CUA	(UAG)	CCA	(UGG)	CAA	Gln	CGA	(UCG)	A
		CUG		CCG		CAG	(UUG)	CGG		G
	A	AUU	Ile	ACU		AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC	(GAU)	ACC	Thr	AAC	(GUU)	AGC	(GCU)	C
		AUA	Met	ACA	(UGU)	AAA	Lys	AGA	stop	A
		AUG	(CAU)‡	ACG		AAG	(UUU)	AGG	stop	G
	G	GUU		GCU		GAU	Asp	GGU		U
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	(GUC)	GGC	Gly	C
		GUA	(UAC)	GCA	(UGC)	GAA	Glu	GGA	(UCC)	A
		GUG		GCG		GAG	(UUC)	GGG		G
		Tercera posición (extremo 3')								

Tabla 1.1. Código genético mitocondrial de mamíferos. (Watson et al., 2006)

*Las diferencias entre el código genético mitocondrial y el universal están en verde.

† Cada grupo de codones está sombreado en gris y lo lee un tRNA individual cuyo anticodón, escrito 5'→3', aparece entre paréntesis. Un tRNA que contiene un U en la primera posición (5') del anticodón lee cada grupo de cuatro codones. tRNA con G o U, en la primera posición del anticodón leen con bombardeo de GU los grupos de dos codones en los que éstos terminan en U/C o A/G respectivamente. Los anticodones con frecuencia contienen bases modificadas. ‡ Obsérvese que en la C en la primera posición anticodónica participa en apareamientos inusuales.

El genoma mitocondrial codifica todas las moléculas de rRNA y tRNA que necesita para sintetizar proteínas, pero se basa en los genes codificantes nucleares para proporcionar todos los otros componentes. Puesto que sólo existen 22 tipos diferentes de tRNA mitocondrial humano, las moléculas de tRNA individuales deben estar disponibles para interpretar varios codones distintos. Esto se logra mediante la variación de la tercera base en la interpretación del codón. Ocho de las 22 moléculas de tRNA tienen anticodones que son capaces de reconocer familias de cuatro codones que sólo difieren en la tercera base y 14 reconocen pares de codones que son idénticos en las posiciones de las dos primeras bases y comparten una purina o una pirimidina en la tercera base. Por consiguiente, entre ellas, las 22 moléculas de tRNA mitocondrial pueden reconocer un total de 60 codones [(8x4)+(14x2)] (Strachan et al., 2004).

Codón	Código Universal	Código mitocondrial humano
UGA	Stop	Trp
AGA	Arg	Stop
AGG	Arg	Stop
AUA	Ile	Met

Tabla 1.2. Diferencias entre el código genético universal y el mitocondrial.

Replicación.

La replicación del cromosoma mitocondrial humano se realiza por un mecanismo diferente al de procariontes y genoma nuclear de eucariotas. En la actualidad hay varias teorías que explicarían la replicación del mtDNA, las cuales se resumen de la siguiente forma:

- a) Modelo clásico: La replicación del mtDNA, unidireccional y asimétrica, se realiza mediante dos orígenes diferentes (O_H y O_L) la molécula de doble cadena de mtDNA se replica de forma asincrónica. La replicación de la cadena L comienza a partir de su origen de replicación (O_L) sólo después de que la síntesis de la cadena H haya completado cerca de dos tercios del círculo y, además, procede en la dirección opuesta. La replicación de la cadena H se inicia usando un pequeño fragmento de transcrito de la cadena L que sintetiza la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), la cual, tiene acceso al molde de DNA mediante la unión de los factores de transcripción A, B1 y B2 (TFAM, TFB1 y TFB2M) a la doble cadena de DNA. El precursor del RNA se corta mediante la endonucleasa procesadora de RNA mitocondrial (MRPRNasa) en el origen de replicación de la cadena H (O_H). Los desoxirribonucleótidos se añaden al extremo terminal 3' libre del transcrito mediante la DNA polimerasa gamma (POLG). La proteína "Twinkle", las topoisomerasas 1 y 3 (TOP1 y TOP3) y las proteínas de unión a monocadena (mtSSB) participan en la preparación de las cadenas molde de la cadena simple para que la POLG realice su función correctamente.

(López, 2007; Clayton, 1982; Kasamatsu y Vinograd, 1974).

- b) Modelo nuevo: Recientemente, se ha puesto en duda el modelo de replicación de desplazamiento de la hebra y ahora, basándose en una técnica que utiliza técnicas bidireccionales, se ha propuesto que el mtDNA se replica de forma unidireccional desde el origen O_H . El punto O_H señala el principio y el fin de la replicación (López, 2007; Holt et al., 2000). También se ha propuesto que podría replicarse de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza con el DNA bacteriano (López, 2007; Bowmaker et al., 2003). Este nuevo modelo, que está tomando bastante fuerza, no explica la

mayoría de datos que hasta ahora se habían obtenido y que eran explicados por el modelo anterior.

- c) Modelo clásico renovado: Hace poco tiempo se renovó el modelo clásico (López, 2007; Brown y Clayton, 2006), de forma que en determinados momentos y dependiendo del tejido existían deferentes inicios de replicación. Además se producían diferentes pausas en la replicación también dependiendo del tejido.

La replicación del mtDNA no tiene lugar específicamente en la fase S, sino a lo largo de todo el ciclo celular y no todas las moléculas de DNA se replican una vez por ciclo, sino que lo hacen al azar.

Transcripción

La transcripción se lleva a cabo por una sola RNAPol que está formada por un solo polipéptido y que, para la iniciación, requiere la presencia de un factor de transcripción mtTFA. El mtDNA se transcribe a partir de 3 lugares de iniciación, dos para la hebra pesada (H1 y H2) y una para la ligera (L), produciéndose así tres transcritos primarios diferentes (dos de ellos complementarios y correspondientes a toda la longitud del cromosoma, 16,5 kb). Los tres promotores se encuentran situados en la región no codificante de control o D-loop. Aún se desconoce si el inicio en H1 y H2 depende de un mismo promotor o de dos independientes.

A partir del primer lugar de iniciación de la hebra pesada H1 se transcribe el DNA que codifica los tRNA^{Phe}, rRNA 12S, tRNA^{Val} y rRNA 16S; la transcripción se detiene tras este último, mediante la participación de un factor de terminación (mTERF). Cuando la transcripción comienza en el segundo punto de inicio H2, localizado inmediatamente tras el tRNA^{Phe}, el transcrito primario (L2) continúa más allá del punto de terminación anterior, completando el resto del cromosoma. Por tanto, el lugar de iniciación define qué tipo de RNAs (ribosómicos o mensajeros) deben sintetizarse. La selección del punto de inicio está a su vez regulada por las hormonas tiroideas. Gracias a esta doble unidad de transcripción la mitocondria sintetiza mucha mayor cantidad de RNAs ribosómicos que el resto de productos génicos. A partir del promotor de la hebra ligera se sintetiza una sola molécula (que es una hebra pesada, H) que sólo codifica 8 tRNAs y un mRNA. Los 3 transcritos primarios sufren una maduración para dar lugar cada uno a varios rRNAs, tRNAs y mRNAs maduros; del transcrito H se origina también el RNA cebador para la replicación de la hebra H (Luque et al., 2001).

1.1.4 Regulación de la expresión genética del mtDNA

La biogénesis de la mitocondria depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear. Entre las proteínas nucleares que pueden actuar regulando esta interacción

se encuentran el factor de iniciación de la transcripción TFAM que podría ser el responsable tanto de los niveles de mtRNA como del número de copias de mtDNA (López, 2007; Ficher y Clayton, 1988). La regulación de la relación entre rRNAs y mRNAs mitocondriales se realiza mediante la selección del lugar de iniciación de la transcripción de la cadena pesada (Montoya et al., 1983), que a su vez parece que está relacionado con el factor de terminación mTERF codificado en el núcleo, y a nivel del procesamiento de los RNAs policistrónicos. Asimismo, la regulación transcripcional puede realizarse como respuesta a hormonas, en particular a hormonas tiroideas que pueden actuar bien directamente sobre el mtDNA o de un modo indirecto a través de la activación de genes nucleares (López, 2007; Enriquez et al., 1999), estabilizando los RNAs maduros (López, 2007; Cantatore et al., 1987; Enriquez et al., 1996; Gelfand y Attardi, 1981; Ostronoff et al., 1995) y a nivel de la traducción de los mRNAs (López, 2007; Ostronoff et al., 1996). Recientemente, se ha visto que la fosforilación de mTERF puede regular la terminación de la transcripción al final de la región de los rRNAs (López, 2007; Prieto-Martin et al., 2004b) e incluso participa regulando la iniciación en H1 (López, 2007; Prieto-Martin et al., 2004a).

1.1.5. Heteroplasmia y efecto umbral

Cada célula contiene cientos o miles de copias del mtDNA dependiendo del tejido o del tipo de célula, su dependencia del metabolismo oxidativo, o su estado metabólico. Durante la división celular, las moléculas de mtDNA se distribuyen de forma aleatoria entre las nuevas células. En tejidos sanos, todas las copias del mtDNA son idénticas (homoplasmia). Las mutaciones patogénicas del mtDNA normalmente afectan a alguna pero no a todas las copias del mtDNA de una célula, un tejido, o un individuo, lo cual resulta en una mezcla de genomas mitocondriales mutados y no mutados (heteroplasmia), y el fenotipo clínico de una mutación puntual particular en el mtDNA está determinado por la proporción relativa de genomas sanos y mutados en los diferentes tejidos. Dependiendo de la demanda energética de una célula, el nivel de genomas mutados requeridos para producir una expresión fenotípica de la mutación varía (efecto umbral). Este efecto es diferente en tejidos distintos, pero, cuando el umbral es sobrepasado, la producción de ATP es menor a la demanda de energía (Andreu et al., 2004) llegando a estar por debajo de la mínima necesaria para el funcionamiento de los tejidos y, debido a la producción defectuosa de proteínas codificadas en el mtDNA, se provoca la aparición de la enfermedad. Si el número de moléculas de mtDNA dañado es relativamente bajo se produce una complementación con las moléculas de DNA normal y no se manifestará el defecto genético. El número de moléculas de DNA es diferente en cada órgano y tejido según la cantidad de energía requerida para su funcionamiento. Por ello, los tejidos que preferentemente se afectan son la visión, el sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos, riñón e hígado (Solano et al., 2001).

1.1.6 Segregación mitótica

El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular debido a que las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas por lo que si en una célula coexisten dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia), a lo largo de las divisiones se podrán originar tres genotipos diferentes: homoplásmico para el DNA mitocondrial normal, homoplásmico para el DNA mutado y heteroplásmico. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje de DNA mutado que contenga (*Solano et al., 2001*). Este fenómeno llamado segregación mitótica explica como ciertos pacientes con desordenes relacionados al mtDNA de hecho pueden cambiar de un fenotipo clínico a otro diferente a medida que envejecen (*DiMauro et al., 2005*).

1.1.7 Modo de herencia

La herencia mitocondrial es una de las excepciones a los principios de transmisión mendeliana de las enfermedades monogénicas. Todos los individuos heredan el DNA mitocondrial (mtDNA) de su madre, por tanto, una mutación patológica en el genoma mitocondrial de una mujer se puede transmitir a toda su descendencia, mientras que el varón en raras ocasiones transmite una mutación análoga (*Luque et al., 2001*).

El mtDNA presenta una tasa de mutación espontánea 10 veces superior a la del DNA nuclear. Este fenómeno puede estar causado porque en la mitocondria se producen continuamente radicales libres de oxígeno, como consecuencia de la oxidación final de los compuestos carbonados, que pueden dañar a un DNA que no está protegido por proteínas (*Solano et al., 2001*). Las mutaciones del mtDNA deben ser corregidas por complejos mecanismos de escisión y transferencia (los sitios dañados son escindidos, removidos, transferidos y sustituidos por las formas correctas), sin embargo, estos mecanismos son bastante ineficientes (10 a 17 veces menos efectivos comparados a los que reparan mutaciones de DNA nuclear) (*Ruiz et al., 2002*).

1.1.7.1 Efecto del cuello de botella

En la mujer, durante la producción de oocitos primarios, un selecto número de moléculas de mtDNA se transfieren a cada oocito. La maduración del oocito esta asociada con la replicación rápida de las moléculas de mtDNA. Este evento de restricción-amplificación puede provocar un cambio aleatorio de la carga de mtDNA mutado entre las generaciones y es responsable de los niveles variables de éste observado en la descendencia afectada de madres con la mutación

patogénica mitocondrial. A este evento se le conoce como “cuello de botella genético” (Fig. 1.3).

(Taylor et al., 2005)

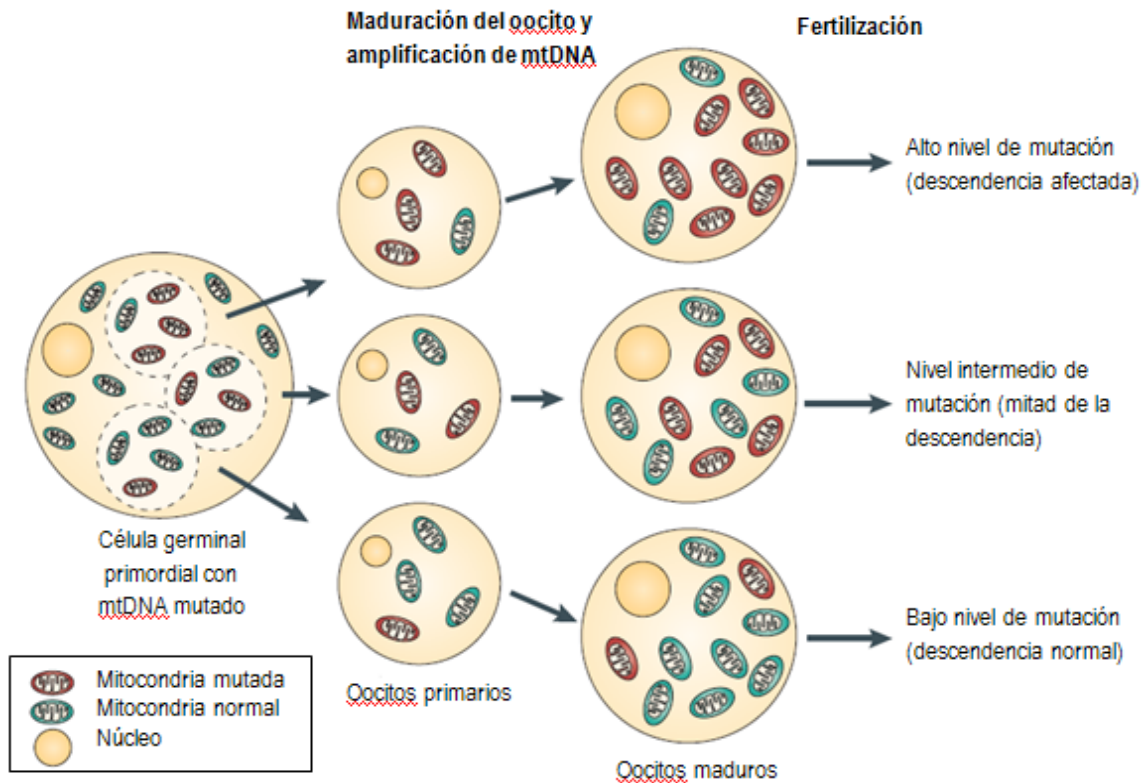


Figura 1.3. Cuello de botella genético. Las mitocondrias que contienen mtDNA mutado se muestran en rojo mientras que las de mtDNA normal en verde. (Taylor et al., 2005)

1.2 Enfermedades mitocondriales

Por convención, el término “enfermedades mitocondriales” se refiere a los desordenes en la cadena respiratoria, excluyendo así, disfunciones en otras vías metabólicas localizadas en la mitocondria como el metabolismo del piruvato, ciclo de Krebs y la oxidación de ácidos grasos. La cadena respiratoria es la única vía metabólica en la célula que esta bajo el control tanto del mtDNA como del genoma nuclear nDNA. Por lo tanto, una clasificación genética de las enfermedades mitocondriales distingue desordenes debidos a mutaciones en el mtDNA, los cuales son gobernados por las relativamente laxas reglas genéticas mitocondriales, y desordenes debidos a mutaciones en el nDNA, que son gobernados por reglas estrictas de genética mendeliana. Las mutaciones en el mtDNA pueden ser nuevamente divididas en las que la síntesis de proteínas mitocondriales es completamente impar y en las que se afecta cualquiera de las 13 subunidades codificadas por el mtDNA. Los desordenes debidos a mutaciones en el nDNA son más abundantes no sólo porque la

mayoría de las subunidades de la cadena respiratoria son codificadas en el núcleo sino que además el correcto ensamblaje y funcionamiento de la cadena respiratoria requiere de varios pasos, los cuales están bajo el control del nDNA.

Estos pasos incluyen:

- i) Síntesis del ensamblaje de las proteínas de cadena respiratoria.
- ii) Señalización intergenómica.
- iii) Importación mitocondrial de proteínas codificadas en el nDNA.
- iv) Control de la transcripción del mtDNA.
- v) Síntesis de los fosfolípidos de membrana interna mitocondrial.
- vi) Movilidad y fisión mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos producidos por un fallo en el sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS), la ruta final del metabolismo energético mitocondrial, con la consiguiente deficiencia en la biosíntesis del trifosfato de adenosina (ATP). Dichas enfermedades pueden presentar una serie de aspectos clínicos, morfológicos y bioquímicos concretos que dan lugar a síndromes bien caracterizados pero, en la mayor parte de los casos, principalmente en edad pediátrica, los síntomas son poco informativos y es sólo la presencia de anomalías neurológicas, a veces acompañadas de aumento de ácido láctico y de otros síntomas clínicos secundarios que afectan a diversos órganos, lo que da alguna orientación en el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial (Solano *et al.*, 2001).

1.2.1 Clasificación

Enfermedades debidas a alteraciones primarias del mtDNA: Este grupo de síndromes clínicos incluye los reordenamientos simples y complejos del mtDNA (deleciones simples o duplicaciones) y las mutaciones puntuales.

- ❖ Reordenamientos del mtDNA (deleciones y duplicaciones). Las deleciones simples se presentan de forma esporádica y han sido asociadas con tres fenotipos clínicos:
 - *Síndrome de Pearson:* es una enfermedad fatal habitualmente caracterizada por anemia sideroblástica y una disfunción exocrina del páncreas.
 - *Síndrome de Kearns-Sayre (KSS):* la edad de aparición de esta enfermedad es normalmente antes de los 20 años de edad. La presentación típica consiste en una dificultad de los movimientos de los ojos (definida como PEO, oftalmoplejía externa progresiva), retinopatía pigmentaria, y bloqueo de la conducción cardíaca. A menudo,

estos síntomas clínicos están acompañados por otros como demencia, ataxia y disfunción endocrina (diabetes mellitus, hiperparatiroidismo y corta estatura). El síndrome también se presenta con alteraciones como acidosis láctica y niveles incrementados de proteínas en el líquido cefalorraquídeo. La biopsia muscular normalmente presenta RRF (Fibras Rojo Rasgadas).

- *POE esporádica*: se puede presentar con o sin debilidad de la musculatura proximal y es a menudo compatible con una esperanza de vida normal. Es debida a la presencia de deleciones simples en el mtDNA de músculo. Las deleciones pueden variar en tamaño y localización, pero existe una llamada “delección común” del mtDNA que comprende 4,9 Kb y se observa frecuentemente en pacientes e individuos con edad avanzada. Debido a la naturaleza genética de estas alteraciones, las duplicaciones y las deleciones pueden coexistir (*Andreu et al., 2004*).

- ❖ Mutaciones puntuales. Desde que la primera mutación puntual fue descrita en 1988, la lista ha crecido exponencialmente, siendo hasta la fecha, más de 150 mutaciones puntuales patogénicas las que se han identificado en el mtDNA de pacientes con una variedad de enfermedades, muchas de las cuales son de herencia materna y multisistémicas, aunque algunas son esporádicas y específicas de tejido. Entre las encefalomiopatías de herencia materna, existen cuatro síndromes que destacan por su prevalencia (*Andreu et al., 2004*).
- El primero es MELAS (del inglés *Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*): que normalmente se presenta en niños o adolescentes que han tenido un desarrollo previo normal. La presentación típica incluye vómitos recurrentes, dolores de cabeza similares a la migraña, y episodios de infartos cerebrales que causan ceguera cortical, hemiparesis o hemianopia. La imagen por RM del cerebro muestra infarto que no corresponden a la distribución de los vasos principales. La mutación más común en el mtDNA es la A3243G en el gen tRNA^{Leu(UUR)}, pero hay muchas otras mutaciones que se han asociado a este síndrome (*Andreu et al., 2004*).

- El segundo síndrome en importancia es MERRF (del inglés *Myoclonus epilepsy with ragged red fibers*), caracterizado por epilepsia mioclónica, miopatía mitocondrial y ataxia cerebelar. Otros síntomas menos comunes incluyen demencia, sordera, neuropatía periférica y múltiples lipomas. La mutación típica del síndrome de MERRF es la A8344G

en el gen tRNA^{Lys}, aunque otras mutaciones puntuales en el mismo gen se han asociado con este síndrome (Andreu et al., 2004, DiMauro et al., 2002).

- El tercer síndrome se presenta de dos maneras: a) NARP (*neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa*) que normalmente afecta a personas jóvenes y causa retinitis pigmentosa, demencia, ataques, debilidad proximal y neuropatía sensorial; y b) MILS (del inglés *Maternal inherited Leigh síndrome*), encefalomiopatía infantil muy severa con lesiones simétricas características en los ganglios basales y el tronco cerebral. Ambos síndromes son debidos a mutaciones en el gen ATP6 (Andreu et al., 2004; Tatuch et al., 1992).

- El cuarto síndrome, LHON (del inglés *Leber's hereditary optic neuropathy*) esta caracterizado por una pérdida de visión aguda o subaguda en personas jóvenes, más frecuentemente en varones, debido a una atrofia óptica bilateral. A este síndrome se le han asociado unas doce mutaciones puntuales del mtDNA en genes estructurales (principalmente genes que codifican subunidades del complejo I, llamados por las siglas ND). De estas 12 mutaciones, sólo tres parecen ser patogénicas incluso cuando se presentan de forma aislada (mutaciones primarias). Estas son G11778A en el gen ND4, G3460A en el gen ND1 y T14484C en el gen ND6 (Andreu et al., 2004; Carelli V, 2002).

Los síndromes asociados con mutaciones en el mtDNA pueden afectar cualquier sistema en el cuerpo, incluyendo la visión (atrofia óptica, retinitis pigmentosa, cataratas); la audición (sordera neurosensorial); sistema endocrino (corta estatura, diabetes mellitus, hiperparatiroidismo); el corazón (cardiomiopatías familiares, infartos); tracto gastrointestinal (disfunción de la función exocrina del páncreas, pseudoobstrucción intestinal, reflujo gastrofageal); el riñón (acidosis renal tubular). Cualquier combinación de los síntomas mencionados debe alertar al clínico sobre la posibilidad de una enfermedad mitocondrial.

Por otro lado, las mutaciones puntuales en el mtDNA en genes que codifican proteínas a menudo no siguen las reglas de la genética mitocondrial, ya que ellas sólo afectan a determinados individuos y tejidos aislados, comúnmente el músculo esquelético. Así, pacientes con intolerancia al ejercicio, mialgia y algunas veces mioglobinuria recurrente, pueden tener defectos aislados del complejo I, complejo III, o complejo IV, debido a mutaciones patogénicas en los genes que codifican sus subunidades. La falta de herencia materna y el hecho de que sólo el músculo esquelético está implicado, sugieren que estas mutaciones se han originado de *ново* en las células embrionarias

miogénicas después de la diferenciación de la línea germinal, y que se han acumulado durante la replicación en el tejido afectado (mutaciones somáticas) (Andreu et al., 2004; Andreu et al., 1999).

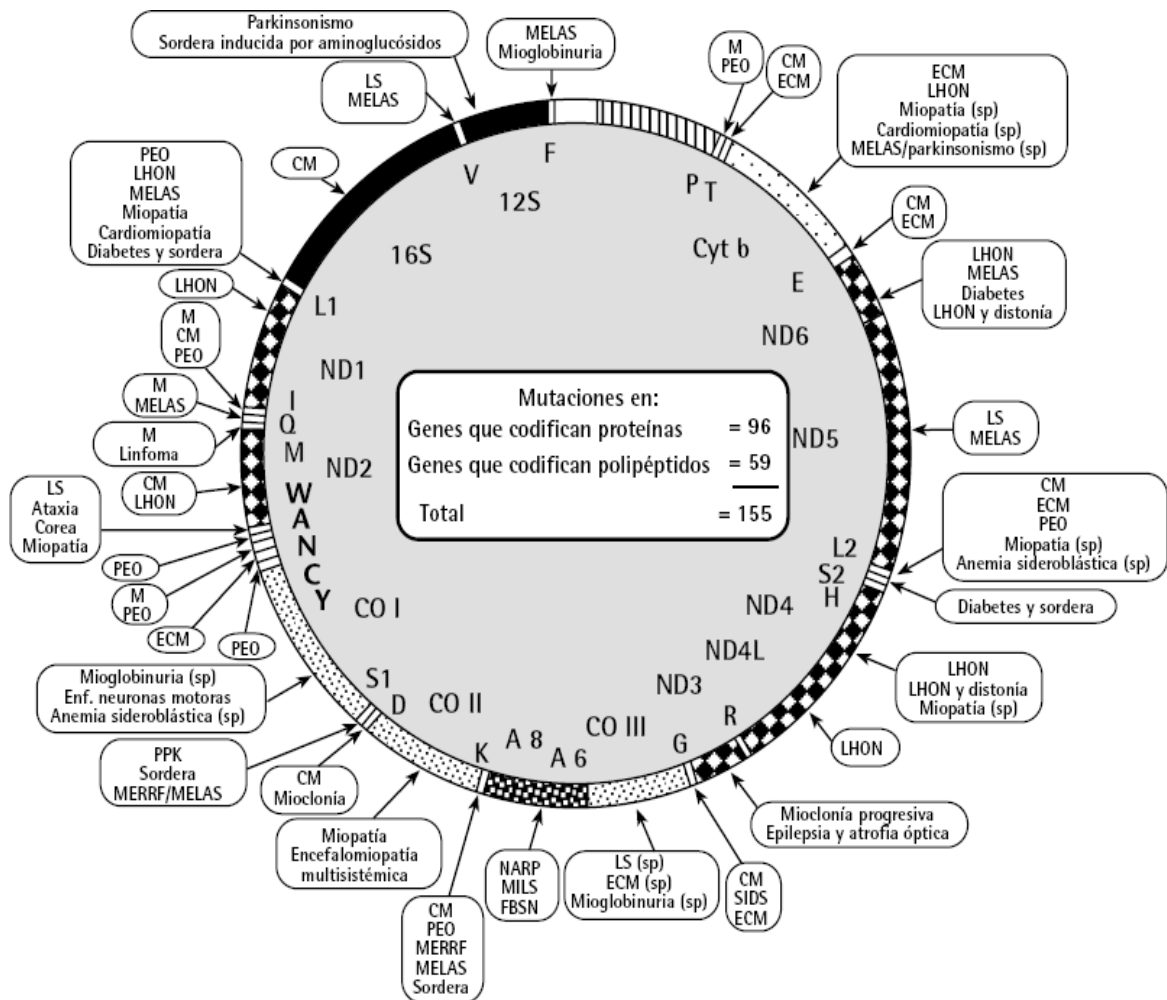


Figura 1.4. Mapa de enfermedades mitocondriales indicando el gen causante. (Andreu et al., 2004)

Las enfermedades mitocondriales así como el gen causante que en muchas ocasiones no es específico para una única patología, por lo que, una misma manifestación patológica generalmente puede deberse a alteraciones genéticas que no siempre son las mismas, así como una mutación en un gen puede causar diversos cuadros patológicos como se observa en la figura 1.4. Las enfermedades debidas a alteraciones en las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa codificadas tanto por el mtDNA como por el nDNA se muestran en las figuras 1.4 y 1.5.

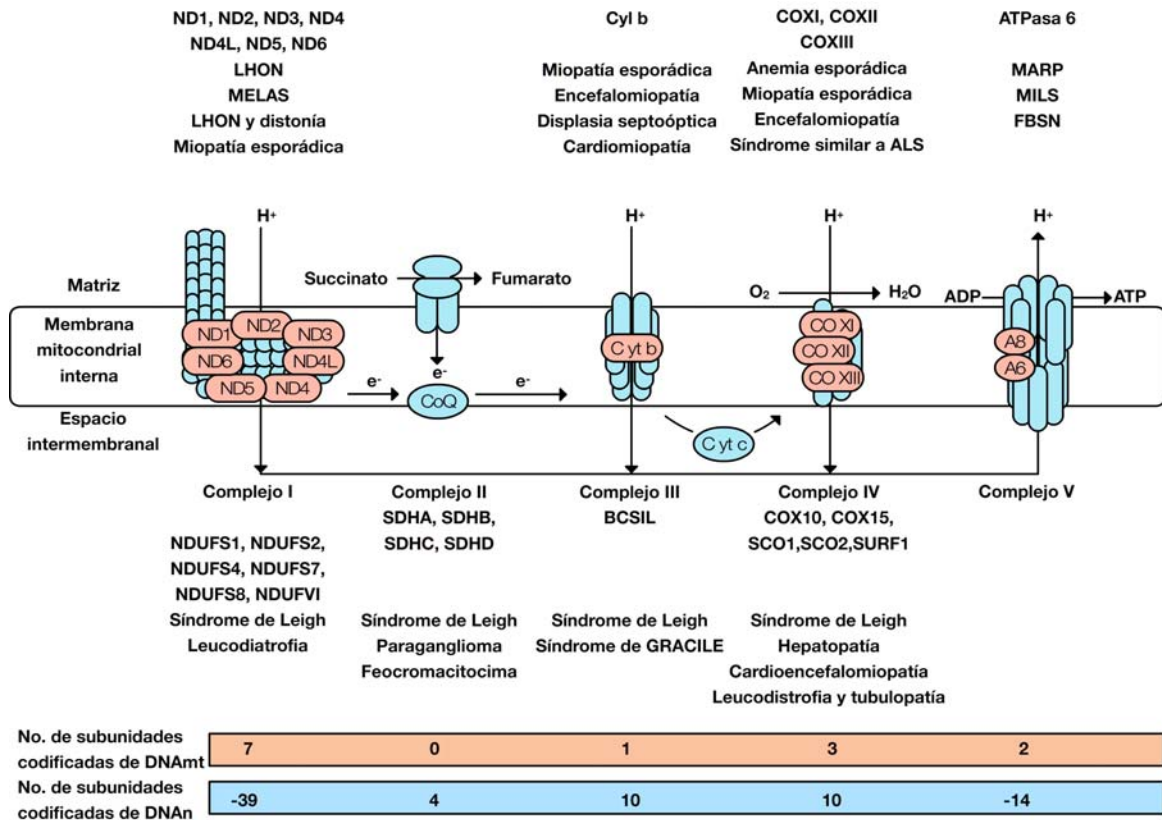


Figura 1.5. Complejos de la cadena respiratoria del I al IV y la fosforilación. Modificado de DiMauro S, 2003. (Medina et al., 2004)

Enfermedades debidas a alteraciones del nDNA: estas son transmitidas por herencia mendeliana e incluyen tres grupos principales (Andreu et al., 2004; Shoubridge EA, 2001).

- ❖ Mutaciones en genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria (estructurales y de ensamblaje). Debido a que el nDNA codifica para todas las subunidades del complejo II, la mayoría de las subunidades de los otros cuatro complejos, así como para la coenzima Q10 y para el citocromo c, recientes avances han podido identificar defectos mendelianos de la cadena respiratoria los cuales pueden afectar a los complejos de la cadena directamente en las subunidades codificadas en el núcleo del complejo enzimático, o indirectamente afectando a las proteínas de ensamblaje o proteínas que controlan la homeóstasis de la replicación del mtDNA.

- Estructurales: se han identificado un número importante de mutaciones en genes que codifican subunidades (incluyendo complejo I (Andreu et al., 2004; Triepels et al., 2001) y II (Andreu et al., 2004; Bourgeron et al., 1995)) de la cadena respiratoria, los cuales se han asociado principalmente con formas autosómicas recesivas del síndrome de Leigh. En

tanto que los síndromes debidos a la falta de coenzima Q10 han sido clasificados en tres grupos: a) un síndrome predominantemente miopático, con mioglobinuria recurrente, b) un síndrome predominantemente encefalopático con ataxia y atrofia cerebelar (Andreu et al., 2004; Musumeci et al., 2001) y c) una forma generalizada. Estos síndromes son comúnmente debidos a mutaciones en diferentes enzimas biosintéticas.

- Ensamblaje: las mutaciones en las proteínas de ensamblaje para la citocromo c oxidasa (complejo IV) son las primeras que se han identificado (Andreu et al., 2004; Shoubridge EA, 2001; Zeviani M, 2001). Mutaciones en SURF1, SCO2, COX10, COX15 (Andreu et al., 2004; Antonicka et al., 2003) y SCO1 se han asociado con síndrome de Leigh y deficiencia de COX u otros desordenes fatales infantiles multisistémicos, en los que la encefalopatía esta acompañada de cardiomiopatía (SCO2, COX15), nefropatía (COX10), o hepatopatía (SCO1).

- ❖ Defectos de la señalización intergenómica: mutaciones en genes nucleares que codifican para factores de replicación y funcionamiento mitocondrial son la casusa de alteraciones cuantitativas o cualitativas del mtDNA.
 - Alteraciones cualitativas de mtDNA: incluyen deleciones múltiples del mtDNA autosómicas dominantes o autosómicas recesivas, acompañadas clínicamente por PEO. Mutaciones en el gen de la timidina fosforilasa (TP) son responsables del síndrome multisistémico autosómico recesivo MNGIE (del inglés *mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy*) (Andreu et al., 2004; Nishino J et al., 2000; Nishino I et al., 1999). Mutaciones en el gen de la isoforma del transportador de nucleótidos de adenina (ANT1) (Andreu et al., 2004; Kaukonen et al., 2000) se han identificado en algunos pacientes con PEO autosómica dominante. Otro gen, *twinkle*, tiene una estructura similar a la proteína primasa/helicasa del bacteriófago T7, y debe estar implicada en la replicación mitocondrial (Andreu et al., 2004; Spelbrink et al., 2001). Además, mutaciones en el gen de la polimerasa γ (POLG), la cual es responsable de la replicación del mtDNA, se han identificado en pacientes con PEO autosómica dominante o autosómica recesiva (Andreu et al., 2004; Van Goethem et al., 2001).

 - Alteraciones cuantitativas del mtDNA: incluyen severas o parciales depleciones del mtDNA, caracterizadas clínicamente por formas congénitas o juveniles de una miopatía o hepatopatía heredada de forma autosómica recesiva. Se han identificado dos genes

involucrados en síndromes de depleción del mtDNA. Mutaciones en el gen de la timidina quinasa 2 (TK2) (Andreu et al., 2004; Saada et al., 2001; Mancuso et al., 2002), se han localizado en pacientes con depleción de mtDNA y miopatía aislada, y también se han encontrado mutaciones en el gen de la deoxiguanosina quinasa (dGK) (Andreu et al., 2004; Mandel et al., 2001) en pacientes que presentan una forma sistémica de depleción del mtDNA, frecuentemente acompañada de miopatía y daño hepático. Todas estas mutaciones parecen inhibir el control del *pool* mitocondrial de dinucleótidos, cuya homeóstasis es probablemente esencial para el control de la replicación del DNAm.

Los factores ambientales, el haplotipo de mtDNA, el fondo genético nuclear y la expresión tejida específica de la interacción entre genes son al menos cuatro factores que pueden influenciar la expresión fenotípica de una enfermedad mitocondrial (DiMauro et al., 2005).

1.2.2 Diagnóstico

Un defecto en la cadena respiratoria mitocondrial es probable, en cualquier paciente que presente una asociación inexplicable de dos o más síntomas, con un curso clínico rápidamente progresivo, y que afecte tejidos y órganos aparentemente no relacionados. Es importante tener en cuenta que cualquiera que sea la edad de inicio y el síntoma inicial de la enfermedad, la principal característica es el incremento progresivo de tejidos afectados durante el curso de la enfermedad, de forma que el sistema nervioso central se encuentra casi siempre involucrado en los estadios avanzados de la misma (Campos et al., 2006).

Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran: desórdenes motores, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, demencia, intolerancia al ejercicio, ptosis, oftalmoplejía, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera, cardiomiopatía, disfunciones hepáticas y pancreáticas, diabetes, defectos de crecimiento, anemia sideroblástica, pseudo obstrucción intestinal, nefropatías, acidosis metabólica y otras más secundarias. La presencia de uno o más de estos síntomas requiere de un estudio morfológico, histoquímico y bioquímico para asegurar la naturaleza de estas enfermedades. Así, con mucha frecuencia se encuentran: fibras rojo-rasgadas (acumulación de mitocondrias anormales en tamaño y número) en biopsias musculares teñidas con tricromo de Gomori y fibras no reactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa; defectos en uno o varios complejos de la cadena respiratoria; y desarreglos metabólicos con elevación de lactato, piruvato o una aminoaciduria generalizada causados por una disfunción de la cadena respiratoria que conlleva un aumento de equivalentes reductores en la mitocondria y citoplasma, y

una alteración del funcionamiento del ciclo de Krebs debido al exceso de NADH, lo que provoca una acumulación de piruvato y su posterior conversión a lactato que difunde a la sangre (Solano et al., 2001).

1.2.3 Tratamiento

La terapia para las encefalomiopatías mitocondriales (definidas como defectos de la cadena respiratoria mitocondrial) es inapropiada, a pesar del gran progreso en el entendimiento de las bases moleculares de dichos desordenes. La terapia paliativa es dictada por buena práctica médica e incluye medicación anticonvulsionante, control de la disfunción endocrina y procedimientos quirúrgicos. La remoción de metabolitos nocivos esta centrada en reducir la acidosis láctica, pero se extiende a otros metabolitos. Los intentos de sustituir los complejos afectados en la cadena respiratoria mediante una administración de aceptores de electrones no ha sido exitosa, pero esto podría lograrse por medio de ingeniería genética. La administración de metabolitos y cofactores es la principal terapia real y es especialmente importante en desordenes debidos a deficiencias primarias de componentes específicos como la carnitina o la coenzima Q10. Existe un creciente interés en la administración de secuestrantes de especies reactivas de oxígeno tanto en enfermedades primarias mitocondriales como en enfermedades neurodegenerativas directa o indirectamente relacionadas a disfunción mitocondrial. El ejercicio aeróbico y la terapia física previenen o corrigen la mala condición y mejoran la tolerancia al ejercicio en pacientes con miopatías mitocondriales debidas a mutaciones en el DNA mitocondrial. La terapia génica es un reto debido a la poliplasmia y heteroplasmia, pero avances experimentales que están siendo seguidos incluyen, por ejemplo, disminución de la relación entre genomas mitocondriales mutantes y normales, convirtiendo genes mutados del mtDNA en genes nucleares normales (expresión alotrópica), importando genes conocidos de otras especies o corrigiendo mutaciones en el mtDNA con enzimas de restricción específicas. En la terapia en la línea germinal hay problemas éticos pero esta siendo considerada para la prevención de la transmisión materna de mutaciones en el mtDNA. La terapia preventiva a través del asesoramiento genético y diagnóstico prenatal esta tomando importancia en desordenes relacionados al DNA nuclear. El progreso en cada uno de estos avances da una luz de esperanza para el futuro aunque falta mucho trabajo por hacer. (DiMauro et al., 2007).

- ❖ Terapia farmacológica específica: los fármacos empleados pueden actuar en tres niveles: modificando la función de la cadena respiratoria, eliminando o impidiendo la formación de los metabolitos tóxicos que se forman, previniendo el estrés oxidativo mediante sustancias antioxidantes.

- ◆ Fármacos que modifican la función de la cadena respiratoria: en estas enfermedades se produce una disminución de la síntesis de ATP por una disfunción de la cadena respiratoria. Los fármacos actúan a nivel de dicha cadena favoreciendo la producción correcta de ATP. Lo ideal es que actúe a nivel de los complejos que no funcionan por lo que es indispensable conocer el defecto bioquímico causante de la enfermedad. En la Tabla 1.3. se resumen los principales fármacos empleados a este nivel y en la figura 1.6 se observa el punto exacto de la cadena respiratoria donde realizan su acción.
- ◆ Fármacos que reducen la acumulación de metabolitos tóxicos para las células: Este tipo de compuestos facilitan la eliminación o impiden la formación de los metabolitos tóxicos formados. En la Tabla 1.3. se pueden observar los compuestos utilizados a este nivel.
- ◆ Fármacos que actúan como antioxidantes: ya que en las enfermedades mitocondriales se produce un aumento en la generación de radicales libres, se debe administrar compuestos que prevengan el estrés oxidativo reponiendo sustancias antioxidantes. Usualmente son empleados antioxidantes como la vitamina E (tocoferol), la vitamina A (retinol), la vitamina C (ascorbato), la vitamina K3 (menadiona) y la ubiquinona-10. Dichas sustancias parecen corregir el daño oxidativo por lo que se recomienda en la terapia de este tipo de pacientes (López, 2007; Pineda et al., 2001).

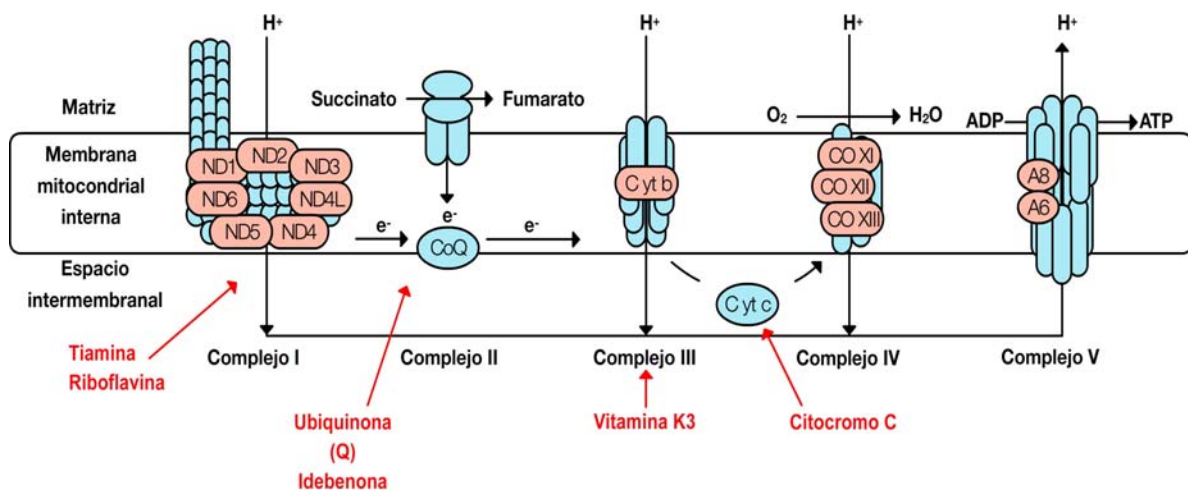


Figura 1.6. Nivel al que actúan los fármacos en la cadena respiratoria. (Pineda et al., 2001)

Tipo de fármaco	Fármaco	Mecanismo de acción	Indicación	Dosis	Observaciones	Referencias
Fármacos que modifican la función de la cadena respiratoria	Ubiquinona-10	Transfiere e- de CI y CII al CIII, también actúa como antioxidante	Déficit de ubiquinona; déficit de CI y CII	100-300 mg/día	Mejora de los síntomas clínicos, reducción de la fatiga y dolores musculares. Poca solubilidad del compuesto y efectos prooxidantes a altas concentraciones	(Goid, 1995; Papadimitriou, 1996; Rotig, 2000)
	Idebenona	Compuesto análogo a Q10	Transtornos de la cadena respiratoria y LHON	90-270 mg/día	Mayor solubilidad acuosa que Q10; Mejora del metabolismo cerebral y muscular en casos de LHON, ataxia de Friedreich y MELAS	(Rustin, 1999; Mashima, 1992)
	Vitamina C (ascorbato)	Aceptor de los e- de la ubiquinona y los cede al CIV (evitando el CIII)	Déficit de CIII	1-2 g/día	También tiene propiedades antioxidantes. Efectividad demostrada en casos aislados.	(Pineda, 2001)
	Vitamina K3	Mecanismo similar a la vit. C	Déficit de CIII	1-2 g/día	Similar a la vitamina K3	
	Riboflavina (vitamina B2)	Cofactor de los CI y CII	Déficit del CI y CII	100-300 mg/día	Efectividad incierta	(Bernsen, 1993; Mathews, 1993)
	Tiamina (vitamina B1)	Cofactor de la piruvato deshidrogenasa	Déficit de PDH	300-900 mg/día	Mejoría en casos aislados. Disminución de los niveles de lactato	(Tanaka, 1997)
Fármacos que reducen la acumulación de metabolitos tóxicos	Citocromo C	Capta los e- del CIII y los cede al CIV	Síndrome de Kearns-Sayre		Administración intravenosa. Mejora la afectación muscular y el edema de córnea	(Tanaka, 1997; Nakagawa, 1996)
	Carnitina	Transportador de ácidos grasos a la mitocondria (es necesaria para el buen funcionamiento del metabolismo energético)	Deficiencia secundaria de carnitina		Muchos pacientes mejoran su sintomatología con este tratamiento. Es un fármaco totalmente inocuo	(Pineda, 2001)
	Dicloroacetato	Análogo de piruvato (reduce la concentración de ácido láctico)	Acidosis metabólica; Déficit de PDH		Tratamientos prolongados pueden provocar polineuropatía	(Stacpoole, 1988; Pineda, 2001)
Fármacos que actúan como antioxidantes	Bicarbonato	Estabilización del pH	Acidosis metabólica		En casos de acidosis metabólica grave, el bicarbonato puede administrarse por vía intravenosa, consiguiendo una rápida estabilización del pH	(Pineda, 2001)
	Tocoferol (vitamina E)	Actúa como antioxidante, reduciendo el estrés oxidativo	Reducir el daño oxidativo producido en las enfermedades mitocondriales			(Pineda, 2001)
	Retinol (vitamina A)	Actúa como antioxidante, reduciendo el estrés oxidativo	Reducir el daño oxidativo producido en las enfermedades mitocondriales			(Pineda, 2001)

Tabla 1.3. Fármacos empleados en la terapia paliativa de las enfermedades OXPHOS (López, 2007; Pineda et al., 2001).

- ❖ Tratamiento de mantenimiento: debido a la afectación multisistémica y la evolución progresiva de estos pacientes se recomienda tratar de evitar y corregir las descompensaciones metabólicas agudas producidas así como controlar los diferentes órganos que se vayan afectando tomando en cuenta los siguientes aspectos (*Pineda et al., 2001*):
 - ◆ Dieta adecuada y aporte vitamínico equilibrado para su requerimiento energético. Evitar ayunos ya que activan la oxidación de ácidos grasos.
 - ◆ Evitar situaciones de alta demanda energética provocadas por ejemplo, por ingesta de alcohol, aumento de temperatura o situaciones de estrés.
 - ◆ Afectación cardíaca: cuando hay bloqueo de conducción se aplica un marcapasos y debe administrarse carnitina si hay déficit de ésta en miocardiopatías hiperconcentricas. También se puede recurrir al trasplante de corazón.
 - ◆ Afectación renal: corregir la pérdida de oligoelementos y metabolitos. En ocasiones, es necesario realizar un trasplante renal.
 - ◆ Afectación digestiva: diarreas o estreñimientos crónicos deben tratarse con dietas adecuadas y reguladores de la movilidad intestinal. En el síndrome de Pearson se observa insuficiencia pancreática tratándose con transfusiones para compensar la anemia producida. En insuficiencia hepática se debe evaluar la posibilidad de un trasplante de hígado.
 - ◆ Afectación endocrinológica: estudiar y tratar los diferentes tipos de afectaciones endocrinas que pueden presentar estos pacientes como diabetes, hipoparatiroidismo, etc.
 - ◆ Sordera: se debe colocar un audífono y si es de origen coclear (como en algunos pacientes con MELAS) se puede realizar un implante coclear.
 - ◆ Afectación oftalmológica: intervención quirúrgica de cataratas y de ptosis.
 - ◆ Epilepsia: los fármacos más efectivos son benzodiazepinas, carbamacepina y gabaérgicos.
 - ◆ Trastornos respiratorios: vigilar la aparición de apneas o insuficiencias respiratorias.
 - ◆ Omitir fármacos con riesgo de toxicidad mitocondrial: diversos antibióticos como tetraciclina, ciprofloxacina, aminoglicósidos, éste último en caso de ser portador de la mutación A1555G que produce sordera. Antivirales que producen depleción del mtDNA. Antiepilepticos como el valproato sódico que inhibe la fosforilación oxidativa, así como los barbitúricos e hidantoína. Anestésicos como etomidato y tiopentona, en el S. de Kearns-Sayre. Existe una gran sensibilidad al antracurio y roncuronio. Además se debe evitar la hipoxia crónica.
 - ◆ La atención psicológica es muy importante tanto en el paciente como en sus familiares.

- ❖ Entrenamiento aeróbico como terapia en miopatías: los pacientes con miopatía mitocondrial pueden mejorar su tolerancia al ejercicio y su capacidad oxidativa, que se atribuye a un aumento en la actividad de la cadena respiratoria, además de que la actividad física induce adaptaciones fisiológicas beneficiosas en el músculo esquelético. Se ha encontrado que en las células satélite (población celular de reserva ubicada en las fibras del músculo esquelético, responsable del crecimiento, curación y regeneración del músculo), puede ocurrir la pérdida de mtDNA mutante en pacientes que presentan la mutación únicamente en músculo y en pacientes de síndrome de Kearns-Sayre (*López, 2007; Taivassalo et al., 1999*), lo cual conlleva a la posibilidad de normalizar el genotipo muscular en estos y otros pacientes similares por estimulación de la proliferación e incorporación de las células satélite a las miofibras existentes. El principio de este tratamiento consiste en que cuando un músculo se daña se produce una proliferación y migración de las células satélite situadas en el exterior de las fibras musculares, hacia la zona afectada. Las células satélites se fusionan y se inician los elementos contráctiles renovándose así el músculo dañado.

- ❖ Terapia génica: en este tipo de enfermedades se encuentra en fase experimental siguiéndose varias líneas de investigación como:
 - ◆ Expresión alotrópica del gen: se pretende la relocalización del gen normal en el núcleo (mediante mutagénesis in vitro, el gen es compatible con el código genético universal y posee la señal de importe mitocondrial). Este procedimiento se siguió con el gen ATP6, cuya mutación T8993G produce NARP y síndrome de Leigh. Una vez transfectado a células humanas se expresó e importó a la mitocondria, y se incorporó al complejo V. La expresión alotrópica de constructos transfectados estables en cíbridos homoplásmicos para la mutación T8993G produjo una recuperación considerable del crecimiento en medio selectivo y aumentaba la síntesis de ATP (*López, 2007; Manfredi et al., 2002*). Otro ejemplo es el caso de la mutación G11778A presente en pacientes de LHON donde se inserta el gen ND4 sintético compatible con el código genético universal y portando una secuencia de importe a la mitocondria, en un vector viral adeno asociado. Esta proteína se importó a la mitocondria de cíbridos portadores de la mutación los cuales recuperaban los valores de respiración normales por expresión alotrópica de la proteína. (*López, 2007; Guy et al., 2002*)

 - ◆ Eliminación selectiva del mtDNA mutante: esto se ha probado en el caso de la mutación T8993G (ATP6) la cual produce un sitio de restricción para la enzima SmaI (utilizado para el

análisis genético de la mutación). La propuesta es transfectar el gen de esta enzima (fusionando con la secuencia de importe a la mitocondria), y de esta forma, se eliminará el mtDNA mutante sin dañar el mtDNA normal. Esto provocará un aumento de la proporción de DNA sano, y resultará en una restauración del nivel normal de ATP (López, 2007; Tanaka et al., 2002).

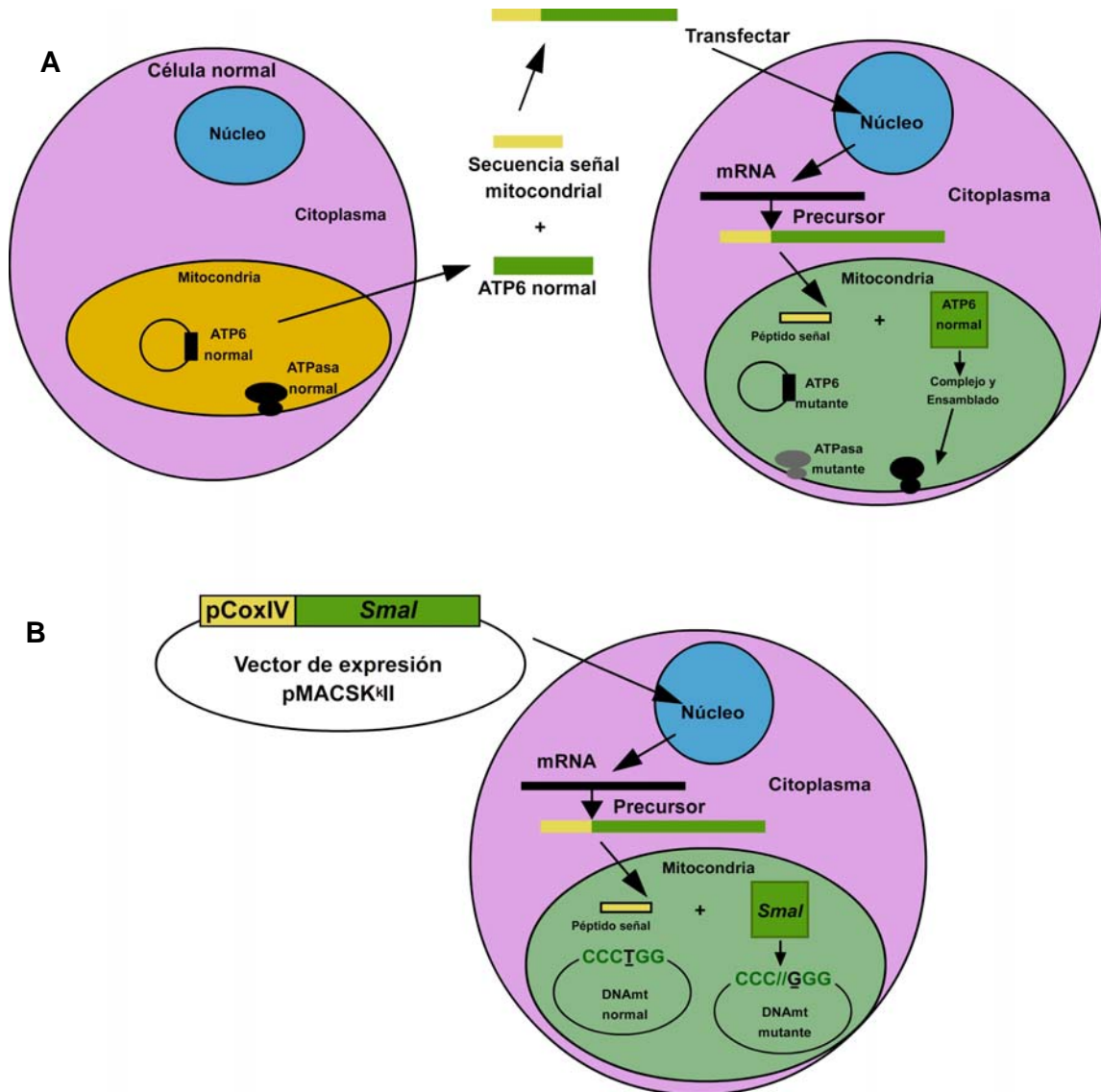


Figura 1.7. Terapia génica. A: Expresión alotrópica del gen (Schon and DiMauro, 2003). B: Eliminación selectiva del mtDNA mutante (Tanaka et al., 2002). (López, 2007)

1.2.4 MELAS

El síndrome MELAS se define como uno de los síndromes mitocondriales multisistémicos que se asocia a accidentes cerebrovasculares antes de los 40 años, acidosis láctica y fibras rojo rasgadas en la biopsia muscular (Pavlakis et al, 1984). MELAS es uno de los mayores subgrupos clínicos de las encefalopatías mitocondriales causado por un reemplazo de una base en el gen del tRNA^{Leu} que es responsable de la traducción de los codones de leucina UUR (R = A o G) (tRNA^{Leu(UUR)}) (Kirino et al, 2004; Kobayashi et al, 1991). Dicho síndrome está causado por diferentes mutaciones puntuales del mtDNA cuya herencia es materna, siendo la más frecuente (80-85%) la que se localiza en posición A3243G del tRNA^{Leu(UUR)} del mtDNA (Coelho et al, 2000), mientras que del 7 al 15% se le atribuyen al cambio timina por citosina (T→C) en la posición 3271 del mismo gen (Yasukawa et al, 2000). Se han identificado además otras mutaciones puntuales asociadas a MELAS en el mismo tRNA^{Leu}, en las posiciones A3252G, C3256T y T3291C (Figura 1.8). Por ello se cree que este tRNA es una zona propensa a presentar mutaciones patológicas. (López, 2007; Moraes et al., 1993)

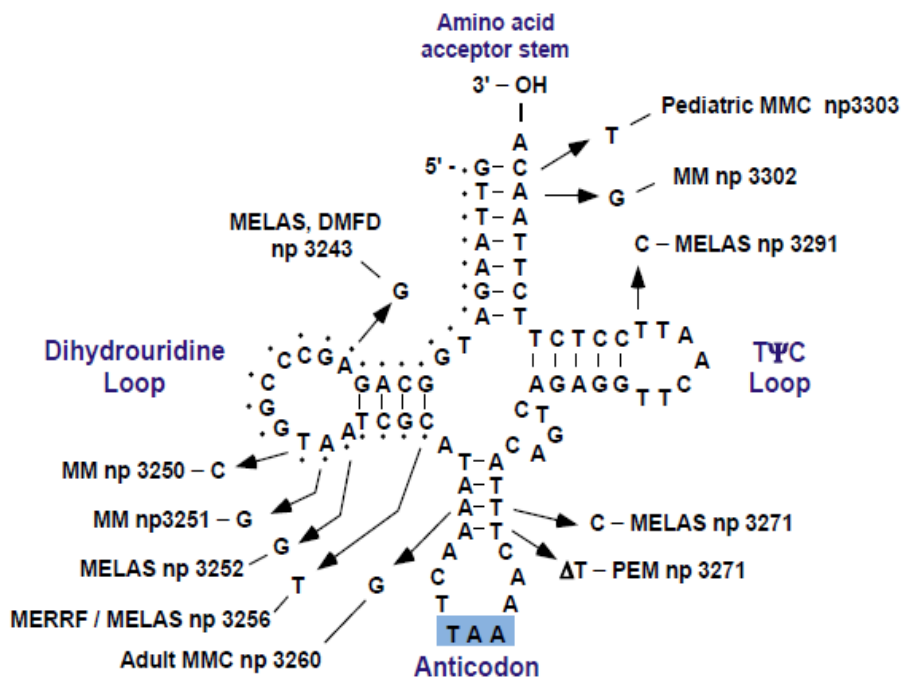


Figura 1.8. Mutaciones patológicas en el tRNA^{Leu(UUR)}.

(<http://www.mitomap.org/MITOMAP/tRNAleu.pdf>)

MELAS también puede ser resultado, en menor frecuencia, de mutaciones en otros genes del mtDNA (Tabla 1.2) como citocromo oxidasa III (COX III), un cambio de T por C en la posición 9957 (T9957C); ND5 (G13515A), tRNA^{Cys} (A5814G), tRNA^{Val} (G1642A), tRNA^{Lys} (T8356C), tRNA^{Ser(UCN)}

(T7521C). Las dos últimas mutaciones tienen una presentación clínica que superpone los síntomas de MELAS y Epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas (Parra et al., 2006).

Mutación	Gen	Referencia
G583A	tRNA ^{Phe}	(Hanna et al., 1998)
G1642A	tRNA ^{Val}	(deCoo et al., 1998)
C3093G	16S rRNA	(Hsieh et al., 2001)
A3243G	tRNA ^{Leu(UUR)}	(Goto et al., 1990a)
A3252G		(Morten et al., 1993)
C3256T		(Sato et al., 1994)
T3271C		(Goto et al., 1991)
T3291C		(Goto et al., 1994)
G4332A		tRNA ^{Gln}
T9957C	COIII	(Manfredi et al., 1995)
A12270G	ND5	(Liolitsa et al., 2003)
A13042C		
G13513A		(Santorelli et al., 1997a)
A13514G		(Corona et al., 2001)
G14453A	ND6	(Ravn et al., 2001)

Tabla 1.4. Mutaciones relacionadas con MELAS (López, 2007)

El tRNA^{Leu} está codificado por la cadena pesada del mtDNA, entre los nucleótidos 3230 y 3304; contiene el Factor de Terminación de la Transcripción mitocondrial (mTERF) necesario para la terminación del transcrito ribosomal 16S (3239-3256); es flanqueado corriente arriba por los genes que codifican para las subunidades 16S del rRNA (1671-3229) y 12S (3206-3229) y corriente abajo por una región no codificante (3305-3306) y el gen de la NADH Deshidrogenasa I (ND I) (3307-4262) (Parra et al., 2006; www.mitomap.org).

La mutación A3243G se encuentra en forma heteroplásmica, lo que, junto con la segregación mitótica, puede explicar las diferencias fenotípicas que se encuentran entre los individuos que presentan esta mutación (Delgado et al., 2007). Por ello, es importante determinar el porcentaje de heteroplasmia el cual influye en la aparición clínica de la patología. Dado el alto nivel de variación en el mtDNA, no es fácil definir como patológica una variante genética, por lo que la comparación de la distribución de las mutaciones patológicas y de las variantes poblacionales puede contribuir a la definición de patogenicidad (Ruiz et al., 2006). La transición A3243G presenta heterogeneidad fenotípica, pues no sólo se presenta en la mayoría de los pacientes con MELAS, sino que está asociada a otros fenotipos, incluyendo oftalmoplejía externa progresiva, miopatía, distonía, sordera es la responsable del 1% de los casos de diabetes mellitus tipo 2 heredada maternalmente (Parra et al., 2006; Yasukawa et al., 2000; DeVivo DC, 1992). El efecto de A3243G en la función mitocondrial se

produce básicamente a nivel de las subunidades ND3 y ND6 del complejo I de la cadena respiratoria, que poseen gran cantidad de residuos de leucina, lo que se ha evidenciado por la deficiencia que este complejo ha mostrado en pacientes con la mutación. Una deficiencia en los complejos I podría disminuir el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna y llevar a una disminución de la respiración y de la síntesis de ATP (Parra *et al.*, 2006; Finnilä S, 2000).

El mecanismo molecular que puede explicar el síndrome MELAS como efecto de la transición A3243G no ha sido dilucidado totalmente, sin embargo, se han realizado varios acercamientos con la técnica de células híbridas (híbridas), células obtenidas por la fusión de líneas celulares carentes de mtDNA ($\rho 0$), con células de pacientes con la mutación (Parra *et al.*, 2006; DiMauro *et al.*, 1993). Con este sistema se han obtenido evidencias que implican el efecto de dicha mutación sobre la síntesis de proteínas, ya que genera cambios en la conformación del tRNA^{Leu(UUR)} mutado que afecta sus modificaciones postranscripcionales (Parra *et al.*, 2006; Helm *et al.*, 1999) entre ellas la metilación de nucleótidos en el extremo 5' del anticodón. Esta metilación es necesaria para conservar la especificidad con el codón y puede afectarse también su aminoacilación (unión de la Leu) puesto que se pierde la especificidad de la enzima leucil-transferasa. Estos efectos conllevan a la sustitución de Leu por fenilalanina en las proteínas mitocondriales (Parra *et al.*, 2006; Jacobs *et al.*, 2000), o a una terminación prematura de la traducción.

Otro mecanismo que se ha dilucidado mediante las células híbridas, ha sido la disminución en la tasa de síntesis de proteína (entre 20-40%) como efecto de la reducción en el número de ribosomas (Parra *et al.*, 2006; Chomyn *et al.*, 1992) puesto que la mutación A3243G afecta la afinidad del mTERM debido a que se localiza en el centro de la secuencia de reconocimiento de dicho elemento. Lo anterior trae como consecuencia una disminución en cantidad de rRNA 16s y la acumulación del precursor RNA 19s, que corresponde a un transcrito que contiene los genes contiguos 16SrRNA+tRNA^{Leu(UUR)} +ND1 (Parra *et al.*, 2006; Finnilä S, 2000). El efecto final es la disminución en la síntesis de ribosomas por falta de la subunidad 16S (Parra *et al.*, 2006).

1.3 Haplogrupos mitocondriales

A diferencia del DNA nuclear, el mtDNA no aparenta sufrir una recombinación de sus bases nucleotídicas durante la división y reproducción de la mitocondria. La ausencia de recombinación permite que las mutaciones se acumulen en una mayor o menor línea o de manera cronológica en

los linajes maternos. Como resultado, hay una ambigüedad mínima en la reconstrucción de la bifurcación de los linajes femeninos a lo largo de los cambios acumulados en sus mtDNAs (Schurr, 2000). De tal forma que, en sus migraciones fuera de África, los humanos han estado acumulando variaciones distintivas del mtDNA de nuestro ancestro "Eva mitocondrial", resultando en numerosos haplotipos característicos de los diferentes grupos étnicos (DiMauro, 2005), en la Figura 1.9 se observa el mapa de migraciones del mtDNA.

Se han empleado dos diferentes métodos moleculares para aprovechar las características genéticas del mtDNA. El análisis de los polimorfismos en los fragmentos largos de restricción (RFLP) contempla mtDNAs individuales por variación de secuencia usando una serie de enzimas (endonucleasas de restricción) que cortan la molécula de mtDNA en un nucleótido específico de la secuencia conocido como sitio de reconocimiento. Si hay diferencias entre dos individuos las enzimas de restricción cortan su DNA en puntos diferentes en el mtDNA, los fragmentos resultantes serán de diferentes longitudes. En el análisis de RFLP, la combinación única de los fragmentos detectados por una serie de enzimas de restricción representa polimorfismos genéticos dentro de un haplotipo de mtDNA. Un grupo de haplotipos relacionados que se define por una serie de RFLPs compartidos es llamado haplogrupo o linaje de mtDNA. Una variación genética considerable dentro y entre las poblaciones humanas se ha detectado mediante el análisis de RFLP. Aunque una porción significativa de esta variación es compartida entre todas las poblaciones, una cierta cantidad es solo encontrada dentro de poblaciones geográficamente circunscritas o grupos étnicos (Schurr, 2000).

Otro método de estudio de la variación del mtDNA involucra la secuenciación directa de uno o ambos segmentos hipervariables (HVS-I y HVS-II *hypervariable segments*) de la región control. A diferencia del análisis de RFLP, que puede ser ligado a un análisis general del genoma mitocondrial, la secuenciación directa proporciona una lectura nucleótido por nucleótido de una porción del mtDNA. Ya que el rango de mutación es elevado en la región control, la secuenciación directa proporciona una vista detallada en los pequeños cambios genéticos que pueden haber ocurrido recientemente. Las mutaciones en la región control ayudan a definir linajes específicos de mtDNA en las poblaciones humanas (como lo hacen ciertos RFLPs), y también revelan la diferenciación genética de esos linajes en áreas geográficamente circunscritas. Por cálculos estadísticos de la cantidad de variación en las regiones control dentro y entre linajes de mtDNA, es posible estimar la edad relativa de las variantes genéticas en una región geográfica particular (Schurr, 2000). Así, la mayoría de los polimorfismos determinantes de haplogrupos son específicos de un continente.

La clasificación de los haplogrupos de mtDNA esta basada en la información obtenida mediante análisis RFLP de la región codificante y de las secuencias de nucleótidos de los segmentos hipervariables en la región control. Los haplogrupos se codifican con letra capital y la subclase con un número común (Schurr et al., 1990; Ballinger et al., 1992a; Torroni et al., 1996; Richards et al., 1998).

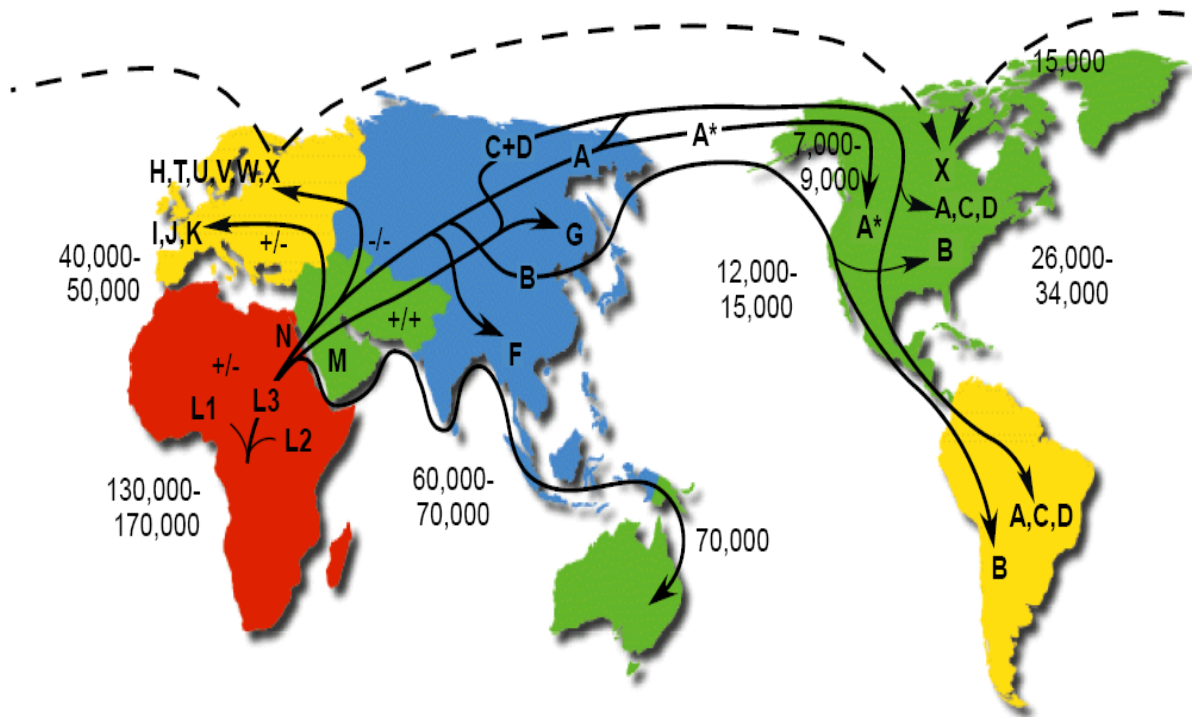
La evolución del mtDNA humano se caracteriza por los distintos linajes étnicos que ya han sido identificados: tres africanos, nueve europeos y siete asiáticos (incluyendo nativo americanos) (Lehtonen, 2002). Cerca del 99% de los mtDNAs europeos se incluyen dentro de nueve haplogrupos designados como H, I, J, K, T, U, V, W y X (Lehtonen, 2002; Torroni et al., 1996), y estos haplogrupos pueden ser además agrupados dentro de cuatro clados: HV, UK, TJ y WIX (Lehtonen, 2002; Richards et al., 1998). En Asia, el 77% de los mtDNAs se encuentran dentro de un superhaplogrupo M que a su vez esta subdividido en pequeños subhaplogrupos designados como C, D, G y E. La mayoría de los mtDNAs asiáticos restantes son de los haplogrupos A, B y F. Esencialmente todos los mtDNAs nativo americanos se encuentran dentro de cuatro haplogrupos: A, B, C y D (Lehtonen, 2002; Torroni y Wallace, 1994), en la Figura 1.9 se pueden observar la localización geográfica de todos los haplogrupos .

Una comparación de nativo americanos, siberianos y asiáticos reveló que los mismos linajes de mtDNA en todos los grupos comparten mutaciones en la región control que son específicas de los haplogrupos. La explicación más simple es que las mutaciones de la región control surgieron en Asia en los linajes mitocondriales fundadores y fueron traídos hacia el nuevo mundo por el nativo americano ancestral. La mayoría de las variantes en las secuencias de la región control de los nativo americanos parecen ser únicas. La distribución geográfica y lingüística de los haplogrupos A-D en América también sugiere que todos ellos estuvieron presentes en la(s) migración(es) original(es). Los cuatro haplogrupos se han observado en poblaciones fuera de América y se han encontrado también en los tres grupos lingüísticos nativo americanos propuestos (Amerindio, Na-Dene, Eskaleut). Sin embargo, los indios Na-Dene y Eskimo-Aleuts originales parecen carecer del haplogrupo B. Aunque los mtDNAs de haplogrupos A-D son frecuentemente encontrados juntos en una sola población, varias tribus carecen de haplotipos de al menos uno de estos haplogrupos. Esta tendencia refleja el hecho de que el flujo genético y los eventos fundadores han jugado un papel significativo en la formación de la distribución de los haplotipos mitocondriales en dichas poblaciones. Esta interpretación es también sostenida por la alta frecuencia de haplotipos mitocondriales “privados” en diferentes tribus amerindias. Dichos resultados sugieren la idea de que

un aislamiento temprano de las tribus y los efectos que fundaron permitieron la divergencia del juego de genes en diferentes regiones (aunque no todos los científicos están de acuerdo en este punto). También es importante mencionar que la composición genética de una población antigua puede no ser la misma a la población que actualmente ocupa la misma región geográfica, debido a las migraciones, el flujo genético u otros procesos (*Schurr, 2000*).

Los haplogrupos A, C y D parecen ser los linajes mitocondriales más antiguos en el nuevo mundo (aproximadamente 47,650 a 23,535 años de edad). Las edades de estos haplogrupos en Siberia son generalmente comparables para los de América. La edad considerable de estos haplogrupos sugiere que la relación entre poblaciones Siberianas y Nativo Americanas son bastante antiguas. El haplogrupo B en América es considerablemente más joven (17,700 a 13,500 años de edad) que los haplogrupos A, C y D. Sin embargo, análisis recientes en la región control en nativo americanos indican que el haplogrupo B puede ser más diverso (y por lo tanto más antiguo) que los haplogrupos A, C y D. Otros trabajos también sugieren que los haplotipos del haplogrupo B estuvieron presentes en el centro-este de Asia al menos 24,000 a 30,000 años antes (*Schurr, 2000*).

Un número de mtDNAs encontrados en nativo americanos no caen dentro de los haplogrupos A-D. Estos fueron originalmente designados como "otros" haplotipos y la mayoría fueron atribuidos a una mezcla no nativa debido a sus afinidades aparentes hacia los mtDNA europeos. En particular, los otros haplotipos detectados en Ojibwa y Navajo se parecen al haplogrupo X visto en canadienses franceses y otros grupos europeos. Un solo haplotipo en los Mayas también parece pertenecer al haplogrupo europeo H, el linaje mitocondrial más comúnmente observado en poblaciones caucásicas americanas y europeas. Sin embargo, se ha visto que los otros haplotipos similares al haplogrupo X europeo de hecho pertenecen a una divergencia de este linaje en particular. Todos los haplotipos del haplogrupo X amerindios comparten un conjunto de RFLP y mutaciones en la secuencia de la región control con el haplogrupo X europeo, pero por otro lado, difieren de ellos por muchas mutaciones en la región control. También, cuatro sublinajes distintos del haplogrupo X se han identificado en poblaciones amerindias implicando que esto ha sido suficiente a lo largo del nuevo mundo para tener una diversificación genética considerable. En contraste con la distribución de los haplogrupos A a D, el haplogrupo X se encuentra en poblaciones exclusivamente cercanas en Norte América. También se ha detectado en pocas muestras brasileñas antiguas lo que implica que dicho haplogrupo estuvo presente en el nuevo mundo antes que los primeros europeos arribaran (*Schurr, 2000*).



+/-, +/+, or -/- = Dde I 10394 / Alu I 10397
 * = Rsa I 16329

Mutation rate = 2.2 - 2.9 % / MYR
 Time estimates are YBP

Figura 1.9. Migración del DNA mitocondrial humano.
 (<http://www.mitomap.org/WorldMigrations.pdf>)

En México se han estudiado diferentes poblaciones nativas usando varios marcadores genéticos y los resultados han mostrado la mezcla genética indígena, europea y africana. Un estudio reciente mostró que los grupos Huichol y Tarahumara no tienen el haplogrupo A o lo tienen en una baja frecuencia. Por otro lado, los grupos de la Mixteca-Alta, Nahua-Necoxtla, Nahua-Actopan, Nahua-Chilacachapa y Nahua-Zitlala tienen al menos los haplogrupos D y B. Los Nahua-Ixhuatlancillo, Otomí, Nahua-Xochimilco, Mixteca-Baja, Tzeltal y Nahua-Coyolillo tienen al menos el haplogrupo C. El grupo Purépecha tiene una frecuencia baja de los haplotipos D, B y C. También se encontró que el grupo Nahua-Coyolillo (localizado cerca del Golfo de México), fue el único grupo indígena con otro haplogrupo (haplogrupo L), presentando una mezcla africana. De acuerdo con estos resultados, una distribución heterogénea de los haplogrupos mitocondriales A, B, C y D está presente entre las poblaciones indígenas mexicanas excepto la Nahua-Coyolillo. (Peñaloza et al., 2007)

Haplogrupo Nativo-Americano	Nucleotido	RFLP	Oligos Ubicación	Oligos Secuencia (5'-3')
A	C16290T G16319A	HaeIII+663	L396 H1067	CCAGCCTAACCAGATTTCAA GGGGTATCTAATCCCAGTTT
B	16189C 16217C	Del. 9-bp	L8192 H8361	GCTCTGAAATCTGTGGAG TATTTAGTTGGGGCATTTCAC
C	16298C 16327T	Alu I +13262	L12978 H13733	CAAGCCTCACCCACTACTA GGTAGAGGGGGATTGTTGTT
D		Alu I -5176	L5042 H5442	CCCACATAGGATGAATAATA GCGATGAGTGTGGGGAGGAA

Tabla 1.5. Haplogrupos nativo-americanos. (Richards et al., 2000).

1.3.1 Asociación entre genotipo y fenotipo mitocondrial

Ciertas mutaciones en el mtDNA pueden causar enfermedades o fenotipos clínicos por sí solos, pero algunas pueden causar enfermedad solo en presencia de un factor adicional. Mutaciones en el mtDNA secundarias y factores ambientales han sido encontrados como contribuidores de patogenicidad. Un ejemplo de una mutación patogénica que necesita de un factor adicional es la mutación 1555A>G (Lehtonen, 2002; Prezant et al., 1993). Mutaciones secundarias en el mtDNA incrementan la penetrancia de una mutación causante de enfermedad, así la penetrancia de la mutación 7445A>G en el gen de tRNA^{Ser(UCN)}, causante de enfermedad, por ejemplo, se incrementa en presencia de tres sustituciones adicionales (Lehtonen, 2002; Fischel-Ghodsian et al., 1995).

Se ha sugerido que los diferentes haplotipos del mtDNA pueden modular la fosforilación oxidativa influenciando la fisiología de los individuos y predisposición o protección a ciertas enfermedades. Entre las características funcionales influenciadas por los haplotipos del mtDNA están el coeficiente intelectual (IQ), movilidad espermática y la adaptación a climas fríos y entre las enfermedades, la cardiopatía, el Alzheimer, la demencia con cuerpos de Lewy, y la esclerosis múltiple han sido asociados con haplotipos específicos del mtDNA. También, pacientes con LHON y cierto haplogrupo del mtDNA tienen un mayor riesgo de desarrollar ceguera, mientras que, no se ha establecido ninguna conexión entre la expresión variable del fenotipo MELAS-3243 y los haplotipos del mtDNA. De hecho, un estudio en pacientes con MELAS y la mutación A3243G también ha fracasado en confirmar una asociación previamente reportada entre una variante polimórfica (A12308G) y el incremento en el riesgo de ataques. Por lo que es necesario definir mejor tanto el papel patogénico de las mutaciones homoplásmicas así como el papel modulador de los haplotipos en la salud y la enfermedad, influenciando la fisiología de los individuos y predisposición o protección a ciertas enfermedades (DiMauro et al., 2005). A pesar de que no se ha encontrado ninguna asociación entre los

haplogrupos mitocondriales de Eurasia occidental y los fenotipos de pacientes con la mutación A3243G, cabría la posibilidad de que otros haplogrupos sí mostraran esta asociación. Sin embargo, sólo se ha descrito un caso de MELAS que presenta la mutación A3243G perteneciente al haplogrupo B2 donde las mutaciones propias no parecen conferir ninguna modificación fenotípica en el síndrome MELAS (*Delgado et al., 2007*).

Muchos sublinajes del haplogrupo U están asociados con diferencias en la movilidad y vitalidad espermática las cuales pueden estar asociadas a una mutación altamente conservada en el gen de COIII del mtDNA y muchas mutaciones igualmente conservadas en gen del citocromo b. Además los linajes con las mutaciones en citocromo b son substancialmente más abundantes en el norte de Europa mientras que aquellas que carecen de dichas mutaciones son más prevalentes en el sur de Europa. Ello sugiere que algunas de las mutaciones conservadas del citocromo b permitieron a nuestros ancestros adaptarse al frío por fosforilación oxidativa mitocondrial desacoplada parcialmente. (*Montiel et al., 2006*)

1.4 Métodos para localizar polimorfismos o mutaciones

El análisis de la estructura del DNA y su papel en la expresión génica se han visto enormemente facilitados por el desarrollo de poderosas técnicas como la PCR y secuenciación de las moléculas de DNA. Mediante dichas técnicas se ha investigado la existencia de diversidad genética en una población conocida como polimorfismo, así como las alteraciones o mutaciones en las mismas. La mutación detectada puede ser por sí misma causa de enfermedad, o puede estar directamente ligada a otra que sí lo sea (*Berg et al., 2003*). Por ello, se ha recurrido al estudio de poblaciones por medio de RFLP con la finalidad de establecer la relación entre una mutación o un polimorfismo y una enfermedad.

1.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

En 1983, Kary Mullis conceptualizó una nueva técnica para amplificar DNA en un tubo de ensayo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar fragmentos de DNA un billón de veces en pocas horas además de que pueden utilizarse cantidades extremadamente pequeñas del DNA original. La base de la PCR es la replicación catalizada por una DNA polimerasa la cual requiere de dos elementos esenciales: una cadena simple de DNA molde del cual una nueva cadena de DNA puede ser copiada y un primer con un grupo 3'-OH al cual nuevos nucleótidos pueden ser añadidos. Ya que una molécula de DNA consiste de dos cadenas de nucleótido y cada una sirve como molde para producir una nueva molécula de DNA, la cantidad de DNA se duplica

con cada evento de replicación. El punto de inicio de la síntesis en el templado es determinado por la elección de los cebadores (primers) que son fragmentos cortos de DNA de entre 17-20 nucleótidos y son complementarios a la secuencia conocida en el templado, cada primer es diferente para cada cadena (Pierce, 2006). La PCR se lleva a cabo en una solución que contiene la secuencia diana, un par de cebadores que hibridan con las secuencias diana, cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), una polimerasa estable al calor y iones de magnesio y otras sales que son necesarias para la reacción (Berg et al., 2003).

Un ciclo de PCR (Figura 1.10) consiste en tres etapas: en la primera (desnaturalización), la solución es calentada a una temperatura entre 90° y 100°C para romper los enlaces de hidrógeno entre las dos cadenas de nucleótidos y así tener los templados de cadena sencilla. La mezcla de reacción se mantiene a esta temperatura por solo un minuto o dos. En la segunda etapa la solución de DNA es enfriada rápidamente a una temperatura entre 50° y 65°C durante un minuto o menos. Durante este intervalo corto las cadenas de DNA no tendrán oportunidad de realinearse ya que los primers estarán disponibles para reconocer a su secuencia complementaria en las cadenas originales. En la etapa 3, la solución es calentada entre 60° y 70°C, temperatura a la cual la DNA polimerasa puede sintetizar nuevas cadenas de DNA mediante la adición de nucleótidos a los primers. El ciclo completo se repite y en cada ciclo la cantidad de DNA se duplica. Una molécula de DNA se incrementa más de 1000 moléculas en 10 ciclos de PCR (Berg et al., 2003). La DNA polimerasa fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en los manantiales hirvientes del Parque Nacional de Yellowstone. Esta enzima (*Taq polimerasa*) es muy estable a altas temperaturas y no se desnaturaliza durante la etapa de separación de las cadenas de la PCR, y por lo tanto puede adicionarse a la mezcla de reacción al inicio del proceso de PCR y continúa funcionando a lo largo de muchos ciclos (Pierce BA, 2006).

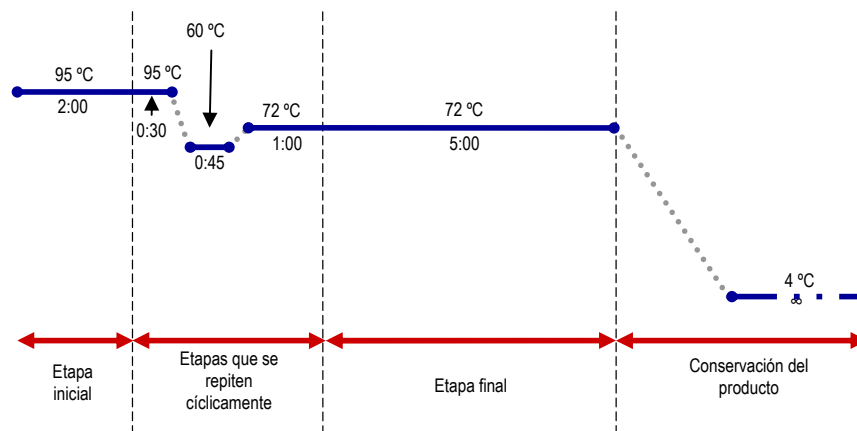


Figura 1.10. Diagrama tiempo-temperatura en un programa de PCR.

Para visualizar los productos de la PCR se hace una electroforesis en gel de agarosa utilizando además bromuro de etidio que es un colorante fluorescente altamente tóxico esencial para la tinción del DNA en el gel. Esta molécula se intercala entre las bases apiladas del DNA creando una unión del tipo Van der Waals con las bases de la cadena. Después de la inserción dentro de la hélice, el colorante permanece perpendicular al eje helicoidal teniendo contacto con la base superior e inferior. La posición arreglada de la molécula y su proximidad a las bases causa que el colorante exhiba un campo fluorescente. El colorante o buffer de carga del gel que se mezcla con las muestras antes de cargarlas tiene 3 propósitos: 1) incrementar la densidad de la muestra, 2) asegurar que el DNA descienda uniformemente dentro del pocillo y 3) añadir color a la muestra, con lo que se simplifica el proceso de carga. Este compuesto contiene colorantes que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico.

1.4.2 Secuenciación

La secuenciación del DNA se basa en la generación de fragmentos cuya longitud depende de la última base de la secuencia. Se pueden generar grupos de estos fragmentos por interrupción controlada de la replicación enzimática (método desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores). Esta técnica se lleva a cabo en cuatro mezclas de reacción al mismo tiempo, en las cuales una DNA polimerasa sintetiza la hebra complementaria de una secuencia concreta de una molécula de DNA de hebra simple. El cebador para la síntesis es un fragmento complementario de una parte de la secuencia conocida. Cada mezcla de reacción contiene, además de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (marcados radiactivamente), una pequeña cantidad del análogo 2',3'-dideoxi de uno de los nucleótidos, uno diferente para cada mezcla de reacción. La incorporación de este análogo impide todo crecimiento posterior de la nueva cadena, porque carece del grupo hidroxilo en 3', que es esencial para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. La concentración de este análogo dideoxi es lo suficientemente pequeña para que sólo ocasionalmente se produzca la terminación de la cadena. La polimerasa añadirá a veces el nucleótido correcto y otras veces el análogo dideoxi, deteniéndose la reacción. Así por ejemplo, si está presente el análogo dideoxi del dATP, se producen fragmentos de distinta longitud pero todos terminarán con el análogo dideoxi de ese nucleótido, el cual sólo se insertará donde se localice una T en el DNA que se está secuenciando. Por tanto, los fragmentos de diferente longitud corresponderán a las posiciones de T. Cuatro de estas series de fragmentos de cadena interrumpida (una por cada análogo dideoxi) se separan por electroforesis y la secuencia de bases del nuevo DNA se lee a partir del autorradiograma de las cuatro calles (*Berg et al., 2003*). Hoy en día,

la secuenciación es realizada por maquinas automatizadas que utilizan colorantes fluorescentes y lectores laser para secuenciar millones de pares de bases en pocas horas. La reacción dideoxi también se utiliza, pero los ddNTPs utilizados en la reacción son marcados con un colorante fluorescente diferente para cada dideoxinucleotido. Por ejemplo, un colorante rojo puede ser utilizado para nucleótidos con timina, un verde para aquellos con adenina, un negro para los que tienen guanina y un azul para citosina. En este caso, las cuatro reacciones de secuenciación pueden hacerse en el mismo tubo y se pueden correr en el mismo pozo durante la electroforesis dado que cada ddNTP es marcado de manera distinta. Las maquinas de secuenciación mas recientemente desarrolladas llevan a cabo la electroforesis en tubos capilares que contienen gel. Los tamaños de fragmentos producidos por la reacción de secuenciación se separan dentro del tubo y pasan a través de un rayo laser y detector. Al paso de los fragmentos por el laser, sus colorantes fluorescentes se activan y resulta la fluorescencia detectada por un lector óptico. Cada colorante emite fluorescencia de una longitud de onda característica, la cual es leída por el lector óptico. La información pasa a una computadora para ser interpretada y los resultados se imprimen como un conjunto de picos en una grafica (electroferograma). Las maquinas secuenciadoras automatizadas pueden tener 96 o mas tubos capilares permitiendo de 50,000 a 60,000 pb de secuencia sean leídas en pocas horas (*Pierce BA, 2006*).

1.4.3 RFLP

Para detectar las variaciones (polimorfismo) en la secuencia del genoma se recurre al método de RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) que se basa en la detección de aquellas variaciones de la secuencia de DNA (codificante o no) que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción. Por tanto, los fragmentos que se obtienen son diferentes dependiendo del alelo presente (*Luque et al., 2001*).

Los RFLPs son variaciones en los patrones de los fragmentos producidos cuando las moléculas de DNA son cortadas con la misma enzima de restricción. Por ejemplo, si el DNA de dos personas se corta con la misma enzima de restricción y diferentes patrones de fragmentos son producidos, esas personas deben poseer diferencias en sus secuencias de DNA. Dichas diferencias son heredables y pueden ser usadas en el mapeo, de manera similar en la que las diferencias alélicas son utilizadas para el mapeo de genes convencionales (*Pierce BA, 2006*). Los RFLPs pueden ser útiles para identificar organismos o analizar la relación incluso cuando no se conoce la función del gen alterado. De hecho, desde que se examina directamente el DNA, la alteración puede ser en una secuencia de DNA no codificante o en una intermedia. No es necesario que esté en una región codificante de un gen.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la amplificación del gen que codifica para el tRNA^{Leu} en el DNA mitocondrial para evidenciar la presencia o ausencia de la mutación A3243G por medio de PCR-RFLP en pacientes con probable enfermedad mitocondrial de MELAS además de la correspondiente determinación del haplogrupo al que pertenece.

Objetivos particulares

Extraer el DNA de una muestra biológica del paciente con probable patología mitocondrial por medio de protocolos establecidos para su posterior análisis molecular.

Determinar la concentración de DNA extraído anteriormente, mediante espectrofotometría a fin de asegurar que sea la adecuada para la reacción en cadena de la polimerasa.

Realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por medio de un programa previamente establecido en un termociclador a fin obtener un número considerable del fragmento de mtDNA que se desea estudiar.

Asegurar que haya ocurrido la amplificación del fragmento de mtDNA específico y que se tenga una adecuada concentración del mismo, mediante una electroforesis en gel de agarosa para los posteriores análisis.

Evidenciar la presencia o ausencia de la mutación A3243G en 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 *Apa I*.

Calcular el porcentaje de heteroplasmia de la mutación A3243G en la muestra mediante un programa para análisis de imágenes (Gel Project) para ver la relación de éste con la severidad de los síntomas.

Identificar el haplogrupo mitocondrial del paciente mediante la detección de polimorfismos específicos ya sea por medio de secuenciación de la región hipervariable I o por PCR-RFLP específicos.

3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1 Materiales y equipos

Las muestras de los pacientes estudiados han sido proporcionadas por el Jefe de Neurología Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI, IMSS. La selección de las mismas se realizó de acuerdo a la sintomatología que presentaron los pacientes sospechándose de una patología mitocondrial, específicamente MELAS.

Se estudiaron 3 pacientes no relacionados de los cuales, a continuación se presenta un resumen de sus historiales clínicos.

MUESTRA	HISTORIA CLÍNICA
1 (sangre periférica)	Paciente femenino de 14 años 6 meses de edad con antecedentes de una prima hermana por línea materna con MELAS, fallecida. Presenta cefalea occipital, disminución de agudeza visual, también refiere parestesia y dolor en la hemicara derecha y en extremidades inferiores, continúa con debilidad del miembro pélvico derecho lo que ocasiona claudicación durante la marcha. El tono muscular normal, no se aprecia déficit motor en este momento. Fondo de ojo con hiperpigmentación de la retina bilateral y papila óptica pálida en ojo derecho sin evidencia de papiledema. Reporte de lactato elevado, IRM con espectroscopia elevación de lactato en regiones occipitales por lo que hay datos fuertemente sugestivos de citopatía mitocondrial.
2 (biopsia muscular)	Paciente masculino de 10 años 5 meses de edad con antecedentes familiares de epilepsia e hipoacusia. Padece asma desde los 2 años de edad, intolerancia a la lactosa desde el año de edad y desde hace 5 meses cursa gastritis. Presenta crisis TCG (tónico clónico generalizadas) de larga duración. Al tercer evento de crisis TCG presenta broncoaspiración que lo lleva al paro respiratorio revertido con maniobras de reanimación. En ocasiones las crisis son precedidas de cefalea, vómito, alucinaciones visuales y amaurosis. Ha presentado deterioro cognitivo y se refiere aparente hipoacusia. En el examen físico se observó ptosis palpebral, pupilas isocóricas, fondo de ojo sin alteraciones de la pigmentación retineana, reflejos fotomotor y consensual presentes, no hay limitaciones a la aducción y versión ocular, marcha sin alteraciones. Sensibilidad normal. Presenta talla baja y deterioro cognitivo, datos sugestivos de neuropatía por lo que se debe descartar enfermedad mitocondrial.
3 (biopsia muscular)	Paciente femenino de 12 años sin antecedentes familiares importantes. Inicia hace 8 meses con episodios de cefalea frontal o universal de aparición súbita, de leve a moderada intensidad, la cual no tenía exacerbación con alguna actividad pero cedía con analgésico tipo paracetamol, sin síntomas acompañantes, de presentación cada 3 a 7 días. A los 2 meses de evolución presenta crisis convulsivas tónico clónico generalizadas de duración de 2 minutos.

Posteriormente evoluciona con crisis convulsivas de diversos tipos, generalizados o focalizados a hemicuerpo derecho y a veces a hemicuerpo izquierdo, siendo de difícil control a pesar de 4 anticonvulsivos. Hace semanas se evidencia exacerbación de las crisis y discreta somnolencia, confirmándose infartos cerebrales sobre regiones frontoparieto occipital izquierda y parieto occipital derecha. En su evolución llegó a presentar amaurosis de ojo derecho por una hora aproximadamente. Desde el inicio de sus síntomas cuenta con TAC de cráneo donde se muestran calcificaciones a nivel de ganglios de la base.

Sus pruebas de laboratorio muestran Lactato elevado en 4.1.

Por lo anterior se sospecha de citopatía mitocondrial de tipo MELAS.

Tabla 3.1. Resumen de las historias clínicas de los pacientes con probable enfermedad mitocondrial.

3.1.1 Extracción de DNA a partir de sangre completa.

- 2 tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Columna QIAamp Spin con tubo colector.
- Termomixer a 56°C, vortex y micropipetas.
- Microcentrífuga con capacidad para 14000 rpm.
- Kit de soluciones de QIAamp DNA Mini Blood (Proteinasa K, buffer AL, etanol absoluto, buffer AW1, buffer AW2 y buffer AE).

3.1.2 Extracción de DNA a partir de biopsia muscular.

- 2 tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Columna QIAamp Spin con tubo colector.
- Termomixer a 56°C, vórtex y micropipetas.
- Microcentrífuga con capacidad para 14000 rpm.
- Kit de soluciones de DNeasy Blood & Tissue (Proteinasa K, buffer AL, etanol absoluto, buffer AW1, buffer AW2 y buffer AE).

3.1.3 Cuantificación y pureza del DNA.

- Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000
- Micropipeta de 0.5 – 10 µl.
- Agua libre de nucleasas.
- Muestra de DNA.

3.1.4 Amplificación de la región específica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Tubos de 200 μ l.
- Micropipetas.
- Solución Master Mix de Promega (*Taq polimerasa*, DNTP's, $MgCl_2$, Buffer).
- Agua libre de nucleasas y DNA problema.
- Termociclador.

3.1.5 Electroforesis 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.
- Fuente de poder.
- Agarosa y buffer TAE 1x.
- Bromuro de etidio.
- Marcador molecular 1 kb Promega.
- Fragmento de mtDNA amplificado (producto de PCR)

3.1.6 Polimorfismo en los fragmentos largos de restricción (RFLP).

- Producto de PCR.
- Enzima de restricción (*Apa I*).
- Tubo de 0.2 ml.
- Termomixer a 30°C.
- Micropipetas.

3.1.7 Purificación.

i) Con kit QIAquick PCR Purification

- Producto de PCR.
- Tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Columna QIAquick con tubo colector.
- Vórtex y micropipetas.
- Microcentrífuga con capacidad para 13000 rpm.
- Kit de soluciones de QIAquick PCR Purification (buffer PBI, buffer PE, buffer EB).

ii) Con ExoSAP-IT®

- Producto de PCR.
- Tubo de 0.2 ml.
- Solución ExoSAP-IT en hielo.
- Termomixer a 37°C.

3.2 Métodos

Para el diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales es necesario el análisis del mtDNA del paciente, mediante la amplificación de fragmentos de la secuencia por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para después digerir dichos fragmentos con una enzima de restricción (RFLP) que identifica específicamente la mutación que se busca. En este trabajo se realizó el estudio a 3 pacientes con probable enfermedad mitocondrial buscando la presencia de la mutación específica A3243G asociada a la encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS), la cual es identificada por la enzima de restricción *Apa I* creando dos fragmentos de 450 y 204 pb en el amplificado de 654 pb. La determinación del porcentaje de heteroplasmia se realizó mediante el análisis del gel obtenido de la electroforesis después de la digestión. El haplogrupo al que pertenece se determinó mediante la secuenciación de la región hipervariable I y/o RFLP. Lo anterior se realizó siguiendo los siguientes protocolos experimentales.

3.2.1 Extracción de DNA de sangre periférica:

1. En un tubo eppendorff colocar 200 µl de la muestra de sangre.
2. Adicionar 20 µl QIAGEN Proteasa (o Proteinasa K).
3. Agitar con vortex el tubo.
4. Adicionar 200 µl del buffer AL a la muestra.
5. Mezclar en vortex por 15 segundos.
6. Incubar a 56°C por 10 minutos.
7. Centrifugar brevemente.
8. Adicionar 200 µl de etanol al 96 - 100% al tubo con la muestra y mezclar nuevamente en vortex por 15 segundos y centrifugar brevemente.
9. Sacar la muestra del tubo y pasarla a la columna QIAamp Spin (contenida en un tubo colector 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 μ l de buffer AW1 sin mojar el borde y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
12. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y desechar el tubo con el filtrado.
13. Abrir cuidadosamente la columna y adicionar 500 μ l de buffer AW2. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
14. Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y desechar el tubo que contiene el filtrado.
15. Abrir la columna y adicionar 200 μ l de buffer AE o agua destilada, incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto.
16. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

3.2.2 Extracción de DNA de músculo:

1. Cortar 25 mg de tejido en partes pequeñas y colocarlas en un tubo de 1.5 ml y adicionar 180 μ l de buffer ATL.
2. Adicionar 20 μ l de proteinasa K, mezclar con vortex e incubar a 56°C hasta que el tejido se haya lisado completamente. Mezclar con vortex ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra.
3. Mezclar con vortex 15 segundos y adicionar 200 μ l de buffer AL a la muestra y mezclar. Adicionar 200 μ l de etanol (96-100%) y mezclar nuevamente.
4. Pasar la mezcla (incluyendo el precipitado) a una columna DNeasy mini spin contenida en un tubo de 2 ml y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
5. Descartar el tubo con el filtrado, colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y adicionar 500 μ l de buffer AW1.
6. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el tubo con el filtrado.
7. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y adicionar 500 μ l de buffer AW2.
8. Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm para lavar la membrana de la columna. Descartar el tubo con el filtrado.
9. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 200 μ l de buffer AE directamente en la membrana e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.

10. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm para eluir el DNA.

3.2.3 Cuantificación y pureza del DNA.

1. Conectar el Nanodrop e iniciar el programa en la computadora para cuantificación de ácidos nucleicos.
2. Levantar el brazo del espectrofotómetro y colocar 2 μl de H_2O libre de nucleasas y RNAasas y presionar "enter" para iniciar el equipo.
3. Limpiar con papel absorbente la gota de agua y colocar 2 μl de la solución blanco (en este caso H_2O nuevamente) y presionar "leer blanco".
4. Limpiar con papel absorbente la gota del blanco y colocar 2 μl de la muestra problema y presionar "F1".

Nota: en cada lectura se debe observar la burbuja que se forma por tensión superficial, entre el brazo del espectro y la base donde se coloca la gota de la solución a leer.

3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Preparar tubos de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3.2. Preparación de una PCR para un volumen de reacción de 25 μl .

REACTIVO	VOLUMEN
PCR Master mix (kit)	12.5 μl
Primer Hmt2797L: 5'-GTCCTAAACTACCAAACCTGC-3'	0.5 μl
Primer LeuH: 5'-AAGGGTTGTAGTAGCCCGTAG-3'	0.5 μl
DNA	1 μl
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 μl

También se prepara un tubo blanco (control negativo) con agua en lugar de DNA. Los tubos preparados se agitan perfectamente para homogenizar la solución y se colocan dentro del termociclador previamente programado a: 95°C 2' (precalentamiento); 95°C 30" (desnaturalización), 60 °C 45" (alineamiento), 72 °C 1' (elongación) [35 ciclos]; 72 °C 5'; 4 °C ∞ .

Para la determinación del haplogrupo se amplifica la región hipervariable I (HSV1) con los primers: 15977L: 5'-CCACCTTAGCACCCAAAGC-3' y 16455H: 5'-CGAGGAGAGTAGCACTCTTG-3', y el programa 95° 2' (95° 30"/ 60° 30"/ 72° 1' 30") 35 ciclos / 72° 5'/ 4 °C ∞ .

3.2.5 Electroforesis

i) Preparación del gel de agarosa al 0.7%

1. Cerrar las aperturas laterales del soporte del gel.

2. En un matraz Erlenmeyer pesar 0.35g de agarosa y adicionar 50 ml de TAE 1X.
3. La mezcla es calentada en horno de microondas a potencia baja, hasta que se disuelva completamente.
4. Añadir una gota de bromuro de etidio (BrEt 0.5 μ g/ μ L) y mezclar bien.
5. La mezcla se vierte en el soporte evitando la formación de burbujas, si se forman es preciso removerlas. Colocar los peines antes de verter la mezcla.
6. Dejar solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire.
7. Retirar los peines y colocar el gel en la cámara de electroforesis de modo que los pocillos queden cercanos al cátodo de la cámara; por último se adiciona TAE 1X a la cámara hasta que el gel se encuentre completamente sumergido.

ii) Carga y corrida del gel

1. En un trozo de parafilm situar 3 μ l de colorante (buffer de carga azul/naranja 6X) correspondiente al número de muestras, blanco y marcador de peso molecular.
2. Posteriormente añadir 3 μ l de BrEt diluido (0.01 μ g/ml) a un lado de las gotas de colorante sin que se mezclen.
3. Finalmente colocar 5 μ l de muestra, o blanco, o marcador de peso molecular. Mezclar una a una con los otros componentes, recoger la mezcla utilizando una micropipeta y depositar cuidadosamente en el pocillo correspondiente.
4. Cuando se ha terminado de cargar el gel, 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. La corrida dura hasta que el colorante se visualice cerca del extremo contrario del gel.
6. Para visualizar el DNA se utiliza un fotodocumentador.

3.2.6 RFLP

La digestión con la enzima *Apa I* se realiza de la siguiente manera:

- Colocar el tubo con el amplificado en el termomixer a 30°C.

- Se colocan 5 μl del amplificado en un tubo de 200 μl y se adiciona 2 μl de la enzima *Apa I* además de 1 μl de buffer y 2 μl de H_2O a 30°C.
- Se coloca el tubo en el termomixer a 30°C y se deja incubar durante 4 hrs.
- Al término del tiempo de digestión se prepara un gel de agarosa al 3% para correr la muestra de la misma manera que en los procedimientos anteriores.
- Al igual que en los pasos anteriores, se toma fotografía del gel para visualizar si hay corte de la enzima y por consiguiente se localiza la mutación A3243G. La fotografía se toma utilizando el sistema de fotodocumentación GelDoc.

3.2.7 Purificación

i) Con el kit QIAquick PCR Purification de Qiagen.

1. Adicionar 5 volúmenes del buffer PBI por 1 volumen del producto de PCR y mezclar.
2. Comprobar que el color de la mezcla es amarillo.
3. Pasar la mezcla a una columna QIAquick spin contenida en un tubo colector de 2 ml.
4. Descartar el filtrado y colocar la columna en el mismo tubo.
5. Para lavar, adicionar 0.75 ml de buffer PE en la columna y centrifugar de 30 a 60 segundos.
6. Descartar el filtrado y colocar la columna en el mismo tubo. Centrifugar la columna por 1 minuto más.
7. Pasar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml.
8. Para eluir el DNA, adicionar 50 μl del buffer EB o agua en el centro de la membrana de la columna y centrifugar por 1 minuto.
9. Para analizar el DNA purificado en un gel, adicionar 1 volumen de loading dye por 5 volúmenes del purificado. Mezclar la solución por pipeteo antes de correr el gel.

ii) Con ExoSAP-IT

1. Colocar la solución ExoSAP-IT en hielo mientras se realiza la purificación.
2. Mezclar 5 μl del producto de reacción de PCR con 2 μl de ExoSAP-IT para un volumen combinado de reacción de 7 μl .
3. Incubar a 37°C por 15 minutos para degradar los remanentes de primers y nucleótidos.
4. Incubar a 80°C por 15 minutos para inactivar ExoSAP-IT.
5. El producto de PCR esta listo para usarse en la secuenciación de DNA.

4. RESULTADOS

Además de los 3 pacientes estudiados, algunos familiares por línea materna de los pacientes 1 y 2 proporcionaron muestras de diferentes tejidos, por lo que se consiguió realizar el estudio de 2 familias, mientras que la 3er paciente se ha estudiado por el momento de forma individual. A continuación se presentan los árboles genealógicos de los pacientes 1 y 2:

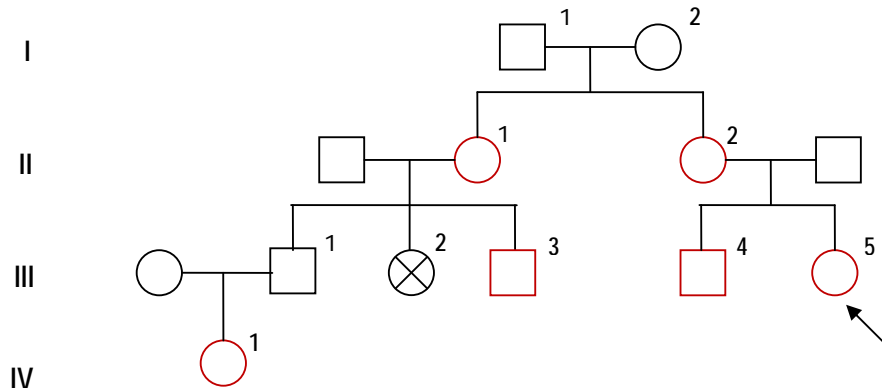


Figura 4.1. Árbol genealógico de la paciente no.1 (III.5) señalada con una flecha.

* Los miembros de la familia que proporcionaron muestras están en contorno rojo.

* El símbolo \otimes se refiere a paciente fallecida por MELAS.

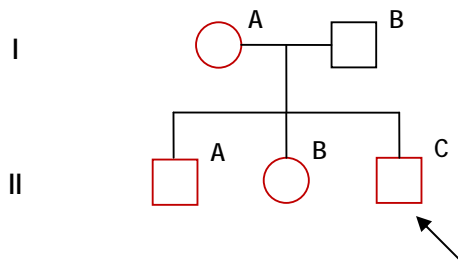


Figura 4.2. Árbol genealógico del paciente 2 (II.C) (señalado con la flecha). Los miembros de la familia que proporcionaron muestras están en contorno rojo.

Muestra	Origen	Concentración de DNA (ng/ul)	Relación 260nm/280nm
III.5	sangre	19	1.69
II.2	sangre	30	1.83
II.1	sangre	49	1.87
III.4	sangre	60	1.81
III.3	sangre	49	1.84
IV.1	sangre	35	1.58
II.2	orina	10	0.62
II.1	orina	6	1.63
III.4	orina	6	1.55
III.3	orina	7	1.46
IV.1	orina	9	1.30
II.2	saliva	30	1.88
II.1	saliva	34	1.78
III.4	saliva	18	1.75
III.3	saliva	31	1.87
IV.1	saliva	19	1.88
II.2	ceja	102	3.08
II.1	ceja	92	3.25
III.4	ceja	39	3.64
III.3	ceja	77	3.53
IV.1	ceja	68	6.49
II.C	músculo	35	1.84
II.B	músculo	51	1.88
I.A	músculo	35	1.76
II.A	músculo	60	1.92
E	músculo	18	1.91

Tabla 4.1. Resultados obtenidos de la cuantificación de DNA por espectrofotometría de los pacientes (en blanco) y familiares (sombreados con diferentes colores) identificados de acuerdo al lugar que ocupan en los árboles genealógicos presentados. La paciente 3 esta referida con la letra E ya que a la fecha no se cuenta con datos de su familia para realizar el árbol genealógico.

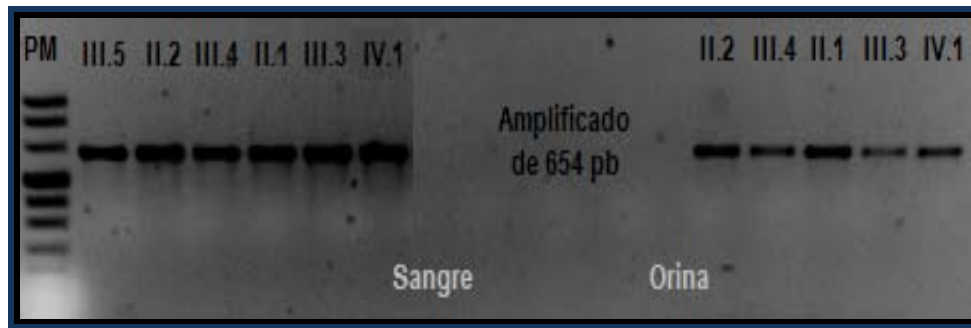


Figura 4.3. Gel de agarosa al 0.7% donde se muestra la amplificado de 654 pb de la paciente III.5 y sus familiares. A la derecha se encuentran los amplificados a partir del DNA extraído de muestras de orina y a la izquierda los que se obtuvieron de sangre.

* De la paciente sólo se obtuvo muestra de sangre.

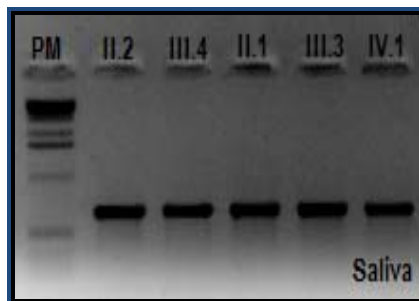


Figura 4.4. Gel de agarosa al 0.7% donde se muestra el amplificado de 654 pb a partir de DNA extraído de saliva de los familiares de la paciente III.5.

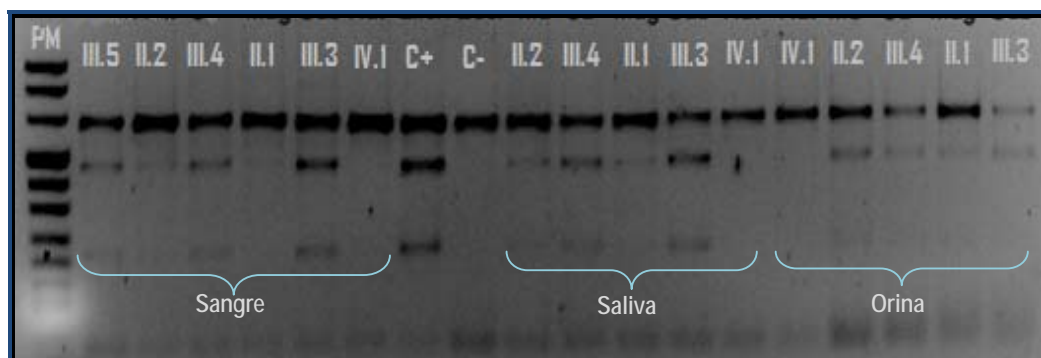


Figura 4.5. Gel de agarosa al 2% donde se muestran los RFLP's realizados con la enzima *Apa I* en los amplificados de 654 pb de la paciente III.5 y sus familiares.

* La mutación A3243G se encontró en las muestras de sangre, saliva y orina, siendo visiblemente menor en orina.



Figura 4.6. Gel de agarosa al 3% donde se muestran los RFLP's realizados con la enzima *Apa I* en los amplificadores de 654 pb del paciente II.C y sus familiares, además de la paciente E.

* Las tres bandas encontradas corresponden al mtDNA no mutado (fragmento de 654pb), mtDNA mutado (450 + 204 pb), resultado de la heteroplasmia que es una característica de una mutación patológica.

Muestra	Origen	Porcentaje de heteroplasmia
III.5	sangre	24
II.2	sangre	< 5
II.1	sangre	< 5
III.4	sangre	12
III.3	sangre	31
IV.1	sangre	0
II.2	orina	8
II.1	orina	9
III.4	orina	< 5
III.3	orina	18
IV.1	orina	0
II.2	saliva	16
II.1	saliva	10
III.4	saliva	28
III.3	saliva	40
IV.1	saliva	0
II.C	músculo	64
II.B	músculo	40
I.A	músculo	< 5
II.A	músculo	0
E	músculo	65

Tabla 4.2. Resultados obtenidos para el cálculo del porcentaje de heteroplasmia en los pacientes (en blanco) y sus familiares.

* De las muestras estudiadas se observa que en músculo fueron mayores los porcentajes de heteroplasmia, y posteriormente en orden descendente: saliva, sangre y orina.

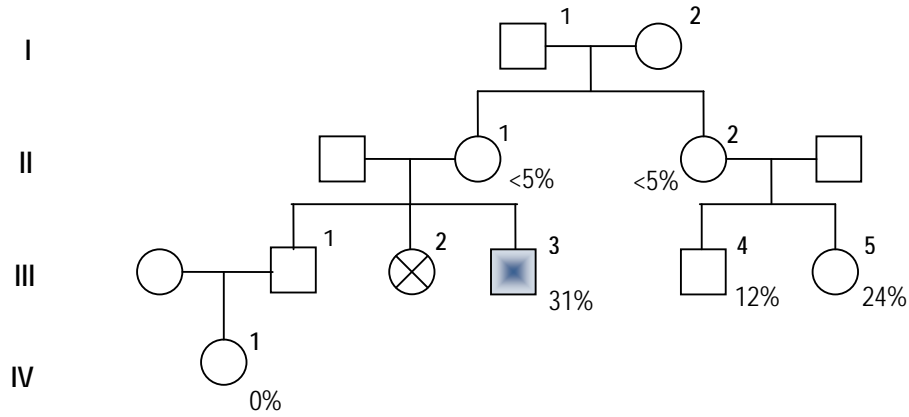


Figura 4.7. Árbol genealógico de la paciente III.5 donde se muestran los porcentajes de heteroplasmia determinados en muestras sanguíneas.

* Los porcentajes encontrados en la mayoría de los familiares son menores al encontrado en la paciente (24%) siendo todos ellos asintomáticos. Sin embargo, el porcentaje encontrado en el niño III.3 es mayor al de la paciente, lo cual es un fuerte indicativo de que desarrollará la patología en algún momento, por ello está resaltado en azul.

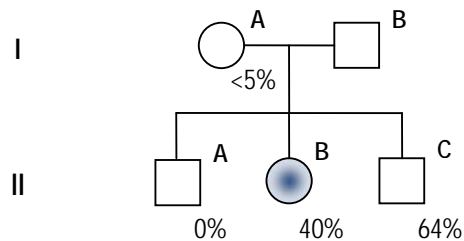


Figura 4.8. Árbol genealógico del paciente II.C donde se observan los porcentajes de heteroplasmia de la mutación A3243G en músculo.

* El 64% de heteroplasmia en el paciente determinó la aparición de la sintomatología a menor edad que en su hermana quien presenta un porcentaje menor.

Paciente	Polimorfismos	Haplogrupo
III.5	Del. 9pb	B
II.C	C16290T, G16319A, T16362C	A
E	Del. 9pb	B

Tabla 4.3. Haplogrupos determinados mediante secuenciación parcial de las muestras de los pacientes estudiados.

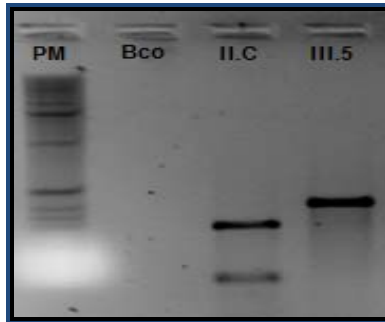


Figura 4.9. Gel de agarosa al 2% que muestra el corte con la enzima *Hae III*, que confirma el haplogrupo A del paciente II.C.

* El corte de la enzima que se realizó en la muestra del paciente II.C indica que la mutación es homoplásmica lo que la convierte en polimorfismo que esta identificado como parámetro para la determinación del haplogrupo A.



Figura 4.10. Comparación de las secuencias de los pacientes III.5 (12L_12F) y E (12E_12F) con la secuencia de referencia mediante el programa Sequencher donde se observa la delección de 9 pb en la posición 8281 a 8290 característica del haplogrupo B.

5. DISCUSIÓN

Las patologías mitocondriales constituyen un problema tanto para su diagnóstico como para su tratamiento debido a su variedad fenotípica y genotípica. La complejidad de este tipo de padecimientos y sus consecuencias no sólo en el paciente sino también en la familia del mismo, han estado en continuo estudio a fin lograr a comprender cuál o cuáles son los mecanismos de patogénesis que se desarrollan de acuerdo cada una de las mutaciones que se presentan y que conllevan a las diferentes manifestaciones clínicas de los síndromes mitocondriales. En nuestro país hay muy poca información acerca del tema, lo que resulta difícil el tratar de establecer la frecuencia o prevalencia de este tipo de padecimientos en la población mexicana, y más aún en específico el síndrome de MELAS, que es la enfermedad asociada en un 80% de los casos, a la mutación A3243G estudiada en este trabajo. El diagnóstico de las enfermedades mitocondriales en México, sólo se ha llevado a cabo por los médicos basándose en la sintomatología multisistémica, resultados de laboratorio como son los valores de lactato, piruvato y lactato/piruvato en sangre y líquido cefalorraquídeo, además de tomografías computarizadas donde observan los infartos cerebrales que sufren los pacientes. En este trabajo se buscó sustentar la sospecha del médico ante la presencia de una mitocondriopatía como MELAS a nivel molecular, en tres pacientes mexicanos (III.5, II.C y E), los cuales presentaron afectaciones multisistémicas como puede observarse en el resumen de historias clínicas al principio de materiales y métodos del presente trabajo. Después de los resultados obtenidos de la cuantificación de DNA (Tabla 4.1) se procedió a la amplificación del fragmento de 654 pb tanto de pacientes como familiares de los mismos para posteriormente realizar el RFLP (Figuras 4.5 y 4.6) que permitió determinar el porcentaje de heteroplasmia de la mutación A3243G en cada uno (Tabla 4.2).

Como puede observarse en la Figura 4.5 que corresponde a los RFLPs de las muestras de la paciente III.5 y su familia por línea materna, la mutación A3243G se encontró en todos los tejidos estudiados en porcentajes variables siendo más altos en las muestras de saliva mientras que son menores en orina, lo cual coincide con lo que ya ha sido reportado siendo —la carga de la mutación usualmente más alta en la mucosa bucal que en los linfocitos en sangre— (*Finsterer, 2007; Shanske et al., 2004; Narbonne et al., 2001*). Cabe mencionar que las muestras de DNA extraído de la raíz de ceja, no amplificaron lo cual se debe a que —teóricamente, una proporción de 0.6 para la relación 260 nm/A280 nm corresponde a la presencia única de proteínas; y una proporción entre 1.8–2.0, corresponde a un 90%-100% de pureza de los ácidos nucleicos; mientras que, los valores mayores a 2.0 podrían indicar excesos de RNA— (*Del Valle et al., 2004; Schultz et al., 1994*); y como se observa en la Tabla 4.1, los valores obtenidos en la cuantificación de dichas muestras son mayores a 3

sugiriendo la presencia de RNA más que de DNA lo cual pudo imposibilitar la amplificación a partir de estas muestras.

Aunque de la paciente III.5 sólo se obtuvo muestra sanguínea, el porcentaje calculado en ésta (de 24%) es menor que el encontrado en su primo III.3 en el mismo tejido (31%, ver Tabla 4.2). Este resultado es importante para la familia ya que al momento tanto de la toma de muestra como del análisis, el niño no presentó ninguna sintomatología, pero teniendo en cuenta que su edad es menor que la paciente III.5 e incluso que su hermana III.2, se puede saber que él presentará también la enfermedad, por ello es que en el árbol de la familia (Figura 4.6) se encuentra resaltado con color azul indicando dicho riesgo. Los resultados obtenidos para el niño III.3 son confirmados tanto en saliva como en orina donde los porcentajes de heteroplasmia de 40% y 18% respectivamente, siendo considerablemente altos en comparación con los porcentajes obtenidos en los mismos tejidos de los demás miembros de la familia (Tabla 4.2). Las únicas muestras donde no se encontró la mutación en ningún porcentaje fueron las de la niña IV.1, quien es hija del primo mayor de la paciente III.5 lo cual se explica por el modo de herencia materna del genoma mitocondrial.

En cuanto al paciente II.C y sus familiares (Figura 4.2), sus muestras fueron de músculo encontrándose porcentajes más altos en relación a los tejidos anteriormente analizados (ver Tabla 4.2). Desde la figura 6 que corresponde a los RFLP's de ésta familia se puede observar que en el paciente II.C hay una carga mayor de la mutación ya que el fragmento normal (sin la mutación) sin corte es de mucho menor intensidad en comparación con lo observado en su madre (I.A) y hermana (II.B) donde claramente puede observarse que el porcentaje de heteroplasmia es menor que en el paciente lo cual se confirma con el calculo de dicho valor siendo de 60% para él, mientras que en su madre y hermana es de <5 y 40% respectivamente. El que el niño presentara los síntomas de la patología mitocondrial a una edad menor a la de su hermana puede deberse al porcentaje de heteroplasmia que presenta y, aunque ambos ya padecen la sintomatología de la enfermedad, al parecer, el tener un 40% de la mutación ha favorecido o retardado la aparición de los síntomas en la hermana quien en el árbol familiar (Figura 4.8) se resalta con azul indicando que se encuentra afectada al igual que su hermano II.C. De manera interesante, el hermano II.A no presenta la mutación evidenciándose aquí el efecto de cuello de botella que se presentó en la madre al momento de la maduración del oocito que, se ha encontrado, —esta asociada con la replicación rápida de las moléculas de mtDNA provocando un cambio aleatorio de la carga de mtDNA mutado entre las generaciones y es responsable de los niveles variables de éste en la descendencia afectada de madres con la mutación patogénica mitocondrial— (Taylor et al., 2005).

A la paciente E, cuya muestra fue de músculo, se le encontró la mutación A3243G en un porcentaje de 65, el cual es muy similar al paciente II.C como se observa en el RFLP (Figura 4.6). De esta paciente no se tienen muestras de sus familiares por lo que no se pudo hacer un estudio similar al de los pacientes anteriores.

La determinación del haplogrupo mitocondrial de los pacientes resulta importante ya que, como ha sido reportado por Pierron et al., 2008, aparentemente los fondos genéticos mitocondriales no tienen impacto en el índice de mutación en la posición 3243, pero hay una relación entre el haplogrupo (especialmente el J) y la expresión de la mutación, confirmándose la susceptibilidad de este haplogrupo en la expresión de las patologías de origen mitocondrial, y si dicho haplogrupo aparenta estar asociado a la prevalencia de la mutación A3243G, es muy probable que otros haplogrupos pudieran también estar asociados. En este sentido, en dos estudios se ha encontrado —una frecuencia muy alta de la delección de 9 pb en pacientes Taiwaneses con MELAS (Liu et al., 2005; Pierron et al., 2008); y una sobrerrepresentación del polimorfismo T16189C en pacientes con la mutación A3243G (Marchington et al., 1996; Pierron et al., 2008). Siendo ambos, marcadores que definen el haplogrupo mitocondrial B— (Pierron et al., 2008). Como se observa en la Tabla 4.3, los pacientes III.5 y E pertenecen al haplogrupo B por la delección de 9 pb observada en la secuenciación parcial (Figura 4.8), mientras que el paciente II.C pertenece al haplogrupo A confirmada por RFLP con enzima *Hae III* (Figura 4.7). En base a lo anterior se buscó recopilar la información disponible hasta el momento en cuanto a pacientes con mitocondriopatías y haplogrupos nativo-americanos en México, encontrándose lo siguiente:

Patología mitocondrial	Haplogrupo	Referencia
MELAS	B2	Delgado et al., 2007
MELAS	B	Presente trabajo
MELAS	B	Presente trabajo
MELAS	A	Presente trabajo

Como se observa en el cuadro anterior, de los estudios realizados hasta el momento la mayoría son pacientes del haplogrupo B, lo cual podría indicar la asociación a la prevalencia de la mutación A3243G reportada en Taiwán; siendo está una tendencia que debe seguir estudiándose en un número considerable de muestras a fin de comprender mejor este tipo de padecimientos y si en realidad los haplogrupos pueden ser una parte del procedimiento de diagnóstico para las enfermedades mitocondriales que permitan saber cuales son los mecanismos de modulación que influyen en la expresión fenotípica de las mismas en determinadas poblaciones.

6. CONCLUSIONES

- ✓ La amplificación del gen que codifica para el tRNA^{Leu} en el DNA mitocondrial permitió evidenciar la presencia de la mutación A3243G por medio de PCR-RFLP en los tres pacientes estudiados con probable enfermedad mitocondrial de MELAS; además se encontró que dos de ellos pertenecen al haplogrupo mitocondrial B, mientras que el tercero pertenece al haplogrupo A.
- ✓ Se logró extraer el DNA tanto en pacientes como familiares a partir de muestras biológicas como sangre, biopsia de músculo, saliva, ceja y orina mediante kits comerciales.
- ✓ La concentración de DNA que resultó adecuada para que se llevara a cabo la reacción en cadena de la polimerasa va desde 18 ng/ul hasta 60 ng/ul y una pureza de 1.8 a 2.
- ✓ La amplificación del fragmento de 654 pb en el que se buscó la mutación A3243G en el DNA mitocondrial, se realizó por PCR lográndose en todos los casos excepto en las muestras provenientes de ceja donde se encontraron cantidades mayores de RNA que de DNA imposibilitando la amplificación.
- ✓ Se encontró la presencia de la mutación A3243G en los amplificados de 654 pb de cada paciente mediante la técnica de RFLP complementando así el diagnóstico y confirmando la sospecha del médico. El estudio en los familiares por línea materna permitió identificar a los miembros de la familia con riesgo potencial de desarrollar fenotípicamente la enfermedad mitocondrial.
- ✓ El porcentaje de heteroplasmia de la mutación A3243G es inversamente proporcional a la edad y severidad con que se manifiesta la enfermedad mitocondrial de MELAS.
- ✓ Para determinar si el haplogrupo mitocondrial B está relacionado con la prevalencia de la mutación A3243G presente en los pacientes de MELAS, es necesario estudiar un número mayor de muestras, ya que aquí sólo se encontró una tendencia en vale la pena profundizar en busca de entender mejor este tipo de padecimientos en la población mexicana.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Andreu A. L. y Gonzalo-Sanz R. "Las enfermedades mitocondriales: una clasificación para el siglo XXI". *Neurología.*, 2004; 19(1):15-22.
- 2) Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, et al. "Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA". *N. Engl. J. Med.*, 1999; 341:1037-44.
- 3) Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, et al. "Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy". *Am. J. Hum. Genet.*, 2003; 72:101-14.
- 4) Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A, Gan YY, Hodge JA, Hassan K, Chen KH & Wallace DC. "Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations". *Genetics.*, 1992a; 130:139-152.
- 5) Bataillard M, Chatzoglou E, Rumbach L, Sternberg D, Tournade A, Laforet P, Jardel C, Maisonobe T, and Lombes A. "Atypical MELAS syndrome associated with a new mitochondrial tRNA glutamine point mutation". *Neurology.*, 2001; 56:405-407.
- 6) Berg J, Tymoczko J, Stryer L. 2003. "Bioquímica". 5a ed. Editorial Reverte, S.A. Barcelona, España. Pp. 146-150.
- 7) Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, et al. "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency". *Nat. Genet.*, 1995; 11:144-9.
- 8) Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA and Holt IJ. "Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone". *J. Biol. Chem.*, 2003; 278:50961-69.
- 9) Brown TA and Clayton DA. "Genesis and wanderings: origins and migrations in asymmetrically replicating mitochondrial DNA". *Cell Cycle.*, 2006; 5:917-21.
- 10) Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. "Mitochondrial DNA and human evolution". *Nature.*, 1987; 325:31-36.
- 11) Carelli V. 2002. "Leber's hereditary optic neuropathy". En Schapira AHV, DiMauro S, editors. *Mitochondrial disorders in neurology*. 2ª edición. Boston: Butterworth-Heinemann., Pp:115-42.
- 12) Campos Y, Pineda M, García S, Montoya J. y Antoni LA. 2006. "Protocolo de diagnóstico de enfermedades mitocondriales". Centro de investigación. Madrid, España.
- 13) Chomyn A, Martinuzzi A, Moneda M, et al. "MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no

- change in levels of upstream and downstream mature transcripts". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992; 89:4221-5.
- 14) Clayton DA. "Replication of animal mitochondrial DNA". *Cell.*, 1982; 28:693-705.
- 15) Coelho-Miranda L, Playán A, et al. "Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS) en edad pediátrica con la mutación A3243G en el gen del RNAt Leu del ADN mitocondrial". *Rev. Neurol.*, 2000; 31(9): 804-811.
- 16) Corona P, Antozzi C, Carrara F, DIncerti L, Lamantea E, Tiranti V and Zeviani M. "Novel mtDNA mutation in the ND5 subunit of complex I in two MELAS patients". *Ann. Neurol.*, 2001; 49: 106-110.
- 17) De Coo I, Sistermans E, deWijs I, CatsmanBerrevoets C, Busch H, Scholte H, deKlerk J, vanOost B, and Smeets H. "A mitochondrial tRNA (Val) gene mutation (G1642A) in a patient with mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes". *Neurology.*, 1998; 50: 293-295
- 18) Delgado-Sánchez R, Zárate Moysén A, Monsalvo A, Herrero MD, Ruiz-Pesini E, López-Pérez MJ, Montoya J, Montiel-Sosa JF. "Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS) con la mutación A3243G en el gen del ARNt Leu(UUR) del ADNmt en haplogrupo B2 nativoamericano". *Rev. Neurol.*, 2007; 44(1):18-22.
- 19) Del Valle C, Rodríguez A. y Espinoza M. "Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos". *Rev. Biol. Trop.*, 2004; 52 (3): 717-725.
- 20) DeVivo DC. "Mitochondrial DNA defects: clinical features". In: DiMauro S, Wallace DC, eds. *Mitochondrial DNA in human pathology.*, 1992:39-52.
- 21) DiMauro S, y Davidzon G. "Mitochondrial DNA and disease". *Annals of Medicine.*, 2005;37(3): 222 – 232.
- 22) DiMauro S, Hirano M, Kaufmann P, Tanji K, Sano M, Shungu DC, et al. "Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers". En: Fahn S, Frucht SJ, editors. *Myoclonus and paroxysmal dyskinesia.* Phyladelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:217-29.
- 23) DiMauro S, Moraes C. "Mitochondrial encephalomyopathies". *Arch. Neurol.*, 1993; 30:1197-1208.
- 24) DiMauro S. y Mancuso M. "Mitochondrial diseases: therapeutic approaches". *Biosci. Rep.*, 2007; 27:125-137.
- 25) Enriquez JA, Fernandez SP, Garrido PN, Lopez-Perez MJ, Perez MA and Montoya J. "Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone". *Mol. Cell Biol.*, 1999; 19:657-70.

- 26) Enriquez JA, Fernandezsilva P, Perezmatos A, Lopezperez MJ and Montoya J. "The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP". *Eur. J. Biochem.*, 1996; 237:601-10.
- 27) Finnilä S. "Detection of mutations in patients with occipital stroke. In: phylogenetic analysis of mitochondrial DNA". Oulu: Oulu University Library. 2000. p.1-17.
- 28) Finsterer J. "Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA^{Leu}(UUR) mutation". *Acta Neurol. Scand.*, 2007; 116:1-14.
- 29) Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fournier P, Stewart IA & Maw M. "Mitochondrial tRNA mutation associated with nonsyndromic deafness". *Am. J. Otolaryngol.*, 1995; 16:403-408.
- 30) Fisher RP and Clayton DA. "Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1". *Mol. Cell Biol.*, 1988; 8:3496-3509.
- 31) Gelfand R and Attardi G. "Synthesis and turnover of mitochondrial ribonucleic acid in HeLa cells: ribosomal and messenger ribonucleic acid species are metabolically unstable". *Mol. Cell Biol.*, 1981; 1:497-511.
- 32) Goto Y.-i, Nonaka I and Horai S. "A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathies". *Nature.*, 1990a; 348: 651-653
- 33) Goto Y.-i, Nonaka I and Horai S. "A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem. Biophys. Acta.*, 1991; 1097: 238-240
- 34) Goto YI, Tsugane K, Tanabe Y, Nonaka I and Horai S. "A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS)". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 202: 1624-30
- 35) Gray Mw. "Origin and evolution of organelle genomes". *Curr. Op. Genet. & Devel.*, 1993;3:884-90.
- 36) Guy J, Qi XP, Palloti F, Schon EA, Manfredi G, Carelli V, Martinuzzi A, Hauswirth WW, and Lewin AS. "Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy". *Ann. Neurol.*, 2002; 52:534-42.
- 37) Hanna MG, Nelson IP, MorganHughes JA, and Wood NW. "MELAS: a new disease associated mitochondrial DNA mutation and evidence for further genetic heterogeneity". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 1998; 65:512-17.
- 38) Helm M, Florentz C, Chomyn A, Attardi G. "Search for differences in posttranscriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu}(UUR)". *Nucleic Acids Research.*, 1999; 27:756-63.

- 39) Holt IJ, Lorimer HE and Jacobs HT. "Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA". *Cell.*, 2000; 100:515-524.
- 40) Hsieh R, Li JY, Pang CY, and Wei YH. "A novel mutation in the mitochondrial 16S rRNA gene in a patient with MELAS syndrome, diabetes mellitus hyperthyroidism and cardiomyopathy" *J. Biomed. Sci.*, 2001; 8: 328-335
- 41) Jacobs HT and Holt IJ. "The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don't". *Hum. Mol. Genet.*, 2000; 9:463-5.
- 42) Kasamatsu H and Vinograd J. "Replication of circular DNA in eukaryotic cells". *Ann. Rev. Biochem.* 1974; 43:695-719.
- 43) Kaukoren J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, et al. "Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance". *Science.*, 2000; 289:782-5.
- 44) Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, Suzuki T. "Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease". *PNAS.*, 2004; 101(42):15070-5.
- 45) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, et al. "A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 173:816-882.
- 46) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S. "Respiration-deficient Cells Are Caused by a Single Point Mutation in the Mitochondrial tRNA-Leu(UUR) Gene in Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes (MELAS)". *Am. J. Hum. Genet.*, 1991; 49:590-599.
- 47) Lehtonen M. 2002. "Mitochondrial DNA sequence variation in patients with sensorineural hearing impairment and in the Finnish population". Academic dissertation. University of Oulu. Finland.
- 48) Liolitsa D, Rahman S, Benton S, Carr LJ and Hanna MG. "Is the mitochondrial complex IND5 gene a hot-spot for MELAS causing mutations?". *Ann. Neurol.*, 2003; 53: 128-132.
- 49) Liu CS, Cheng WL, Chen YY, Ma YS, Pang CY, Wei YH. "High prevalence of the COII/tRNA(Lys) intergenic 9-bp deletion in mitochondrial DNA of Taiwanese patients with MELAS or MERRF syndrome". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005; 1042:82-87.
- 50) López E. 2007. "Defectos en el DNA mitochondrial asociados a enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa". Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
- 51) Luque J y Herráez A. 2001. "Biología molecular e ingeniería genética". Ediciones Harcourt. Madrid, España.

- 52) Mancuso M, Salviati L, Sacconi S, Otaegui D, Camano P, Marina A, et al. "Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA". *Neurology.*, 2002; 59:1197-202.
- 53) Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, et al. "The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA". *Nat. Genet.*, 2001; 29:337-41. [Erratum, *Nat. Genet.* 2001;29:491.]
- 54) Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, Sadlock JE, Kwong JQ, Guy J, and Schon EA. "Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus". *Nat. Genet.*, 2002; 30:394-99.
- 55) Manfredi G, Schon EA, Moraes CT, Bonilla E, Berry GT, Sladky JT, and DiMauro S. "A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene". *Neuromuscular Disord.*, 1995; 5: 391-398
- 56) Marchington DR, Poulton J, Sellar A, Holt IJ. "Do sequence variants in the major non-coding region of the mitochondrial genome influence mitochondrial mutations associated with disease?". *Hum. Mol. Genet.*, 1996; 5(4):473-479.
- 57) Medina-Crespo V, Vázquez-Memije ME, Vázquez-Acevedo M, Vela-Amieva M, Perez-Andrade ME, González-Halphen D. "Bases para el diagnóstico de las citopatías mitocondriales. Antecedentes históricos, bases genéticas y bioquímicas (I de IV partes)". *Acta Pediatr. Mex.*, 2004; 25(4):244-56.
- 58) Montiel SF, Ruiz PE, Enríquez JA, Marcuello A, Díez SC, Montoya J, Wallace DC, López PM. "Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages". *Gene.*, 2006; 368:21-27.
- 59) Montoya J, Gaines GL and Attardi G. "The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units". *Cell.*, 1983; 34: 151-9.
- 60) Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Jansen C, Hirano M, Rao N, Lovelace RE, Rowland LP, Schon EA, and DiMauro S. "Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis- is the transfer RNA(Leu(UUR)) gene an etiologic hot spot?". *J. Clin. Invest.*, 1993; 92:2906-15
- 61) Morten KJ, Cooper JM, Brown GK, Lake BD, Pike D, and Poulton J. "A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy". *Hum. Mol. Genet.*, 1993; 2: 2081-87
- 62) Musumeci O, Naini A, Slonim AE, Skavin, Hadjigeorgiou GL, Krawiecki N, et al. "Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency". *Neurology.*, 2001; 56:849-55.

- 63) Narbonne H, Perucca-Lostanlen D, Desnuelle C, Vialettes B, Saunieres A, Paquis-Flucklinger V. "Searching for A3243G mitochondrial DNA mutation in buccal mucosa in order to improve the screening of patients with mitochondrial diabetes". *Eur. J. Endocrinol.*, 2001; 145:541-2.
- 64) Nishino J, Spinazzola A, Papadimitriou A, Hammans S, Steiner I, Hahn CD et al. "Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations". *Ann. Neurol.*, 2000; 289:782-5.
- 65) Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. "Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder". *Science.*, 1999; 283:689-92.
- 66) Ostronoff LK, Izquierdo JM and Cuezva JM. "mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995; 217:1094-98.
- 67) Ostronoff KL, Izquierdo JM, Enriquez JA, Montoya J, and Cuezva JM. "Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation". *Biochem. J.*, 1996; 316:183-191.
- 68) Parra MV, Fermín P, Cornejo JW, Carrisoza J, Ruíz A, y Bedoya G. "Genética de la citopatía mitocondrial MELAS (Encefalopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Apoplejía)". *Medicas UIS.*, 2006; 19:51-5
- 69) Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. "Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome". *Ann. Neurol.*, 1984; 16:481-8.
- 70) Peñaloza R, Arenas D, Cerda R, Buentello L, González G, Torres J, Álvarez B, Mendoza I, Flores M, Sandoval L, Loeza F, Ramos I, Muñoz L, Salamanca F. "Characterization of mtDNA Haplogroups en 14 Mexican Indigenous Populations". *Human Biology.*, 2007; 79(3):313-320.
- 71) Pierce BA. 2006. "Genetics a conceptual approach". 2a ed. Editorial W.H.Freeman and Company. USA. Pp.530-2,542-3,557-60.
- 72) Pierron D, Rocher C, Amati-Bonneau P, Reynier P, Martin-Négrier M, Allouche S, Batandier C, Mousson B, Godinot C, Rotig A, Feldmann D, Bellanne-Chantelot C, Arveiler B, Pennarun E, Rossignol R, Crouzet M, Murail P, Thoraval D. and Letellier T. "New evidence of a mitochondrial genetic background paradox: impact of the J haplogroup on the A3243G mutation". *BMC Medical Genetics.*, 2008; 9:41.
- 73) Pineda M, and Artuch R. 2001. "Tratamiento en las enfermedades mitocondriales. En Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias". E. Ergon, ed., pp. 411-19.

- 74) Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Amos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M & Fischel-Ghodsian N. "Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness". *Nat Genet.*, 1993; 4:289-294.
- 75) Prieto-Martin A, Montoya J, and Martinez-Azorin F. "New DNA-binding activity of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF)". *J. Biochem. (Tokyo)*, 2004a; 136:825-30.
- 76) Prieto-Martin A, Montoya J, and Martinez-Azorin F. "Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA". *Nucleic Acids Res.*, 2004b; 32:2059-68.
- 77) Ravn K, Wibrand F, Hansen FJ, Horn N, Rosenberg T, and Schwartz M. "An mtDNA mutation, 14453 G-> A, in the NADH dehydrogenase subunit 6 associated with severe MELAS syndrome". *Eur. J. Human Genet.*, 2001; 9: 805-809.
- 78) Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T, Villems R, Thomas M, Rychkov S, Rychkov O, Rychkov Y, Gölge M, Dimitrov D, Hill E, Bradley D, Romano V, Cali F, Vona G, Demaine A, Papiha S, Triantaphyllidis C, Stefanescu G, Hatina J, Belledi M, Di Rienzo A, Novelletto A, Oppenheim A, Nørby S, Santachiara-Benerecetti S, Scozzari R, Torroni A, Bandelt H.-J. "Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool". *American Journal of Human Genetics.*, 2000; 67:1251-1276.
- 79) Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ y Sykes BC. "Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe". *Ann. Hum. Genet.*, 1998; 62:241-260.
- 80) Ruiz PE, López GE, Dahmani Y, Herrero MD, Solano A, Díez SC, López PM, Montoya J. "Enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial humano". *Rev. Neurol.*, 2006; 43 (7): 416-424.
- 81) Ruiz S JL, García GU, Ochoa MR, Corona MV, Gutiérrez AG, León JC, Barrinagarrementería F. "Citopatías mitocondriales, imágenes y revisión". *Rev. Mex. Neuroci.*, 2002; 3(4):191-204.
- 82) Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. "Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy". *Nat. Genet.*, 2001; 29:342-4.
- 83) Santorelli, FM, Tanji K, Kulkova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP and DiMauro S. "Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997a; 238: 326-328.
- 84) Sato W., Hayasaka K., Schoji Y., Takahashi T., Takada G., Saito M., Fukawa O. And Wachi E. "A mitochondrial tRNA (Leu(UUR)) mutation at 3256 associated with mitochondrial myopathy,

- encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS)". *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1994; 33: 1055-61.
- 85) Schultz DJ, Craig R, Cox-Foster DL, Mumma RO and Medford JI. "RNA isolation from recalcitrant plant tissue". *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1994; 12: 310-316.
- 86) Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM & Wallace DC. "Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they are derived from four primary maternal lineages". *Am. J. Hum. Genet.*, 1990; 46:613-623.
- 87) Schurr TG. "Mitochondrial DNA and the peopling of the new world". *National Academic of Sciences, USA.*, 2000; 91:1158-62.
- 88) Shanske S, Pancrudo J, Kaufmann P et al. "Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: implications for diagnosis". *Am. J. Med. Genet.*, 2004; 130:134-7.
- 89) Shoubridge EA. "Cytochrome c oxidase deficiency". *Am. J. Med. Genet.*, 2001; 106:46-52.
- 90) Shoubridge EA. "Nuclear gene defects in respiratory chain disorders". *Semin. Neurol.*, 2001; 21:261-7.
- 91) Solano A, Playán A, López P MJ, Montoya J. "Genetic diseases of the mitochondrial DNA". *Salud Pública.*, 2001; 43(2):151-161.
- 92) Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria". *Nat Genet.*, 2001;28:223-31 [Erratum, *Nat Genet* 2001;29:100]
- 93) Strachan T y Read A. 2004. "Genética Humana". 3ª edición. Ed. McGraw Hill. D.F. México.
- 94) Taivassalo T, Fu K, Johns T, Arnold D, Karpati G, and Shoubridge EA. "Gene shifting: a novel therapy for mitochondrial myopathy". *Hum. Mol. Genet.*, 1999; 8:1047-52.
- 95) Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, et al. "Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria". *J. Biomed. Sci.*, 2002; 9:534-41.
- 96) Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JT, Wherret J, Smith C, et al. "Heteroplasmic mtDNA mutation (T to G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high". *Am. J. Hum. Genet.*, 1992; 50:852-8.
- 97) Taylor RW and Turnbull DM. "Mitochondrial DNA mutations in human disease". *Nature Reviews Genetics.*, 2005; 6:389-402.
- 98) Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. "Respiratory chain complex I deficiency". *Am. J. Med. Genet.*, 2001; 106:37-45.

- 99) Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML & Wallace DC. "Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations". *Genetics.*, 1996; 144:1835-1850.
- 100) Torroni A & Wallace DC. "Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance". *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1994; 26:261-271.
- 101) Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. "Mutation of POLG is associated with progressive external opthalmoplegia characterized by mtDNA deletions". *Nat. Genet.*, 2001;28:211-2.
- 102) Wallace DC. "Diseases of the mitochondrial DNA". *Annu. Rev. Biochem.*, 1992; 61:1175-1212.
- 103) Wallace DC, Lott MT. (2003). *tRNA^{Leu}*. Recuperado el 14 de mayo, 2009 del sitio URL <http://www.mitomap.org>
- 104) Wallace DC, Lott MT. (2003). *WorldMigrations*. Recuperado el 14 de mayo, 2009 del sitio URL <http://www.mitomap.org>
- 105) Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. 2006. "Biología molecular del gen". 5a edición. Editorial medica panamericana. Madrid, España. Pp: 509.
- 106) Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S, Watanabe K. "Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes". *J. Biol. Chem.*, 2000; 275:4251-7.
- 107) Zeviani M. "The expanding spectrum of nuclear gene mutations in mitochondrial disorders". *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2001; 12:407-16.