



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“Análisis de la región del ARNr 12s del ADN mitocondrial humano mediante Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante en individuos sanos o con tratamiento de aminoglicósidos”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA:  
**AURORA ANGÉLICA CASTAÑEDA ARROYO**

TUTOR:  
**DRA. GRACIELA MEZA RUÍZ**

**MÉXICO D, F. 2011**

**Facultad de Medicina**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Reconocimientos**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Otoneurobioquímica de la División de Neurociencias, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Doctora Graciela Meza Ruíz.

A la Dra. Nadia Magali Torres Ruíz por su Asesoría Técnica durante el desarrollo de esta Tesis.

Proyecto apoyado por CONACYT no. 40516. Convocatoria 2008. Apoyo para investigadores nacionales para el fortalecimiento de actividades de tutoría y asesoría de estudiantes de nivel licenciatura.

México, Distrito Federal. Julio de 2011.

## **Agradecimientos**

A Dios mi Padre, y a Jesucristo mi Salvador, quien por su profundo e incambiable amor se hizo presente en mi vida, y me ha redimido por su sangre. Quien me amó desde el principio, y en mi vacío me ha dado vida nueva. A mi buen pastor, quien me guía por sendas de paz y me hace descansar en pastos delicados. Porque sin Él, nada de lo que ha sido hecho fue hecho.

A mis padres: Alejandro Castañeda y Evangelina Arroyo. Gracias por amarme de muchas maneras. Gracias por mantener siempre un hogar donde podemos llegar y descansar. Porque no sólo han dado conocimiento, sino educación a través del ejemplo de vida. Que por amor han sacrificado su vida para que yo pueda ser levantada.

A mis hermanos. Ale y Bere, por compartir tantos momentos juntos, por su apoyo y paciencia en todo momento. Por ser mis amigos desde el principio, y hasta el final de nuestras vidas.

A mis abuelitos, TODOS mis tíos, primos, sobrinos. Por enseñarme la colaboración, el amor fraternal, y que en medio de este siglo aún puede haber grandes familias. A mis tíos: Víctor, Chavo, Sergio, Marce, Toño, Javier, Martín, Arturo, Juan. A mis tías: Graciela, Lourdes, Beatriz, Virginia, Laura, Elia, Claudia

A Lizzette por mostrarme ejemplo de amor a Dios a través de la obediencia, introducirme en la palabra de Dios y por presentarme a mi buen pastor Jesús. A M. David y Esther Hong mis abuelitos espirituales, M. Abraham y Sara Hwang; por su amor a Dios, su sacrificio y amor constante en oración para México. Por amarnos antes que a su propia nación y que a su propia vida. A mis hermanos en Cristo, por su amor, amistad, y lucha de fe. Por enseñarme la verdadera amistad. Por su ejemplo de vida en Cristo, su apoyo, y su repreensión cuando ha sido necesario. Jazmín e Irazú, las tres amigas de Daniel. A los miembros de Sión, y a los chicos de Alabanza: Pablo, David, Elí, Gerardo, Víctor, Kitzia, Natalia, Alejandro.

A la Dra. Graciela Meza por su vida, por aceptarme en su trabajo, su paciencia, y todo lo que he podido aprender a través de ella; aún más que el conocimiento académico. Gracias por todo.

A la Dra. Nadia Torres por su vida, su tiempo, su amistad, por guiarme a través de todo este trabajo, y alentarme a través de su propia lucha a ser esforzada y a depender de Dios en oración. A la Sra. Cecilia Escalona también por su vida, por su compañía, y todo su apoyo en el laboratorio.

A mis anteriores tutores: Dra. Martha Robles, Dra. Bertha Espinosa y Dra. Bertha González. Gracias por guiarme en mis primeros pasos en la ciencia.

A mis amigos: Emmanuel, Raúl, Layla, Alfredo, David, y todos los que han sido parte de mi vida y de mi formación.




LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA  
COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS**  
DIRECTOR  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
PRESENTE.

Por este conducto le informamos que la tesis titulada “Análisis de la región del ARNr 12S del ADN mitocondrial humano mediante Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante en individuos sanos o con tratamiento de aminoglicósidos.” que presenta la alumna **AURORA ANGÉLICA CASTAÑEDA ARROYO** con número de cuenta **406039947** cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

  
Dr. Luis Padilla Noriega

  
Dra. Graciela Meza Ruíz

  
Dra. Martha Robles Flores

  
Dr. Emilio Rojas del Castillo

  
Dra. Xóchitl Pérez Martínez

## Resumen

En México, la sordera congénita afecta a 2/1000 recién nacidos y puede tener diferentes orígenes y sintomatología. Uno de los fenómenos más interesantes es la sordera neurosensorial no sindrómica de origen genético. Ésta se debe a mutaciones en el ADN presentes en todas las células del organismo, pero el único síntoma es la deficiencia auditiva. Alrededor del 5% de los casos reportados se deben a mutaciones en los genes del ADN mitocondrial. De ellos, dos se han implicado en el desarrollo de esta patología: el del ARN de transferencia de la serina (UCN) y el del ARN ribosomal de la subunidad pequeña (12S). Ambos son elementos muy importantes para la traducción de proteínas en la mitocondria, y por tanto para la supervivencia de las células del oído interno.

Se han reportado algunas mutaciones puntuales en el gen del ARN ribosomal 12S mitocondrial en pacientes con diferentes grados de deficiencia auditiva esporádica o como resultado del tratamiento a corto plazo con antibióticos aminoglicósidos derivados de la estreptomicina como la gentamicina, la kanamicina y la amikacina. Estos son antibióticos de amplio espectro utilizados comúnmente en la clínica para el tratamiento de infecciones severas como la tuberculosis, debido a su bajo precio y a su efectividad; sin embargo, son tóxicos para los sistemas auditivo-vestibular y renal. Se sabe que el blanco terapéutico de este tipo de antibióticos es el ARN 16S de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano. Por tanto, se presume que en los humanos las mutaciones encontradas confieren hipersensibilidad porque modifican la estructura del ARNr 12S, haciendo que éste se parezca al bacteriano, lo que permitiría la unión de los antibióticos. Esto altera la síntesis de proteínas, provocando la muerte de las células auditivas.

En estudios anteriores realizados en el laboratorio se sondeó el gen completo del ARNr 12S mitocondrial en busca de mutaciones previamente reportadas como A827G,

961delT/insC, T1095C, C1494T, A1555G y otras modificaciones que se pudieran encontrar también en individuos mexicanos, ya que la presencia y frecuencia de cada cambio dependen de la población analizada. De las reportadas, por medio de secuenciación y utilizando diversos cebadores, sólo se encontró el cambio A827G, pero se pudieron detectar otras dos variaciones: la A663G y la T1189C. Debido a que este método es lento y muy costoso, y se desea continuar con estos estudios en otros grupos humanos, en este trabajo se realizó la estandarización de una técnica para detectar estos cambios en forma rápida y confiable. La técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (EGGD) es muy sensible para detectar cambios puntuales y se basa en las diferentes temperaturas de desnaturalización de los diversos fragmentos de ADN. Modificando varios parámetros (concentración del gradiente, temperatura del tanque, tiempo de corrimiento, voltaje) se establecieron las condiciones óptimas para detectar estos cambios, desde la extracción del ADN, la amplificación del fragmento deseado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y su análisis en EGGD. En este trabajo se describen los múltiples intentos para detectar el cambio T1189C en la región 3', explicando por qué no fue posible diferenciarlo claramente. Sin embargo sí se encontraron las condiciones óptimas para detectar los cambios puntuales en la región 5' del gen: A663G y A827G, lo que constituye una aportación fundamental para posteriores estudios de variaciones puntuales en el gen del ARNr 12S mitocondrial.

**Palabras Clave:** aminoglicósidos, mutaciones, ADN mitocondrial, ARNr 12S, hipoacusia, mexicanos



## Índice

### Introducción

<b>1.- Aminoglicósidos</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades	1
1.2 Estructura química	1
1.3 Mecanismos de acción antimicrobiana	3
1.4 Mecanismos moleculares de acción de los aminoglicósidos sobre la síntesis de proteínas	5
1.5 Mecanismos de resistencia	11
<b>2.- Breve descripción del oído en mamíferos</b>	<b>14</b>
2.1 Morfología y Fisiología	14
2.2 Oído interno	15
2.2.1 Anatomía de la cóclea	16
2.2.2 Mecanismos de audición	18
<b>3.- Toxicidad de los aminoglicósidos</b>	<b>20</b>
3.1 Uso de los aminoglicósidos en la clínica	20
3.2 Farmacocinética	21
3.3 Toxicidad de los aminoglicósidos	22
3.3a Nefrotoxicidad	23
3.3b Ototoxicidad	25
<b>4.- Antecedentes</b>	<b>29</b>
4.1 Deficiencia Auditiva. Definición y clasificación	29
4.2 Deficiencia auditiva neurosensorial no sindrómica de origen genético	30
4.3 Participación del genoma mitocondrial. Breve descripción del cromosoma mitocondrial	32
4.4 Mutaciones en el ADN mitocondrial relacionadas con Deficiencia Auditiva No Sindrómica	34
4.5 Factores que modifican la penetrancia de las mutaciones mitocondriales. Modelo de '2 Hits'	40
4.5.1 Factores Genéticos	40
4.5.2 Factores Ambientales	42
4.6 Usos de los AGs en México y entidades nosológicas tratadas con éstos	43
4.7 Estudios recientes en el laboratorio	44
<b>5.- Objetivos</b>	<b>46</b>
<b>Diseño Experimental</b>	<b>47</b>
<b>6.- Materiales y métodos</b>	<b>48</b>
6.1 Muestras	48
6.2 Purificación de ADN total de sangre periférica	48
6.3 Amplificación de fragmentos del ADN mitocondrial por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	49
6.3.1 Cebadores	49

6.3.2 Mezclas de reacción	49
<b>6.4</b> Electroforesis de ADN en gel de agarosa	51
<b>6.5</b> Purificación de los productos de PCR	51
<b>6.6</b> Secuenciación automática de ADN	52
<b>6.7</b> Análisis de las secuencias. Detección de los cambios puntuales	53
<b>6.8</b> Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (EGGD)	53
6.8.1 Soluciones	53
6.8.2 Preparación del gel	53
6.8.3 Electroforesis	55
6.8.4 Tinción	55
6.8.5 Análisis	56
<b>7.- Resultados</b>	<b>57</b>
<b>7.1</b> Análisis del gen de ARNt Ser (UCN) por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante	58
<b>7.2</b> Análisis del gen del ARNr 12S por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante	59
7.2.1 Detección de los 3 cambios: A663G, A827G, y T1189C	59
7.2.2 Detección de A663G y A827G	64
7.2.3 Uso de pinza GC en 5': GC628UP-1282LW, GC628UP-850LW	68
7.2.4 Detección de T1189C	69
<u>7.2.4.1</u> Modificando las propiedades del fragmento amplificado	70
7.2.4.1a Acercando el extremo 5': 1071UP-1282LW	70
7.2.4.1b Acercando el extremo 3': 628UP-1207LW y 1071UP-1207LW	73
<u>7.2.4.2</u> Modificando las proporciones de los agentes desnaturalizantes	75
7.2.4.2a Modificando las proporciones de urea/formamida en el gel	75
7.2.4.2b Desnaturalización por condiciones desnaturalizantes extremas	78
7.2.4.2c Pretratamiento de las muestras con desnaturalizantes	82
<b>8.- Discusión</b>	<b>85</b>
<b>9.- Conclusiones</b>	<b>94</b>
<b>Apéndice 1</b>	<b>95</b>
<b>Apéndice 2</b>	<b>101</b>
<b>Apéndice 3</b>	<b>106</b>
<b>Referencias</b>	<b>110</b>

## 1.- Aminoglicósidos

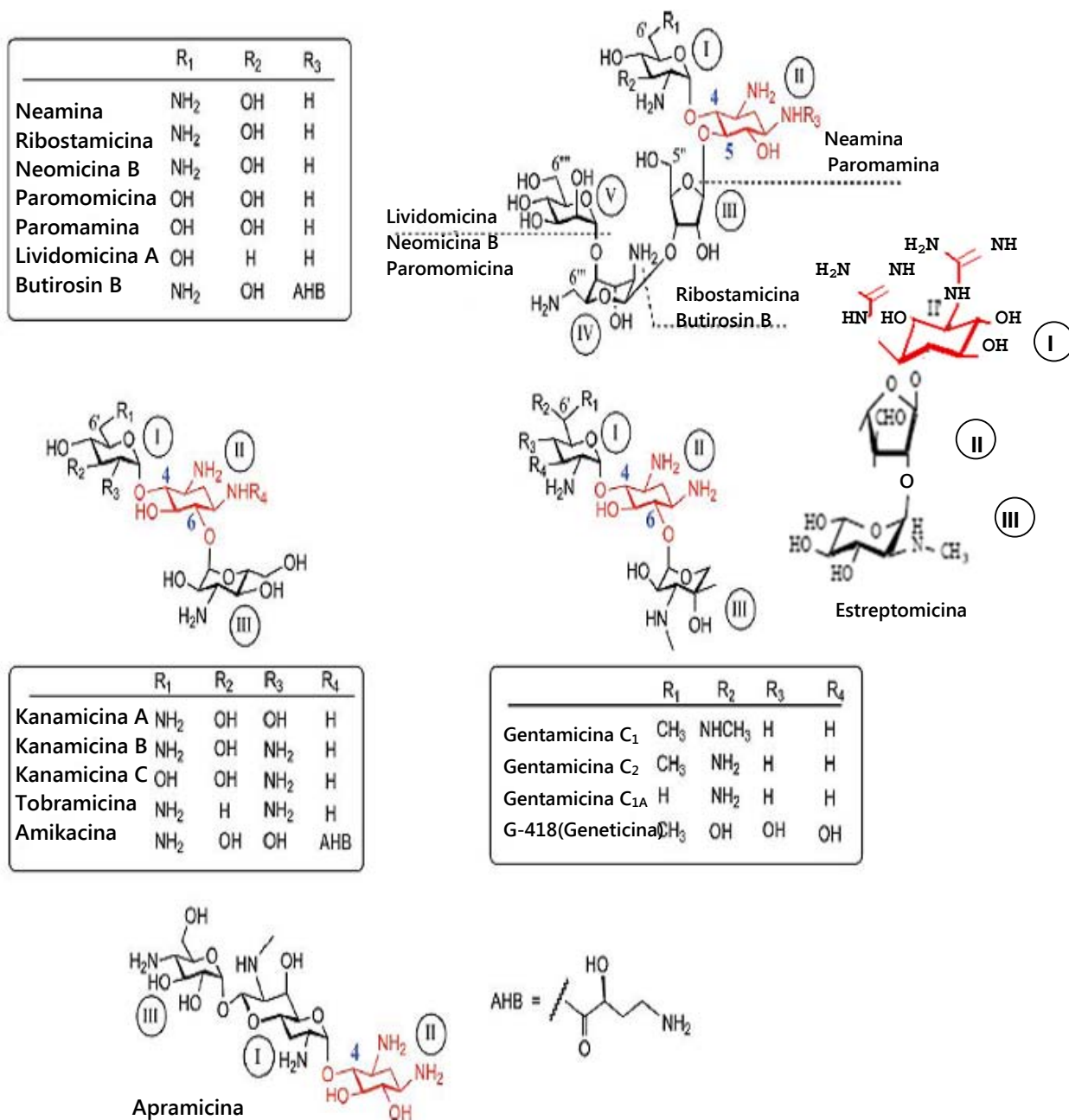
### 1.1 Generalidades

Los aminoglicósidos (AGs) son un grupo de antibióticos de amplio espectro utilizados en la clínica, efectivos contra bacterias Gram-negativas principalmente, y Mycobacteria. Éstos son producidos naturalmente por actinomicetos: *Streptomyces* ssp. y *Mycromonospora* spp. (Rodríguez-Álvarez, 2002). La estreptomina fue el primer antibiótico de este grupo, descubierto en 1944 por el grupo de Waksman, probando su eficacia para combatir *Mycobacterium tuberculosis*. Al conocer su actividad antibacteriana se aislaron otros compuestos en las décadas subsecuentes, tales como: neomicina, paromomicina, kanamicina, tobramicina y gentamicina. Su espectro terapéutico es muy amplio, sin embargo, presentan efectos nefrotóxicos, ototóxicos, y de manera menos frecuente bloqueo de la placa neuromuscular. Además, las bacterias blanco desarrollaron mecanismos de resistencia al fármaco. Por tales razones se ha limitado su uso clínico y a través de estudios de modificación química se han desarrollado otros compuestos para mejorar la eficiencia y disminuir su toxicidad. Algunos de los AGs semisintéticos son amikacina, dibekacina, sisomicina, isepamicina y netilmicina (Hainrichson y col, 2008).

### 1.2 Estructura Química

La estructura básica de los AGs consiste en un aminociclitol unido a uno o más aminoazúcares por medio de enlaces glicosídicos (Silva y Carvalho, 2007). El aminociclitol de la mayoría de los AGs naturales es un anillo no glicosídico llamado 2-desoxiestreptamina (2-DOS), con sustituyentes glicosídicos en las posiciones 4-, 5-, y 6-. De acuerdo a la nomenclatura actual, en la mayoría de los AGs, la 2-DOS se encuentra en la posición central y corresponde al anillo **II**. El azúcar unido a la posición 4- se le

nombra anillo **I** y al que se encuentra unido a la posición 5- ó 6- se le denomina anillo **III** ( Hainrichson y col, 2008).



**Figura 1. Estructura química de los 4 principales grupos de AGs.** El anillo 2-DOS, y estreptidina se denotan como anillo **I**. Modificada de Hainrichson y col, 2008 y Silva y Carvalho, 2007 (estreptomicina).

Los AGs se clasifican en 4 grupos de acuerdo a su estructura química: disustituidos 4, 5- ó 4,6-; monosustituidos 4-, y estreptomina. En la Fig. 1 se muestran las estructuras de los 4 grupos principales de AGs. Algunos ejemplos de los 4,5-disustituidos son la neomicina y la paromomicina; mientras que la gentamicina, la amikacina y la tobramicina corresponden al grupo de los disustituidos 4, 6-. El único representante natural conocido del grupo monosustituido 4- es la apramicina, la cual posee un grupo bicíclico como anillo I. Sin embargo, debido a su toxicidad su uso se ha restringido al área veterinaria (Hainrichson y col, 2008). El otro grupo es el de la estreptomina la cual posee al aminocilitol estreptidina como base, y se nombra anillo I (Silva y Carvalho, 2007).

Los AGs son compuestos básicos altamente polares debido principalmente a sus múltiples grupos amino, cargados positivamente a pH fisiológico. Un ejemplo es el caso de la estreptomina, en el que la carga positiva se debe en gran parte a los grupos guanidino de la estreptidina. Estudios de la conformación espacial de la STP por mecánica molecular mostraron que ésta presenta una conformación helicoidal. En ese estado, uno de los grupos guanidino de la STD, el que se encuentra unido al C7, se encuentra hacia el exterior de la hélice, y el entorno químico le hace el sitio más reactivo de la molécula (Toxqui, 1999). Estas características químicas le confieren a los AGs diferentes propiedades que afectan su absorción, internalización, y sus blancos de acción.

### **1.3 Mecanismos de Acción Antimicrobiana**

El efecto de los AGs es dependiente de la concentración y dosis administrada. Pueden funcionar como bactericidas en dosis altas y como bacteriostáticos en dosis bajas. Tras una breve exposición, el antibiótico suprime el crecimiento bacteriano

(PAE- PostAntibiotic Effect) lo cual permite el tratamiento por dosis únicas diarias para disminuir su toxicidad sobre los huéspedes eucariontes. Los AGs ejercen su efecto antimicrobiano en dos blancos: 1) sobre la membrana bacteriana provocando su rompimiento y 2) uniéndose al ARNr 16S.

La membrana externa, también llamada pared bacteriana, está compuesta por moléculas que les confieren una carga negativa. En el caso de las Gram-negativas éstas son aportadas por los grupos fosfatos de los fosfolípidos, mientras que en las Gram-positivas se debe a los ácidos teicóicos unidos al peptidoglicano. El carácter catiónico de los AGs les permite concentrarse en torno a las bacterias por atracción de las cargas negativas de la superficie bacteriana, desplazando los iones de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  enlazados a las moléculas de lipopolisacáridos. Este proceso modifica la estructura de la membrana externa y permite el paso, inicialmente lento, de los AGs por difusión. Una vez atravesada fácilmente la barrera de peptidoglicano los AGs vuelven a concentrarse en torno a la membrana citoplasmática. La difusión a través de esta membrana ocurre en 2 fases: una inicial lenta y otra posterior rápida. Ambas etapas son dependientes del potencial transmembranal generado por el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria. Este hecho explica la ineficacia de estos compuestos frente a microorganismos anaerobios. La presencia de iones de magnesio y calcio en el medio y las situaciones que disminuyen el potencial transmembranal (pH ácido, ambiente anaerobio o hiperosmolaridad), reducen la difusión del AG al interior de la bacteria (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

La carga positiva de los AGs les permite unirse a moléculas cargadas negativamente como ADN y ARN. Se ha observado que los AGs se unen a ARNs funcionales de diferentes orígenes entre los que se encuentran intrones del grupo I, ribozimas *hammerhead* (ribozima cabeza de martillo), la ribozima del virus de hepatitis

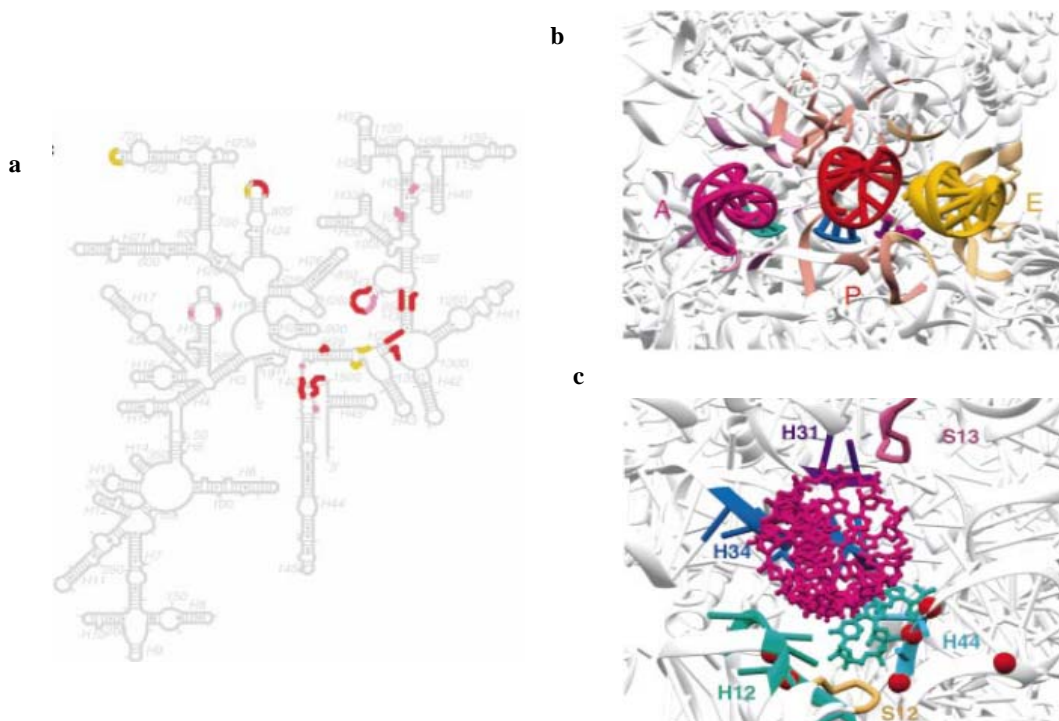
δ humana, elementos de reconocimiento RRE (Rev Responsive Elements) y TAR (Trans-Acting Responsive Sequence) del ARN del VIH, bloqueando la unión de las proteínas VIH-Rev y VIH-tat, estructuras en horquilla de ARN y el sitio A de la región codificadora del ribosoma (Silva y Carvalho, 2007). Muchos de estos blancos no han sido estudiados profundamente aún. El blanco más estudiado y de importancia antibacteriana es el sitio A del ARNr 16S en la subunidad 30S del ribosoma. Una vez que se unen, los AGs impiden el inicio de la síntesis de proteínas, interfieren con el proceso de *proofreading* inhibiendo la translocación y disminuyen la fidelidad de la traducción de las proteínas. Consecuentemente, se producen proteínas anómalas, truncas o incorrectamente plegadas, acumulándose y llevando a la bacteria a la muerte. (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

#### **1.4 Mecanismos Moleculares de acción de los Aminoglicósidos sobre la Síntesis de Proteínas**

El proceso de traducción convierte el lenguaje de 4 letras del ARNm al de 20 letras de las proteínas. Los cofactores ribosomales involucrados varían entre procariotes, eucariotes y mitocondria pero en todos los casos el proceso se lleva a cabo en 3 etapas: Iniciación, Elongación y Terminación. Durante la Iniciación el ARNr de la subunidad pequeña ribosomal reconoce al ARNm y lo posiciona de manera que el ARNt-(f)Met se une al codón inicial. Entonces se une la subunidad grande junto con otros cofactores para formar el complejo de iniciación. La Elongación incluye 3 procesos: unión del aminoacil-ARNt al sitio A ribosomal y su selección por interacciones con la región codificante codón-anticodón, la formación del enlace peptídico en la subunidad 50S, y la translocación del ahora peptidil-ARNt del sitio A al P en el ribosoma de manera dependiente de GTP. El proceso se repite hasta encontrar el codón de término donde un

factor reconoce al codón y se concluye con la liberación de la cadena polipeptídica y la disociación de las subunidades ribosomales. Cada una de estas etapas puede ser afectada por los AGs.

Estudios de *footprinting* (obtención de huella plantar), de Resonancia Magnética Nuclear y Cristalográficos (Wimberly y col, 2000) han permitido dilucidar los residuos participantes en cada uno de los sitios del ribosoma (A, P, E), además de la estructura del sitio A decodificador del ribosoma procarionte y profundizar en los mecanismos de decodificación natural. En la Figura 2 se muestra de manera general la estructura secundaria del ARNr de la subunidad pequeña 16S, señalando los residuos pertenecientes a cada sitio (a) y su conformación terciaria (b). En amarillo se muestran los residuos que forman el sitio E, en rojo el sitio P y en magenta el sitio A (Carter y col, 2000). El sitio A ribosomal es una estructura conservada filogenéticamente que involucra bases distantes cuando se observa la secuencia lineal o en estructura



**Figura 2. Residuos en la subunidad 30S que componen los sitios A, P y E.** Sitio E-amarillo, sitio P-rojo; sitio A-magenta. Tomado de Carter y col, 2000. a) Estructura secundaria ARNr 16S. b) Modelos de la posición de los ARNs de transferencia en cada sitio ribosomal c) Detalle del sitio A ribosomal, modelado con un codón (verde) y hélice homóloga a ARNt (magenta); los círculos rojos son residuos involucrados por experimentos bioquímicos.

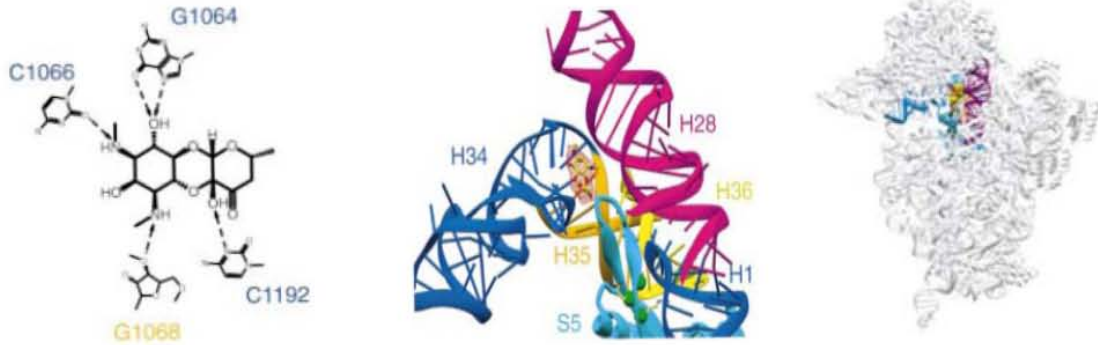


secundaria (Fig. 2a). Incluye porciones del loop 530, H31 y H34, en el dominio de la cabeza y los residuos 1492-1493 del dominio 3' menor.

En las bacterias, los AGs se unen a la subunidad 30S que posee la función decodificadora y alteran la conformación e interacciones naturales de ésta, interfiriendo con la síntesis proteica (otros antibióticos, como los macrólidos que intervienen en la formación del enlace peptídico, unen la subunidad 50S). Carter y col obtuvieron cristales de la subunidad ribosomal 30S en complejo con varios AGs para determinar los sitios de unión y el papel de cada uno. La *spectinomycin* inhibe la translocación del p-ARNt del sitio A al P después de la formación del enlace peptídico. En la Figura 3a se muestra el sitio de inserción de este antibiótico, el cual se une en una región que funcionaría como pivote permitiendo el movimiento de elementos del dominio de la cabeza del ribosoma, necesario para la translocación. Es posible que la rigidez de la molécula bloquee el movimiento estérico o prevenga los cambios conformacionales de la hélice H34 impidiendo este paso. La *streptomycin*, por otro lado, se une fuertemente al esqueleto de fosfatos del 16S en los residuos 14, 527, 916 y 1490, así como K45 de la proteína S12 a través de puentes salinos y de hidrógeno. Existen dos estados del ribosoma: *ram* en el que el sitio A, generalmente de baja afinidad por ARNs t, aumenta su afinidad, y el *restrictivo*, en el que se lleva a cabo el *proofreading* (verificar que la pareja codón-anticodón sea la correspondiente). La STP estabiliza el estado *ram*. Esto aumenta la unión de ARNs t al sitio A afectando la selección inicial y el *proofreading* a pesar de encontrar ARNs t no correspondientes al codón, por lo que aumenta la cantidad de errores en la traducción (Fig. 3b) (Carter y col, 2000). Los AGs 2-DOS, por su parte, se unen más cerca del sitio decodificador del ribosoma, que en el caso del 16S bacteriano corresponde a la H44. En la Fig. 3c se muestra el modelo con la

paromomicina. Este mecanismo ha sido descrito con más detalle y actualmente existe una hipótesis generalmente aceptada.

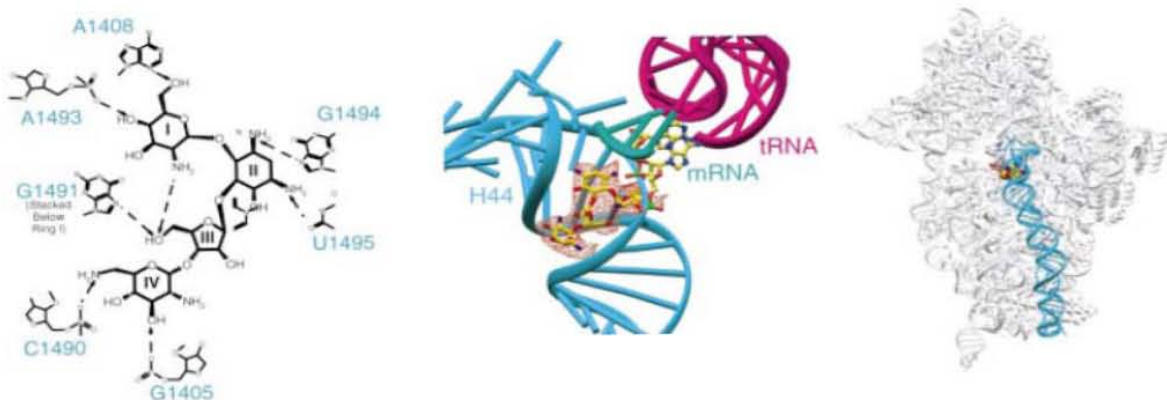
a



b



c



**Figura 3. Estructura de varios AGs y los residuos con los que interactúan en la subunidad 30S ribosomal.** Se observa la estructura de cada antibiótico y los residuos con los que interactúan en diversas hélices del 16S (izquierda). En medio se muestra un modelo de la orientación de las hélices y antibióticos al interactuar. Finalmente, se muestra la región de la subunidad en la que interactúa el AG. a) Espectinomicina b) Estreptomicina c) Paromomicina. Obtenido de Carter y col, 2000.

La selección del aminoacil-ARNt durante el proceso de decodificación es un proceso complejo, no conocido en su totalidad actualmente. Sin embargo, se conoce hasta ahora que depende de la formación de una mini hélice entre el codón del ARNm y el anticodón del aminoacil-ARNt correspondiente. Dos posiciones del gen 16S son de suma importancia para este proceso: A1492 y A1493, las cuales cambian de conformación dependiendo del correcto/incorrecto apareamiento del codón-anticodón. En estado “apagado” las dos adeninas se encuentran plegadas hacia el interior de la hélice ribosomal, y cambian al estado “encendido” en presencia de un aa-ARNt, volteándose al exterior de la hélice ribosomal e interactuando con la minihélice codón-anticodón (Hainrichson y col, 2008).

Estas 2 adeninas monitorean grandes porciones del surco menor de la mini hélice codón-anticodón. Como la distancia entre dos grupos 2' OH a lo largo del surco menor es una función de la geometría del apareamiento de bases, la formación simultánea de puentes de hidrógeno a las dos hebras de la hélice codón-anticodón debe ser sensible a distorsiones en caso de mal apareamiento. Se propone que el resto de la superficie decodificante está compuesta de residuos de ARN conservados pertenecientes al pseudonudo 530 y la hélice H34 que se encuentra cerca, y posiblemente monitorean la adecuada conformación de la hélice codón-anticodón, y contribuyen con uniones adicionales (Carter y col, 2000).

Esto permite monitorear el apareamiento de las bases, y funciona como switch que determina de manera irreversible la continuación de la traducción en condiciones sin antibiótico.

Los AGs 2-DOS disustituídos (4,5- ó 4,6-) alteran el equilibrio conformacional de las adeninas conservadas A1492 y A1493 estabilizando el estado “encendido” aún en

ausencia del complejo ARNm-ARNt correspondiente (Fig. 4). Esto aumenta la afinidad del sitio A para la formación de los ARNm-ARNt, interfiriendo con el monitoreo del apareamiento, permitiendo la introducción de ARNts no correspondiente y el ensamblaje de proteínas de secuencia incorrecta (Hainrichson y col, 2008), activando diversas vías de señalización culminando con la muerte celular.

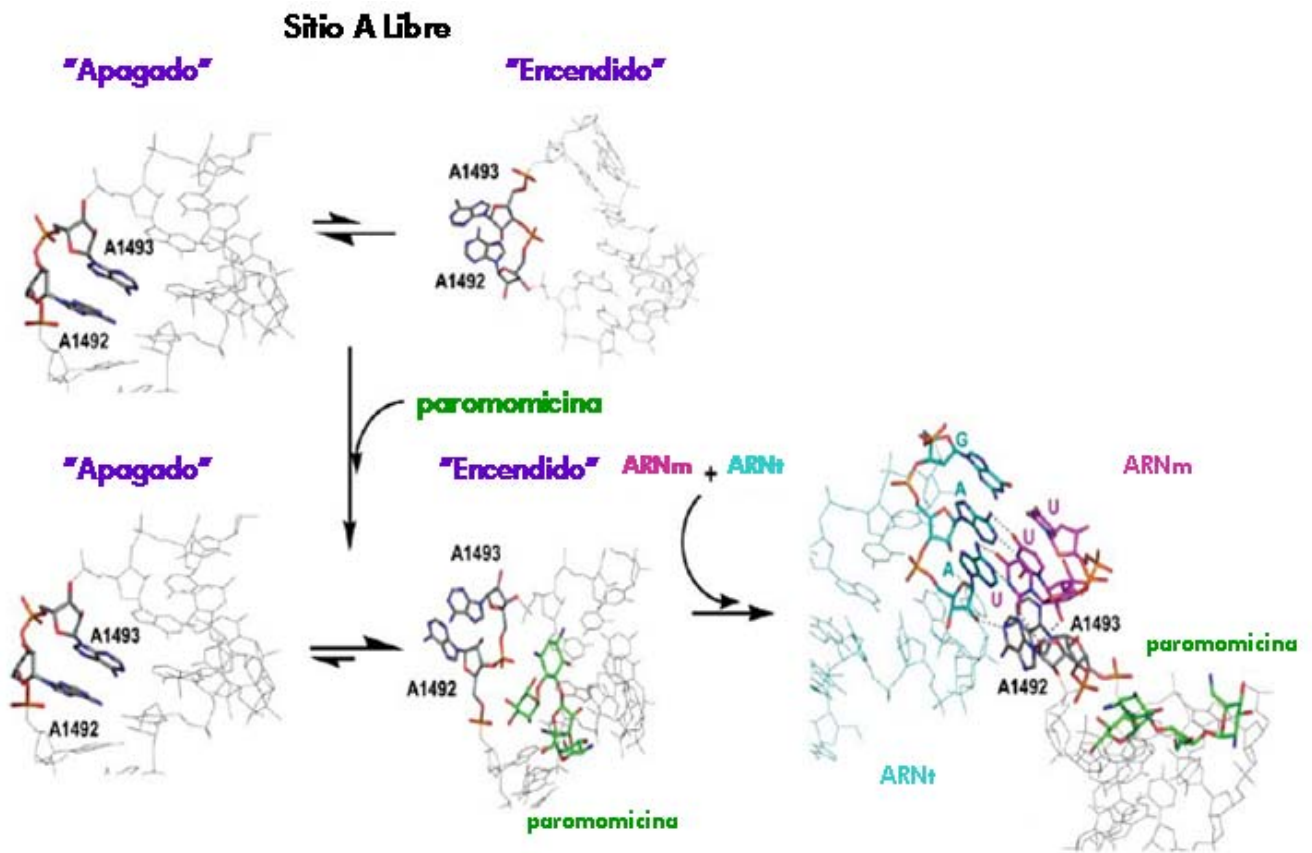


Figura 4. Mecanismo de acción propuesto de los AGs 2-DOS sobre ARNr 16S del sitio A decodificador. Figura reproducida de Hainrichson y col, 2008.

## 1.5 Mecanismos de Resistencia

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia contra los AGs, entre los que se encuentran (Silva y Carvalho, 2007):

- a) *Baja concentración del aminoglicósido al interior de la bacteria.* Esto puede deberse a que la membrana presenta especialmente una baja permeabilidad a los AGs. *P. aeruginosa* es una bacteria anaerobia, que carece de cadena respiratoria, por lo cual no se genera el gradiente electroquímico necesario para la internalización del aminoglicósido. También se ha hallado esta resistencia en algunas cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aureus* aisladas de infecciones causantes de endocarditis, las cuales presentaban deficiencias en algún componente de la cadena respiratoria. También puede deberse a la presencia de bombas dependientes de ATP que sacan el aminoglicósido de la bacteria. Un ejemplo son la familia de transportadores *RND* (*Resistance-Nodulation-Cell Division*). Se localizan en la membrana citoplásmica, e interactúan con proteínas en el espacio periplásmico y la membrana externa en bacterias Gram-negativas, formando un canal tripartito (de 3 partes) capaz de exportar los substratos al espacio extracelular (Shakil y col, 2008).
- b) *Metilación del ARNr.* Varios organismos que producen AGs expresan metilasas y metiltransferasas de ARN, capaces de modificar el ARNr16S en posiciones específicas. Por ejemplo, en resistencia a kasugamicina se ha observado que el gen *ksgaA*, que codifica la metilasa de ARNr puede encontrarse mutado dando como resultado una variedad de metilaciones postranscripcionales en los nucleótidos A1519 y A1520. *Micromonospora purpurea* sintetiza gentamicina A, y *S. tenebrarius* kasugamicina; ambos catalizan la metilación de G1405 en la

posición N7, lo que confiere una alta resistencia específica para las desoxiestreptaminas 4,6- disustituídas (Shakil y col, 2008).

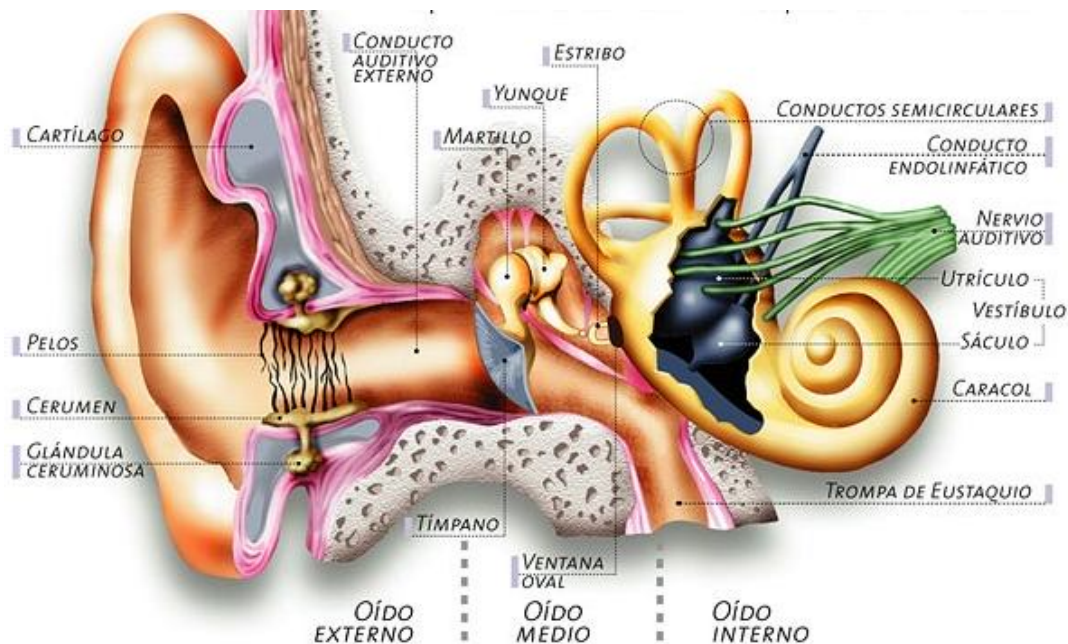
- c) *Mutaciones en el ARNr*. Éste mecanismo de resistencia sólo funciona con *M. tuberculosis* y estreptomycin. *Mycobacterium* es el único género de eubacterias que contienen sólo una copia del operón ribosomal, lo cual asegura que una mutación puntual resulte en una población homogénea de ribosomas mutados, confiriendo resistencia a la acción bactericida.
- d) *Enzimas modificadoras de AGs: ANTs, APHs, AACs*. El principal mecanismo de resistencia contra los AGs consiste en modificar de manera específica algunos de sus grupos químicos por enzimas, denominadas de manera colectiva como enzimas modificadoras de AGs (AMEs). Cada una de las clases de enzimas realiza una reacción específica cuyos productos carecen de actividad antimicrobiana. Adicionalmente, cada clase contiene varios miembros con especificidad del sustrato y de la posición que modifican. *Fosfotransferasas de AGs (APH)*; corresponden al grupo más abundante y con mayor relevancia clínica. Transfieren un fosfato- $\gamma$  del ATP al grupo 3'-OH de varios AGs. Esto provoca que la carga positiva de la molécula disminuya conjuntamente con su capacidad para unirse al sitio A ribosomal. *Acetilinasas de AGs (AACs)*; son el segundo grupo más abundante de AMEs. Catalizan la *N*-acetilación regioselectiva de grupos amino, dependientes de acetyl CoA. La mayoría de estas enzimas son monofuncionales, sin embargo, recientemente se han encontrado algunas bifuncionales. *Nucleotidiltransferasas de AGs (ANTs)* son el grupo más pequeño de enzimas inactivadoras. Catalizan la reacción entre Mg-ATP y el aminoglicósido transfiriendo AMP a un grupo hidroxilo de manera dependiente de ATP (Hainrichson y col, 2008; Silva y Carvalho, 2008). Las

AMEs generalmente se encuentran codificadas en plásmidos o asociadas a transposones. La transferencia horizontal es un mecanismo común por conjugación, que facilita la dispersión de estos mecanismos de resistencia (Shakil y col, 2008).

## 2.- Breve Descripción del Oído en Mamíferos

### 2.1 Morfología y Fisiología

El oído está compuesto por 3 partes: *oído externo*, *oído medio* y *oído interno*. El *oído externo* se encarga de captar y transmitir el sonido. Éste viaja a través del canal auditivo hasta la membrana timpánica o tímpano. La presión sonora en la membrana timpánica depende de las propiedades acústicas del pabellón auditivo, el canal auditivo y la cabeza; además de la frecuencia y del ángulo de incidencia del sonido. La presión en la membrana timpánica es mayor que en la entrada del canal auditivo. El *oído medio*, compuesto de la membrana timpánica, y 3 huesecillos (martillo, yunque y estribo) se encarga de amplificar la señal y transmitirla a la cóclea. La diferencia entre la fuerza que actúa en las dos ventanas de la cóclea es la responsable de poner el fluido coclear en movimiento. La fuerza en la ventana oval es mayor por el efecto de los huesecillos



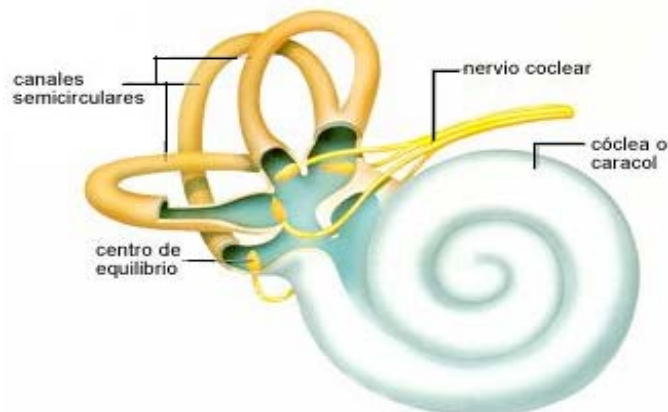
**Figura 5. Esquema general del oído humano.** En el esquema se muestran las tres partes que componen al oído humano, y los principales componentes de cada parte. Imagen disponible en <http://audiofilos.blogspot.es/> [En línea] Recuperado en Septiembre de 2010.



sobre ésta, que la ventana redonda no tiene (Möller, 2006). También los músculos que conectan el martillo y el estribo son inhibidos por el reflejo estapédico, limitando la transmisión de la energía, protegiendo así al oído de sonidos muy fuertes y sonidos interferentes producidos internamente (Martini y col, 1996). El *oído interno*, consiste de 2 partes: el aparato vestibular para el equilibrio y la cóclea para la audición. La cóclea separa los sonidos dependiendo de su frecuencia antes de ser transducidos por las células pilosas en un código neural en las fibras del nervio auditivo (Möller, 2006).

## 2.2 Oído Interno

El oído interno puede dividirse en dos partes: la cóclea que contiene los receptores auditivos y el sistema vestibular que contiene los receptores de equilibrio y gravedad (Fig. 6). Estos receptores alojan a las células pilosas, que funcionan de manera muy similar tanto en el sistema auditivo como en el vestibular, respondiendo a deflexiones de los esterocilios que se extienden en su superficie. Los esterocilios de las células pilosas en el sáculo y en el utrículo se deflexionan cuando la membrana gelatinosa otolítica a la cual están unidas se mueven por efecto de la gravedad cuando la posición de la cabeza cambia. Las células pilosas de los canales semicirculares responden al movimiento de los fluidos en su interior, que es provocado por movimientos angulares de la cabeza (Martini y col, 1996).

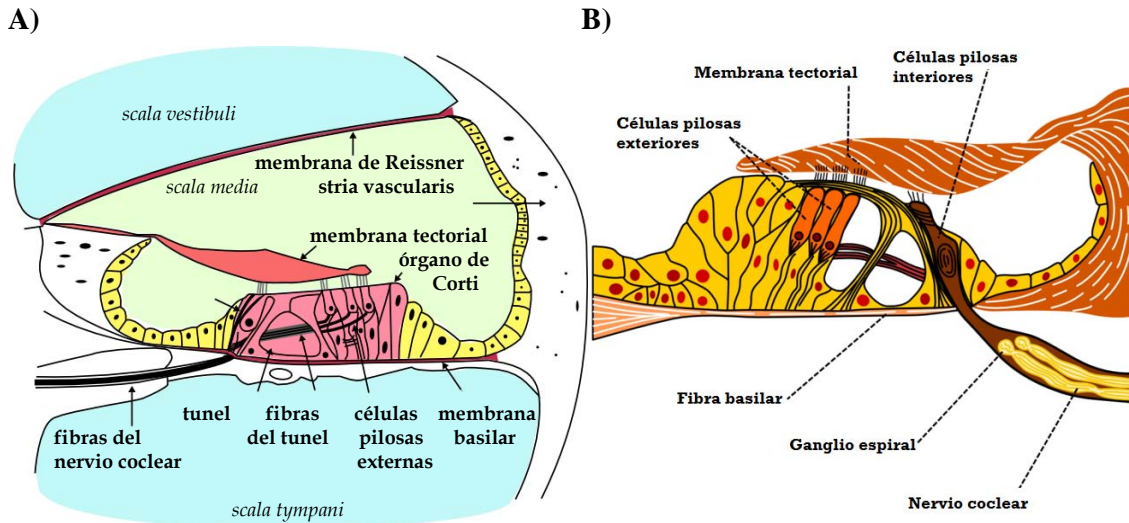


**Figura 6. Esquema de las partes que componen el oído interno.** Sistema vestibular: compuesto de los canales semicirculares, utrículo y sáculo. Sistema auditivo conformado por la cóclea. Imagen disponible en <http://es.wikipedia.org/wik/O%C3%ADdo> [En Línea] Recuperado en Septiembre de 2010.

### 2.2.1 Anatomía de la Cóclea

La cóclea se encuentra contenida en el hueso temporal. Ésta es una estructura ósea en forma de caracol con poco más de 2 ½ vueltas en el oído humano, que contiene el órgano de la audición. La longitud aproximada en el adulto es de 3.1 a 3.3 cm y su altura de 0.5 cm. En el esquema de la figura 7a se indican los componentes de la cóclea. El conducto se encuentra dividido por la membrana basilar. Esta membrana separa los sonidos de acuerdo a su espectro y el órgano de Corti (a lo largo de la m. basilar) contiene células pilosas que transforman la vibración de ésta en un código neural. Una de las mitades de la cóclea se divide nuevamente por medio de la membrana de Reissner, la cual mantiene al órgano de Corti aislado. En total, la cóclea se divide en tres canales llenos de líquidos: *scala tympany*, *scala media* y *scala vestibuli*. El grosor de la *s. media* disminuye al final de la cóclea, hasta el ápice, donde hay una apertura de  $\sim 0.05 \text{ mm}^2$  (helicotrema) que conecta *s. tympany* con *s. vestibuli*. Tanto la *s. tympani* como la *s. vestibuli* contienen un líquido llamado perilinfa cuyas propiedades son similares a las de otros fluidos extracelulares: baja concentración de potasio, y alto contenido de sodio. La *s. media* está llena de endolinfa, con composición similar a los fluidos intracelulares: alta concentración en potasio y bajo sodio (Möller, 2006). La endolinfa baña al órgano de Corti, permitiendo el flujo de iones potasio al interior de estas células en la transducción. Además, mantiene un potencial de reposo altamente positivo. Este potencial endococlear genera una diferencia de potencial en la superficie de las células pilosas, con carga positiva en la endolinfa y negativa al interior de las células. Estas propiedades son mantenidas por bombas de iones en la *stria vascularis*. La endolinfa es la batería iónica del órgano de Corti, mantenida por la *s. vascularis*. A su vez, ésta se encuentra altamente vascularizada, y se compone de tres capas: marginal

hacia la *s.media*, células intermedias compuestas por melanocitos especializados, y basal que separan a la stria del tejido conectivo por debajo (Martini y col, 2006).



**Figura 7. Esquema del sistema auditivo.** A) Esquema de un corte transversal de la Cóclea. Disponible en: [http://gl.wikipedia.org/wiki/%C3%93rgano\\_de\\_Corti](http://gl.wikipedia.org/wiki/%C3%93rgano_de_Corti). B) Esquema general del órgano de Corti. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/O%C3%ADdo>. [En Línea] Recuperado en Septiembre de 2010.

El órgano de Corti es el encargado de la audición, y está compuesto de varios tipos celulares (Fig. 7b). Los receptores son las células pilosas: interiores y exteriores. Existen alrededor de 3, 500 células pilosas interiores, organizadas en una fila; su forma es de pera hacia la parte basal. Las células pilosas exteriores son más abundantes, alrededor de 12,000 arregladas en 3-5 filas; su forma es cilíndrica y alargada. Éstas se encuentran sostenidas por varios tipos celulares como las células de Dieter y las de Henson (Möller, 2006). La parte superior del órgano de Corti, formado por las células pilosas y de soporte, comunicadas por uniones estrechas, es reforzada por arreglos densos de componentes del citoesqueleto. Los esterocilios están embebidos en estas placas llamadas placas cuticulares, en la parte apical de las células pilosas (Martini y col, 1996). La inervación se lleva a cabo por células aferentes: tipo I- (~95%) cubiertas de mielina, con cuerpos grandes, varias inervan a una sola célula pilosa interior; y tipo

II- (~5%) sin mielina, con cuerpos celulares pequeños, una sola célula inerva varias células pilosas exteriores. Las células eferentes actúan directamente en células exteriores pero afectan las señales de salida de las interiores (Möller, 2006).

### *2.2.2 Mecanismos de audición*

La membrana basilar de la cóclea lleva a cabo un análisis espectral de los sonidos. Esto fue propuesto primeramente por Helmholtz, quien pensaba que poseía resonadores afinados a diferentes frecuencias que cubrían todo el rango audible. Fue von Bèkèsy quien dio prueba experimental de esto. Cada punto a lo largo de la m. basilar se encuentra afinado a cierta frecuencia, con las más altas en la base y las más bajas en el ápice. La rigidez de la m. basilar desciende desde la base al ápice de manera no lineal, y es más selectiva para sonidos de baja intensidad que para los de alta. El sonido pone en movimiento al fluido coclear que a su vez pone en movimiento a la m. basilar. Al avanzar la onda por la membrana encuentra partes menos rígidas, por lo cual la velocidad de propagación disminuye, y la longitud de onda también. Cuando el movimiento de la onda se hace más lento, la energía se amontona, provocando que la amplitud de la vibración aumente. El aumento en la amplitud es contrarrestado por la pérdida de energía por fricción y cuando la longitud de onda alcanza valores pequeños la pérdida es mayor hasta que la propagación de la onda se detiene y la onda se extingue. Debido a todo lo anterior, la distancia que recorre la onda en la m. basilar antes de extinguirse es una función directa de la frecuencia del sonido que pone a la membrana en movimiento. La masa de la membrana tectorial y la longitud y rigidez de los estereocilios de las células pilosas varían a lo largo de la m. basilar. También las propiedades de la membrana tectorial y los estereocilios de las células pilosas

contribuyen a la selectividad de frecuencias de la membrana basilar, formando resonadores a lo largo de ésta (Möller, 2006).

El estímulo normal de las células pilosas es la deflexión de sus esterocilios, que posteriormente permite convertir un estímulo mecánico en un estímulo eléctrico. Los esterocilios contienen canales capaces de transducir señales. Cuando estos sufren deflexión por las fuerzas mecánicas en una dirección específica los canales se abren, mientras que si se deflexionan en la dirección opuesta se cierran. Esto regula la corriente de potasio y el potencial intracelular. La despolarización de las células pilosas incrementa la concentración de calcio intracelular provocando la liberación de neurotransmisores, y la posterior señalización a las áreas del sistema nervioso central. La transducción en el oído necesita emplear señalización directa por los canales puesto que las células pilosas son capaces de responder a frecuencias de hasta 100 kHz o más, demasiado rápido para que se pudiera llevar a cabo la acción por un segundo mensajero. Las neuronas que inervan las células pilosas proyectan al cerebro a través del 8vo. nervio craneal. Las repuestas de las fibras nerviosas cocleares se encuentran delicadamente afinadas reflejando la posición de la célula con la que se encuentran conectada, con respecto a la membrana basilar (Martini y col, 1996).

### 3.- Toxicidad de los Aminoglicósidos

#### 3.1 Uso de los Aminoglicósidos en la clínica

Debido a su eficacia los aminoglicósidos son utilizados contra diversas infecciones severas, generalmente de etiología desconocida, en ocasiones en compañía de otros antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, debido a sus efectos tóxicos, su uso se restringe tan pronto como se conozca la naturaleza del agente causante de la infección. Cada AG presenta características y usos distintos, de los cuales se mencionan algunos a continuación (Rodríguez-Álvarez, 2002):

- a) *Streptomycina*. Forma parte de los esquemas antituberculosos como fármaco de segunda línea. También se emplea en combinación con penicilina G en el tratamiento de endocarditis bacteriana. La vía de administración más frecuente es la intramuscular. Su uso se limita a 10 días para evitar desarrollar resistencia (excepto para endocarditis y tuberculosis). La dosis recomendada para pacientes con función renal normal es 15 mg/kg/24 h.
- b) *Gentamicina*. Es un agente empleado para infecciones serias de etiología desconocida, en combinación con betalactámicos. Puede administrarse como ungüento, crema, vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Es utilizada en las soluciones de diálisis peritoneal para el tratamiento de peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal continua ambulatoria (generalmente en combinación con vancomicina y ajuste gradual de la dosis). Se ha reportado también su uso exitoso en pacientes con traqueostomía y neumonía.
- c) *Tobramicina* y *Amikacina*. Al igual que la gentamicina se utilizan para infecciones de etiología desconocida. Puede administrarse por vía intravenosa o intramuscular. Se ha reportado efectividad de *amikacina* contra *Nocardia*

*brasiliensis*, e *in Vitro* contra *Francisella tularensis* y *Yersinia pestis*. La dosis diaria en pacientes con función renal íntegra es de 15 mg/kg.

- d) *Netilmicina*. Puede administrarse por vía intravenosa o intramuscular. La dosis para infecciones complicadas del tracto urinario es de 1.5-2 mg/kg/12h, mientras que para infecciones sistémicas graves es de 4-6.5 mg/kg/24 h.
- e) *Neomicina*. Este medicamento se administra en cremas, ungüentos dermatológicos y oftálmicos, y sprays debido a su toxicidad cuando se absorbe sistémicamente. Puede administrarse por vía enteral a dosis de 4-12 g diarios, dividida en varias tomas. También se utiliza para la preparación intestinal en cirugías de colon o para el manejo de encefalopatía hepática, siempre bajo estrecha vigilancia del paciente, ya que puede llegar a acumularse en pacientes con función renal disminuida.
- f) *Kanamicina*. Puede administrarse por vía intramuscular, intravenosa y oral. Se administra, generalmente en combinación con neomicina oral, para la preparación preoperatoria del colon. Se utiliza en el tratamiento de mastitis, septicemias, nefritis, pneumonías, enteritis, actinobacilosis, tuberculosis (especialmente causado por especies resistentes a la eritromicina), entre otras. La kanamicina es más efectiva en el tratamiento de las infecciones urinarias cuando el pH de la orina es alcalina. La dosis convencional es de 15mg/kg/8h (Li, 2005).

### **3.2 Farmacocinética**

Todos los aminoglicósidos son más efectivos en ambientes alcalinos, y se absorben rápidamente por vía intramuscular o subcutánea. Su administración por vía intravenosa se usa poco y debe ser en infusiones que duren de 30 a 60 minutos para la

administración total de la dosis. De otra forma, ocurre aumento súbito de la concentración plasmática del aminoglicósido y también el riesgo de bloqueo de la placa neuromuscular. En condiciones normales, tienen baja actividad en líquido cefalorraquídeo, compartimentos oculares y próstata, así como en líquidos pleural y sinovial. Sólo atraviesan la barrera hematoencefálica si las meninges se encuentran inflamadas. Tienen una vida media prolongada. Se encuentran en orina 48-200 horas después de suspender un régimen de dosis múltiples, aún sin ser detectable en suero. Se excretan en un 98% por filtración glomerular, 1% por secreción tubular y <1% en heces y saliva. A pesar de ser poco absorbidos por vía oral o rectal (<1%), en pacientes con falla renal pueden acumularse y alcanzar niveles tóxicos en sangre (Rodríguez-Álvarez, 2002).

### **3.3 Toxicidad de los Aminoglicósidos**

La toxicidad de los AGs depende de su estructura química. Diversos grupos se han dedicado a sintetizar y estudiar AGs derivados de los naturales con el objetivo de mantener el efecto bactericida y disminuir la toxicidad (Silva y Carvalho, 2007). Al comparar los efectos de varios AGs naturales y aquellos modificados químicamente se observan efectos conservados. En general, al disminuir la basicidad de los AGs substituyendo sus grupos amino por otros neutros como acetilos, disminuye la toxicidad. Presumiblemente esto se debe a que la atracción electrostática de los AGs a las moléculas blancas, cargadas negativamente, disminuye. De manera contraria, al substituir los grupos hidroxilo la toxicidad aumenta, porque la carga neta positiva del AG, y por tanto su atracción electrostática a las moléculas blanco crece (Hainrichson y col, 2008).



A pesar de estas consideraciones, los efectos de los AGs reportados en la literatura varían de un estudio a otro. Se ha observado toxicidad sub-aguda, aguda y crónica, dependiendo de la dosis utilizada, velocidad y vía de administración, duración de la terapia y especie utilizada como modelo de estudio (Silva y Carvalho, 2007). Sin embargo, en humanos los principales efectos observados de los AGs son nefrotoxicidad (reversible), y ototoxicidad (irreversible); y en algunos casos menores, bloqueo de la placa neuromuscular.

### *3.3a Nefrotoxicidad*

El riesgo de desarrollar nefrotoxicidad por AGs en población hospitalaria abierta es del 5-10%. El daño renal está determinado por dos condicionantes, principalmente: 1) el potencial intrínseco del fármaco para dañar estructuras subcelulares, determinado por la estructura del AG, y 2) la cantidad del fármaco acumulado en la corteza renal, determinado por el esquema de administración empleado (Rodríguez-Álvarez, 2002). Debido a que la mayor parte de estos antibióticos se excretan por vía renal, los riñones se encuentran expuestos a los AGs. Estudios autoradiográficos revelaron la retención selectiva de AGs en las células epiteliales de la Pars Recta de los túbulos proximales, pero no en las partes distales de la nefrona (Nagai y Takano, 2004).

Debido a la acumulación de AGs observada se han realizado varios estudios para determinar los blancos de los AGs en el riñón. El grupo de Schacht realizó cromatografía de afinidad con neomicina acoplada a esferas de vidrio, aislando fosfoinosítidos, entre ellos: fosfatidilinositol-4-monofosfato (PIP) y fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) de tejidos del oído interno y riñón (Nagai y Takano, 2004). También se observó que membranas purificadas del borde en cepillo de la corteza renal eran capaces de unir AGs (Nagai y Takano, 2004). De esta manera, los fosfolípidos ácidos pueden servir como sitios de unión inicial para AGs. Sin embargo, debido a que éstos

también están presentes en otros tejidos, debe haber factores extras que justifiquen su acumulación selectiva en las zonas del riñón antes mencionadas.

La *megalina* es un receptor endocítico que une múltiples ligandos. El grupo de Moestrup reportó que este receptor corresponde al 0.1% del total de la proteína de la membrana plasmática cortical del riñón de conejo (Nagai y Takano, 2004). La megalina se expresa normalmente en la parte final del segmento 1 y en el segmento 2 del túbulo proximal principalmente; también se expresa abundantemente en las células epiteliales del oído interno. A nivel celular, se le encuentra en el lado apical de las células y en el aparato endocítico: invaginaciones revestidas de clatrina, vesículas endocíticas grandes y pequeñas, y un poco en lisosomas (probablemente como productos de degradación). En el humano, es una proteína de peso molecular de 516, 636 daltones sin incluir la glicosilación, y de carácter aniónico (su punto isoeléctrico es de 4.6) que une diversas proteínas ricas en aminoácidos cargados positivamente, incluyendo AGs. Moestrup y col (1995) probaron tres AGs: gentamicina, netilmicina y amikacina. La presencia de estos antibióticos inhibió la unión del complejo PAI-1 marcado radiactivamente (inhibidor tipo 1 del activador de  $^{125}\text{I}$ -urocinasa-plasminógeno) a megalina purificada de conejo, de manera dependiente de la concentración utilizada (Nagai y Takano, 2004). De manera que la megalina también es un blanco específico de los AGs en la membrana de los túbulos proximales en riñón, lo que favorece su toxicidad.

El efecto neurotóxico de los AGs es resultado de varios procesos en la célula. Los AGs acumulados en la membrana plasmática alteran su estructura e inducen la pérdida de iones intracelulares ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), proteínas (macroglobulinas  $\alpha$ -2 y  $\beta$ -2, lisozimas), y enzimas (alanilaminopeptidasas, *N*- acetilglicosaminidasas) (Silva y Carvalho, 2007). También el AG forma un complejo con la megalina el cual es endocitado y transportado al aparato de Golgi, provocando una disminución en la

síntesis proteica. Por otra parte, los AGs unen a los ribosomas mitocondriales a través de un mecanismo semejante al 16S bacteriano. La nefrotoxicidad es reversible, y puede disminuirse modificando el esquema de administración del fármaco a una sola dosis al día (Rodríguez-Álvarez, 2002).

### *3.3b Ototoxicidad*

La ototoxicidad es la falla en la función y degeneración celular de los tejidos del oído interno provocado por agentes terapéuticos. El resultado de esta exposición es la pérdida de la función auditiva y/o vestibular. El índice de deficiencia reportada varía entre un pequeño porcentaje y hasta 33%, mientras que el de vestibulotoxicidad ocurre en aproximadamente 15% de los pacientes administrados con AGs (Rybak y Ramkumar, 2007).

No existe acumulación de los AGs en el oído interno pues la concentración en este tejido no sobrepasa la concentración del antibiótico en plasma. Sin embargo, la vida media de los aminoglicósidos es cinco veces mayor en los líquidos óticos (endolinfa y perilinfa) que en plasma, persistiendo aún 6 meses posteriores a su administración. El efecto ototóxico ocurre por la destrucción directa de las células pilosas exteriores en el órgano de Corti y las células pilosas sensoriales tipo I en el órgano vestibular. El daño coclear se manifiesta como pérdida de la audición comenzando desde la base de la cóclea, hasta el ápice y finalmente el nervio auditivo. Por esta razón, se pierde primero la audición de los sonidos de alta frecuencia. Por otro lado, el daño vestibular se manifiesta por vértigo y ataxia. La ototoxicidad puede ocurrir días o semanas después de suspender el tratamiento. A diferencia del daño renal, la ototoxicidad es permanente, ya que las células del oído interno son incapaces de regenerarse. La incidencia está directamente relacionada con la dosis diaria y la duración del tratamiento (Rodríguez-Álvarez, 2002). El uso de AGs durante periodos de tiempo extendidos, de 30 o más

días, provoca la muerte de las células pilosas. Sin embargo, en individuos con hipersensibilidad estos efectos se ven en tratamientos de corta duración y con dosis terapéuticas (Silva y Carvalho, 2007). Los AGs presentan diferente toxicidad: la amikacina, la neomicina, la kanamicina, la dihidroestreptomicina y en menor medida la netilmicina son primordialmente cocleotóxicos; mientras que la estreptomicina es vestibulotóxica. La gentamicina y la tobramicina, por su parte, presentan ambos efectos.

Los mecanismos moleculares que culminan en la toxicidad aún no se conocen completamente. Sin embargo, se han involucrado tres fenómenos: 1) Formación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno; 2) Sobreactivación de receptores glutamatérgicos de N-metil-D-aspartato (NMDA); y 3) Interrupción de la síntesis de proteínas en la mitocondria. A continuación se describen estos procesos brevemente.

1) Formación de Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno (EROs y ERNs).

Los AGs forman complejos con hierro capaces de interactuar con los lípidos de la membrana como el ácido araquidónico. Esto promueve la formación de EROs y lipoperoxidación de la membrana plasmática, lo cual concuerda con lo observado en las etapas tempranas en tejidos del oído interno (Selimoglu, 2007). Los radicales libres activan a JNK que se transloca al núcleo activando genes de muerte celular. A su vez, éstos se translocan a la mitocondria, provocando la apertura del poro de permeabilidad y pérdida del potencial membranaral mitocondrial. Entonces se libera citocromo *c* de la mitocondria el cual activa la apoptosis por medio de caspasas (Rybak y Ramkumar, 2007; Selimoglu, 2007; Aguilar-Maldonado y Meza, 2008; Guthrie, 2008).

La participación de las especies reactivas en la ototoxicidad debida a AGs es apoyada por varios estudios. Al administrar quelantes de hierro (defroxamina, dihidroxibenzoato) y antioxidantes (ácido lipóico, *d*-metionina) conjuntamente con los

AGs se observa un efecto protector de las células pilosas (Guthrie, 2008). En un estudio clínico se administró aspirina durante 14 días, observando una disminución de la incidencia de ototoxicidad en pacientes tratados con gentamicina. Los salicilatos, son quelantes de hierro y de radicales libres, lo que explicaría el efecto observado (Rybak y Ramkumar, 2007). En el epitelio del sistema vestibular también se ha registrado aumento de la actividad de la Sintasa de Óxido Nítrico (NOS) al aplicar AGs (Mercado y col, 2007; Aguilar-Maldonado y Meza, 2008). También se observa resistencia a la toxicidad por AGs en animales que sobreexpresan la enzima superóxido dismutasa con respecto a los controles (Rybak y Ramkumar, 2007). Por otro lado, el nivel de glutatión (GSH) en las células pilosas externas es menor que el observado en otras células del órgano de Corti. Esto correspondería con la muerte de estas células, comparada con la supervivencia de las células pilosas internas (Aguilar-Maldonado y Meza, 2008).

## 2) Sobreactivación de receptores glutamatérgicos de N-metil-D-aspartato (NMDA).

Los AGs interactúan con el sitio modulador de poliaminas del receptor de NMDA ya que son semejantes a las poliaminas endógenas por su carácter policatiónico. Tienen un efecto agonista de las poliaminas, con efecto excitotóxico final. Al aumentar la dosis del AG aumenta la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por la activación de los canales asociados a los receptores NMDA. Esto aumenta la degeneración de células pilosas y fibras nerviosas cocleares (Selimoglu, 2007).

## 3) Interrupción de la síntesis de proteínas en la mitocondria

Los AGs también se unen al ARNr de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial 12S en el sitio A en un mecanismo no totalmente conocido al cual nos hemos referido anteriormente (Sección 1). Probablemente, al entrar a las células eucariotes los AGs son atraídos hacia la mitocondria por su potencial transmembranal,

debido a que poseen cadena respiratoria al igual que las bacterias. Se ha observado hipersensibilidad al tratamiento con AGs en el gen de ARNr 12S. Este fenómeno se detalla en secciones posteriores de esta tesis.

## 4.- Antecedentes

### 4.1 Deficiencia Auditiva. Definición y Clasificación

La deficiencia auditiva es uno de los impedimentos sensoriales más comunes, con una frecuencia de al menos 1/1000 individuos al nacer a nivel mundial (2/1000 en la población mexicana), mientras que a la edad de 80 años alrededor del 50% ha desarrollado pérdida de la audición lo suficientemente severa para inhabilitar la comunicación (Kokotas y col, 2007). Consiste en la pérdida de la audición, ya sea total o parcial (dependiendo del rango de frecuencias en que se encuentre). Puede clasificarse de varias maneras dependiendo del criterio que se considere (Willems, 2000):

- *Con respecto al desarrollo del lenguaje:* Prelingual o Poslingual.
- *Etiología* (Genético o Ambiental). En caso de deberse a origen *genético* se refiere a cambios heredables, y presentes desde el nacimiento, aunque no se presenten siempre fenotípicamente desde esa etapa. Los de origen *ambiental* se deben a agentes externos al individuo e incluyen ruido, traumatismos, malformaciones, infecciones o los efectos propios del envejecimiento (presbiacusis).
- *Severidad de la deficiencia.* Se refiere al rango de niveles o umbrales al sonido que es afectado; se clasifica generalmente en 5 grados: medio (20-39 dB), moderado (40-54 dB), moderado severo (55-69 dB), severo (70-89 dB), y profundo (90dB o más); considerándose <20 dB el nivel normal (Li y col, 2005).
- *Fisiología* (Conductiva o Neurosensorial): *Conductiva* se refiere a daños en el oído externo o medio que inhiben la conducción de las ondas a través del oído; por ejemplo traumatismos, malformaciones, incorrecta relación de los huesecillos del oído medio, etc. La de tipo *neurosensorial*

se debe a daño del VIII nervio craneal o vestíbulo-coclear, las células pilosas del órgano de Corti en el oído interno, o las regiones auditivas del cerebro, en cuyo caso las ondas son recibidas pero no pueden interpretarse.

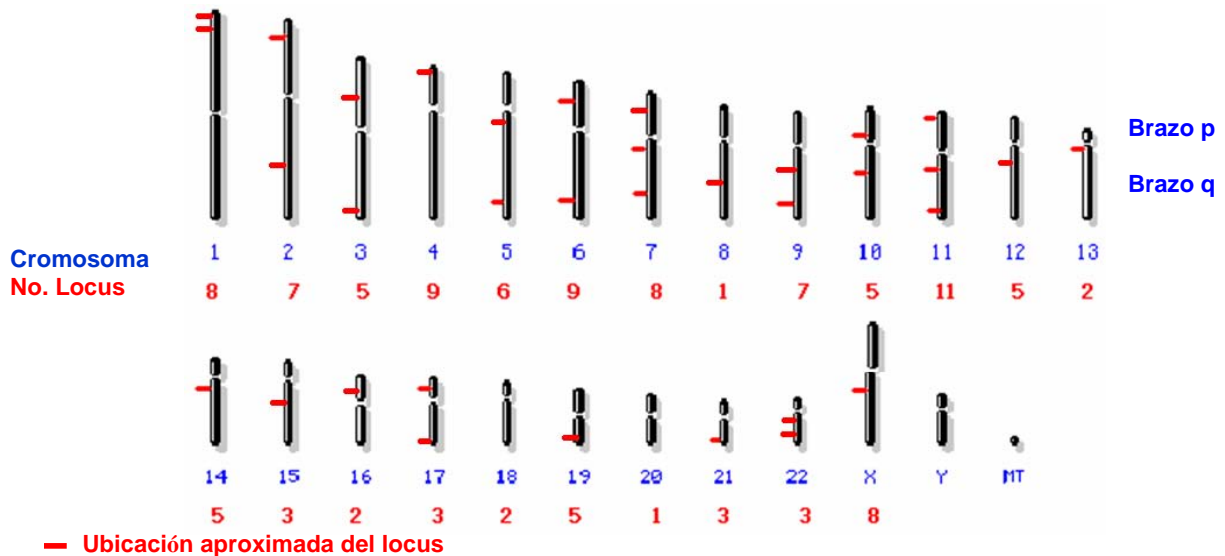
- *Aparición de otros síntomas* (Sindrómica o No sindrómica). Se llama *sindrómica* cuando la sordera es un síntoma adicional a otros causado por defectos en el ADN. Los síntomas son principalmente neurológicos, musculares u ópticos. Entre estas enfermedades se encuentran: *KSS* (Síndrome de Kearns-Sayre), *MERRF* (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers), *MELAS* (Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes) y *MIDD* (Maternally Inherited Diabetes and Deafness) (Hereditary Hearing Loss Homepage. <http://hereditaryhearingloss.org>). Se le llama *No-Sindrómica* cuando el síntoma principal es la deficiencia auditiva sin que se acompañe por otros síntomas (Van Camp y Smith, 2000).

#### **4.2 Deficiencia auditiva neurosensorial no sindrómica de origen genético**

Estas clasificaciones pueden unirse para describir de manera más adecuada y precisa el tipo de deficiencia auditiva presente. La sordera no sindrómica puede deberse a mutaciones en genes nucleares y/o mitocondriales. En el caso de la sordera genética no sindrómica prelingual entre 70-75% es de origen autosómico recesivo, 20-25% autosómico dominante, y <5% ligado al cromosoma X (Kokotas y col, 2007). Se han identificado más de 50 genes nucleares y más de 100 locus relacionados con deficiencia auditiva genética neurosensorial en todos los cromosomas, a través de análisis de ligamiento. La naturaleza de estos genes varía grandemente, e incluye factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, miosinas, proteínas de matriz extracelular,



y canales (Piatto y col, 2005). En la figura 8 se muestran las ubicaciones aproximadas de algunos de los loci relacionados con la sordera no sindrómica por análisis de ligamiento. Se observa que en la mayoría de los cromosomas se ha relacionado más de una región con este padecimiento.



**Figura 8.** Loci relacionados a sordera no sindrómica por medio de análisis de ligamiento, presentes en todos los cromosomas del ADN nuclear humano. Información obtenida de Van Camp y Smith, Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org>

También se ha estudiado el papel del ADN mitocondrial en el desarrollo de deficiencia auditiva (DA). En el caso de DA de establecimiento prelingual sólo <1% de los casos se deben a mutaciones en el ADN mitocondrial. Notoriamente, en la población caucásica, al menos 5% de la DA no sindrómica poslingual es provocada por mutaciones en el ADN mitocondrial. Esto representa la causa más frecuente de pérdida de la audición después de la mutación 35delG (delección de G en el nucleótido 35) en el gen GJB2 (gap junction binding protein 2) de la conexina 26 (Kokotas y col, 2007), y por esto resulta de gran importancia su estudio. Las mutaciones reportadas en el ADNmt se encuentran en 2 genes: MTRNR1 (ARN de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial 12S) y MTTS1 (ARNt de serina (UCN)). Éstos se encuentran

involucrados en la síntesis de proteínas mitocondriales, afectando el metabolismo celular. Ya que el establecimiento del padecimiento no se da desde la niñez se supone que éste es un fenómeno multifactorial, lo cual ha sido confirmado posteriormente a partir de varios estudios.

#### **4.3 Participación del Genoma Mitocondrial. Breve Descripción del Cromosoma**

##### **Mitocondrial**

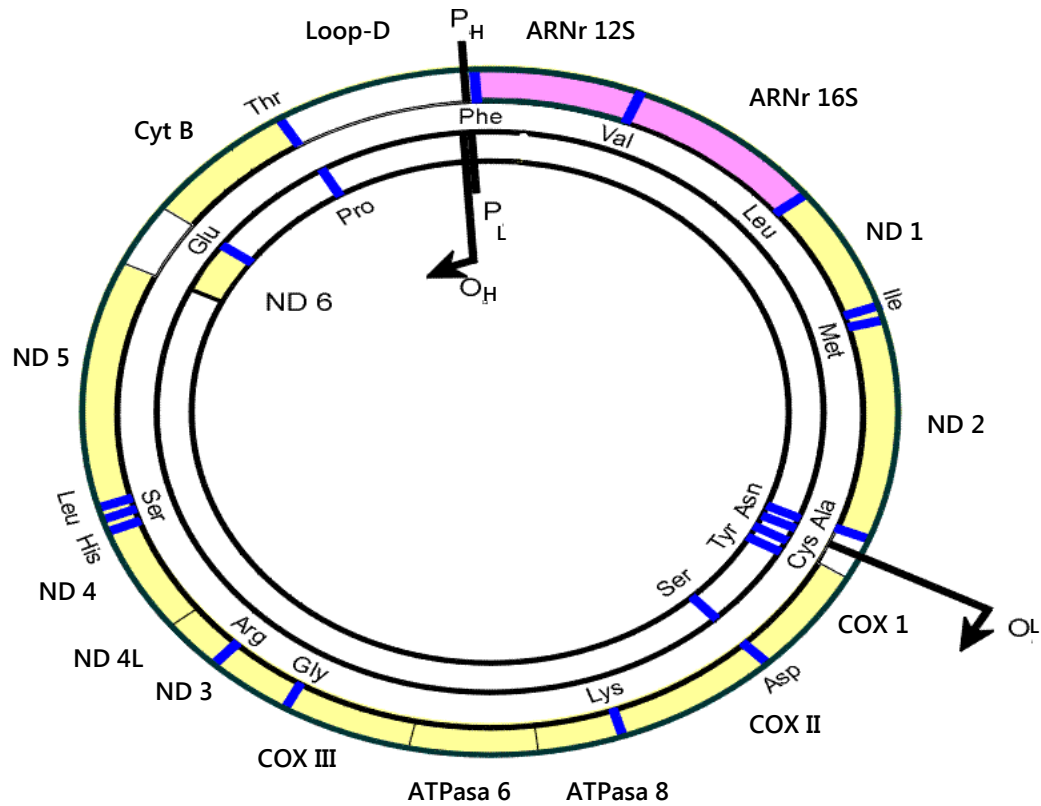
Las mitocondrias son organelos citoplasmáticos presentes en la mayoría de las células eucariotas. El número de mitocondrias presentes en cada célula depende de las necesidades energéticas del tejido al que pertenezcan. Su tamaño es entre 0.5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, mas continuamente cambian de forma, fusionándose y separándose para realizar los procesos metabólicos requeridos. Las partes que las conforman son: membrana externa, espacio intermembranal, membrana interna, matriz y crestas mitocondriales. Cada una de éstas posee características que les permiten cumplir funciones específicas (Alberts y col, 2002)

La principal función de las mitocondrias es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs, beta-oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa, que es dependiente de la cadena transportadora de electrones. El ATP producido en la mitocondria representa un porcentaje muy alto del ATP total sintetizado por la célula. La mitocondria posee toda la maquinaria necesaria para la replicación, transcripción y traducción de sus componentes para poder llevar a cabo estas funciones. Éstos se encuentran codificados tanto en el ADN nuclear como en el mitocondrial. El ADNmt es heredado de la madre desde la fecundación del óvulo y su regulación es independiente del ADN nuclear.

La organización y composición del ADN mitocondrial difiere de la del nuclear. El ADNmt se encuentra adherido a la membrana interna, junto con algunas helicasas, factores de transcripción, proteínas de unión al ADN y ADNpol $\gamma$  entre otros factores, ‘empacado’ en complejos que se conocen como nucleoides (Montoya, 2005). En mamíferos el ADN mitocondrial es circular. Cada mitocondria puede poseer entre 2-10 moléculas de ADN, y puede haber incluso 1,000 mitocondrias por célula (por ejemplo, en el hígado de rata), dando un total de hasta 10, 000 copias de ADNmt. Sin embargo, no todas las copias son idénticas en secuencia (homoplasmía), sino que pueden coexistir diferentes poblaciones con cambios puntuales o rearrreglos mayores. Esto provoca un fenómeno denominado heteroplasmía. En este caso, una mutación que altere la función de un gen puede no manifestarse como fenotipo si hay otras copias sin mutación que compensen a la deficiente. Por esto, se piensa que en caso de heteroplasmía la relación de moléculas mutadas/moléculas sanas debe pasar un umbral para manifestarse fenotípicamente (Alberts y col, 2002).

El cromosoma mitocondrial humano consta de 16,569 pares de bases. Casi todas las bases forman parte de algún gen, excepto por una zona no codificante de 1,100 pb donde se encuentra el origen de replicación de la cadena pesada (O<sub>H</sub>), promotores, y elementos reguladores de la expresión del ADNmt. Además, las dos hebras se transcriben, dando origen a diferentes productos. De los 37 genes codificados 2 corresponden a los ARNs de las subunidades ribosomales (12S y 16S); 22 son ARNs de transferencia; y 13 son polipéptidos de los complejos de la cadena respiratoria: CI- NaDH: ubiquinona reductasa (7/46 genes, codificados en ADNmt), CIII- ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa (1/11), CIV- citocromo c oxidasa (3/13), CV- ATP sintasa (2/16) (Montoya, 2005). La disposición de los genes mitocondriales se muestra en la figura 9.

En ninguna de las proteínas del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se han encontrado mutaciones o rearrreglos grandes relacionados con la Deficiencia Auditiva Neurosensorial No-Sindrómica. Sólo se han relacionado hasta ahora, algunas mutaciones puntuales en los genes de ARNr 12S y ARNt Ser (UCN).



**Figura 9. Esquema del cromosoma mitocondrial humano.** Se muestran los productos de cada hebra del ADNmt; adentro: cadena ligera, afuera: cadena pesada. En *amarillo*: genes que codifican las proteínas de los complejos OXPHOS; *azul*: ARNt; *rosa*: ARNr.  $O_H$  y  $O_L$  indican la posición de los orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera del ADNmt, respectivamente.  $P_H$  y  $P_L$  indican los promotores de transcripción de cada cadena. Disponible en: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514255674/html/x287.html>

#### 4. 4 Mutaciones en el ADN mitocondrial relacionadas con Deficiencia Auditiva No Síndrómica

En diferentes grupos étnicos se han reportado mutaciones en la secuencia del ADN mitocondrial que predisponen para el desarrollo de deficiencia auditiva no síndrómica esporádica o inducida por tratamiento con AGs. Las mutaciones se encuentran en el gen

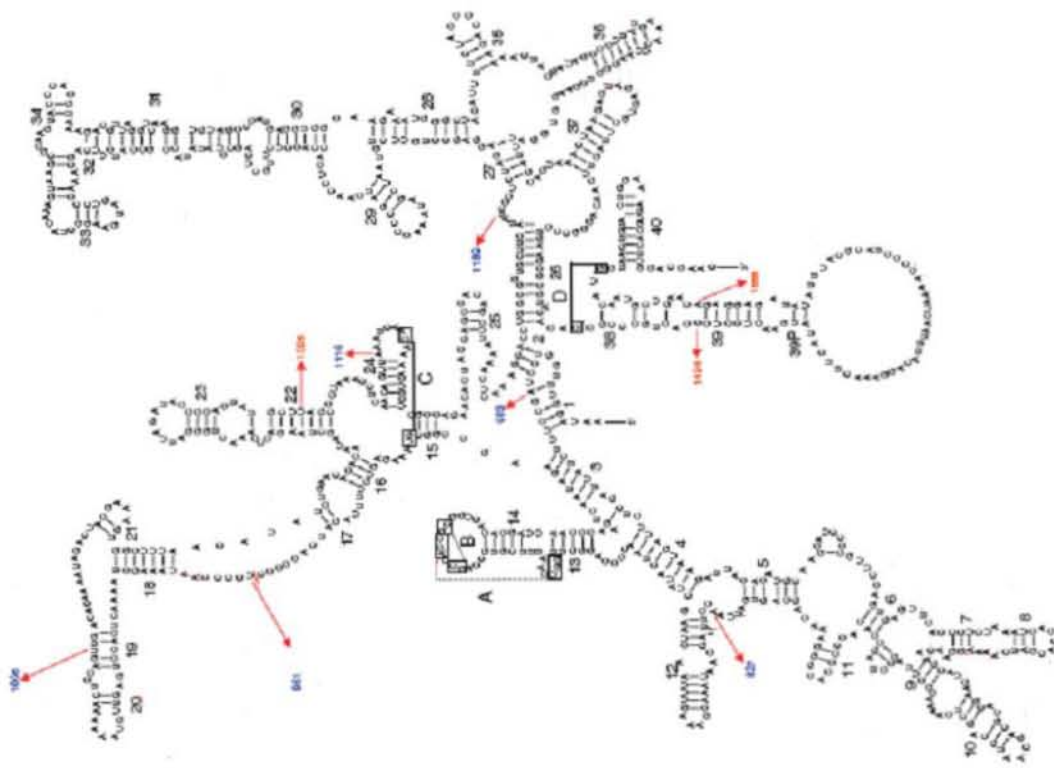
de ARNt Ser (UCN) y el ARNr 12S como se mencionó anteriormente (Kokotas y col, 2007). En el gen del ARNt Ser(UCN) se han encontrado las siguientes mutaciones:

- **A7445G**. Presente en homoplasmía/heteroplasmía. Penetrancia intrafamiliar variable. Se encuentra en el codón de término de COX1 en la cadena pesada (UGA→UGG). Afecta el procesamiento del ARNt Ser (UCN) y ND6 en la cadena ligera (Kokotas y col, 2007).
- **7472insC**. Presente en homoplasmía/heteroplasmía >95%. Deficiencia auditiva progresiva. Se localiza en una región de 6-7 G's que alteran el brazo T $\psi$ C del ARNt, provocando la disminución de éste sin afectar la traducción proteica (Van Camp y Smith, 2000).
- **T7510C y T7511C**. Presente en homoplasmía/heteroplasmía > 95%. Deficiencia auditiva progresiva. Afectan la estructura del brazo aceptor del ARNt (Van Camp y Smith, 2000).

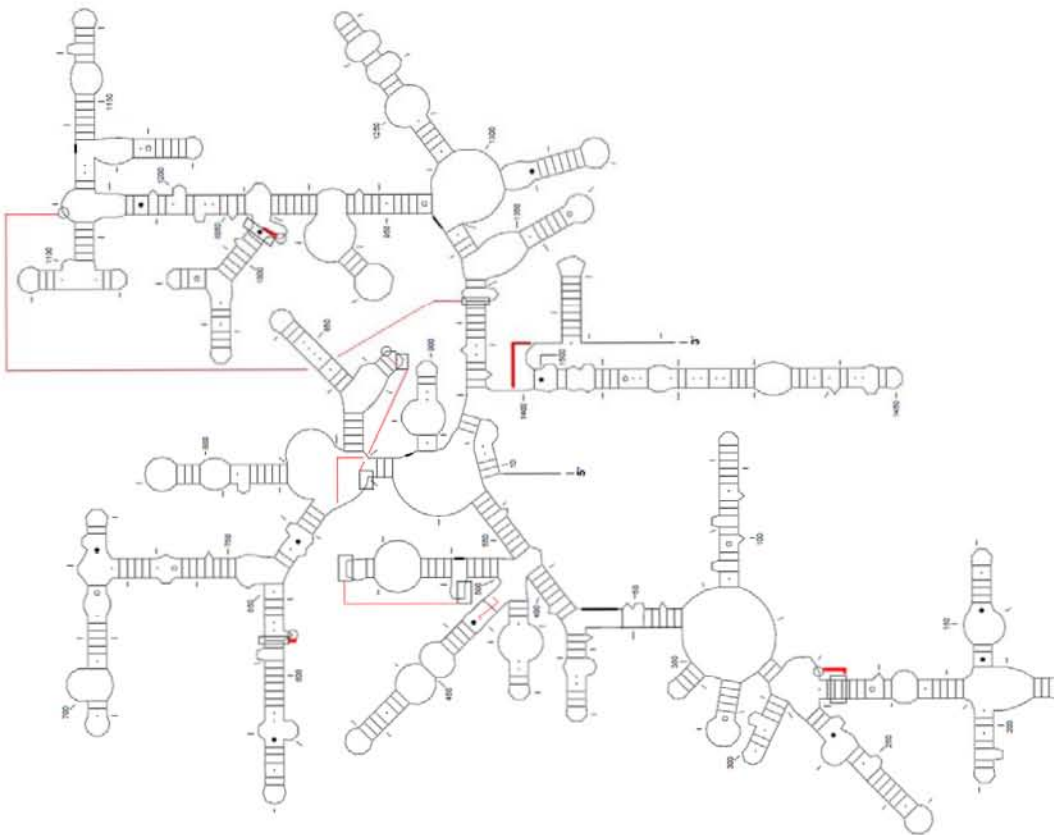
En el caso del ARNr 12S se han encontrado más mutaciones que provocan deficiencia auditiva neurosensorial (MITOMAP. Recuperado en octubre de 2010: <http://www.mitomap.org/MITOMAP>). La figura 10 muestra la estructura secundaria del gen 12S y la ubicación de estos cambios:

- **A827G**. Este cambio se encuentra en el sitio A del ribosoma; corresponde a una posición altamente conservada en bovino, ratón, *Xenopus laevis* y humano (Li y col, 2005). La penetrancia es incompleta, aunque se ha relacionado con ototoxicidad inducida por AGs. Li y col. detectaron este cambio en homoplasmía, en 2/60 pacientes pediátricos chinos con deficiencia auditiva inducida por AGs, y en 3/68 con diferentes grados de deficiencia auditiva no sindrómica. Algunos autores dicen que se trata de un polimorfismo propio de las poblaciones asiáticas, donde se ha reportado (Yao y col, 2006).

a)



b)



**Figura 10. Esquema comparativo de la estructura secundaria del ARNr de la subunidad pequeña.** Izquierda. Estructura secundaria del ARNr 12S mitocondrial humano. Se indica la posición de las variantes comentadas en el texto. Modificada de Ruiz-Pesini y Wallace, 2006. Derecha. Estructura secundaria del ARNr 16S de *Escherichia coli*. (Comparative RNA Website and Project: <http://www.ma.cccb.utexas.edu/>)

- **961delT/insC.** Se trata de la delección de una T y la inserción de un número variable de Cs. Se encontró 2% de frecuencia en pacientes; puede haber alta prevalencia. Se ha reportado en homoplasmía y en heteroplasmía (Kokotas y col, 2007). En la población china se analizaron 35 casos no relacionados con deficiencia auditiva sin mutación A1555G, y se halló en heteroplasmía en 1 paciente (Bacino y col, 1995). Li y col encontraron también 2 individuos con este cambio que presentaban DA severa.
- **T961C.** Homoplásmica, hallada en 5 niños chinos no relacionados, con DA moderada (Kokotas y col, 2007).
- **T1095C.** Confirmada. Se presenta tanto en homoplasmía como en heteroplasmía. Identificada en 4 pacientes chinos con DA inducida por AGs y DA no sindrómica en homoplasmía; 1 individuo chino con neuropatía auditiva; en una familia italiana con neuropatía, parkinsonismo y ototoxicidad y otra con DA por herencia materna (Bindu y Reddy, 2008). La presencia de esta mutación en familias no relacionadas sugiere fuertemente que está involucrada en el desarrollo de DA. La transición de T a C modifica una base conservada filogenéticamente en la horquilla de la hélice 25 del ARNr 12S (Li y col, 2005).
- **T1005C y A1116G.** Probables. Variantes encontradas en 2 pacientes pediátricos chinos en homoplasmía que desarrollaron DA no sindrómica. No se encontró en 144 controles analizados (Li y col, 2005).
- **C1494T.** Homoplasmía. Zhao y col en 2004 caracterizaron una familia China grande con deficiencia auditiva no sindrómica e inducida por AGs. En ausencia de los antibióticos, algunos de los miembros desarrollaron sordera progresiva y de establecimiento tardío, con amplia variación en la severidad y edad del

establecimiento. Cuando se les administró AGs la edad de establecimiento fue más temprana, y la DA fue más severa. Analizando la secuencia del ADNmt se encontró el cambio C1494T en homoplasmía. Esta mutación se encuentra en la hélice 44, responsable de la decodificación y selección del ARNt correcto durante la traducción. Normalmente, se forma el par C1494-1555A, pero en presencia del cambio se forma la interacción canónica U1494-1555A (lo mismo que sucede con la mutación A1555G: C1494-1555G), modificando la hélice y sensibilizándola al efecto de los AGs. Pruebas bioquímicas de consumo de oxígeno con células linfoblastoides de individuos con C1494T sintomáticos, asintomáticos, y controles, mostraron disminución y retraso del crecimiento en las células mutantes. Sin embargo, también se observaron diferencias entre los individuos sintomáticos y asintomáticos portadores.

- **A1555G.** Confirmada. Fue la primera mutación reportada y la más estudiada hasta ahora, como asociada con deficiencia auditiva neurosensorial no sindrómica. Prezant y col (1993) llevaron a cabo los primeros estudios, donde analizaron varias familias con sordera neurosensorial no sindrómica: por herencia materna, inducida por el uso de AGs, y una familia árabe-israelí en la cual algunos miembros desarrollaron sordera a edad temprana. Ya que en cada familia todos los miembros afectados tenían un ancestro femenino común, y no había deleciones/inserciones/rearreglos grandes en el ADN nuclear, se analizó el ADN mitocondrial de las familias con hipersensibilidad a AGs. Puesto que el blanco original de los aminoglicósidos es la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano, se secuenció el ARNr 12S de varios miembros en las familias y 278 controles con diferente fondo genético (138 asiáticos, 60 árabes-israelíes, 55 caucásicos, 25 negros). Se encontraron 3 cambios (A663G, A1763G y A1555G),



pero únicamente A1555G estaba presente en 3 sordos no relacionados en homoplasmía y en ninguno de los controles. En el ADNmt de la familia árabe-israelí se encontraron muchos cambios, mas A1555G fue el único común en todas las familias estudiadas (árabe-israelí y las hipersensibles a aminoglicósidos). El mecanismo postulado desde ese momento fue que esta mutación se encuentra en el sitio A ribosomal, cerca de la interfase con la subunidad grande. Los AGs unen esta región y estabilizan los ARNt no apareados correctamente, afectando la síntesis de proteínas. Los AGs, que generalmente no unen ribosomas eucariontes pueden unirse a esta región porque esta mutación estrecha el tallo de la hélice, que generalmente está abierto en eucariontes, asemejándolo al bacteriano (Fig. 11). La hélice donde se encuentra esta mutación corresponde a la H44 en bacterias, la cual ha sido ampliamente involucrada en la codificación y selección del ARNt correcto durante la traducción (Wimberly y col, 2000). Más tarde, se analizaron diferentes poblaciones, confirmando la presencia de esta mutación en diferentes fondos genéticos (Fischel-Ghodsian y col, 1997), y en diferentes frecuencias (Pandya y col, 1999; López-Bigas y col, 2000; Gallo-Terán y col, 2002).

Aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual estas mutaciones provocan sordera. En todos los casos, aunque la mutación se encuentre en homoplasmía, y la mayoría de ellas se han localizado al sitio A del ribosoma, la penetrancia es incompleta. Por esta razón, deben existir factores que modifiquen la expresión fenotípica de las mutaciones mitocondriales.

## 4.5 Factores que modifican la penetrancia de las mutaciones mitocondriales.

### Modelo de '2 Hits'

Debido a la penetrancia incompleta de las mutaciones mitocondriales relacionadas con la deficiencia auditiva no sindrómica e inducida por AGs, se ha propuesto un modelo llamado de '2-Hits', para desarrollar el padecimiento (Prezant y col, 1993). Los cambios en el ADN mitocondrial son necesarios pero no suficientes, y se requiere de factores adicionales que pueden ser de carácter *genético* o *ambiental*. Entre los factores *genéticos* están: la presencia de mutaciones adicionales en el ADN nuclear y/o mitocondrial y la presencia de genes modificadores. Entre los *ambientales* se conoce el uso de antibióticos aminoglicósidos.

#### 4.5.1 Factores Genéticos

- *Mutaciones en el ADN mitocondrial.* En ocasiones los individuos con A1555G desarrollan deficiencia auditiva con edad de establecimiento y severidad variable, aún sin el uso de AGs. En algunos individuos se han encontrado varias mutaciones simultáneas en el ADNmt, en el ARNt Ser (UCN). Pandya y col, encontraron los cambios A7443G, A7445G, A7444G junto con A1555G en algunos casos en estudiantes sordos de Mongolia. No se ha comprobado su efecto.
- *Mutaciones en el ADN nuclear.* Guan y col, (1996) evaluaron el papel del fondo nuclear en la manifestación de la mutación A1555G por pruebas bioquímicas. De la familia árabe-israelí antes estudiada, tomaron pacientes sintomáticos y asintomáticos, e individuos sin mutación. Realizaron pruebas de tiempos de duplicación, síntesis y marcaje de proteínas mitocondriales, consumo de oxígeno total y por complejos y sensibilidad a AGs. Se encontraron diferencias entre los tres grupos, y también entre sintomáticos y asintomáticos, demostrando que el

fondo genético es importante. En un estudio posterior (Guan y col, 2001) se transfirieron las mitocondrias de pacientes sintomáticos y asintomáticos a células  $\rho^0$  206 (sin mitocondrias) para evaluar el efecto propio de la mutación A1555G. En este estudio no se hallaron diferencias significativas entre los individuos sintomáticos y asintomáticos.

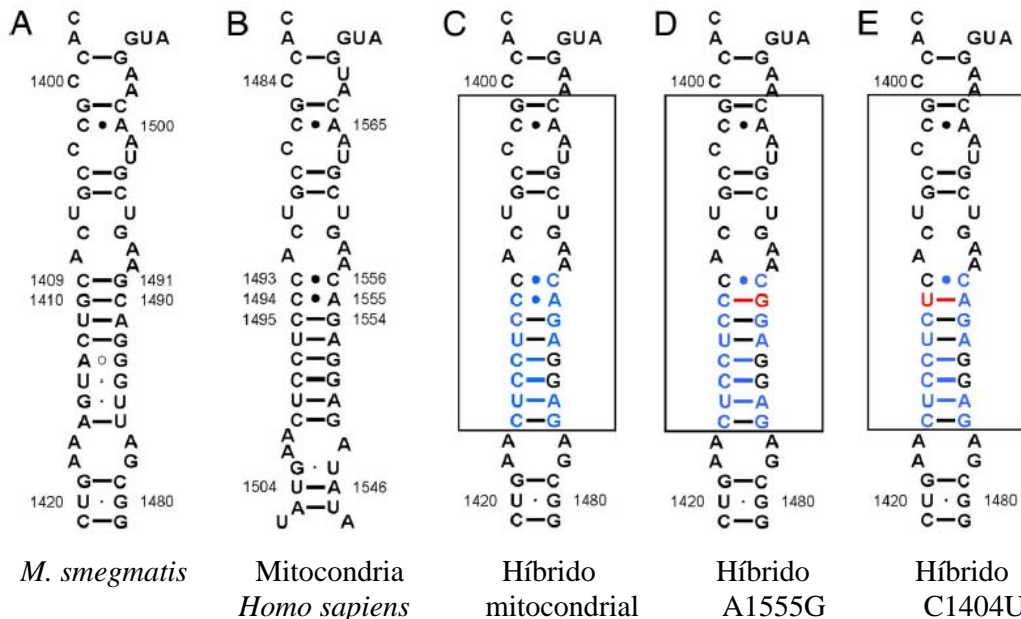
- *Genes Modificadores.* Dados los resultados anteriores, se han realizado varios estudios genéticos de análisis de ligamiento para determinar genes nucleares que modifiquen la penetrancia de las mutaciones mitocondriales. Riazuddin y col (2000), analizaron una familia pakistaní grande seleccionando a los miembros con sordera neurosensorial, congénita, profunda, no sindrómica. Entre los individuos que presentaban el marcador para DFNB26 (4q31) se observó la cosegregación de otra región (DFNM1-1q24), la cual modificaba la severidad del padecimiento. Uno de los factores más estudiados es h-mtTFB1. Se encontró por ligamiento que la región donde se encuentra este factor modifica el fenotipo de A1555G al analizar familias de varios fondos genéticos, confiriendo un efecto protector (Bykhovskaya y col, 2004a). Realizando estudios posteriores, se encontró que h-mtTFB1 es un homólogo funcional de la metilasa de ksgA que modifica el N6 de adeninas en el ARNr de *E. coli* cerca del sitio decodificador (Seidel-Rogo y col, 2002); además, h-mtTFB1 activa la transcripción del ADNmt (Falkenberg y col, 2002; Cotney y col, 2007) a través de unir el extremo C' terminal de la polimerasa h-mtTFA (McCulloch y Shadel, 2003). Por esto, se ha propuesto que las proteínas ribosomales o involucradas en el procesamiento transcripcional o posterior de los ARNr pueden funcionar como modificadores. Se han propuesto algunos candidatos: *h-mtTFB2*, parecido a h-mtTFB1; *MTO1*, *GTPB3* (Bykhovskaya y col, 2004b) y *TRMU* (Yan y col, 2006) que son

homólogos de modificadores de bases de ARNs t en levadura; y algunas isoformas de *MRPS18CP2* que es una proteína componente del ribosoma mitocondrial (Ballana y col, 2007).

#### 4.5.2 Factores Ambientales

- *Aminoglicósidos*. El blanco natural de los AGs es el ARNr del sitio A en la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano; éste es un sitio conservado filogenéticamente. Notoriamente, las mutaciones antes mencionadas se han encontrado en familias que presentan deficiencia auditiva inducida por AGs, o en las que el padecimiento es más severo al tratarse con estos antibióticos. Esto hace del gen de ARNr 12S mitocondrial un gen de estudio muy importante. Los AGs muestran especificidad, afectando los ribosomas bacterianos, pero no a los eucariotes citosólicos. Hobbie y col (2007), intercambiaron un fragmento del sitio decodificador bacteriano, por el de varios eucariotes y realizaron pruebas bioquímicas para evaluar la función de los ribosomas híbridos. Utilizando técnicas de biología molecular intercambiaron un fragmento de la H44 de *M. smegmatis* y pusieron la secuencia correspondiente de *Blastocrithidia*, *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Homo sapiens*. Al evaluar las funciones en presencia de diversos AGs, los de *M. smegmatis* y *Blastocrithidia* fueron sensibles, mientras que los de *Leishmania* y *Trypanosoma* fueron menos afectados, y *Homo sapiens* resistió; además mostrando que este sitio funciona de manera independiente. Posteriormente, utilizando este método se probaron ribosomas híbridos con 34nt centrales del ribosoma mitocondrial humano. Como se observa en la figura 11, estos sitios difieren sólo en unas bases. Aunque la procesividad no se ve afectada, la fidelidad de la traducción disminuye siendo A1555G el más afectado (fidelidad: nativo > C1494T > A1555G) (Hobbie y col,

2008). Se propone que estas dos mutaciones hacen que el sitio decodificador se asemeje más al bacteriano formando una interacción canónica entre las bases. Esto permite la unión de los AGs al ribosoma, lo que no sucede generalmente. Al unirse, los AGs estabilizan la conformación ‘encendida’ como se mencionó anteriormente en bacterias (págs. 10-12).



**Figura 11. Comparación de la estructura secundaria del ARNr sitio A decodificador en la subunidad pequeña mitocondrial.** A) H44 del ARNr 16S de *M. smegmatis*. B) Secuencia homóloga del ARNr 12S mitocondrial humano. C-E) ARNr del sitio decodificador de ribosomas híbridos humano-bacteria. La región transplantada se muestra en la caja, y los residuos únicos de humano en azul Tomado de Hobbie y col. 2008.

#### 4.6 Usos de los AGs en México y entidades nosológicas tratadas con éstos

Los AGs se utilizan en el tratamiento de: posible bacteremia, infecciones en quemaduras, endocarditis infecciosa (apendicitis, diverticulitis, colecistitis, peritonitis), fiebre y neutropenia, tuberculosis (Rodríguez-Álvarez, 2002; Silva y Carvalho, 2007), en el 84% de niños prematuros con infecciones de idiopatía desconocida, generando un muy alto riesgo de hipoacusia.

#### **4.7 Estudios recientes en el laboratorio**

En México, la prevalencia de tuberculosis es muy grande y el tratamiento de elección son los AGs. Debido al tratamiento prolongado los pacientes presentan reacciones adversas y en algunos casos hipersensibilidad. En el laboratorio estamos interesados en averiguar si existen mutaciones que se relacionen con hipersensibilidad a los aminoglicósidos en la región 12S del ARNr mitocondrial por su importante participación en la síntesis de proteínas. Por esta razón se estableció una colaboración con el Servicio de Audiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Ellos seleccionaron 3 grupos de individuos, según pruebas vestibulares y audiológicas realizadas:

- a) Individuos sanos sin tratamiento. No presentan alteraciones en las funciones vestíbulo-auditivas.
- b) Individuos tratados con AGs que presentan alteraciones vestíbulo-auditivas.
- c) Individuos no tratados, con sordera o alteraciones vestibulares

A estos individuos se aisló el ADN y se amplificó la región 12S del ARNr mitocondrial para identificar los cambios en la secuencia nucleotídica. Así, se intentó establecer alguna relación entre los cambios encontrados y los daños en la función vestíbulo-auditiva. De acuerdo con estos resultados se podrían hacer recomendaciones para la clínica.

En el laboratorio se analizaron algunos individuos pertenecientes a estos grupos a través de PCR-RFLP para detectar las mutaciones ya reportadas. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos para la presencia de estas mutaciones. Ni siquiera se encontró A1555G, la cual ha sido reportada en varias poblaciones con diferentes fondos étnicos. La técnica de PCR-RFLP es limitada pues es necesario conocer los cambios en la secuencia y su posición en ésta. Además, se requiere que este cambio modifique un

sitio de restricción. Posteriormente se analizó todo el gen de ARNr 12S por secuenciación automática, lo que resultó en la detección de 2 cambios en la región 5', y uno en la región cercana al extremo 3'; sin embargo, esto resulta muy costoso. Por estas razones, en el presente trabajo se utilizó la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (EGGD). Esta técnica permite detectar cambios puntuales en fragmentos de igual longitud. Utiliza un gradiente de químicos que desnaturalizan los diferentes dominios del fragmento dependiendo de su  $T_m$  y por tanto, de su secuencia.

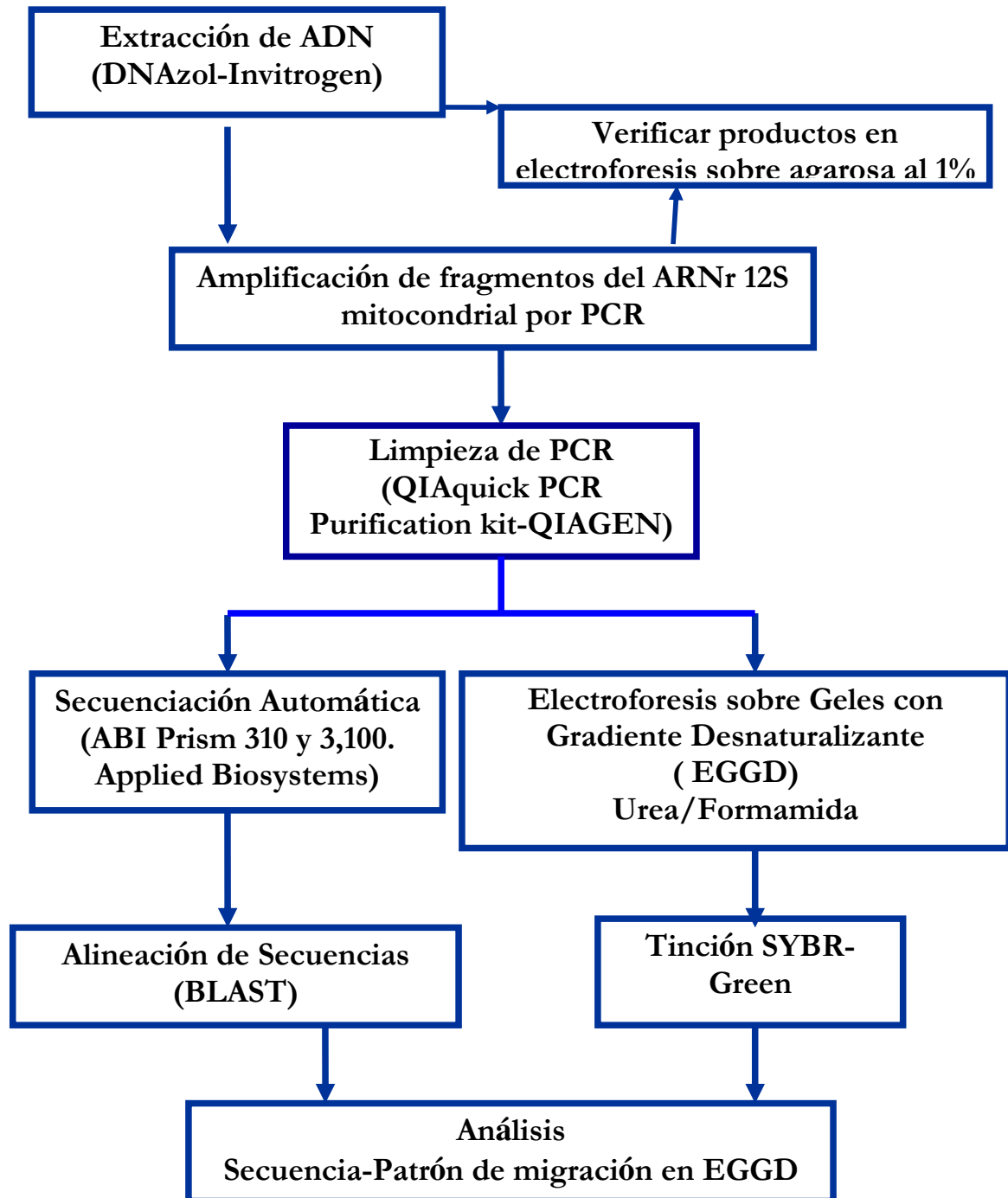
## 5.- Objetivos

Proponer el uso de EGGD para análisis de mutaciones en el gen del ARNr 12S mitocondrial humano en la población mexicana sana o con deficiencia auditiva y tratamiento de aminoglicósidos.

- Realizar la purificación del ANDmt de sangre periférica y la amplificación del gen del ARNr 12S mitocondrial
- Determinar las variantes presentes en la población analizada por secuenciación automática.
- Determinar el protocolo de EGGD para detectar cada una de las variantes encontradas.



## DISEÑO EXPERIMENTAL



## **6.- Materiales y Métodos**

A continuación se describen las técnicas utilizadas para el presente trabajo. El fundamento teórico de las mismas se encuentra en el Anexo 1.

### **6.1 Muestras**

La obtención de las muestras se realizó con la colaboración de la Dra. Carmen Tirado del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Se extrajo sangre periférica de los individuos procurando tener su historial clínico. Se utilizaron tubos con EDTA (marca *BD Vacutainer. K2 EDTA*) que es una solución de sales sódicas y potásicas del ácido etilendiaminotetracético (Especialidades Diagnósticas IHR Ltda.). Éste secuestra el calcio, interrumpiendo la cascada de señalización responsable de la coagulación de la sangre (Fink, y col., 2007). Las muestras se mantuvieron en congelación hasta su uso para extraer el ADN

Para evaluar la función auditiva se utilizó un Audiómetro AC40 de Interacoustics ®. Para evaluar la función vestibular se utilizaron pruebas térmicas, de acuerdo a la metodología de Fitzgerald y Hallpike. Su objetivo es la estimulación de los canales semicirculares de cada lado a diferentes temperaturas, lo cual genera una respuesta nistágmica en direcciones contrarias que permite determinar la actividad refleja de cada oído así como su integración con el SNC.

### **6.2 Purificación de ADN total de sangre periférica.**

Se utilizó el kit de Invitrogen DNAzol. Brevemente: Descongelar la sangre a temperatura ambiente y mantenerla en agitación. En tubos de microcentrífuga agregar 50 µl de cada muestra más 1 ml de DNAzol y mezclar vigorosamente. Agregar 0.4 ml de isopropanol y mezclar con el vortex. Incubar de 15-20 min, centrifugar 6 min a 13,000 rpm; decantar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 500 µl de DNAzol

lentamente, y centrifugar 5 min a 6,000 rpm; decantar el sobrenadante. Lavar con 1 ml de etanol al 75% incubando durante 20 min a -20°C. Centrifugar 5 min a 13,000 rpm y retirar el sobrenadante con una pipeta sin tocar el pellet. Esperar unos minutos hasta que se evapore por completo el etanol restante. Resuspender las muestras en 50 µl de H<sub>2</sub>O estéril y guardarlas a -20°C hasta su uso.

### **6.3 Amplificación de fragmentos del ADN mitocondrial por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Para amplificar el gen del ARNt Ser (UCN) y el gen del ARNr 12S mitocondrial se utilizó el kit *Phusion High-Fidelity PCR* conforme a las instrucciones del proveedor (Finnzymes) ligeramente modificadas.

#### 6.3.1 Cebadores.

Se amplificaron distintos fragmentos de dos genes del ADN mitocondrial: ARNt SerUCN (7446-7514) y ARNr de la subunidad pequeña 12S (648-1601). Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, UNAM. La secuencia de los cebadores, sus características y la posición que reconocen en los genes correspondientes se describen en el Apéndice 2.

#### 6.3.2 Mezclas de reacción

Se ajustaron las concentraciones finales de los reactivos para 50 µl de reacción. Se modificó la cantidad de magnesio utilizada ya que en un principio se observaron subproductos. Dado que el funcionamiento de esta enzima es sensible al magnesio, se redujo la concentración al mínimo recomendado, con lo que se obtuvieron mejores resultados. También se modificaron los tiempos de incubación de cada una de las fases del ciclo. De esta forma, se obtuvieron amplificadores más limpios y definidos. A

continuación se muestran las concentraciones finales de cada reactivo y las condiciones generales del PCR. La descripción del programa utilizado para cada par de cebadores se encuentra en el Apéndice 2.

Reactivo	Concentración Final
Buffer HF 5X	1x
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.5 mM
Cebador 5'	20 pm
Cebador 3'	20 pm
H <sub>2</sub> O estéril	Ajustar al volumen final
<i>Phusion</i> , Polimerasa de ADN	1 U por 25 µl
ADN	100 ng/ µl

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización Inicial	98°C	5 min	
Desnaturalización	98°C	30 s	
Alineamiento	X °C	25 s	30-35 ciclos
Extensión	72°C	45 s	
Extensión Final	72°C	7 min	
Enfriamiento	4°C	∞	

En cada experimento, para preparar una mezcla general, se agrega en un tubo cada componente dependiendo de la cantidad de muestras más la mitad de la unidad. Por ejemplo, si se tenían 8 muestras se multiplicaba cada componente por 8.5, y eso se agregaba en un tubo, excepto el templado. En diferentes tubos se agrega el templado correspondiente y la mezcla general hasta completar 50 µl, evitando la formación de burbujas y procurando que la mezcla de reacción quedara al fondo del recipiente. Se utilizaron tubos para PCR (*Axygen*) con tapa en domo para evitar pérdida por evaporación.

Para amplificar el gen del ARNt Ser (UCN) se utilizó el programa *PHU60*. Para amplificar el gen de ARNr 12S se utilizaron varios programas: *PHUSION 55*, *PHU60*, *PHUSION 60*, y *PHUSION 65*. Esto se debe a que se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores con distintas T<sub>m</sub>'s y fue necesario ajustar los parámetros

para cada par. Adicionalmente, los fragmentos amplificados varían en longitud desde 256 pb hasta 600 pb por lo cual también se modificó la duración de cada etapa del ciclo para obtener los mejores resultados. Se utilizó un termociclador PERKIN ELMER *Gene Amp PCR System 2400* en todos los casos. Los productos obtenidos se analizaron por Electroforesis en Gel de Agarosa para verificar su pureza y especificidad, y por Secuenciación Automática para verificar su secuencia.

#### **6.4 Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

Para poder determinar en primera instancia si el producto obtenido del PCR era el deseado, se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% (peso/volumen). Brevemente: en un matraz se pesa la agarosa (UltraPure Agarose 1,000 de *Invitrogen*) y se afora hasta el volumen correspondiente con amortiguador TAE 1X (Tris/Acetic Acid/EDTA -40mM Tris, 20mM ácido Acético, 1 mM EDTA pH 8.3- ya preparado, de *BIORAD*). Se calienta la solución hasta que se disuelva la agarosa por completo y se agrega 0.6 µl de colorante SYBR GREEN I (*Invitrogen*); se vacía en la cámara antes de que gelifique. Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (*GIBCO BRL-Life Technologies*- modelo Horizon 58). Los geles se sometieron a las fuerzas del campo eléctrico a 100V, alrededor de 40 min. Se observaron los geles sobre un transiluminador (*SPECTROLINE. BIO-VISION*) y se documentó con una cámara digital.

#### **6.5 Purificación de los productos de PCR**

Se utilizó el kit QIAquick PCR Purification de *QIAGEN* conforme a las instrucciones del proveedor. Brevemente: Se agregan 5 volúmenes de Buffer PBI por cada volumen de PCR que se desee limpiar. Este kit contiene un indicador colorimétrico para monitorear que el pH de la solución sea menor a 7.5, de manera que la limpieza se

lleve a cabo en las mejores condiciones. Después de agregar el amortiguador PBI se confirma que el color de la mezcla sea amarilla.; de no ser así se agrega 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5.0 para conseguir el pH adecuado. Se colocan las columnas en los tubos de lavado y se vierte el ADN al centro, sobre la membrana de silica. Se centrifuga 1 min a 13,000 rpm, se desecha el fluido y de nuevo se coloca la columna dentro del tubo de lavado; ahora el ADN se encuentra unido a la columna. Para lavar se agrega 750 µl de Buffer PE al centro de la columna, incubando durante 3 min; al término se centrifuga 1 min. y se desecha el líquido del tubo. Se centrifuga nuevamente la muestra y se deja 5 min para que se evapore el etanol restante en la columna. Esto elimina cebadores e impurezas no deseadas, sales, enzimas, detergentes, colorantes, agarosa, etc. de la mezcla. La elución debe realizarse en condiciones básicas y de baja concentración de sales, por lo cual se coloca la muestra dentro de un nuevo tubo para microcentrífuga y se eluye la muestra con H<sub>2</sub>O estéril. Generalmente esto se hace dos veces para tener una mayor eficiencia de recuperación del ADN. Se desecha la columna y la muestra se almacena a -20° C hasta su uso. La limpieza del ADN se verifica por electroforesis en agarosa.

## **6. 6 Secuenciación Automática de ADN**

La secuenciación automática se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, UNAM. Se utilizaron secuenciadores ABI Prism 310 y 3100 de *Applied Biosystems*, basados en electroforesis capilar.

## **6.7 Análisis de las secuencias. Detección de los cambios puntuales**

La secuencia obtenida se comparó con la secuencia consenso de Cambridge disponible en la página de MITOMAP para determinar los cambios en ella. Se utilizó el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la opción: *Highly similar sequences (megablast)*. Después de esto, se hicieron correcciones manuales con el programa de libre descarga: DNABaser (disponible en: <http://www.dnabaser.com/> ). Este programa permite visualizar tanto la secuencia como el cromatograma, y en caso de que sea necesario, cambiar la escala, aclarando la distancia de los picos de detección y discernir la base que corresponde a cada posición. De esta manera, se corroboró la detección hecha previamente de 3 cambios puntuales según las secuencias analizadas: la A663G y la A827G en la región 5' del gen, y la T1189C en la 3'. Los cromatogramas se muestran en el Apéndice 2. Estos cambios se analizaron por EGGD.

## **6.8 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (EGGD)**

### 6.8.1 Soluciones.

Para formar el gel son necesarias dos soluciones: una de alta y otra de baja concentración de urea/formamida, las cuales definen los límites superior e inferior del desnaturalizante. A lo largo del trabajo se modificó este gradiente y el de acrilamida. Las indicaciones para preparar las soluciones se encuentran en el Apéndice 2.

### 6.8.2 Preparación del gel.

Previamente a la preparación del gel se limpian los vidrios, separadores, y peines con etanol. Se agrega una capa delgada de silicón (*CPS-5/25 Poly Silikote CEL Associates Inc.*) a los vidrios para facilitar el manejo del gel y evitar que se rompa al finalizar el experimento. Se forma un marco con los dos vidrios y los separadores.

Se coloca el aditamento para hacer gradientes sobre un agitador magnético cuidando que todas las llaves de paso estén cerradas. La salida de este aditamento está conectada a una manguera que en el otro extremo tiene una punta, la cual se inserta al centro de los vidrios del marco. Aparte en vasos de precipitado se vierten 25 ml de las soluciones desnaturalizantes correspondientes a los límites del gradiente. A la solución de mayor desnaturalizante se le agregan 100µl de colorante azul de metileno para identificarla y verificar que el gradiente se forme de manera uniforme. Se agrega a cada solución 60 µl de PSA al 2% (Persulfato de Amonio. *BIORAD*) y 12 µl de TEMED (N, N, N', N' tetrametiletilenodiamina. *BIORAD*) y se mezcla. Estos dos componentes son el polimerizador y el catalizador del gel respectivamente, por lo cual todo debe estar listo antes de agregar estas dos sustancias. La solución concentrada se coloca en el compartimento al frente del aditamento para hacer gradientes y la de menor desnaturalizante detrás. Gradualmente se abre la llave de paso de la manguera apenas permitiendo el flujo de la solución (si se abre demasiado, el gradiente se forma como sonrisa y las muestras no avanzan correctamente). Una vez que se forma una capa de aproximadamente 3mm en la base, se abre la llave de paso entre los dos compartimentos del aditamento, con lo que se mezclan las dos soluciones. Es importante evitar la formación de burbujas en el gel y verificar la formación del gradiente visualmente a través del colorante (mayor intensidad en la parte inferior y arriba casi transparente). Se llena casi hasta el tope y se coloca el peine evitando la formación de burbujas. La solución restante se recupera en el vaso de precipitados de la solución de menor desnaturalizante y, en caso de que disminuya la altura del gel por fuga se utiliza esta para completar los pozos. Los geles desnaturalizantes tardan de 30 a 60 min. en solidificar. Una vez terminado, se retiran las pinzas del marco y los excedentes. Siempre



se prepararon el día anterior por lo cual se envuelven con cuidado en plástico autoadherente y se guardan a 4°C hasta su uso.

### 6.8.3 Electroforesis.

Para montar el experimento se preparan la cámara, los geles y las muestras. La cámara de electroforesis que se utiliza es especial para esta técnica pues tiene un dispositivo para mantener constante la temperatura y la recirculación del amortiguador (*C.B.S. Scientific*). Se llena el tanque con amortiguador TAE 1X y se calienta hasta la temperatura deseada. Mientras tanto se atemperan los geles, se limpian los vidrios y se colocan en la base de acrílico destinada para esto, fijando con pinzas a cada lado. Entonces se introduce la base al tanque cubriendo el electrodo de la base con amortiguador. Se retira el peine de cada gel cuidando la integridad de los pozos. Es importante que utilizando una micropipeta se limpien cada uno de los pozos en este punto y justo antes de colocar las muestras. Aunque no sea notable a simple vista, en ocasiones algunos restos de acrilamida quedan al fondo de los pozos y no permiten que las muestras entren de manera homogénea, alterando los resultados. Se deposita cuidadosamente cada muestra en el fondo del pozo. Se utilizaron diferentes parámetros para la electroforesis a lo largo de la estandarización: de 50 a 75 ° C, 150-300V, y entre 2 y 5 horas de corrida.

### 6.8.4 Tinción.

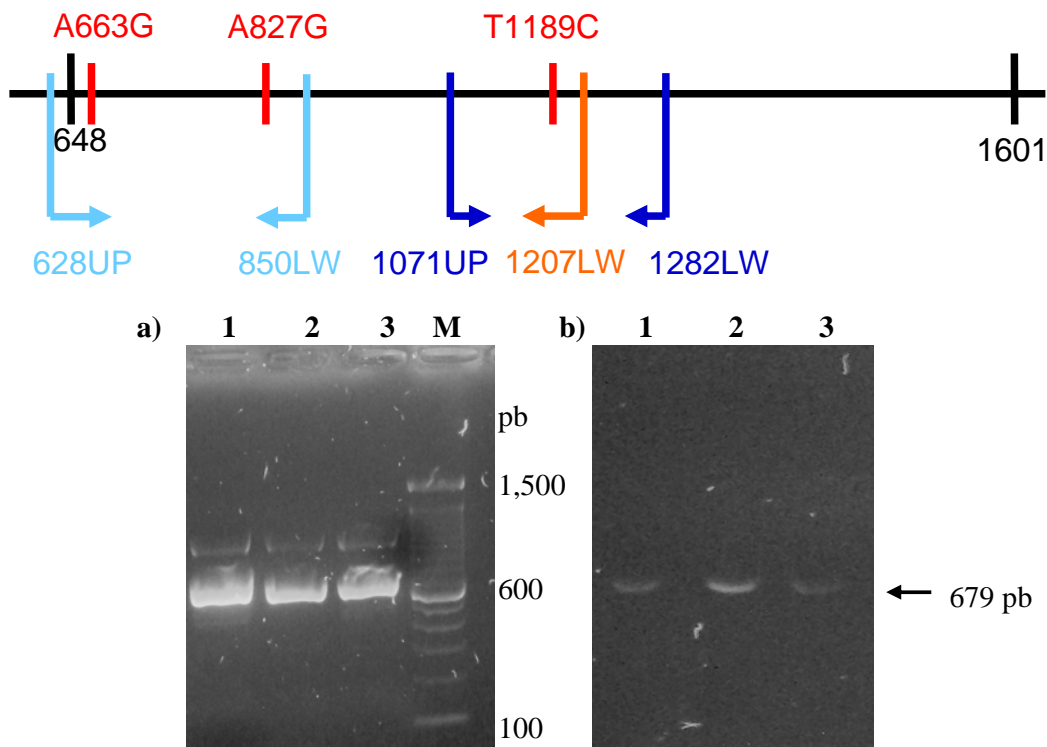
En un recipiente de plástico se agregan 120 ml de amortiguador TAE 1X y 10 µl de colorante SYBRGREEN. Se incuban los geles por separado en esta solución de 10 a 15 min. Se colocan en el transiluminador UV para visualizar los fragmentos de ADN, y se documentan en fotografía. Es importante no tocar el gel en ningún punto con las manos pues aparecen manchas en este los cuales modifican la tinción.

#### 6.8.5 Análisis.

El análisis se realizó manualmente. Se determinó el porcentaje de desnaturalizante donde se detuvo cada muestra, estableciendo relaciones entre el gradiente de desnaturalizante usado y las distancias recorridas por cada muestra.

## 7.- Resultados

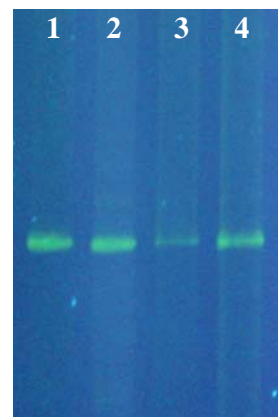
Se lograron establecer las condiciones de purificación de ADN y PCR adecuadas para la obtención de cada fragmento de ADN mitocondrial analizado en este trabajo. En la figura 13 se muestra el producto obtenido de la purificación del ADN. Además, en concordancia con los estudios efectuados en el laboratorio anteriormente se realizó la secuenciación del gen del ARNr 12S mitocondrial de todas las muestras disponibles, por electroforesis capilar. Se analizaron las secuencias de 36 individuos con deficiencia auditiva o vestibular y sanos (10/36) con el programa BLAST, lo cual resultó en la identificación de 3 cambios en el gen ribosomal, presentes en diferentes frecuencias: A663G (12/36), A827G (12/36), y T1189C (2/36). En ninguno de los individuos se hallaron dos cambios simultáneamente. La posición de estos cambios se muestra en el siguiente esquema:



**Figura 13. Productos de PCR con los cebadores 628UP-1282LW de la región del ARNr 12S mitocondrial.** a) Producto de 679pb, analizado en agarosa después de la amplificación. b) Se observan las mismas muestras después de limpiarlas con el kit de purificación de PCR de QIAGEN. Se presentan los productos obtenidos de tres individuos diferentes, denotados con los números 1 al 3. M-marcador de peso molecular. \*la mancha corresponde al colorante de carga

## 7.1 Análisis del gen de ARNt Ser (UCN) por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante

En los primeros estudios en el laboratorio se analizó el gen de ARNt Ser (UCN) en busca de las mutaciones reportadas en la literatura. Se amplificó el gen de varios individuos utilizando los cebadores *7399UP-7750LW* (351pb) reportados anteriormente. No se encontraron cambios en la secuencia de este gen al compararla contra el consenso de Cambridge ni en individuos sanos ni con deficiencia auditiva o vestibular. Después de realizar varios experimentos para analizar muestras independientes modificando diferentes parámetros de la EGGD (concentración del gradiente, temperatura del tanque, voltaje y tiempo de migración) no se encontraron diferencias de migración entre ellos en ninguna de las condiciones. La figura 14 es un gel representativo que muestra el comportamiento del amplificado de ARNt Ser (UCN) analizado por EGGD. Se observan productos de PCR de 4 individuos distintos (denominados con números del 1-4) que presentan sólo una banda definida que recorre la misma distancia en el gel. Este mismo patrón se observó independientemente de que se cambiaran las condiciones del EGGD. Por estas razones se utilizó este fragmento como control de corrimiento, para verificar que los resultados obtenidos no se debieran a una incorrecta migración, sino a la presencia de cambios en la secuencia de las muestras analizadas en los experimentos subsiguientes.

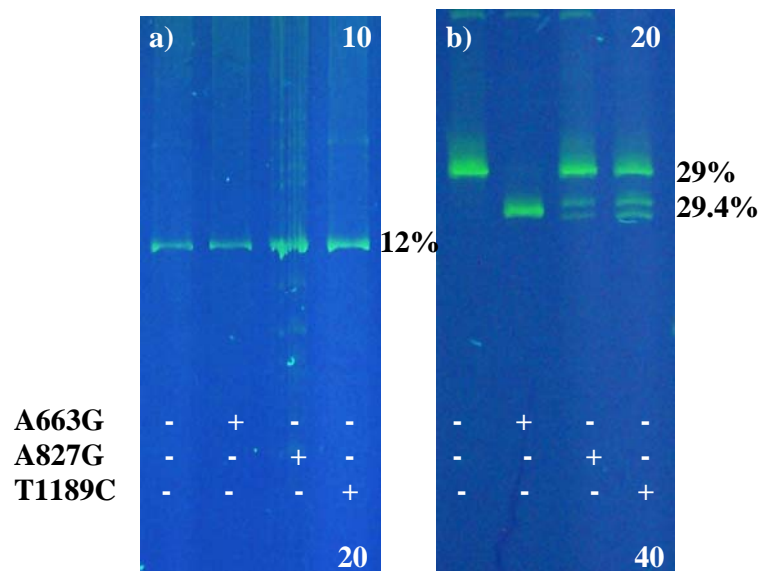


**Figura 14. Figura representativa de los experimentos de EGGD con el gen de ARNt Ser (UCN) *7399UP-7750LW*.** Se muestran los amplificadores de distintos individuos (1-4). No se observan cambios de migración entre ellas. Se observa una banda definida y recorren la misma distancia en el gel.

## 7.2 Análisis del gen del ARNr 12S por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante

### 7.2.1 Detección de los 3 cambios: A663G, A827G, y T1189C

Inicialmente se intentó detectar los 3 cambios en un solo fragmento de ADN y en una sola condición de EGGD. Por esta razón, se utilizaron cebadores que comprendieran todas las posiciones en las que se encontraron los cambios por secuenciación. Se obtuvo un producto de 679pb utilizando los oligonucleótidos 628UP-1282LW.



**Figura 15. Productos de PCR 628UP-1282LW sometidos a dos diferentes gradientes desnaturalizantes urea/formamida a 60° C, 200V, 4.5 h, 12% acrilamida.** a) 10-20% B)20-40% Se observa el efecto de la concentración de gradiente desnaturalizante. El gradiente bajo (a) no permite ver diferencias entre las muestras. El gradiente alto (b) sí permite ver diferencias en los patrones de migración a la misma temperatura. Sólo se muestra una región del gel.

Fischer y Lerman (1983) en el artículo original de la técnica utilizaron una temperatura de 60° C en el tanque de corrida y 150V durante 14.5 ó 7 h, dependiendo del fragmento analizado. El uso más difundido de la EGGD actualmente es para evaluar la composición de las poblaciones bacterianas en un ecosistema dado usando el gen de

ARNr 16S. Se utilizan tiempos de corrida prolongados (7-17 h), entre 100 y 150V, y 60° C en la temperatura del tanque; sin embargo, los protocolos varían mucho, y parecen ser específicos para el fragmento que se analiza. Uno de los objetivos del presente trabajo era disminuir el tiempo de corrida, por lo cual, a menos que se indique de otra forma, en los geles que se presentan se utilizó 200V durante 4.5h de corrida. Fischer y Lerman utilizaron un gradiente de urea/formamida de 20-50%. Por estas razones, inicialmente se probaron dos gradientes a 60° C, 10-20% y 20-40% u/f, que incluyen un rango menor y otro equivalente al utilizado por estos autores; el resultado se muestra en la figura 15. Con una concentración de gradiente menor a 20% (Fig. 20a) no se observa ningún cambio en el patrón de migración. Sin embargo, con un gradiente mayor a 20% (Fig. 20b) existe una muestra que recorre mayor distancia en el gradiente: la que contiene el cambio A663G. A pesar de esto, no es posible distinguir las otras dos mutaciones de la secuencia consenso, por lo cual se probaron diferentes concentraciones de gradientes conservando esta temperatura (10-40, 20-25, 20-30, 20-35, 20-50, 20-60, 25-45, 40-60). Los gradientes con concentraciones de desnaturalizantes menores a 20% no permitieron diferenciar las secuencias de los fragmentos, mas al aumentar las concentraciones de estos se observó un cambio en los patrones de migración de una de las muestras analizadas (A663G (+)) hasta cierto punto, pues en los experimentos con concentraciones mayores a 25% como límite inferior, las muestras no pudieron entrar profundamente al gel.

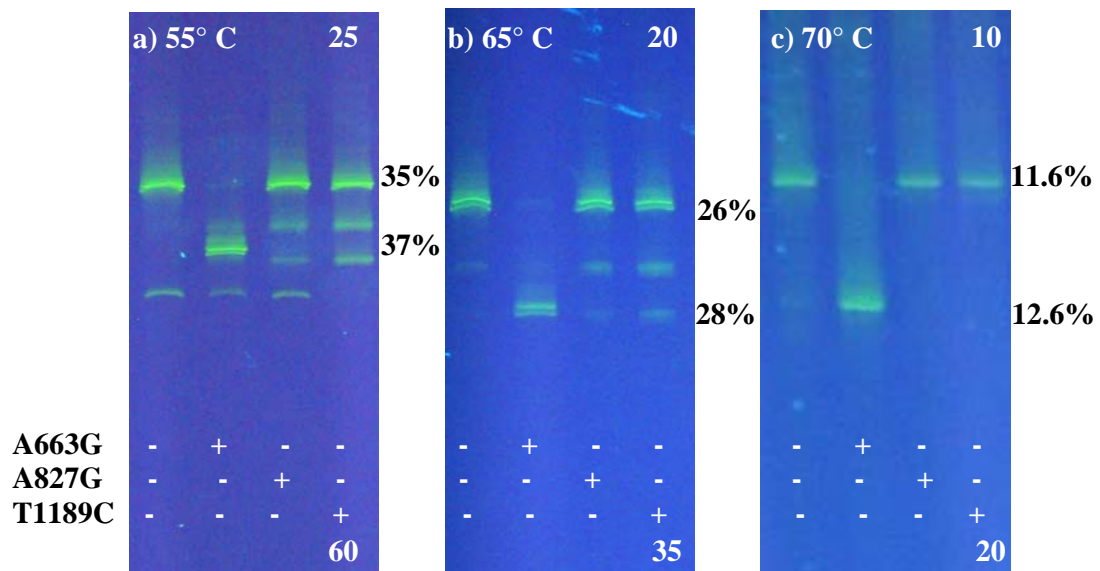
Puesto que no se observó un patrón de migración particular que nos permitiera distinguir entre fragmentos s/mutación, A827G(+) y T1189C(+) bajo las condiciones probadas, se utilizó una estrategia distinta: mantener el gradiente desnaturalizante y modificar la temperatura del tanque. Se utilizó inicialmente, un gradiente 20-40% u/f, donde se observaron las diferencias para A663G anteriormente y se probaron

temperaturas de 55, 60, 65 y 70° C. En la temperatura más baja (55° C) no hubo cambios en el patrón de migración de las muestras, mientras que en la más alta (70° C) no pudieron migrar correctamente. Parece que en el primer caso, la condición desnaturalizante no es suficiente para separar las hebras del fragmento de ADN y modificar el patrón de migración. En el caso contrario, el desnaturalizante (temperatura y concentración del gradiente) es demasiado alto que el fragmento se desnaturaliza al momento de entrar al gel y se detiene su migración.

Al observar este efecto se realizaron experimentos combinando estos dos parámetros con el propósito de discernir el efecto de cada uno en la diferenciación de los cambios puntuales. Para cada experimento se prepararon dos gradientes, uno bajo (límite superior, hasta 20% u/f) y otro alto (límite inferior desde 25%) y se sometieron a EGGD simultáneamente a distintas temperaturas: 50, 55, 65 y 70° C. Se probaron diferentes concentraciones de gradientes desnaturalizantes y rangos (diferencias) con el propósito de detectar todos los cambios con este par de oligonucleótidos. Se probaron gradientes más altos, por ejemplo de hasta 60-80% u/f en el caso de 55° C por una parte. Por otra parte, en los que se encontró alguna diferencia se buscó estrechar el gradiente, por ejemplo: empezando con 20-40%, luego 20-30% e incluso hasta 20-25% u/f. De acuerdo al razonamiento, esto permitiría distinguir los cambios en la secuencia en caso de que el punto de desnaturalización de los fragmentos fuera muy cercano.

Los resultados fueron distintos para cada temperatura. A pesar de utilizar gradientes más altos a 50° C no se observaron diferencias en la migración de los fragmentos; tampoco aumentando la temperatura a 55° C usando un gradiente 20-40% desnaturalizante. Fue necesario utilizar mayor concentración de desnaturalizantes para detectar los cambios a esa temperatura (25-60, 30-45, 30-50, 50-80, 60-80% u/f), encontrando la mejor separación a 55° C en un gradiente de 25-60% u/f. A 65° C se

observaron diferencias en el patrón de migración sólo con concentraciones del gradiente entre 20 y 35%, similar a lo observado a 60° C. Sin embargo, a 70° C con gradientes mayores a 20% no fue posible hallar diferencias, al contrario parece que las condiciones desnaturizantes fueron muy drásticas. A esta temperatura se observaron las diferencias en el patrón de migración en gradientes menores (10-15 ó 10-20%). En la figura 16 se muestran las condiciones en las que se encontraron mejores diferencias a cada temperatura.



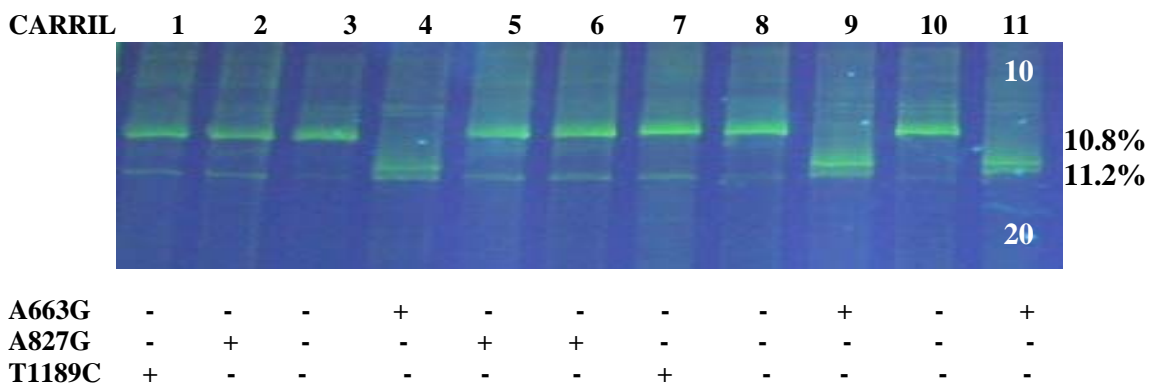
**Figura 16. Efecto de la temperatura y el gradiente desnaturizante sobre la detección de los cambios puntuales.** a) 55° C, 25-60% u/f. b) 65° C 20-35% u/f. c) 70° C, 10-20% u/f. A temperaturas más bajas se necesita mayor concentración de desnaturizantes para observar diferencias. A mayor temperatura la concentración utilizada es menor. Sólo se muestra una región del gel.

De esta manera, se observó que para esta técnica los dos parámetros resultan importantes para encontrar diferencias. La combinación de la temperatura y la concentración del gradiente son fundamentales para alcanzar el punto de desnaturización de los dominios del fragmento y la separación de las hebras.



Aumentar un parámetro y disminuir el otro resulta en el mismo efecto en cuanto a discernimiento. Las bandas extras que se observan en algunas muestras no se deben a heteroplasmía pues de acuerdo a los análisis por secuenciación estos cambios se encuentran de manera homoplásmica y nunca simultáneamente, en los individuos analizados. En caso de que en otros individuos se presentara heteroplasmía sería más certero distinguirlo bajo las condiciones mostradas, pues claramente se observa una ligera diferencia de migración entre las bandas A663G (+) y las extras de las otras muestras. De esta manera se pueden evitar confusiones al momento de evaluar varias muestras de secuencia desconocida. Las mejores condiciones que se obtuvieron son: 55° C, 25-60% *u/f*; 60°C 20-40% *u/f*, y 70°C 10-20% *u/f*; sin embargo, únicamente se distingue claramente la muestra A663G (+) .

Para confirmar que con las condiciones encontradas se detecta el cambio A663G únicamente, se analizaron más muestras para poder correlacionar el patrón de migración con la secuencia de cada fragmento. Muestras independientes fueron secuenciadas, y se confirmó la presencia/ausencia de los cambios en homoplasmía y de manera exclusiva en cada fragmento. Como se observa en la figura 17, las muestras A827G (+) y las T1189C (+) se retrasan junto con las que no tienen ningún cambio con respecto a la



**Figura 17. Fragmentos 628UP-1282LW en EGGD 70°C, 10-20 % desnaturizante, 10% acrilamida, permiten detectar el cambio A663G.** Utilizando muestras de distintos individuos se comprobó que tanto las que no tienen cambios (c3, 8 10) como las que tienen el A827G (c2, 5 y 6) o T1189C (1, y 7) migran igual, mientras que las muestras que tienen el cambio A663G (c4, 9 y 11) avanzan más en el gel.

secuencia consenso de Cambridge. En los carriles 2-3 y 7-8 de la Fig. 17 se observan claramente que las muestras A827G (+) y T1189C (+) respectivamente, migran igual que las que no tienen estos cambios. Todas las muestras que migraron más contienen el cambio A663G (carriles 4, 9, 11). Por tanto, estas condiciones únicamente son efectivas para detectar el cambio A663G.

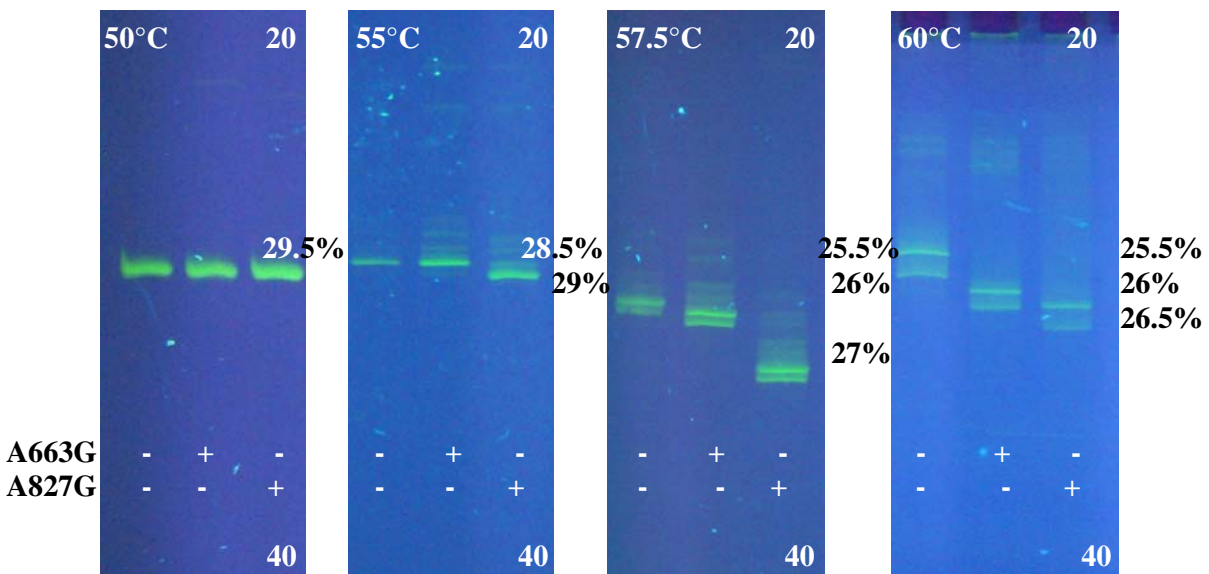
Al no obtener mejores resultados con estos cebadores después de probar tantas condiciones se cambió de estrategia. Es posible que no se pueda acceder a los dominios donde se encuentran los cambios por la longitud del fragmento. Por esto, se probaron fragmentos más pequeños, a manera de que los dominios queden accesibles al efecto de los desnaturalizantes. Para esto fue necesario usar al menos dos fragmentos: uno que comprenda las mutaciones A663G y A827G, y otro que sirva para detectar T1189C. Se sintetizaron nuevos cebadores para analizar estas regiones. Los resultados se muestran en la siguiente sección.

### 7.2.2 Detección de A663G y A827G

Para detectar los cambios A663G y A827G se mantuvo el extremo 5' en la posición anterior (628UP) y se sintetizó el cebador 850LW, recorriendo el extremo 3' más cerca a la mutación A827G. Fue necesario establecer las condiciones específicas para detectar los cambios en este nuevo fragmento de 245 pb. Se probaron primeramente, las condiciones con las que se obtuvieron mejores resultados con el fragmento anterior para tener una idea del comportamiento de este nuevo producto de PCR. Utilizando  $70^{\circ} C$  10-20% *u/f* y  $60^{\circ} C$  20-40% *u/f* se diferenciaron las tres condiciones, pero se observaban dobles bandas por lo cual fue necesario buscar nuevas alternativas modificando el tiempo de corrida y el voltaje. Utilizando el gradiente mencionado a  $60^{\circ} C$  se modificó el tiempo de corrida, desde 2 hasta 5.5 horas. También

se probaron hasta 300V para migrar las muestras. Estas condiciones no ayudaron a desaparecer las dobles bandas, aunque las muestras sí recorrieron mayor distancia en el gel.

A pesar de que en la literatura el EGGD se utiliza principalmente para analizar poblaciones bacterianas; se encontraron algunos trabajos en los cuales utilizaban genes humanos. Zeuthen, y col. (1998) usaron una temperatura de 54°C 160V 4h para analizar el gen humano p16 relacionado con cáncer. Con esta base, se decidió probar temperaturas más bajas para analizar este nuevo fragmento de ADN. Se mantuvo un mismo gradiente de 20- 40% u/f, 12% de acrilamida y se probaron diferentes temperaturas: 50°C (extremo inferior), 55° C (intermedio), y 57.5°C (más cercano al anterior de 60°C).

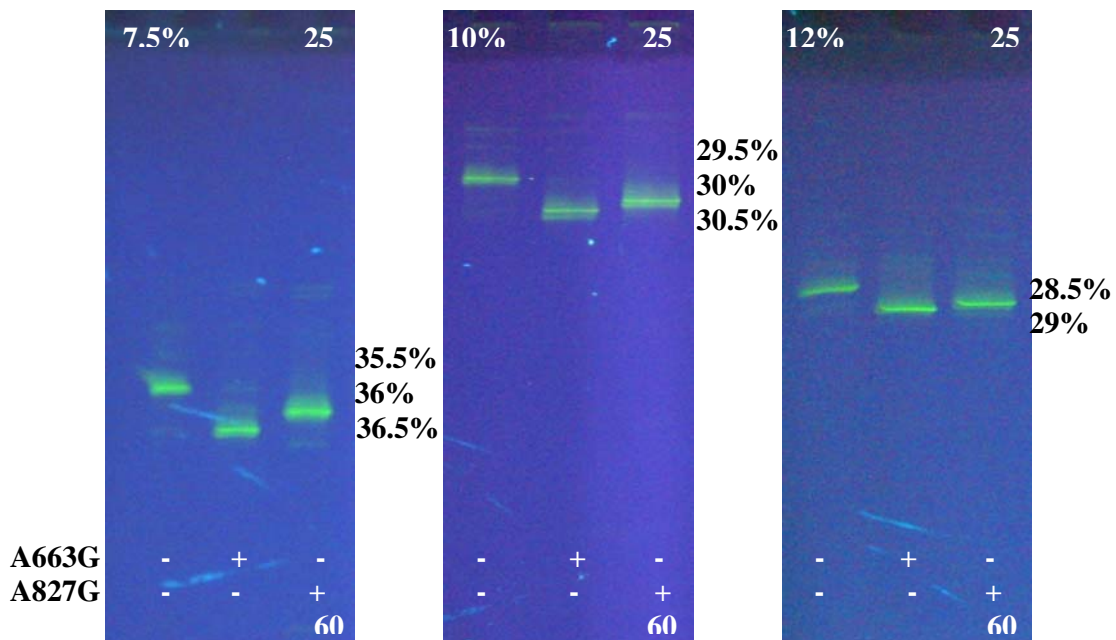


**Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la diferenciación de los cambios y definición de las bandas del fragmento 628UP-850LW.** Se utilizó en todos los casos un gradiente 20-40% u/f, 12% acrilamida y la temperatura del tanque indicada en cada imagen; se corrieron las muestras durante 4.5 h, a 200V. Se observa mayor diferencia de migración y la aparición de dobles bandas al aumentar la temperatura. Sólo se muestra una región del gel.

En la figura 18 se pueden observar varios efectos de la temperatura sobre las bandas: 1) modifica el patrón de migración de las muestras, 2) la distancia que separa la migración de una muestra de otra y 3) la calidad de las bandas. El cambio en el patrón de migración (1) es evidente a simple vista. Al aumentar la temperatura, en un gradiente 20-40% u/f el fragmento sin mutaciones se retrasa más que el fragmento con A663G (en medio), mientras que la muestra con A827G recorre mayor distancia en el gel. Con respecto a la distancia entre las muestras (2), ésta también aumenta proporcionalmente a la temperatura. 50°C es una temperatura muy baja para detectar los cambios en la secuencia con este gradiente por lo cual todas se ven iguales, mientras que a 60° C la diferencia entre ellas es clara. Además, se observa que al aumentar la temperatura por tan sólo 2.5° el efecto sobre la distancia es mucho. El problema es el efecto sobre la calidad de las bandas (3), pues también al aumentar la temperatura aumenta proporcionalmente la aparición de bandas extras. Observando todo esto, es necesario encontrar un equilibrio de condiciones en que la diferenciación de las muestras por su secuencia sea evidente sin comprometer la calidad de la banda observada.

Se decidió utilizar una temperatura de 55° C ya que ahí se observó sólo una banda, y probar gradientes desnaturalizantes más altos (25-60, 30-45, 30-50, 35-50, 50-80, 60-80% u/f). Modificando el gradiente se esperaba poder mejorar la separación de las bandas. Se encontró una mejor diferenciación de los fragmentos en los gradientes de 25-60 y 30-50% u/f. Adicionalmente, se probaron diferentes concentraciones de acrilamida. La retícula de acrilamida es importante porque es el medio por el que se mueven los fragmentos y puede modificar la migración dependiendo de su empaquetamiento. A continuación se muestran los resultados obtenidos con concentraciones de 7.5, 10 y 12 % acrilamida, y con un gradiente de 25-60% de desnaturalizantes (Fig. 19).

En la figura 19 se observa que aumentando el gradiente desnaturalizante, a 55°C con un gradiente de 25-60% se mantiene sólo una banda visible y aumenta la distancia de migración entre los fragmentos. La concentración de acrilamida también determina la distancia que recorren los fragmentos en el gel. En este caso, utilizando menor concentración (7.5%) se observa mejor separación y por tanto se reduce la posibilidad de confundir los resultados al analizar múltiples muestras con secuencia desconocida. Existe certeza de reproducibilidad pues en todos los casos se conserva este patrón: la muestra sin cambios se retrasa, con A663G avanza y con A827G migra en medio de las otras dos. Esto nos permite detectar tres alelos con un solo fragmento y con mejor calidad que con el fragmento 628UP-1282LW probado inicialmente.



**Figura 19. Efecto de la concentración de acrilamida sobre la detección de cambios puntuales en el fragmento 628UP-850LW.** Utilizando un gradiente de u/f 25-60% a 55° C, 200V, 4.5h se observa detección de todos los cambios y sólo una banda. Además, menores concentraciones de acrilamida permiten que éstas puedan distanciarse mejor sin alterar el patrón de migración. El porcentaje de acrilamida utilizado se indica en el extremo superior derecho de cada imagen. Sólo se muestra una región del gel

Se probaron más gradientes a 55°C con diferentes concentraciones de acrilamida (datos no mostrados), sin embargo la detección de los cambios puntuales no fue tan evidente como en las condiciones que aquí se reportan. **Según esta evidencia, las condiciones ideales para diferenciar los fragmentos sin cambios, con A663G y con A827G utilizando los oligonucleótidos 628UP-850LW son: 55°C, acrilamida al 7.5%, y gradiente desnaturizante 25-60% urea/formamida durante 4.5h a 200V.**

### 7.2.3 Uso de pinza GC en 5': GC628UP-1282LW, GC628UP-850LW

Con el propósito de detectar por EGGD todos los cambios puntuales en un fragmento dado, se ha reportado la adición de una secuencia GC repetida de 40 pb's en el cebador 5' utilizado para el PCR. Esta secuencia genera un dominio muy estable de doble cadena y con la Tm más alta del fragmento en el extremo 5' del amplificado, lo que funciona como pinza. Estabilizar uno de los extremos permite que el efecto de los desnaturizantes sobre cada dominio del fragmento sea abrupto, lo cual resulta en un mejor patrón de migración. Teóricamente, con esta técnica es posible detectar todos los cambios en un fragmento dado, presentes en diferentes dominios de desnaturización, excepto en el de mayor Tm (pinza) (después de esto, sólo hay cadenas sencillas de ADN).

En este estudio se probó esta herramienta añadiendo la pinza GC al extremo 5' del oligonucleótido *628UP*. Utilizando el producto de PCR se hicieron las mismas pruebas hasta ahora mencionadas para los fragmentos anteriores. En ninguno de los casos fue posible detectar las cuatro secuencias. Utilizando el par *GC628UP-1282LW* sólo se vio una banda, la cual migraba a la misma altura en todas las condiciones probadas. Por otra parte, con el par *GC628UP-850LW* se redujo el número de bandas observadas (comparándolo con su homólogo sin pinza) incluso a temperaturas de 60°C.

Sin embargo, sólo se diferenciaron las muestras A827G (+), las cuales recorrían mayor distancia, de las que no presentan cambios y las A663G (+) que se retrasaban. Lo más interesante de este par es que el resultado siempre fue el mismo: independientemente de la temperatura, la concentración del gradiente desnaturizante, y el porcentaje de acrilamida utilizado, sólo fue posible diferenciar A827G (+) con el fragmento de 245pb. Aunque sin pinza se detectaba el cambio A663G con el fragmento largo, ya no se observó con la pinza, posiblemente porque esa posición queda inaccesible debido al punto de desnaturización alto del dominio adyacente (40 GCs); lo mismo sucede con el fragmento corto. Sin embargo, con éste último es posible detectar el cambio A827G ya que las interacciones en el extremo 3' del fragmento se conservan como en el amplificado sin pinza GC (datos no mostrados).

#### 7.2.4 Detección de T1189C

Detectar este cambio fue más complicado que los anteriormente mencionados. De manera general, se usaron dos estrategias para intentar detectar a T1189C: 1) modificar las propiedades del fragmento amplificado, y 2) modificar las proporciones de los agentes desnaturizantes. En total, se amplificaron 3 distintos fragmentos del gen de ARNr 12S mitocondrial que contenían el cambio T1189C utilizando los fragmentos siguientes: *1071UP-1282LW*, *1071UP-1207LW* y *628UP-1207LW*. En la mayoría de las ocasiones se sometieron los tres amplificados a las mismas condiciones e incluso en el mismo gel, lo cual elimina variaciones propias de los experimentos. Por esta razón, se presentan los resultados obtenidos conjuntamente. En cuanto a las modificaciones hechas a las proporciones de los agentes desnaturizantes, éstas consistieron en: modificar las proporciones de urea/formamida que componen el gel, aumentar la

temperatura del tanque más de 70° C y someter las muestras a un tratamiento desnaturizante previo a la EGGD.

#### 7.2.4.1 Modificando las propiedades del fragmento amplificado

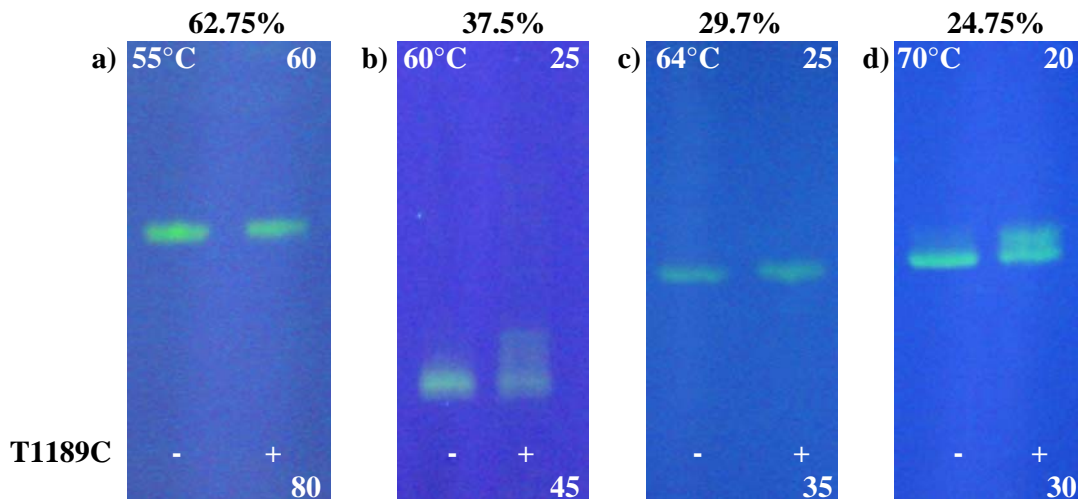
##### *7.2.4.1a Acercando el extremo 5': 1071UP-1282LW*

Para detectar este cambio se utilizó inicialmente el cebador ya disponible *1282LW* en el extremo 3' y se sintetizó uno nuevo en el extremo 5', a 118 pb de la mutación T1189C, y con Tm similar: *1071UP*. El fragmento *1071UP-1282LW* tiene la posición 1189 justo a la mitad del fragmento de 236 pb. Debido a los resultados obtenidos anteriormente, sólo se usó acrilamida al 7.5% para analizar este fragmento de manera que las diferencias que se encontraran fueran más evidentes. Ya que para el fragmento *628UP-850LW* (245pb) que tiene una longitud similar se obtuvieron resultados positivos a 55° C se inició el estudio de este fragmento probando varios gradientes con esta temperatura (30-45, 35-50, 50-80 y 60-80%). Fue necesario utilizar mayores concentraciones de desnaturizantes para detectar este cambio en la secuencia. En la figura 20 se muestran las condiciones en las que se observaron diferencias más evidentes para cada temperatura. En el inciso a) se observa la condición en que se encontró una mejor separación de los fragmentos a 55° C. Un gradiente de 60-80% es una concentración de desnaturizantes muy alta, sin embargo, a 55° C apenas se nota un ligero retraso en la migración de la muestra T1189C (+) con respecto al control sin mutación. Por esta razón, se probaron temperaturas y gradientes mayores. Nuevamente se utilizó 60° C en la temperatura del tanque por ser el estándar de la técnica, y 70° C como extremo superior, y varios gradientes de u/f (60° C: 20-40 y 25-45%; a 70° C: 10-20, 20-30 y 22-60%). Adicionalmente, se probó 64° C (20-30, 20-35, 25-35, 30-50% u/f) como temperatura del tanque pues corresponde a la Tm de los cebadores *1071UP* y



*1282LW*. Esto último pensando que al utilizar una temperatura del tanque correspondiente a la  $T_m$  de los oligonucleótidos usados se favorece la desnaturalización de las hebras de ADN, y el gradiente de desnaturalizantes químicos actuaría más finamente para poder diferenciar los cambios en la  $T_m$  del dominio correspondiente por causa del cambio de T → C.

En todas las condiciones en que se hallaron diferencias en el patrón de migración el fragmento con el cambio T1189C se retrasa ligeramente con respecto al que no presenta cambios. A 60° C se halló una ligera diferencia de migración con gradiente 25-45% u/f (Fig. 20b), lo cual fue similar para 64°C (Fig. 20c), donde se encontró un ligero retraso de la muestra T1189C (+) con 20-35% u/f, entre todos los gradientes usados. En cuanto a 70° C, se halló diferencia con un gradiente de 20-30% de desnaturalizantes (Fig. 20d), mayor al 10-20% u/f con el que se encontraron diferencias para los fragmentos *628UP-1282LW* y *628UP-850LW*. Con los fragmentos anteriores,



**Figura 20. EGGD realizada en 7.5% acrilamida con los oligonucleótidos 1071UP-1282LW para detectar el cambio T1189C.** Se muestran las condiciones en las que se halló mayor diferencia en la migración de los fragmentos para cada temperatura probada. Se intentó separar los fragmentos utilizando condiciones crecientes de desnaturalizantes, pero la diferencia fue muy ligera. T1189C (+) se retrasa en la migración. Sólo se muestra una región del gel; la temperatura y el gradiente correspondiente se indica en la parte superior de cada imagen.

usar gradientes mayores a 20% eran condiciones muy severas, que resultaban en poca migración de los fragmentos y la aparición de muchas bandas extras.

El retraso del fragmento T1189C (+) con respecto al que no presenta cambios resulta lógico dado que el cambio de una timina por citosina aumenta el número de puentes de hidrógeno entre las dos hebras y por tanto la estabilidad del dominio al que pertenece esa posición. Algo notorio de este fragmento fue que las condiciones desnaturalizantes para analizar esta región eran más severas que las usadas para detectar los cambios A663G y A827G. Parece que esta región es más estable por su secuencia, y por tanto necesita mayor concentración de desnaturalizantes para separarse. Las mejores condiciones para detectar T1189C con este fragmento son 55° C 60-80% y 64° C 25-35% u/f. Sin embargo, la ligera separación puede provocar confusión al analizar varias muestras de secuencia desconocida por lo cual se buscaron nuevas condiciones para mejorar la separación de los fragmentos.

Analizando los resultados obtenidos en la detección de A663G y A827G se cambió la estrategia para esta mutación. Usando el fragmento de 679 pb *628UP-1282LW* se pudo detectar el cambio A663G. Además, la longitud de los dos fragmentos es muy parecida: *1071UP-1282LW* es tan solo 9 pares de bases menor a *628UP-850LW*. Esto hace pensar que la detección de los cambios no se relaciona exclusivamente con la longitud del fragmento analizado, sino conjuntamente con el número de pares de bases que existe en cada fragmento desde el extremo 5' o 3' hasta la posición del cambio. Con el par de cebadores *628UP-1282LW* fue posible detectar A663G, la cual se encuentra a 35 pb del extremo 5', pero no fue posible detectar A827G ni T1189C que se encuentran a 480 y 118 pb del extremo 3', respectivamente. En cambio, cuando se utilizó el par *628UP-850LW*, A663G fue detectable porque permaneció a la misma distancia; asimismo A827G, que se encuentra a tan solo 46 pb del extremo 3' en este fragmento.

Observando esta situación se diseñó otro oligonucleótido que permitiera tener el cambio de T1189C a una distancia menor del extremo 3'. Se sintetizó un cebador de 23 pb que comienza en la posición 1207, de manera que T1189C se encuentra a 41 pb del extremo 3' del fragmento amplificado, quedando dentro del rango que se ha propuesto empíricamente como detectable. Se utilizaron dos combinaciones de cebadores: *628UP-1207LW* y *1071UP-1207LW*.

#### *7.2.4.1b Acercando el extremo 3': 628UP-1207LW y 1071UP-1207LW*

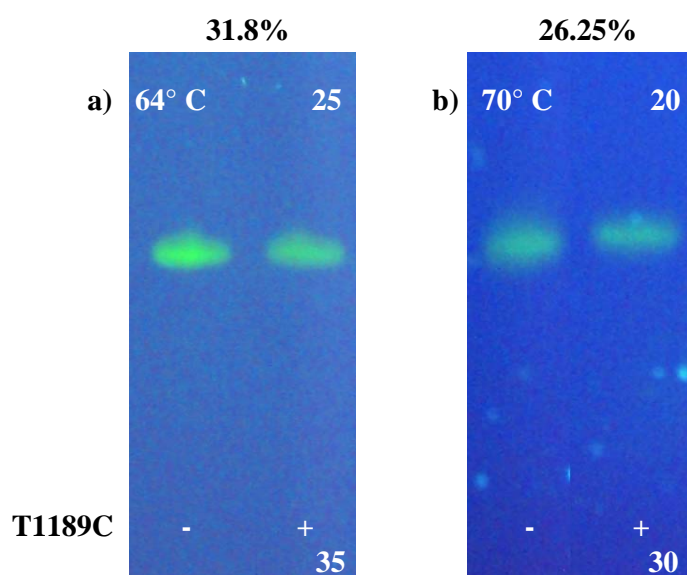
Para probar el fragmento amplificado con los oligonucleótidos *628UP-1207LW* (602 pb) se utilizaron tres temperaturas: 60, 64 y 70° C por las razones ya mencionadas en las secciones anteriores. Se utilizaron geles al 7.5% de acrilamida y diferentes gradientes desnaturalizantes en los que ya se había detectado A663G (+) con el fragmento *628UP-1282LW*: 60°C (20-40 y 25-45%), 64° C (20-30, 20-35, 25-35 y 20-40%), 70° C (10-20, 20-30 y 10-40%). Nuevamente se observó que la muestra con el cambio A663G recorrió mayor distancia en el gel, mas no hubo diferencias de migración entre las muestras sin cambio, A827G (+) y T1189C (+), aún utilizando diferentes temperaturas. A pesar de esto, bajo las condiciones de voltaje y tiempo usadas, las muestras se detenían en el gradiente cerca del 25% de desnaturalizante, por lo cual se intentó estrechar este gradiente para expandir la región en la que las muestras migraban. El objetivo era que al estrechar el rango del gradiente desnaturalizante por ejemplo, de 20-30% ( $\Delta 10$ ) a 22-27% ( $\Delta 5$ ) y mantener el tamaño del gel, éste cambiara más sutilmente. Por esta razón, aunque los puntos de desnaturalización de los fragmentos fueran muy cercanos, cada uno de ellos tendría que recorrer mayor distancia para alcanzar ese punto, y esto se observaría visualmente en mayor distancia entre las bandas de los fragmentos sin y con el cambio T1189C.

Estrechar el gradiente desnaturalizante no funcionó como se esperaba para mejorar la separación de los fragmentos de acuerdo a su  $T_m$ . Puesto que las muestras se detenían cerca del 25% de desnaturalizantes se probaron dos gradientes: 22-27 y 22-25% u/f. Las muestras recorrieron la misma distancia en ambos gradientes, y A663G se separó como siempre. Es posible que se necesite más tiempo y voltaje para que cada fragmento alcance su punto de desnaturalización.

Como se observó que la región de ADN donde se encuentra el cambio T1189C requiere de condiciones desnaturalizantes más severas se evaluó el fragmento *1071UP-1207LW* a dos temperaturas altas: 64° C (20-30, 25-35 y 30-50%) y a 70° C (10-20, 20-30, 22-60%); nuevamente se usó 7.5% acrilamida para observar una mayor separación. Los resultados positivos se muestran en la figura 21. A 64° C se observó un ligero retraso en la migración del fragmento T1189C (+) con el gradiente 25-35% u/f. A pesar de que el gradiente 20-30% se encuentra muy cerca, no fue posible detectar algún cambio bajo esas condiciones, así como en el de 30-50%, donde las condiciones fueron muy severas y no se hallaron diferencias. Esto señala la importancia de elegir el gradiente y rango adecuado para detectar la mutación. A 70° C no se hallaron diferencias usando el gradiente 10-20%, sino que fueron necesarias condiciones más severas. De la misma manera que sucedió con el fragmento *1071UP-1282LW*, en la figura 21b se observa un ligero retraso en la migración de la muestra T1189C (+) al utilizar un gradiente 20-30% u/f. Ésta es la mejor separación que se encontró usando estos cebadores.

Bajo las condiciones usadas para analizar el fragmento *1071UP-1207LW* sólo se encontró una pequeña diferencia en el patrón de migración de los fragmentos. La mejor separación se observó a 64° C 25-35% u/f, y 70° C, 20-30% u/f, sobre todo en última. Existe un pequeño retraso en la migración del fragmento con T1189C pero es muy

ligero, tal y como se observó utilizando los oligonucleótidos *1071UP-1282LW*. Al no obtener mejores resultados se probaron dos estrategias diferentes, modificando otras variables de la EGGD: cambiar la proporción de urea/formamida en el gel desnaturizante, y someter a las muestras a tratamiento con algunos desnaturizantes (temperatura, urea/formamida) previo a la EGGD. Debido a los resultados obtenidos hasta aquel momento, únicamente se utilizaron dos pares de oligonucleótidos en los que se observaron ligeras diferencias: *1071UP-1282LW* y *1071UP-1207LW*.



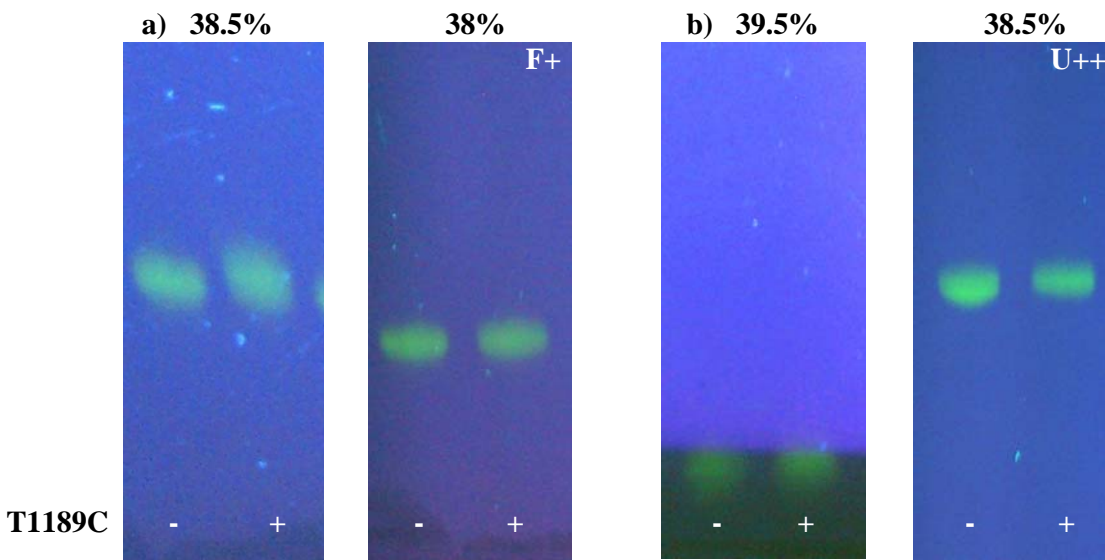
**Figura 21. Detección de T1189C con los oligonucleótidos *1071UP-1207LW*.** Se sometieron las muestras a diferentes gradientes, 200V, 4.5h, 7.5% acrilamida. Sólo se muestra una parte del gel. La temperatura y gradiente utilizados se indican en la parte superior de la imagen. Se observa un leve retraso del fragmento que posee el cambio T1189C con respecto al que no tiene cambio. Esta diferencia es más evidente en la condición del inciso b.

#### 7.2.4.2 Modificando las proporciones de los agentes desnaturizantes.

##### *7.2.4.2a Modificando las proporciones de urea/formamida en el gel*

En la literatura se utiliza de manera estándar para preparar las soluciones de EGGD: 7M urea y 40% (v/v) de formamida para la solución al 100% de desnaturizantes. Ya que no mejoró la separación de las muestras con y sin T1189C cambiando los fragmentos, se decidió modificar las proporciones de urea/formamida en

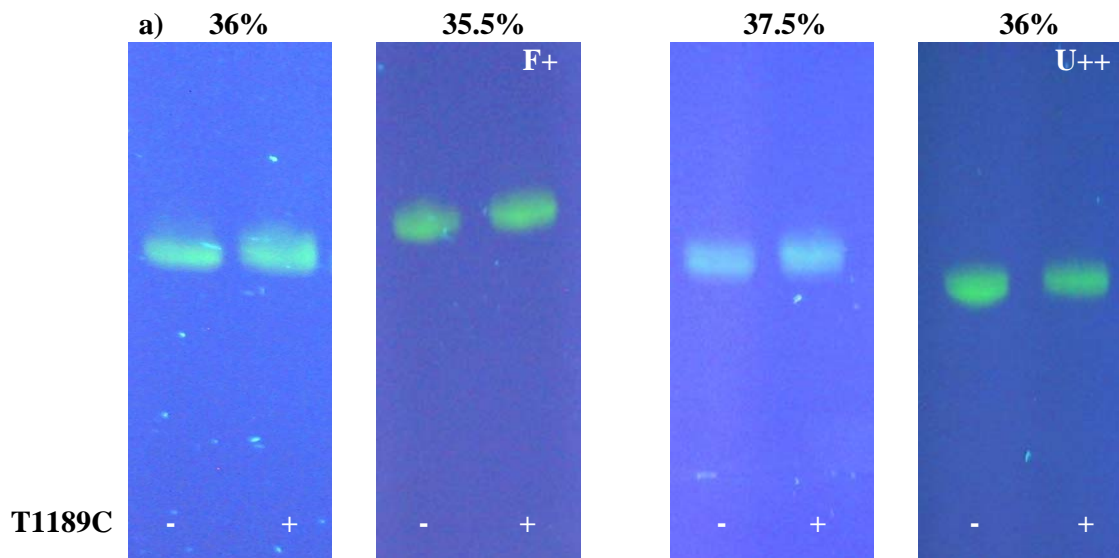
el gel para intentar mejorar la separación de nuestras muestras. Tomando como base la tabla para preparar las soluciones (Apéndice 2) se aumentó la concentración de uno de los componentes a la vez ya sea en un 10 ó un 20% en cada solución, manteniendo el otro fijo. Por ejemplo: para preparar una solución estándar al 30% de desnaturalizante se necesita 2.1M de urea y 12% (v/v) de formamida. Para modificar esta proporción como F+ (10% extra de formamida) se mantiene la urea (2.1M) y se agrega formamida 16% (v/v); y para una solución F++ (20% extra de formamida) se agrega formamida 20% (v/v). De la misma manera, una solución al 30% U+ (10% extra de urea) tiene consiste en urea 2.8M y formamida 12% (v/v); mientras que U++ (urea 20% extra) sería urea 3.5M manteniendo el porcentaje de formamida. Para disminuir las variaciones propias de cada experimento y poder realizar una comparación más directa del efecto de modificar las proporciones de los desnaturalizantes en el gel se preparaban dos geles simultáneamente, uno con soluciones estándar y otro con las soluciones modificadas a cada lado del dispositivo de la cámara de EGGD y se corrían las mismas muestras.



**Figura 22. EGGD de los fragmentos 1071UP-1207LW a 70° C, 7.5% acrilamida, 30-40% u/f con soluciones estándar o modificando las proporciones de los desnaturalizantes en las soluciones.** Se encontró un ligero retraso en la migración de T1189C(+). Al aumentar alguno de los componentes desnaturalizantes se retrasa ligeramente la migración de los fragmentos (ver texto). Sin embargo, no mejora la diferenciación de los fragmentos por su secuencia.

Utilizando las soluciones estándar se encontró mejor separación de las muestras a 64° C 25-35% u/f para el fragmento *1071UP-1282LW* y 70° C 20-30% u/f para *1071UP-1207LW*; además se encontró que en el gradiente 30-40% u/f también se observaban diferencias. Por estas razones, se probaron tres gradientes: 20-35, 30-40 y 35-45% u/f a 64 y 70° C, con soluciones estándar, F+, F++ ó U++.

En las figuras 22 y 23 se muestran las diferencias encontradas para cada par de cebadores, *1071UP-1207LW* y *107UP-1282LW* respectivamente, a 70° C 30-40% u/f; también se observaron diferencias con el gradiente 64° C 20-35% F+ pero con el mismo efecto (datos no mostrados). A simple vista se observa que en todas las condiciones el patrón de migración de los fragmentos es el mismo: el fragmento con T1189C se retrasa ligeramente en la migración, y aumentar la concentración de uno u otro de los desnaturalizantes no hace diferencia. El único efecto que se detectó es que los fragmentos recorren menor distancia en aquellos geles que utilizan las soluciones



**Figura 23. EGGD de los fragmentos 1071UP-1282LW a 70° C, 7.5% acrilamida, 30-40% u/f con soluciones estándar o modificando las proporciones de los desnaturalizantes en las soluciones.** Se encontró un ligero retraso en la migración de T1189C (+). Al aumentar alguno de los componentes desnaturalizantes se retrasa ligeramente la migración de los fragmentos (ver texto). Sin embargo, no mejora la diferenciación de los fragmentos por su secuencia.

modificadas. El retraso fue de ~0.5% cuando se aumentó la concentración de formamida un 10%, y de ~2% cuando aumentó la urea un 20% con respecto al de soluciones estándar, comparando únicamente los geles que corrieron simultáneamente para ambos fragmentos. Por ejemplo, con el par *1071UP-1282LW*, en condiciones normales los fragmentos se detuvieron ~36% del desnaturalizante, y con las soluciones F+ se detuvieron en 35.5% (Fig. 23a). Así, en el caso de *1071UP-1207LW*, en condiciones normales migró ~39.5 % en el gel, y con U++ se detuvo ~38.5%. Comparando únicamente los geles que corrieron simultáneamente.

La separación de las muestras y el patrón de migración no dependen de uno de los desnaturalizantes en el gel (urea o formamida) sino de la combinación de los dos. Sin embargo, la distancia que recorren sí se ve afectada al aumentar uno de los componentes, probablemente porque las condiciones totales de desnaturalizantes aumentan en el gel. Por esta razón, es posible que no se observe mayor separación entre las muestras. Resulta conveniente usar las soluciones con las concentraciones estándar reportadas ampliamente en la literatura. Como consecuencia, nuevamente se intentó aumentar la distancia modificando otros parámetros de la técnica de EGGD.

#### *7.2.4.2b Desnaturalización mediante condiciones desnaturalizantes extremas*

Ya que no se encontraron diferencias modificando las proporciones de urea/formamida en el gel de acrilamida se decidió probar con otro de los desnaturalizantes propios de la técnica. Por esto, se utilizaron temperaturas altas en el tanque de corrida (70 y 75° C), y mayor concentración de gradientes desnaturalizantes. La región donde se encuentra el cambio T1189C parece ser muy estable y por esta razón se pretendía que fuera desnaturalizado bajo estas condiciones.



Los gradientes altos a estas temperaturas ayudan a que la banda se vea limpia y definida. Sin embargo, utilizando estas condiciones no fue posible detectar los cambios en la secuencia. En las figuras 24 y 25 se muestran los resultados obtenidos de varios gradientes realizados a 70 y 75° C, respectivamente. En un principio se utilizó un gradiente muy amplio (0-100 y 30-100%), lo cual permitió ubicar el desnaturalizante en el que se detendrían los fragmentos con las condiciones de voltaje y tiempo utilizadas (200v, 4.5h). Realizando las mediciones y cálculos correspondientes se determinó el porcentaje aproximado de desnaturalizante donde se detuvo la migración de cada fragmento. Entonces se comenzó a estrechar el gradiente con el mismo razonamiento antes mencionado. Sin embargo, no funcionó de la manera esperada, y no se observa diferencia de migración entre los fragmentos debida a su secuencia. Únicamente se observó una ligera diferencia en los gradientes de 30-100 y 45-100% u/f a 70° C con el fragmento *1071UP-1282LW* (Fig. 24b). En el primer caso se observa el retraso de la muestra con el cambio, mientras que en el segundo, la muestra T1189C(+) avanza sólo un poco más en el gel. A pesar de estas condiciones extremas, la diferencia que se observa es aún menor que la que se observó en otras condiciones probadas anteriormente, de manera que es preferible usar alguna de las anteriores a éstas. El efecto del incremento de la temperatura 5° C es un ligero retraso en la migración de las bandas no en su separación, de la misma manera que sucedió cuando se modificó la proporción de u/f en el gel. El efecto de doble banda observado anteriormente al aumentar la temperatura del tanque de 50 a 60° C para el fragmento *628UP-850LW* probablemente no se observa aquí porque los gradientes utilizados son muy altos.

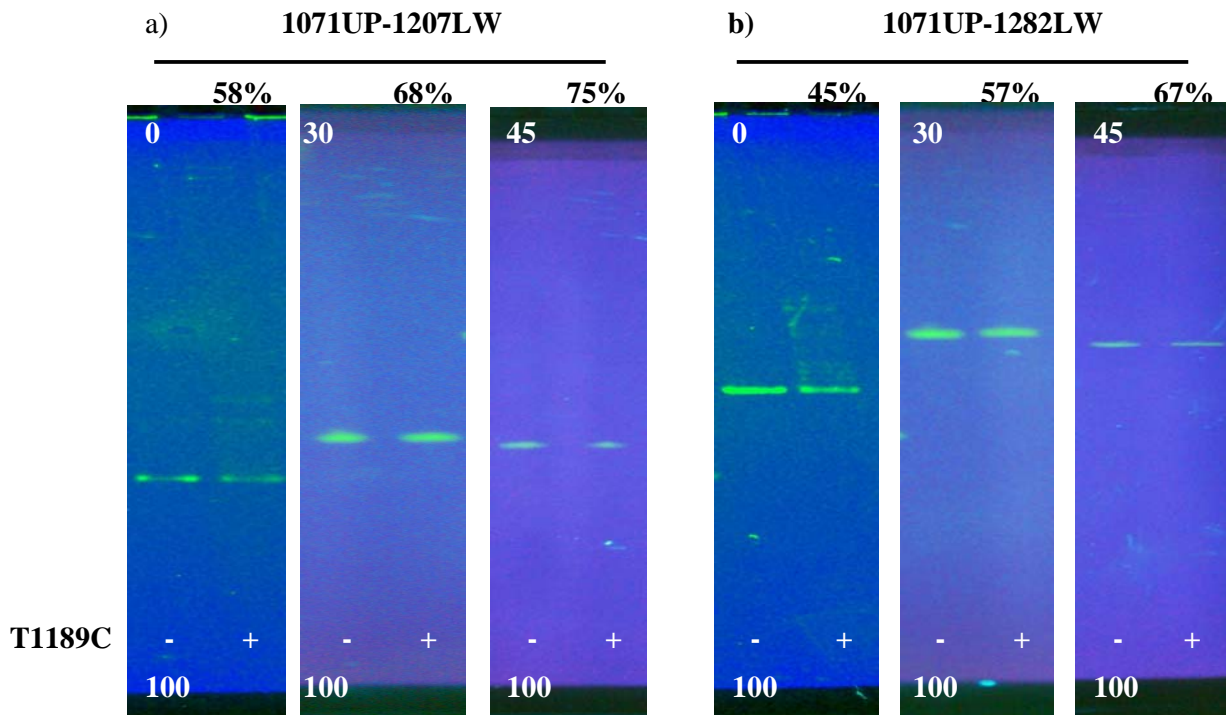


Figura 24. EGGD 7.5% acrilamida, 200V, 4.5h a 70° C utilizando gradientes altos para detectar T1189C en los fragmentos 1071UP-1207LW y 1071UP-1282LW según se indique. Las fotos muestran la totalidad de la longitud del gel, indicando el gradiente. En la parte superior de cada gel se indica el porcentaje de desnaturante en donde se detuvo la migración bajo las condiciones utilizadas.

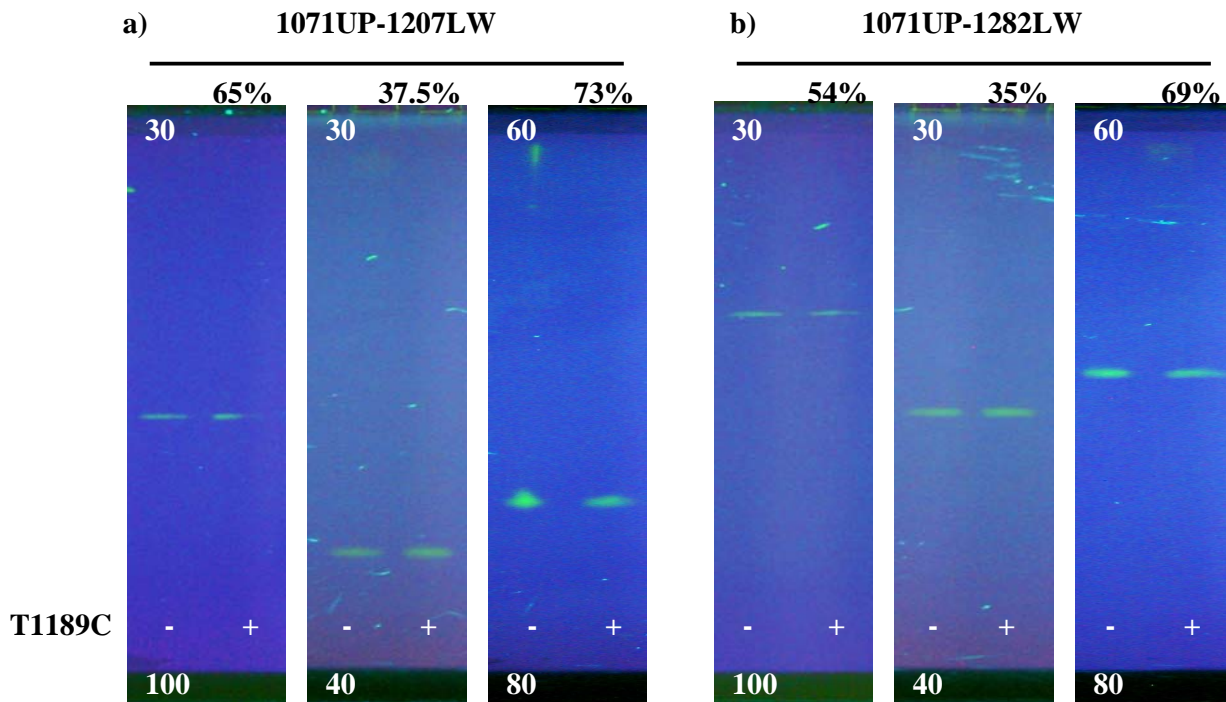


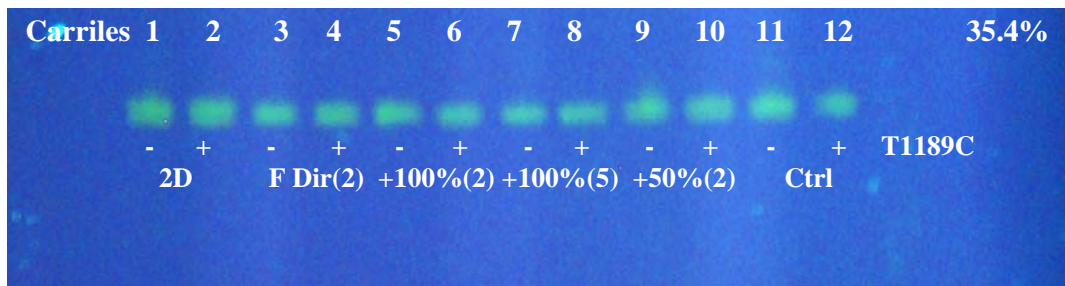
Figura 25. EGGD 7.5% acrilamida, 200V, 4.5h a 75° C utilizando gradientes altos para detectar T1189C en los fragmentos 1071UP-1207LW y 1071UP-1282LW según se indique. Las fotos muestran la totalidad de la longitud del gel, indicando el gradiente. En la parte superior de cada gel se indica el porcentaje de desnaturante en donde se detuvo la migración bajo las condiciones utilizadas.

Otro aspecto notable al analizar estos geles y que se hace evidente al compararlos uno junto al otro como en las figuras 24 y 25 es que los fragmentos recorren aproximadamente la misma distancia independientemente de la concentración del gradiente utilizado cuando existe el mismo rango de u/f. Por ejemplo, en la Fig. 25 la concentración de los gradientes 30-40% y 60-80% son muy diferentes, pero el rango es el mismo ( $\Delta 20$ ). Los fragmentos se detienen en ambos casos alrededor de la mitad del gel: ~35% y ~69% respectivamente. Esto sucede en varias condiciones de temperatura y gradiente. Por esta razón, es posible que los fragmentos, al desnaturalizarse parcialmente, continúen migrando en el entramado de acrilamida hasta que se quita el impulso por la corriente eléctrica y por esto recorran distancias similares. En la mayoría de los experimentos se utilizó un voltaje de 200V durante 4.5h, y en los que se utilizó un voltaje mayor (hasta 300V) las muestras recorrieron mayor distancia en el gel, pero no se separan más una de otra. A pesar de esto, en algunos gradientes se ven mejor las diferencias que en otros. Esto puede deberse a la diferencia en tiempo con que los fragmentos se desnaturalizan. Es decir, ambos comienzan a migrar y si un fragmento se desnaturaliza antes, su migración comienza a retrasarse pero el otro continúa migrando a la misma velocidad. Cuando el fragmento que va al frente alcanza su  $T_m$  y se desnaturaliza parcialmente, comienza a alentarse y entonces ambos fragmentos migran a la misma velocidad hasta retirar el impulso eléctrico. La distancia observada al teñir el gel corresponde a la diferencia de tiempo entre la desnaturalización de uno y otro fragmento bajo las condiciones del experimento. Por tanto, es importante encontrar el gradiente en que la diferencia del tiempo de desnaturalización es mayor a manera de observar una mayor separación de las muestras y diferenciarlas claramente. Así, para la última estrategia que se utilizó se regresó a utilizar gradientes en los que se

veían un poco de diferencias anteriormente. En este último intento se sometió la muestra a condiciones desnaturalizantes previas a la migración en EGGD.

#### 7.2.4.2c Pretratamiento de las muestras con desnaturalizantes

Modificando las condiciones desnaturalizantes en la composición del gel y la temperatura del tanque no fue posible detectar claramente a T1189C, por lo cual se decidió actuar sobre la muestra. Se usaron las condiciones en las que se observó alguna diferencia ligera anteriormente, con los cebadores *1071UP-1207LW* y *1071UP-1282LW*: 70° C 30-40% u/f. Las muestras fueron tratadas antes de colocarlas en el gel con diferentes desnaturalizantes: sometiéndolas a temperaturas altas, agregando diferentes porcentajes de urea, formamida o ambas en la mezcla. Ya que no fue posible aumentar la separación modificando los desnaturalizantes desde afuera se esperaba mejorar la diferenciación de los fragmentos al sensibilizar las muestras desde adentro, pensando que de esta manera tienen mayor acceso y efecto sobre las hebras del ADN antes de entrar al gel.



**Figura 26. EGGD 30-40% u/f, 70° C, 7.5% acrilamida de las muestras 1071UP-1282LW pretratadas con desnaturalizantes.** Las muestras fueron incubadas toda la noche a 60°C. 2D (carriles 1 y 2)-muestra incubada durante 2 días a 60°C. FDir (c3 y 4)-formamida directo 2µl. +100% (c 5-8) solución desnaturalizante urea/formamida al 100%, 2 ó 5 µl. +50% (c9-10) - solución desnaturalizante al 50%, 2µl. Ctrl (c11 y 12)- incubación a 60°C toda la noche.

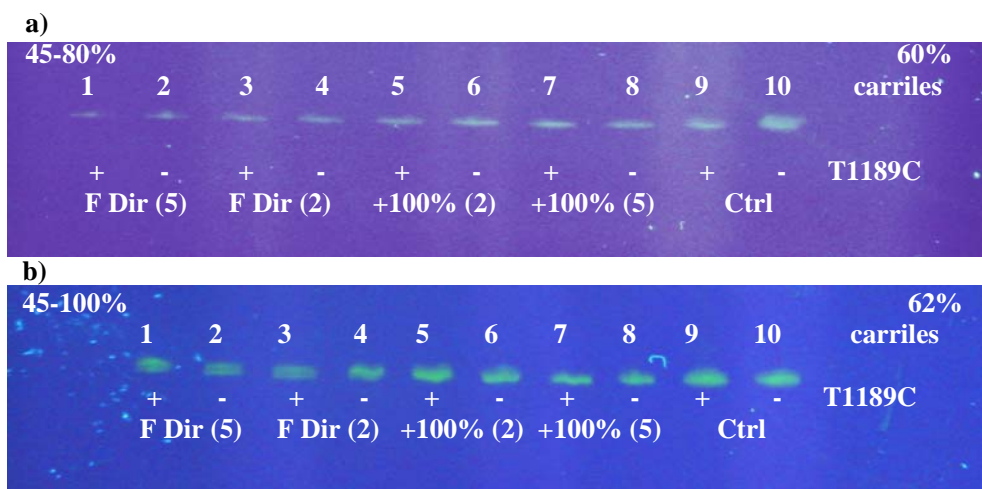
No existía referencia previa para determinar las condiciones a las que debían someterse las muestras, por lo cual se probaron diversas combinaciones. En cuanto a la desnaturalización por temperatura, se incubaron las muestras desde 5 min. hasta toda la

noche previa a la EGGD, a temperatura ambiente (RT), 50 y 60° C. Las soluciones de urea y formamida utilizadas se formularon nuevamente con base en las proporciones usadas para preparar los geles desnaturalizantes. Se prepararon las muestras con 5µl de producto de PCR y 2 ó 5 µl de las soluciones desnaturalizantes: 30, 40, 50 y 100% u/f ó en su caso formamida directa. Estas muestras se sometieron a las diferentes temperaturas y se mantuvieron en baño María hasta cargar cada una en el gel, a fin de mantener hasta el último momento las condiciones desnaturalizantes. En la figura 26 se muestran algunos de los resultados obtenidos.

No se observa un cambio evidente en la migración de los fragmentos. En algunos casos existe una pequeña diferencia de migración, pero ésta es igual a como se observó anteriormente sin tratamiento. En la muestra control se observa muy ligero retraso del fragmento con T1189C. También en los otros tratamientos se ve una ligera diferencia; sin embargo, es igual que el que se encontró anteriormente con este gradiente. Se esperaba encontrar al menos un retraso general de cada par de las muestras tratadas con respecto al control, como sucedió al modificar las proporciones de u/f del gel, pero no sucedió de esta manera. En la figura 26, las muestras tratadas con 5µl de solución u/f al 100% (carriles 7 y 8) migran muy parecido a las muestras control (carriles 11 y 12). Seguramente esto no se deba a que falte tiempo de incubación de las muestras pues incluso unas de ellas se incubaron durante dos días por un lado, y en el otro extremo hubo algunas muestras que fueron tratadas 5 min. antes de someterlas a EGGD.

Finalmente se utilizó otro gradiente para intentar aumentar la separación de las muestras. Se usaron los gradientes 45-80 y 45-100% u/f, a 70° C porque anteriormente se obtuvieron bandas definidas (sección 7.2.4.2b). Se incubaron las muestras a 60° C toda la noche y se sometieron a los dos tratamientos más agresivos: agregando 2 ó 5 µl

de solución desnaturalizante al 100% ó formamida directa. No se detectaron diferencias con el gradiente 40-80% (Fig. 27a). Sin embargo, utilizando el gradiente 45-100% se observaron diferencias ligeras en todas las condiciones. Estas diferencias aún son muy ligeras.



**Figura 27. Tratamiento de los fragmentos 1071UP-1282LW con formamida y solución desnaturalizante urea+formamida en gradientes altos a 70°C, 7.5% acrilamida. a) 45-80% u/f b) 45-100% u/f. El porcentaje de desnaturalizante en que se detuvo la migración del fragmento se indica en el extremo superior derecho. F Dir-formamida directa, 2 ó 5 µl. +100%- solución desnaturalizante 100%, 2 ó 5 µl.**

A pesar de modificar los desnaturalizantes el patrón de migración fue el mismo para los fragmentos con T1189C. No fue posible aumentar la distancia entre las muestras. Las mejores condiciones en que se vieron diferencias fue a 70° C 20-30% ó 30-40% u/f y a 64° C 25-35% u/f utilizando los fragmentos 1071UP-1282LW y 1071UP-1207LW donde la muestra T1189C (+) se retrasa ligeramente con respecto a la control.

## 8.- DISCUSIÓN

Mutaciones en el gen del ARNr 12S mitocondrial se han relacionado con el desarrollo de deficiencia auditiva neurosensorial no sindrómica espontánea. Adicionalmente, el uso de antibióticos aminoglicósidos acorta la edad de establecimiento y provoca una DA más profunda en estos individuos. Por tanto, la presencia de ciertas mutaciones en este gen provocan hipersensibilidad al efecto citotóxico de los AGs (Prezant y col, 1993; Bacino y col, 1995; Fischel-Ghodsian y col, 1997; Zhao y col, 2004, Li y col, 2005). Estos antibióticos son ampliamente administrados en la clínica cuando se desconoce la etiología de la infección, especialmente en países en vías de desarrollo e incluso en recién nacidos (Rodríguez-Álvarez, 2002, Silva y Carvalho, 2007), por lo cual resulta importante determinar la predisposición genética de un individuo para desarrollar sordera si se le somete a este tratamiento. Por esta razón, en el presente trabajo se propone el uso de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante como método para detectar cambios puntuales en la secuencia gen del ARNr 12S mitocondrial humano.

Los métodos más utilizados para estudiar la predisposición genética al desarrollo de DA espontánea y por AGs son RFLP (Polimorfismos por Longitud de Fragmentos de Restricción, por sus siglas en inglés), y secuenciación automática. La primera se ha utilizado para detectar la mutación A1555G, y es sensible para detectar heteroplasmía. Sin embargo, su efectividad es limitada pues resulta necesario que el cambio en la secuencia del ADN modifique un sitio reconocido por enzimas de restricción, reduciendo el número de posiciones que son detectables. Además, requiere de un amplio repertorio de enzimas para llevar a cabo el análisis. Por otra parte, la secuenciación automática es un método muy confiable. Sin embargo, resulta muy costosa y no es tan sensible para detectar heteroplasmía, pudiendo confundirse con contaminación. Se

propone el uso de EGGD con este fin ya que se utiliza ampliamente en el campo de la microbiología ambiental para analizar los cambios en la composición de las poblaciones bacterianas de un sitio específico. Amplificando el gen del ARNr de la subunidad pequeña en bacterias es posible determinar las proporciones relativas de cada especie e identificarlas dependiendo de su patrón de migración (Green y col, 2009). Su uso para el estudio del ADN mitocondrial no es muy extenso, y es aún menor en humanos. Una búsqueda en la base de datos del NCBI con las palabras clave: *DGGE AND mitochondria* arroja sólo 17 resultados, de los cuáles 6 son en humanos. Entre ellos, 4 estudian los ARNt, 1 la región hipervariable 1 (HV1) y el último escanea todo el ADNmt. Por lo cual, este trabajo sería el primer reporte en que se utiliza la EGGD para buscar mutaciones puntuales en el gen del ARNr 12S mitocondrial humano. Con esta técnica es posible analizar varias muestras simultáneamente sin necesidad de invertir en diferentes reactivos para cada posición. Además, es sensible para detectar heteroplasmía (Tully y col, 2000), la cual es una condición importante al estudiar patologías de origen mitocondrial. Por otra parte, es necesario estandarizar las condiciones adecuadas para cada combinación de cebadores. Las condiciones reportadas en ADNmt varían grandemente: 4-18 h, desde 65 hasta 150V, y se realizan en gradientes de urea/formamida muy distintos (10-60%, 40-50%, 20-80%) (Yoon y col, 1991; Tully y col, 2000; Kolberg y col, 2005). Esto hace que su estandarización sea compleja en ocasiones. Las condiciones encontradas en este trabajo permiten detectar 3 secuencias distintas (s/cambio, A663G, y A827G) en un sólo gradiente de manera muy clara. La detección del cambio T1189C fue más complicada.

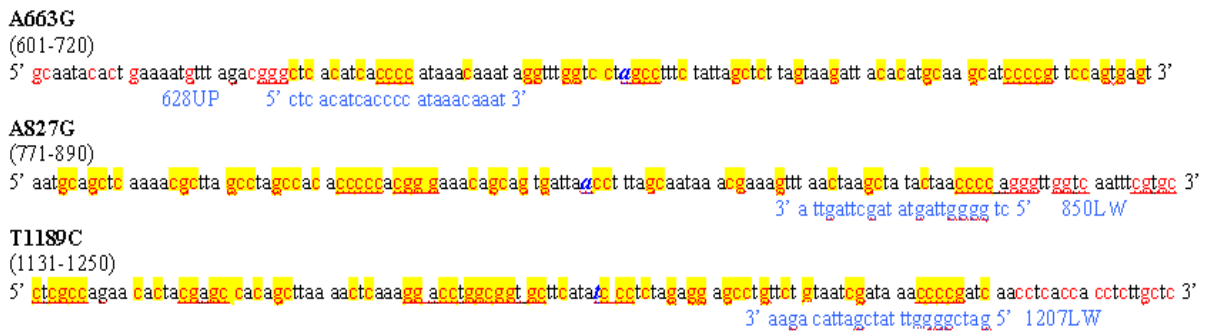
En un principio se intentó detectar todos los alelos en un solo fragmento y una condición utilizando los cebadores *628UP-1282LW*. Fischer y Lerman (1983) lograron detectar 6 diferentes cambios puntuales en diferentes posiciones usando un fragmento



de ADN de fago  $\lambda$  de 536 pb de longitud, presentes en el primer dominio de desnaturalización. En nuestro estudio, utilizando esta combinación de cebadores sólo fue posible detectar la variante A663G de las demás a pesar de que el tamaño de este fragmento se encuentra dentro del rango detectable con esta técnica (200-700 pb. Yoon y col, 1991). Los cambios A827G y T1189C se encuentran alejados de los extremos, razón por la cual del fragmento, no pudieron ser discernidos con respecto a la muestra control. Es posible que varios dominios en los extremos lograran desnaturalizarse paulatinamente al encontrar concentraciones crecientes de urea/formamida, retardando la migración del fragmento, mientras que los dominios centrales no lograron desnaturalizarse bajo todas las condiciones probadas. Esto pudo deberse además, a que era necesario exponer a los fragmentos a mayores concentraciones de los desnaturalizantes, lo que no se logró debido a falta de tiempo de corrimiento o a que la parte del fragmento que se encontraba en cadena sencilla fue de tal longitud que ya no permitió que continuara la migración de éste a través de la retícula de acrilamida (Fischer y Lerman, 1983).

Al utilizar fragmentos más cortos (245 pb), flanqueando la región a analizar con los cebadores *628UP-850LW*, fue posible detectar los cambios A663G y A827G (Fig. 19). En este fragmento los cambios se encontraban aproximadamente a 40 pb de cada extremo. Esta disposición posiblemente les hizo susceptibles para ser detectados porque los cambios pertenecían a dominios de desnaturalización susceptibles a la urea y formamida. En la figura 28 se muestra la secuencia contigua a los cebadores utilizados para amplificar los fragmentos del gen, resaltando en amarillo las regiones de GC. Ya que la desnaturalización es un proceso cooperativo que involucra todo el dominio, esta figura resulta de utilidad para explicar el patrón de migración observado experimentalmente: la muestra sin cambios se retrasa más, la A827G migra intermedia

y la A663G recorre mayor distancia (Fig. 19). A663 se encuentra rodeada de varias GCs, lo cual al cambiar por G podría contribuir para estabilizar el dominio al que pertenece, aumentando la Tm de éste. El contexto de A827G es diferente aunque se trate de la misma transición, sin tantas GCs alrededor, por lo cual es probable que el aumento de la Tm no sea tan severo. De esta manera, las muestras comienzan a migrar simultáneamente en el gradiente de urea/formamida provocando la desnaturalización del extremo 3' del fragmento control y retrasando su migración. Esto no sucede con el fragmento con A827G ya que aumenta la Tm del dominio en este extremo y permite que recorra mayor distancia en el gel. Sin embargo, finalmente se desnaturaliza antes que el extremo 5' del fragmento con A663G, el cual recorre la mayor distancia en el gel, siendo más estable por las GCs que le rodean.



**Figura 28. Secuencia contigua a los cebadores utilizados para amplificar los fragmentos del gen del ARNr 12S del ADNmt.** En azul se muestra la posición del cebador y del cambio en la secuencia; en amarillo se remarcan las regiones de GC en la secuencia.

En el caso de la muestra con el cambio T1189C, se sintetizó un fragmento en el que la mutación se encontrara a menos de 40 pb del extremo 3' (*1071UP-1207LW*) siguiendo la misma estrategia que para detectar A663G y A827G, pero no se pudo detectar el cambio con tanta claridad a pesar de modificar las condiciones. Aún utilizando condiciones desnaturalizantes extremas resulta muy extraño que no se haya

podido distinguir claramente la variante T1189C de las muestras control. Posiblemente lo que sucede en este fragmento es que la desnaturalización se da solamente en el extremo 5', mientras que el 3' se mantiene en doble cadena. Observando la figura anterior, en la secuencia río arriba de la posición 1189 se encuentra una región de GCs; lo mismo sucede cerca del extremo 3' del amplificado. Esto podría funcionar como pinza GC, haciendo al dominio del extremo 3' altamente estable a la desnaturalización y que por tanto no fuera posible detectarlo con claridad. Utilizando EGGD sólo se pueden detectar las mutaciones contenidas en el primer dominio de desnaturalización del fragmento (Fischer y Lerman, 1983); pero se ha observado que al utilizar una secuencia de 40 pbs GC en el cebador 5' ésta funciona como pinza permitiendo detectar más del 80% de los cambios en un fragmento dad (Yoon y col, 1991). En los experimentos realizados con esta pinza en el cebador *628UP* se observó que los fragmentos recorrían mayores distancias en el gel, alcanzando concentraciones mayores de los desnaturalizantes. Al estabilizar el fragmento éste migra mejor a través de la red de acrilamida, pero no se distinguieron los cambios. Utilizando los cebadores *GC628UP-850LW* sólo se pudo distinguir las muestras con el cambio A827G del resto, posiblemente porque a causa de la pinza GC usada en el extremo 5' se estabilizó ese dominio. Tully y col (2000), al analizar la región hipervariable 1 (HV region 1) no pudieron detectar heteroplasmía en una región con repetidos CCC debido a su composición. Una alternativa que no se abordó en el presente trabajo para resolver este problema sería mantener la T1189C a una distancia menor de 40 pb's del extremo 3' con el cebador *1207LW*, y utilizar una pinza GC en el extremo 5' en el oligonucleótido *1071UP*. Esto crearía un dominio con Tm más alta en el fragmento, que lo mantendría estable, disminuyendo la Tm relativa del dominio donde se encuentra el cambio T1189C, haciéndolo detectable por EGGD con mayor claridad.

En lo concerniente a la relación estructura-función de los cambios encontrados, aún no es claro si éstos provocan hipersensibilidad a los AGs para desarrollar sordera neurosensorial no sindrómica. A827G ya ha sido aceptado (Li y col, 2005), pero éste es el primer reporte de A663G y T1189C. En estudios realizados en el laboratorio se secuenció por completo el gen del ARNr 12S mitocondrial en una población de 40 individuos: sanos sin tratamiento, hipersensibles al tratamiento con AGs y sordos sin tratamiento. Los cambios A663G y A827G se encontraron en frecuencias similares tanto en los individuos sanos como en los afectados en la población mexicana. Por Su parte, la variante T1189C encontró en dos individuos con daño a la función vestibular y no en individuos sanos. En el laboratorio se espera continuar este estudio con un número mayor de individuos para correlacionar los datos clínicos con los moleculares.

A diferencia de la mutación A1555G que ha sido ampliamente estudiada (Prezant y col, 1991; Fischel-Ghodsian y col, 1997; Pandya y col, 1999; López-Bigas y col, 2000; Gallo-Terán y col, 2002), la estructura y función de las variantes encontradas en la población analizada no es muy clara. Actualmente no se ha estudiado la estructura tridimensional del ribosoma mitocondrial humano hasta lograr cristalizarlo. Además, resulta difícil comparar directamente la secuencias del ARNr 12S mitocondrial humano con la del ARNr 16S bacteriano ya que este último tiene aproximadamente 500 pb más, cuya función ha sido sustituida por la aparición de proteínas ribosomales en la macromolécula de los mamíferos (Sharma y col, 2003). Debido a estas limitaciones, para conocer la estructura y función probable de las variantes encontradas en este trabajo se utilizaron dos estrategias. 1) Se comparó la secuencia del ARNr 12S mitocondrial humano (NC-001807) con las secuencias mitocondriales de varios mamíferos (*Pan troglodytes* NC\_001643, *Gorilla gorilla* NC\_001645, *Bos taurus* NC\_006853, *Mus musculus* NC\_005089, *Ratus norvegicus* NC\_001665, *Canis lupus*

*familiaris* NC\_002008) y con la de *Escherichia coli* (J01695.2), a manera de identificar si los cambios se encuentran en posiciones conservadas (Anexo 3). 2) Correlacionar las estructuras del ARNr 12S mitocondrial humano y el ARNr 16S bacteriano, cuya estructura secundaria ha sido más estudiada y su estructura cristalográfica ha sido dilucidada (Wimberly y col, 2000). A través de estos estudios se han propuesto algunos mecanismos del proceso natural de traducción de proteínas, así como las interacciones del ARNr y proteínas que componen el ribosoma bacteriano con antibióticos (Carter y col, 2000; Hobbie y col, 2007 y 2008). Gutell y col (Comparative RNA Website and Project) han utilizado métodos comparativos para establecer las estructuras secundarias del ARNr de diversos organismos (Fig. 10). Combinando estas herramientas se puede tener una idea del papel de las variantes encontradas en el presente trabajo en el desarrollo de DA.

La variante A663G se encuentra a tan sólo 15 pb del extremo 5' del gen. Es una posición conservada entre los mamíferos analizados, menos en rata y ratón; también se conserva en *E. coli*. Comparando con la estructura del ribosoma bacteriano (Fig. 10), este cambio se encontraría en el sitio central de la subunidad pequeña del ribosoma. Pertenece a la hélice H1, que junto con la H2 se encuentra en el sitio donde se separan los 4 dominios de éste. Por su posición esta hélice debe poseer mucha flexibilidad para permitir los movimientos necesarios para el proceso de traducción, sobre todo de la translocación del ARNt del sitio A al P después de la formación del enlace peptídico (Seminaro del Dr. J Puglisi en el Instituto de Investigaciones Biomédicas). En bacteria esta posición forma una interacción no canónica U<sup>o</sup>G lo cual hace que el tallo de la hélice sea pequeño. En mitocondria el par 655U-A663 es canónico lo cual extiende el tallo de la H1; sin embargo, en la variante con G sucede lo mismo que en la bacteria, y el tallo es corto, abriendo la estructura como en el caso de la A1555G (Prezant y col,

1993; Hobbie y col, 2008) (Fig. 11). Otras mutaciones que se han relacionado con la DA neurosensorial no sindrómica se encuentran también en los tallos de las hélices: T1005C se encuentra en la H19 y T1095C en la H22, así como C1494T-A1555G que se encuentran en la H39 (la numeración de las hélices corresponde al modelo del ARNr 12S en la Fig. 10). Por tanto, el cambio A663G podría afectar el funcionamiento, aunque faltan estudios que confirmen esto.

El efecto de las variantes en la estructura y función es más fácil de entender cuando se encuentran en el tallo, a diferencia de las que se encuentran en las asas. Tal es el caso de las otras variantes encontradas (Fig. 10). A827 es una posición conservada tanto en mamíferos como en *E. coli* y forma parte de un asa en el dominio 5' entre las hélices 12 y 5. Ya que no se encuentra apareada, el cambio por G no modifica a simple vista la estructura secundaria, y su función no es muy clara. T1189 también es una posición altamente conservada, hasta en bacteria. Se encuentra en una asa entre H28 y H29, en el dominio 3' mayor del ARNr 12S, pero cerca del centro de la subunidad pequeña ribosomal. Parece que no modifica la estructura secundaria pues no está apareada, aunque alarga una región de Cs, las cuales conforman el *loop* en humano. El papel de T1189C no es muy claro en este contexto, y aún especialmente porque los individuos en que se halló no presentaban deficiencia en la función auditiva, sino en la vestibular. Otras mutaciones reportadas que se encuentran en *loops* son las que modifican la posición 961 (entre H17 y 18) y A1116G (cerca de H24). Las asas son muy importantes para el correcto arreglo e interacción tridimensional de las hélices ribosomales. Es posible que las variantes que modifican estas asas alteren la capacidad del ARN para 'doblarse' en el ángulo adecuado y adoptar la conformación ideal para su funcionamiento desestabilizando la molécula, aún a distancia. De cualquier manera, es necesario realizar estudios posteriores para dilucidar el papel de cada uno de estos

cambios en las propiedades del ARNr 12S mitocondrial con respecto a su estructura. Estudios posteriores facilitarían la interpretación de por qué una mutación puntual puede alterar de manera definitiva la función del oído interno. De manera inmediata es posible utilizar la EGGD para analizar una población más grande o individuos relacionados y establecer si existe relación entre las variantes encontradas y la DA; así poder dirigir los trabajos estructurales posteriores de manera eficiente. Por todo esto resulta importante reconocer el uso de la técnica del EGGD para contribuir al análisis de cambios nucleotídicos únicos en este gen tan importante del ADN mitocondrial.

## 9.- Conclusiones

- En la población mexicana analizada no se encontró la mutación A1555G reportada en otras poblaciones, pero sí A827G. En cambio, se encontraron los cambios A663G y T1189C.
- El cambio T1189C resulta de interés ya que se encontró en 2 individuos con deficiencia vestibular, y no se observó en individuos sanos. La región cercana a este cambio es rica en GCs, lo que dificulta su detección de manera evidente bajo las condiciones experimentales usadas. Las condiciones donde se observó una mejor separación de las bandas sin cambio y con T1189C son: a  $70^{\circ}C$ , 20—30% ó 30-40% urea/formamida, y a  $64^{\circ}C$  25-35% *u/f* con los cebadores *1071UP-1282LW* y *1071UP-1207LW*.
- Se determinaron las condiciones para la identificación de las variantes A663G, A827G y sin cambios en un solo fragmento de ADN. Utilizando los cebadores *628UP-850LW*, gel de 7.5% acrilamida y gradiente desnaturizante 25-60% urea/formamida, con corriente de 200V durante 4.5h a  $55^{\circ}C$ .
- EGGD es un método útil para detectar cambios puntuales en el gen del ARNr 12S mitocondrial humano.



## **APÉNDICE 1. Base Teórica de los Métodos utilizados**

### **A1.1 Purificación de ADN total de sangre periférica.**

En términos generales, la purificación de ADN de sangre periférica consta de 4 etapas: lisis celular, precipitación del ADN, lavado del ADN, y solubilización del ADN (Wikipedia. DNA Extraction). Para la lisis celular se utiliza una solución con detergentes, proteasas, y ARNasas, los cuales solubilizan la membrana celular y degradan las proteínas y ARN presentes. Después se agrega etanol o isopropanol para precipitar el ADN. Éste se solubiliza debido a las propiedades dieléctricas del agua en presencia de moléculas polares como el ADN. El etanol es menos polar que el agua; si se agrega suficiente, desarregla las interacciones del agua con el esqueleto de fosfatos del ADN. Esto permite la interacción del esqueleto con los iones positivos presentes en la solución y la precipitación del ADN (Wikipedia. Ethanol Precipitation). El sistema DNAzol utiliza una solución de lisis con detergente de guanidina que hidroliza el ARN y promueve la precipitación selectiva de ADN del lisado celular (Biocompare). Lavados adicionales con etanol permiten obtener un ADN más puro. Finalmente, se resuspenden las muestras en agua de manera que el solvente no intervenga en usos posteriores.

### **A1.2 Amplificación de fragmentos del ADN mitocondrial por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis en 1986 (Saiki y col 1986). Esta técnica de Biología Molecular es ampliamente utilizada en investigación, medicina, ciencia forense, paleontología, genética de poblaciones, etc. ya que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de material genético *in vitro*, teóricamente a partir de una sola molécula inicial. Esto representa grandes ventajas pues anteriormente era necesario poseer muestras muy

grandes o realizar clonación previamente en un vector bacteriano para poder analizar el ADN.

El fundamento se encuentra en el mecanismo por el cual el ADN es sintetizado naturalmente dentro de la célula. En un tubo especializado, el cual tiene una pared muy fina de alta conductividad térmica se colocan todos los componentes para la reacción. Se necesita un *templado*: el material genético que contiene el fragmento que se desea amplificar; *cebadores*: oligonucleótidos de entre 15-30 pb's complementarios a las dos hebras para delimitar el fragmento para analizar; *dNTPs* (desoxinucleótidos trifosfato) que son el sustrato para polimerizar nuevo ADN; *iones divalentes* (en el caso de la polimerasa *Phusion* lo que se usa es  $MgCl_2$ ) para mejorar la procesividad de la enzima; *solución amortiguadora* que mantiene el pH adecuado para la polimerasa; y *ADN polimerasa*, que es la enzima encargada de sintetizar los fragmentos nuevos, suele provenir de bacterias termófilas lo cual la hacen resistente a las altas temperaturas usadas en cada ciclo del PCR para la desnaturalización del ADN. Esto se lleva a cabo en un aparato llamado termociclador, el cual ajusta rápidamente la temperatura para cada una de las etapas de la PCR.

En la etapa inicial de desnaturalización del ADN la célula utiliza helicasas especializadas, mientras que en la PCR se somete la reacción a una temperatura muy alta para romper los puentes de hidrógeno entre las dos hebras (entre 90-98°C). Después, dentro de cada ciclo se somete a desnaturalización también a temperaturas altas. En la etapa de alineamiento se disminuye la temperatura entre 50 y 65° C generalmente, aunque depende de la  $T_m$  de los oligonucleótidos, dando tiempo suficiente para que se unan fuertemente a la zona que debe ser amplificada. En la etapa de extensión se usa la temperatura óptima de trabajo de la enzima (que suele ser intermedia a las otras), y es donde se sintetizan los nuevos fragmentos. Estas tres etapas

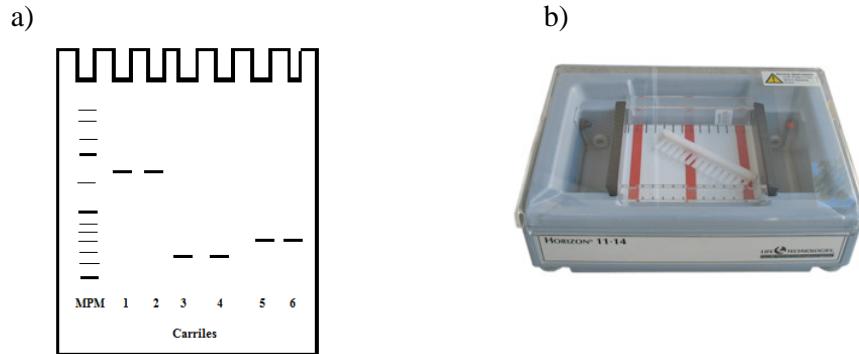
se repiten entre 20 y 35 veces, aumentando el número de moléculas en cada ciclo de manera exponencial. Finalmente se dan entre 5 y 10 min de tiempo final de extensión para asegurar que todas las copias del fragmento deseado se sinteticen por completo. Cada uno de los parámetros (concentración de cada uno de los componentes, tiempos de cada ciclo, temperaturas de cada etapa, no. de ciclos) deben ajustarse dependiendo de los oligonucleótidos utilizados para optimizar el producto obtenido.

### **A1.3 Electroforesis para ADN en gel de agarosa**

La electroforesis consiste en la migración de macromoléculas a través de una retícula por la aplicación de un campo eléctrico. Esta migración se debe a la carga negativa de las macromoléculas. La solución de carga que se utiliza para preparar las muestras se une al ADN y le provee de una carga neta negativa proporcional al tamaño del fragmento. Para determinar si se trata del producto esperado se utiliza un Marcador de Peso Molecular comercial (*Invitrogen 100bp Ladder Cat. No. 10830-012*), el cual es una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño conocido contra los cuales se comparan los productos de PCR obtenidos. Los geles se someten a las fuerzas de un campo eléctrico, el cual promueve que los fragmentos de ADN, ahora cargados negativamente, migren a través de la retícula de agarosa hasta el ánodo y se separen dependiendo de su peso molecular. Los fragmentos de peso molecular bajo recorren mayor distancia a través del gel y los de peso molecular alto migran con mayor lentitud (Figura A1.1). Finalmente, para visualizar los fragmentos se tiñe el gel. El colorante utilizado (*SYBR GREEN I-Invitrogen*) se intercala entre el ADN de doble cadena, emitiendo fluorescencia al exponerse a luz UV.

Esta técnica permite discernir de manera rápida si el producto de PCR es el deseado y determinar su pureza. Dado que se conoce la secuencia del fragmento

buscado se compara el tamaño del producto obtenido con el marcador de peso molecular. También se determina la pureza al observar el número e intensidad de las bandas en el gel.



**Figura A1.1 Electroforesis para ADN en gel de agarosa.** a) Diagrama explicativo. Se observan la migración final de varios fragmentos de ADN (carriles 1-6). Los fragmentos más pesados migran lentamente (c 1 y 2), mientras que los más pequeños recorren mayor distancia (c 3 y 4). Al comparar con el marcador de peso molecular, se puede conocer el tamaño del fragmento. b) Cámara horizontal para electroforesis de ADN utilizada en este trabajo

#### A1.4 Secuenciación Automática de ADN

Esta técnica combina los principios de PCR y de electroforesis. Se requiere del templado cuya secuencia se quiere conocer (en este caso los fragmentos amplificados por PCR); cebadores que reconozcan la secuencia 5' de nuestro fragmento; polimerasa para sintetizar la cadena complementaria; dNTPs –desoxiribonucleótidos trifosfato: dATP , dCTP, dTTP, dGTP. Esto se prepara por cuadruplicado en tubos diferentes. Entonces, a cada tubo se le agrega uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) marcados con fluorescencia. Éstos tienen la característica de que pueden incorporarse a la cadena nascente de ADN, pero en ese momento se detiene la síntesis pues carecen del grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar, indispensable para continuar la síntesis. Al someter cada mezcla a los ciclos normales de PCR estos ddNTPs compiten con los dNTPS, por lo cual se producen fragmentos de varios tamaños con un mismo nucleótido final para cada tubo.

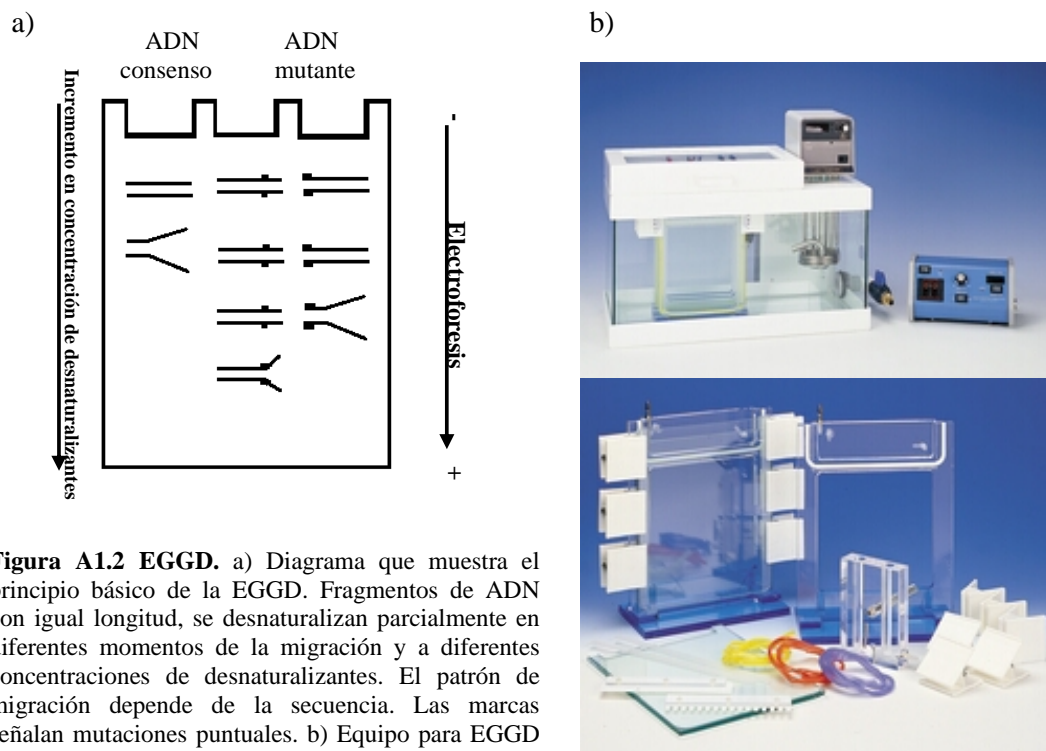
Las 4 mezclas se juntan y se someten a electroforesis capilar. En ese extremo se encuentra un láser el cuál detecta el tipo de marca fluorescente del fragmento. Los fragmentos más pequeños, por lo tanto más cercanos al extremo 5' son detectados por el láser primero. De manera ordenada se detectan las diferentes marcas fluorescentes en dirección 5'→3' que conectado a una computadora se interpreta como la secuencia del fragmento. El resultado se muestra gráficamente en un cromatograma. En caso de que no sea posible determinar la base que ocupa esa posición se muestra una letra *N*. Por esta razón, es importante analizar muestras limpias. (Secuenciación de ADN. <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm>)

### **A1.5 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (EGGD)**

La Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante es una técnica de Biología Molecular capaz de detectar cambios de una sola base en un fragmento dado. En el ámbito médico se utiliza para detectar Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP-Single Nucleotide Polymorphisms) que sirven como marcadores moleculares o se relacionan con alguna enfermedad (Green, 2009). Fragmentos de ADN de una misma región y longitud amplificados de diferentes muestras por PCR son sometidos a electroforesis en un gel de acrilamida con un gradiente lineal de desnaturalizantes. En la medida en que los fragmentos recorren la retícula del gel y aumenta la concentración del desnaturalizante, estos pasan por diferentes estados de separación de las cadenas. Cada fragmento posee varios dominios, de longitud variable (desde 25 hasta varios cientos de pares de bases) los cuales se desnaturalizan de manera cooperativa a temperaturas discretas, denominadas *T<sub>m</sub>* (Myers, 1988). La *T<sub>m</sub>* de un dominio depende de su secuencia: los puentes de hidrógeno entre las bases (3 para GC, 2 para AT) y las interacciones de empaque entre bases adyacentes. El orden de las bases contribuye a lo

anterior y por tanto a la estabilidad local de un dominio. Debido a la cooperatividad, cambios de hasta una sola base pueden alterar grandemente la  $T_m$  de un dominio dado.

En la cámara de electroforesis se buscan las condiciones favorables para la desnaturalización y detección de los cambios puntuales. El amortiguador de la cámara se calienta a una temperatura por debajo del dominio con menor  $T_m$ , generalmente entre 60 y 70 °C. Conforme avanzan los fragmentos en el gel y aumenta el gradiente desnaturalizante, la urea y formamida intervienen en los puentes de hidrógeno entre las bases separando las cadenas. Los dominios de menor  $T_m$  se separan y en ese momento una región del fragmento se encuentra en doble cadena y otra en cadena sencilla. La desnaturalización parcial del fragmento provoca el retraso en la migración del ADN en el gel. Esto permite detectar cambios en la secuencia de las muestras analizadas a través de los patrones de migración. En ocasiones se agrega una pinza de 40 pb's de GC en el extremo 5' del fragmento para que sea el domino de mayor  $T_m$  y así mejorar la sensibilidad de la técnica para detectar todos los cambios en la secuencia (Myers, 1988).



**Figura A1.2 EGGD.** a) Diagrama que muestra el principio básico de la EGGD. Fragmentos de ADN con igual longitud, se desnaturalizan parcialmente en diferentes momentos de la migración y a diferentes concentraciones de desnaturalizantes. El patrón de migración depende de la secuencia. Las marcas señalan mutaciones puntuales. b) Equipo para EGGD utilizado en este trabajo.



Ubicación de los cebadores utilizados para amplificar el gen del ARNr 12S mitocondrial.

Gen ARNr 12S

601 611 621 631 641 651 661 671  
**GCAATACACT** **GAAAATGTTT** **AGACGGGCTC** **ACATCACCCC** **ATAAACAAAT** AGGTTTGGTC CTAGCCTTTC TATTAGCTCT  
628UP 5'CTC ACATCACCCC ATAAACAAAT 3' A663G

681 691 701 711 721 731 741 751  
 TAGTAAGATT ACACATGCAA GCATCCCCGT TCCAGTGAGT TCACCCTCTA AATCACCACG ATCAAAAGGA ACAAGCATCA

761 771 781 791 801 811 821 831  
 AGCACGCAGC AATGCAGCTC AAAACGCTTA GCCTAGCCAC ACCCCACGG GAAACAGCAG TGATTAACCT TTAGCAATAA  
A827G

841 851 861 871 881 891 901 911  
 ACGAAAGTTT AACTAAGCTA TACTAACCCC AGGTTTGGTC AATTTCTGTC CAGCCACCGC GGTCACACGA TTAACCCAAG  
 3' A TTGATTCGAT ATGATTGGGG TC 5' 850LW

921 931 941 951 961 971 981 991  
 TCAATAGAAG CCGGCCTAAA GAGTGTITTA GATCACCCCC **TCCCAATAA** AGCTAAAACCT CACCTGAGTT GTAAAAAACT  
961delT/insC, T961C

1001 1011 1021 1031 1041 1051 1061 1071  
 CCAGTTGACA CAAAATAGAC TACGAAAGTG GCTTTAACAT ATCTGAACAC ACAATAGCTA AGACCCAAAC TGGGATTAGA  
T1005C 1071UP 5' TGGGATTAGA

1081 1091 1101 1111 1121 1131 1141 1151  
 TACCCCACTA TGCTTAGCCC TAAACCTCAA CAGTTAAATC AACAAAACCTG CTCGCCAGAA CACTACGAGC CACAGCTTAA  
 TACCCCACTA TGCTT 3' A1116G  
T1095C

1161 1171 1181 1191 1201 1211 1221 1231  
 AACTCAAAGG ACCTGGCGGT GCTTCATATC CCTCTAGAGG AGCCTGTCT GTAATCGATA AACCCCGATC AACCTCACCA  
T1189C 3' AAGA CATTAGCTAT TTGGGGCTA 5' 1207LW

1241 1251 1261 1271 1281 1291 1301 1311  
 CCTCTTGCTC AGCCTATATA CCGCCATCTT CAGCAAACCC TGATGAAGGC TACAAAGTAA GCGCAAGTAC CCACGTAAAG  
 3'CTACTTCCG ATGTTTCATT CCGCTT 5' 1282LW

1321 1331 1341 1351 1361 1371 1381 1391  
 ACGTTAGGTC AAGGTGTAGC CCATGAGGTG GCAAGAAATG GGCTACATTT TCTACCCAG AAAACTACGA TAGCCCTTAT

1401 1411 1421 1431 1441 1451 1461 1471  
 GAAACTTAAG GGTGGAAGGT GGATTTAGCA GTAAACTAAG AGTAGAGTGC TTAGTTGAAC AGGGCCCTGA AGCGCGTACA

1481 1491 1501 1511 1521 1531 1541 1551  
 CACCGCCCGT CACCCTCCTC AAGTATACTT CAAAGGACAT TTAATAAAAA CCCCTACGCA TTTATATAGA GGAGCAAGT  
C1494T A1555G

1561 1571 1581 1591 1601 1611 1621 1631  
 CGTAACATGG TAAGTGTACT GGAAAGTGCA CTTGGACG **AA\_C**CAGAGTGTA **GCTTAACACA** **AAGCACCCAA** **CTTACACTTA**  
 3' GTGGOTT GAATGTGAAT

1641 1651 1661 1671  
**GGAGATTCA** **ACTTAACTTG** **ACCGCTCTGA** **GCTAAACCTA**  
 CCTCTAA 5' 1624LW

La numeración corresponde a la posición en el ADN mitocondrial. verde: secuencia contigua al gen de interés; azul subrayado: primer codón del gen; rojo subrayado: último codón del gen; rojo: mutaciones relacionadas con deficiencia auditiva neurosensorial no sindrómica, incluyendo las encontradas en este estudio. (Secuencia obtenida de <http://www.mitomap.org> en Julio de 2010 )



Programas utilizados para amplificar los fragmentos de ADN mitocondrial.

ARNt Ser (UCN)

**PHU60**

ETAPA	Temperatura	Tiempo	
D. Inicial	98°C	5 min	
Desnaturalización	98°C	30 s	35 Ciclos
Alineamiento	60°C	25 s	
Extensión	72°C	45 s	
Ext. Final	72°C	7 min	
Enfriamiento	4°C	∞	

ARNr 12S

**PHU60**

ETAPA	Temperatura	Tiempo	
D. Inicial	98°C	5 min	
Desnaturalización	98°C	30 s	35 Ciclos
Alineamiento	60°C	25 s	
Extensión	72°C	45 s	
Ext. Final	72°C	7 min	
Enfriamiento	4°C	∞	

**PHUSION55**

Temperatura	Tiempo
98°C	5 min
98°C	30 s
55°C	25 s
72°C	45 s
72°C	7 min
4°C	∞

628UP-1282LW

GC628UP-1282LW

GC628UP-850LW

**PHUSION60**

ETAPA	Temperatura	Tiempo	
D. Inicial	98°C	5 min	
Desnaturalización	98°C	10 s	30 ciclos
Alineamiento	60°C	25 s	
Extensión	72°C	40 s	
Ext. Final	72°C	5 min	
Enfriamiento	4°C	∞	

**PHUSION65**

Temperatura	Tiempo
98°C	5 min
98°C	10 s
65°C	25 s
72°C	40 s
72°C	5 min
4°C	∞

628UP-850LW

628UP-1207LW

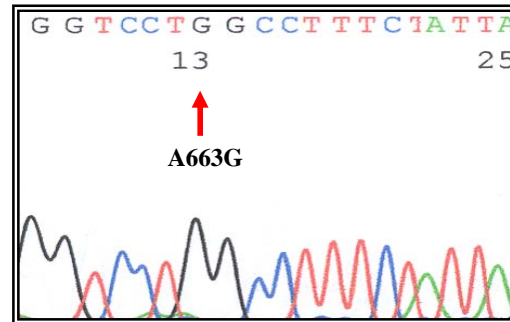
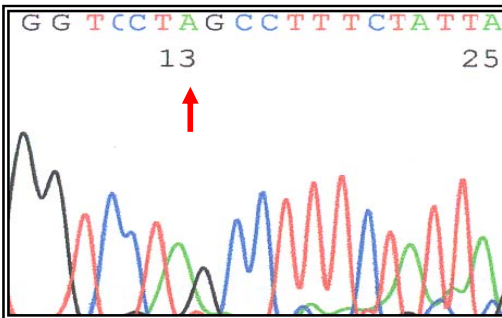
1071UP-1207LW

1071UP-1282LW

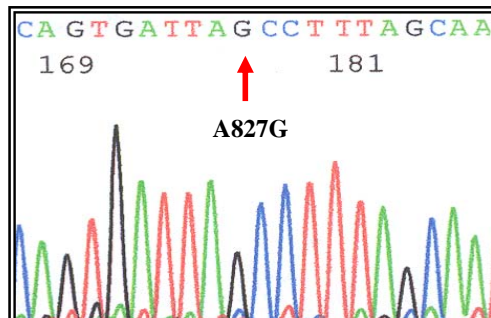
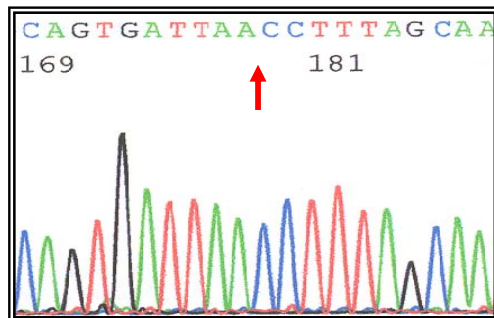
## A2.2 Secuenciación automática

A continuación se muestran los cromatogramas de las regiones en que se encontraron cambios en la secuencia del gen del ARNr 12S con respecto al consenso de Cambridge (MITOMAP. ORG)

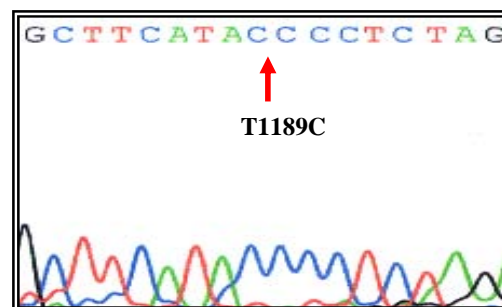
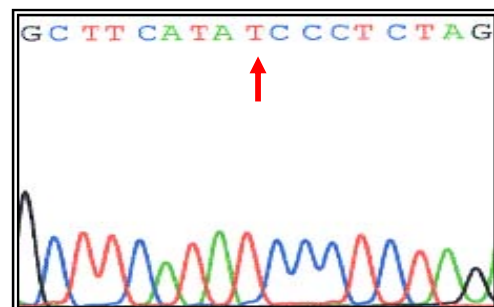
### A663G



### A827G



### T1189C



### A2.3 Soluciones para EGGD

%Desnaturalizante	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Formamida (ml)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Urea (g)	2.1	4.2	6.3	8.4	10.5	12.6	14.7	16.8	18.9	21	22.1	24.2	26.3	28.4	30.5	32.6	34.7	36.8	38.9	42
40% Acrilamida /Bis (ml)	Concentración Final de Acrilamida/Bis: 7.5%-18.8 ; 10%-25; 12%-30																			
Amortiguador TAE 1X(ml)	Aforar hasta 100 ml. Agregar 12µl de TEMED y 60µl de PSA al 20%																			

Para preparar las soluciones se utilizan las cantidades indicadas. Las soluciones se preparan en agitación constante y aplicando un poco de calor para disolver la formamida (*desionizada. SIGMA. Grado Biología Molecular*), urea (*BIORAD*) y la acrilamida (*BIORAD. 40% Acrilamida/Bis*). Se aforan a 100ml, y se sonicán (*Branson 3200*) durante al menos 20 min para eliminar las fuerzas intermoleculares y evitar que al preparar el gel se formen burbujas. Las soluciones se guardan en frascos ámbar a 4°C hasta su uso, sin exceder 2 meses de almacenamiento.

La solución al 100% de desnaturalizantes está compuesta por urea 7M y formamida al 40% (v/v).

Para preparar las soluciones con diferentes proporciones de u/f que se mencionan en los resultados, sección 6.2.4.2a se selecciona el porcentaje de la solución que se desea preparar. Se mantiene uno de los componentes (urea o formamida) fijo y el otro aumenta en 10 ó 20% según sea el caso, con referencia en esta tabla.









## Referencias

1. Aguilar-Maldonado B, Meza G (2008) *El óxido nítrico y su papel en el daño en el oído*. En: Radicales Libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Konigsberg, M. (ed) Manual Moderno: México, DF
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell 4<sup>th</sup> Edition*. Garland Science: New York, USA
3. Bacino C, Prezant TR, Fournier P, Fischel-Ghodsian N (1995). *Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness*. Pharmacogenetics **5 (3)**: 165-172
4. Ballana E, Mercader JM, Fischel-Ghodsian N, Estivill X (2007). *MRPS18CP2 alleles and DEFA3 absence as putative chromosome 8p23.1 modifiers of hearing loss due to mtDNA mutation A1555G in the 12S rRNA gene*. BMC Medical Genetics **8**:81
5. *BD Vacutainer*. [En Línea]. Recuperado de WWW en Agosto de 2010. Disponible en: <http://www.bd.com/vacutainer/>
6. Bindu LH, Reddy PP (2008). *Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non-syndromic mitochondrial hearing impairment: A review*. International Journal of Audiology **47(11)**: 702-707
7. BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . NCBI
8. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang H, Estivill X, Shohat M, Fischel-Ghodsian N (2004) *Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the A1555G mutation*. Molecular Genetics and Metabolism **82**: 27-32
9. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang H, Estivill X, Shohat M, Fischel-Ghodsian N (2004) *Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes MTO1 and GTPBP3*.Molecular Genetics and Metabolism **83**: 199-206
10. Calvo J, Martínez-Martínez L (2009). *Mecanismos de acción de los antimicrobianos*. Enferm Infecc Microbiol Clin **27** (1): 44-52
11. Carter A, Clemons W, Brodersen D, Morgan-Warren R, Wimberly B, Ramakrishnan V (2000). *Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics*. Nature **407**: 340-348
12. Cotney J, Wang Z, Shadel G (2007) *Relative abundance of the human mitochondrial transcription system and distinct roles for h-mtTFB1 and h-mtTFB2 in mitochondrial biogenesis and gene expression*. Nucleic Acids Research **35** (12): 4042-4054



13. *Cromosoma mitochondrial humano (esquema)*. Oulu University Library (2000). Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA: Detection of mutations in patients with occupational stroke. Chapter 2.2 Review of the literature: The mitochondrial genome [En Línea] Recuperado de WWW en Septiembre de 2010. Disponible en: <http://herkules oulu.fi/isbn9514255674/html/x287.html>
14. Especialidades Diagnósticas IHR Ltda. *Anticoagulante Sequestreno EDTA*. [En Línea] Recuperado de WWW en Agosto de 2010. Disponible en : <http://www.ihrdiagnostica.com/tecnicas/pdf/AnticoagulanteSEQUESTRENOEDTAv4.pdf>
15. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson N, Gustafsson C (2002). *Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA*. *Nature Genetics* **31** (3): 289-294
16. Fink N, Chiesa M, Fernández MA, Ventimiglia F, González M, Casali JL (2007). *Métodos del Laboratorio Hematológico*. [En línea] Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Recuperado de WWW en Agosto del 2010. Disponible en: <http://www.biol.unlp.edu.ar/hematologia/guia1.doc>
17. Fischel-Ghodsian N, Prezant T, Chaltraw W, Wendt K, Nelson R, Arnos K, Falk R (1997). *Mitochondrial gene mutation is a significant predisposing factor in Aminoglycoside Ototoxicity*. *American Journal of Otolaryngology* **18**(3): 173-178
18. Fischer SG, Lerman LS (1983) *DNA fragments differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory*. *PNAS* **80**: 1579-1583
19. Gallo-Terán J, Morales-Angullo C, del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo, MA, García-Mantilla J, Moreno F (2002). *Incidencia de las mutaciones A1555G en el ADN mitocondrial y 35delG en el gen GJB2 (conexina 26) en familias con hipoacusia neurosensorial postlocutiva no sindrómica en Cantabria*. *Acta Otorrinolaringol* **53**: 563-571
20. Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD (2009). *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis*. En: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (Ed). Springer: Heidelberg, Germany. Pages 4137-4158
21. Guan M, Fischel-Ghodsian N, Attardi G (1996). *Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation*. *Human Molecular Genetics* **5**(7): 963-971
22. Guan M, Fischel-Ghodsian N, Attardi G (2001). *Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation*. *Human Mol Genet* **10**(6): 573-580.

23. Guldberg P, Grønbaek K, Aggerholm A, Platz A, Thor Straten P, Ahrenkiel V, Hokland P, Zeuthen J (1998). *Detection of mutations in GC-rich DNA by bisulphite denaturing gradient gel electrophoresis*. *Nuc Ac Res* 26(6):1548-1549
24. Gutell Lab. *Comparative RNA Website and Project*. [En Línea] Recuperado de WWW en Diciembre del 2010. Disponible en: <http://www.rna.cccb.utexas.edu/>
25. Guthrie O (2008). *Aminoglycoside induced ototoxicity*. *Toxicology* **249**: 91-96
26. Hainrichson M, Nudelman I, Baasov T (2008) *Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases*. *Org Biomol Chem* **6**: 227-239
27. Heracle Software. *DNABaser*. [En Línea] Recuperado de WWW EN Agosto de 2010. Disponible en: <http://www.dnabaser.com/>.
28. Hobbie S, Kalapala S, Akshay S, Bruell C, Schmidt S, Dabow S, Vasella A, Sander P, Böttger E (2007). *Engineering the rRNA decoding site of eukaryotic cytosolic ribosomes in bacteria*. *Nuc Ac Res* **35** (18): 6086- 6093.
29. Hobbie S, Bruell C, Akshay S, Kalapala S, Shcherbakov D, Böttger E (2008). *Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code*. *PNAS* **105(9)**: 3244-3249
30. Kokotas H, Petersen MB, Willems JP (2007). *Mitochondrial Deafness*. *Clin Genet* (71): 379–391
31. Kolberg G, Jansson M, Pérez-Bercoff A, Melberg A, Lindberg C, Holme F, Moslemi AR, Oldfors A (2005) *Low frequency of mtDNA point mutations in patients with PEO associated with POLG1 mutations*. *Eur J Hum Genet* **13(4)**: 463-469
32. Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, Xiong S, Heman-Ackah S, Wu J, Choo D, Guan MX (2005). *Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss*. *Human Genetics* **117**: 9-15
33. López-Bigas N, Rabionet R, Martínez E, Bravo O, Girons J, Borragan A, Pellicer M, Arbonés ML, Estivill X (2000) *Mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) and in the GJB2 (Connexin 26) gene are not modifiers of the age at onset or severity of hearing loss in spanish patients with the 12S rRNA A1555G mutation*. *Am J Hum Genet* **66**: 1465-1467.
34. Martini A, Read A, Stephens D ed. (1996) *Genetics and Hearing Impairment*. Singular Publishing Group Inc.: San Diego, USA
35. McCulloch V, Shadel G (2003) *Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFBA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity*. *Molecular and Cellular Biology* **23** (16): 5816-5824

36. Mercado V, Burgos R, Muñoz C (2007) *Ototoxicidad por medicamentos*. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello **67**: 167-177
37. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. (2009) [En Línea] Recuperado de WWW en Agosto de 2010. Disponible en: <http://www.mitomap.org>
38. Möller A (2006). *Hearing: Anatomy, Physiology, and Disorders of the Auditory System*. Academic Press: Boston, USA.
39. Montoya J (2005). *Biogénesis y Patología Mitocondrial*. Rev. Real Academia de Ciencias de Zaragoza 60: 7-28
40. Myers RM, Sheffield VC, Cox DR (1988) *Detection of Single base changes in DNA: ribonuclease cleavage and denaturing gradient gel electrophoresis*. IRL Press Oxford: UK
41. Nagai J, Takano M (2004). *Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity*. Drug Metab Pharmacokin **19** (3): 159-170
42. *Oído humano (esquema)* Audiófilos [En Línea] Recuperado de WWW en Septiembre de 2010. Disponible en: <http://audiofilos.blogspot.es/>
43. *Oído interno (esquema)*. [En Línea] Recuperado de WWW en Septiembre de 2010. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/O%C3%ADdo> .Wikipedia.
44. *Órgano de Corti (esquema)*. [En Línea] Recuperado de WWW en Septiembre de 2010. Disponible en [http://gl.wikipedia.org/wiki/%C3%93rgano\\_de\\_Corti](http://gl.wikipedia.org/wiki/%C3%93rgano_de_Corti). Wikipedia.
45. Pandya A, Xia X, Erdenetungalag R, Amendola R, Landa B, Radnaabazar J, Dangaasuren B, Van Tuyle G, Nanca W (1999). *Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf students from Mongolia*. Am J Hum Genet **65**: 1803-1806.
46. Petersen MB, Willems PJ (2006). *Non-syndromic, autosomal-recessive deafness*. Clin Genet **69**: 371-392
47. Piatto V, Nascimento E, Alexandrino F, Oliveira C, Lopes A, Sarturato E, Maniglia I (2005). *Molecular Genetics of Non-Syndromic Deafness*. Rev Bras Otorrinolaringol **71** (2):216-223
48. *Polymerase Chain Reaction*. Biology Animated Library. [En Línea] Recuperado de WWW en Agosto del 2010. Disponible en: <http://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html> Dolan DNA Learning Center. Cold Spring Harbor Laboratory.
49. Prezant, T.; Agapian, J.; Bohlman, M; Bu, X; Oztas, S; Qiu, WQ; Arnos, KS; Cortopassi, GA; Jaber, L; Rotter, JI; Shohat, M; Fischel-Ghodsian, N. (1993) *Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness*. Nature Genetics **4**:289-294

50. Riazuddin S, Castelein C, Ahmed Z, Lalwani AK, Mastroianni MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ, Riazuddin S, Wilcox R (2000) *Dominant modifier DFNB1 suppresses recessive deafness DFNB26*. *Genetics* **26**: 431 - 434
51. Rodríguez-Álvarez M (2002). *Aminoglucósidos*. *Enf Infec y Micro* **22** (1): 20-30
52. Rodríguez-Tarducky G, Santiago-Martínez M *Secuenciación Automática de ADN*. [En Línea] Recuperado de WWW en Agosto de 2010. Disponible en: <http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/SecuencaciaADN.html> Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB - CSIC). Universidad de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
53. Ruiz-Pesini E, Wallace DC (2006) *Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA*. *Human Mutation* **27(11)**: 1072-1081
54. Rybak LP, Ramkumar V (2007). *Ototoxicity*. *Kidney International* **72**: 931-935.
55. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986) *Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes*. *Nature* **324(6093)**: 163-166
56. *Secuenciación de ADN* [En Línea] Recuperado de WWW en Agosto de 2010. Disponible en: <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm> Universidad Complutense Madrid.
57. Seidel-Rogol B, McCulloch V, Shadel G (2002) *Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop*. *Nature Genetics* **33**:23-24
58. Selimoglu E (2007) *Aminoglycoside-induced ototoxicity*. *Current Pharmaceutical Design* **13**: 119-126
59. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan A (2008). *Aminoglycosides versus bacteria- a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground*. *Journal of Biomedical Science* **15**: 5-14
60. Sharma MR, Koc EC, Datta PP, Booth TM, Spremulli LL, Agrawal RK (2003) *Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins*. *Cell* **115(1)**: 97-108
61. Silva J, Carvalho I (2007). *New insights into aminoglycoside antibiotics and derivatives*. *Curr Med Chem* **14**: 1101-1119
62. Toxqui A (1999). *Estudio del comportamiento de la estreptomicina y de la estreptidina frente a iones metálicos y en diferentes medios*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM

63. Tully LA, Parsons TJ, Steighner RJ, Holland MM, Marino MA, Prenger VL (2000) *A sensitive denaturing gradient-Gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region.* Am J Hum Genet **67**(2): 432-443
64. Van Camp G, Smith RJH. *Hereditary Hearing Loss Homepage.* [En Línea] Recuperado de WWW en Agosto de 2010. Disponible en: <http://hereditaryhearingloss.org/>
65. Van Camp G, Smith RJH (2000) *Maternally Inherited Hearing Impairment.* Clin Genet **57**: 409-414
66. Willems P (2000). *Genetic Causes of Hearing Loss.* The New England Journal of Medicine. **342** (15):1101-1109
67. Wimberly B, Brodersen D, Clemons W, Morgan-Warren R, Carter A, Vonheim C, Hartsch T, Ramakrishnan V (2000). *Structure of the 30S ribosomal subunit.* Nature **407**:327-339
68. Yan Q, Bykhovskaya Y, Li R, Mengesha E, Shohat M, Estivill X, Fischel-Ghodsian N, Guan M (2006) *Human TRMU encoding the mitochondrial 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase is a putative nuclear modifier gene for the phenotypic expression of the deafness associated 12SrRNA mutation.* Biochemical and Biophysical Res Com: 1130-1136.
69. Yao YG, Salas A, Bravi C, Bandelt HJ (2006). *A reappraisal of complete mtDNA variation in East Asian Families with hearing impairment.* Human Genetics **119**: 505-515
70. Yoon KL, Modica-Napolitano JS, Ernst SG, Aprille JR (1991) *Denaturing gradient gel method for mapping single base changes in human mitochondrial DNA.* Anal Biochem **196**(2): 427-432
71. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX (2004). *Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family.* American Journal of Human Genetics **74**: 139-152