



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“Localización de deleciones en el DNA mitocondrial
asociadas al diagnostico del síndrome de Kearns Sayre”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JONATHAN ISRAEL JASSO CARDENAS

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa



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.

Agradecimientos

En esta enseñanza a la cual solemos llamar vida la cual tiene un largo camino por recorrer en el cual nos encontramos con obstáculos e infortunios, solo nos queda levantarnos y no volver la vista atrás y si lo hacemos solo será para contemplar el error y no cometerlo nuevamente, tenemos una misión que cumplir y el prepararnos para la batalla es lo que nos salvara toma un tanque y enfrenta la vida o tu decides si solo quieres salir a la contienda con un fusil en la mano y todo momento tienes la libertad de elegir si lo que quieres es morir en la mediocridad del ser y no poder serlo, pero recuerda que siempre tendrás una mano con la cual podrás sostenerte las veces que quieras solo necesitas pedirla. Gracias papas por todo son mi ejemplo a seguir los amo.

Jonathan Jasso

A mi padre Fermin por sus enseñanzas, comprensión, apoyo y por ser ese ejemplo a seguir, sobre todo por ser más que un padre un amigo que me ofreció un tanque en lugar de un fusil te amo papá.

A mi madre Virginia por toda la fuerza y coraje infundado para realizar las cosas con amor y dedicación y por ser ese pilar en el cual me puedo sostener te amo mamá.

A mis hermanos Claudia (Caya), Aleli (Mimi) y Moacir (Mincho) por sus enfados, alegrías y por todo el apoyo que me han brindado y por compartir y dejarme ser parte de sus vidas los amo mucho.

A mi sobrina Azul por ser ese angel que vino a dar luz y alegría a nuestras vidas

Al doctor Francisco Montiel por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y encaminarme en este mundo maravilloso de la investigacion, por encontrar en el a un amigo gracias Doctor.

A mis colegas del pT Bruno, Jairshiño (Buho), Beto, Carlos (mal amigo), Cesar, José (Negro), Fabiola, Estefani, Ana, Gaby, Gracias por los momentos vividos y por todos estos años juntos espero que sean mas. (Rajale 1:69 dios es selectivo nosotros no)

A mis compañeros del laboratorio Angélica, Josefina y Alejandro por todo el apoyo brindado.

A mis compañeros Vala, Bloques, Fer, Vicente por ser lo que son gracias.

A Dios por que en el busco la fortaleza y apoyo para seguir adelante



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Localización de deleciones en el DNA mitocondrial asociadas
al diagnóstico del síndrome de Kearns Sayre

que presenta el pasante: Jonathan Israel Jasso Cardenas
con número de cuenta: 097365I94 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Marzo de 2016

| | | |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE | <u>Dr. José Francisco Montiel Sosa</u> | |
| VOCAL | <u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u> | |
| SECRETARIO | <u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>Dra. Patricia Ramírez Noguera</u> | |

Índice

| | |
|--|----------|
| Índice general | I |
| Índice de figuras | li |
| Índice de tablas | iii |
| Glosario de abreviaturas y términos | iv |
| 1. Generalidades | 1 |
| 1.1 Mitocondria | 1 |
| 1.1.1 Origen | 1 |
| 1.1.2 Estructura y función de las mitocondrias | 2 |
| 1.1.3 Metabolismo mitocondrial | 3 |
| 1.1.4 Cadena transportadora de electrones | 4 |
| 1.1.5 Fosforilación oxidativa | 6 |
| 1.1.6 Mitocondrias y estrés oxidativo | 7 |
| 1.2 Sistema genético mitocondrial | 8 |
| 1.2.1 Estructura y organización del genoma mitocondrial | 9 |
| 1.2.2 Replicación del DNA mitocondrial | 11 |
| 1.2.3 Transcripción del DNA mitocondrial | 13 |
| 1.2.4 Traducción del DNA mitocondrial | 14 |
| 1.3 Genética mitocondrial | 15 |
| 1.3.1 Poliplasmia | 15 |
| 1.3.2 Heteroplasmía y Homoplasmía | 15 |
| 1.3.3 efecto umbral | 16 |
| 1.3.4 Segregación amitótica | 17 |
| 1.3.5 Alta velocidad de mutación | 18 |
| 1.3.6 Tipo de herencia | 18 |
| 1.3.7 Teoría cuello de botella | 19 |
| 1.4 Enfermedades de origen mitocondrial | 21 |
| 1.4.1 Enfermedades debidas a alteraciones primarias del DNAm | 22 |
| 1.4.2 Reordenamientos del DNA mitocondrial | 23 |
| 1.4.2 Enfermedades debidas a alteraciones del DNA nuclear | 24 |
| 1.5 Haplogrupos mitocondriales | 26 |
| 1.6 Síndrome de Kearns Sayre | 29 |

| | |
|--|----|
| 1.6.1 Enfermedad y origen | 29 |
| 1.6.2 Diagnóstico y tratamiento | 31 |
| 1.7 Estrategias moleculares para el estudio de enfermedades del DNAm | 33 |
| 1.7.1 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción | 33 |
| 1.7.2 reacción en cadena de la polimerasa | 34 |
| 1.7.3 Southern Blot | 36 |
| 2. OBJETIVOS | 41 |
| I Objetivo general | 41 |
| II Objetivos particulares | 41 |
| III Hipótesis | 41 |
| 3. Metodología de investigación | 42 |
| 3.1 Materiales y equipo | 42 |
| 3.2 Métodos | 45 |
| 3.2.1 DNA extraído de músculo por medio de kit | 45 |
| 3.2.2 DNA extraído de músculo por medio de fenol | 46 |
| 3.2.3 Cuantificación y pureza de la concentración del DNA | 46 |
| 3.2.4 PCR larga | 47 |
| 3.2.5 PCR región hipervariable II | 47 |
| 3.2.6 Electroforesis para el DNAm | 48 |
| 3.2.7 Digestión con enzimas de restricción | 48 |
| 3.2.8 Purificación | 49 |
| 4. RESULTADOS | 50 |
| 5. DISCUSIÓN | 60 |
| 6. CONCLUSIONES | 63 |
| 7. ANEXOS | 64 |
| 8. BIBLIOGRAFIA | 69 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| 1 Esquema de la teoría de la endosimbiosis | 1 |
| 2 Estructura de la mitocondria | 3 |
| 3 Complejos mitocondriales | 6 |
| 4 Mapa del genoma mitocondrial | 10 |
| 5 Diagrama del genoma mitocondrial | 12 |
| 6 Segregación replicativa | 16 |
| 7 Herencia materna y fenómeno de segregación | 17 |
| 8 Árbol genealógico | 19 |
| 9 Teoría cuello de botella | 20 |
| 10 Mapa de las migraciones del hombre moderno | 28 |
| 11 Esquema de PCR | 35 |
| 12 Gel de agarosa al 0.7%, donde se muestra la amplificación de todo el DNA mitocondrial (16500) a partir de DNA extraído con kit comercial | 50 |
| 13 Gel de agarosa al 0.7%, fragmentos obtenidos con las enzimas de restricción <i>Ava I</i> , <i>Apa I</i> , <i>Pvu II</i> , del producto de PCR larga | 51 |
| 14 Gel de agarosa al 0.7%, fragmentos obtenidos con las enzimas de restricción <i>Ava I</i> , <i>Ns I</i> y <i>Xho I</i> , del producto de PCR larga | 52 |
| 15 Fragmentos esperados con las enzimas de restricción | 53 |
| 16 Gel de agarosa al 2%, donde muestra la amplificación de 1700 pb del DNAm _t para localizar la posición exacta de la delección | 54 |
| 17 Cromatógrama de la purificación y secuenciación de la amplificación de 1700 pb, para ubicar el sitio exacto de la delección | 54 |
| 18 Figura del mapa mitocondrial para representar la delección | 55 |
| 19 Resultado de la hibridación Southern blot | 56 |
| 20 Gel de la densitometría | 57 |
| 21 Grafica resultado de la densitometría | 57 |
| 22 Gel de agarosa al 0.7%, donde se muestra la amplificación de la región hipervariable II | 58 |
| 23 Comparación de la secuencia de la región hipervariable II | 59 |
| 24 Secuencia del Blast | 70 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| 1 Complejos mitocondriales | 4 |
| 2 Origen proteico de las subunidades mitocondriales | 9 |
| 3 Sinapsis clínica del síndrome de Kearns Sayre | 31 |
| 4 Detección de híbridos | 38 |
| 5 Programa del termociclador para la PCR larga | 47 |
| 6 Programa del termociclador para la región hipervariable II | 47 |
| 7 Cuantificación del DNA total | 50 |
| 8 Resultados de los polimorfismos para determinar el haplogrupo | 59 |
| 9 Genes deletados en el DNAmT de la paciente | 65 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|---|
| ATP: | Adenosin Trifosfato |
| OXPPOS: | Sistema de fosforilación oxidativa |
| CTE: | Cadena transportadora de electrones |
| VCDa: | Canal aniónico dependiente de voltaje |
| PDHC: | Complejo piruvato deshidrogenasa |
| CRM: | Cadena respiratoria mitocondrial |
| NADH: | Dinucleótido de nicotinamina y adenina reducido |
| FMN: | Mononucleótido de flavina |
| FAD: | Dinucleótido de flavina y adenina reducido |
| ROS: | Especies reactivas de oxígeno |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAmt: | Ácido desoxirribonucleico mitocondrial |
| TFAm: | Factor de transcripción mitocondrial A |
| POLG: | DNA Polimerasa gamma |
| mtSSB: | Proteína de unión a DNAmt de hebra única |
| RNA: | Ácido ribonucleico |
| rRNAs: | Ácido ribonucleico ribosomal |
| tRNA | Ácido ribonucleico de transferencia |
| COX: | Citocromo C oxidasa |
| O _L : | Cadena ligera |
| O _H : | Cadena pesada |
| RNA ^{Phe} | Ácido ribonucleico de transferencia para fenilamina |
| RNA ^{Val} : | Ácido ribonucleico de transferencia para valina |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensajero |
| dNTPs: | Bases nitrogenadas |
| MELAS: | Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovascular |
| MERRF: | Epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas |
| SKS: | Síndrome de Kearns Sayre |
| NARP: | Neuropatía Ataxia y Retinitis Pigmentosa |
| LHON: | Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber |

| | |
|-------|---|
| CPEO: | Oftalmoplejia Crónica Progresiva Externa |
| HV: | Región hipervariable |
| RFLP: | Polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción |
| VNTR | Número Variable de Repeticiones en Tandem Minisatélites |
| SNP: | Polimorfismos de un solo nucleótido |
| PCR: | Reacción en cadena de la polimerasa |
| LCR: | Líquido cefalorraquídeo |
| FRR: | Fibras rojo rasgadas |
| CPK: | Proteína Creatin Kinasa |

1. GENERALIDADES

1.1 MITOCONDRIA

1.1.1 Origen

La mitocondria, cuyo nombre proviene del griego mito (hilo) y chondros (cartílago) es un organelo citoplasmático con un origen ciertamente peculiar (Tornero y Jordán. 2004). Derivados de la endosimbiosis de un organismo del grupo de las α -proteobacterias con un ancestro de las células eucarióticas que contenía un núcleo (Montoya y col., 2005).

Todas sus características estructurales y funcionales evidencian que una bacteria fue fagocitada por un macroorganismo con el fin de aprovecharse de la energía en forma de ATP que esta fabricaba mientras que la célula anfitriona dotaba a su huésped de materia prima y protección, la simbiosis perfecta entre dos organismos primitivos supone uno de los pasos más importantes de la evolución, en la figura 1 se puede ver el esquema de la endosimbiosis (Tornero y Jordán. 2004; Montoya y col., 2005).

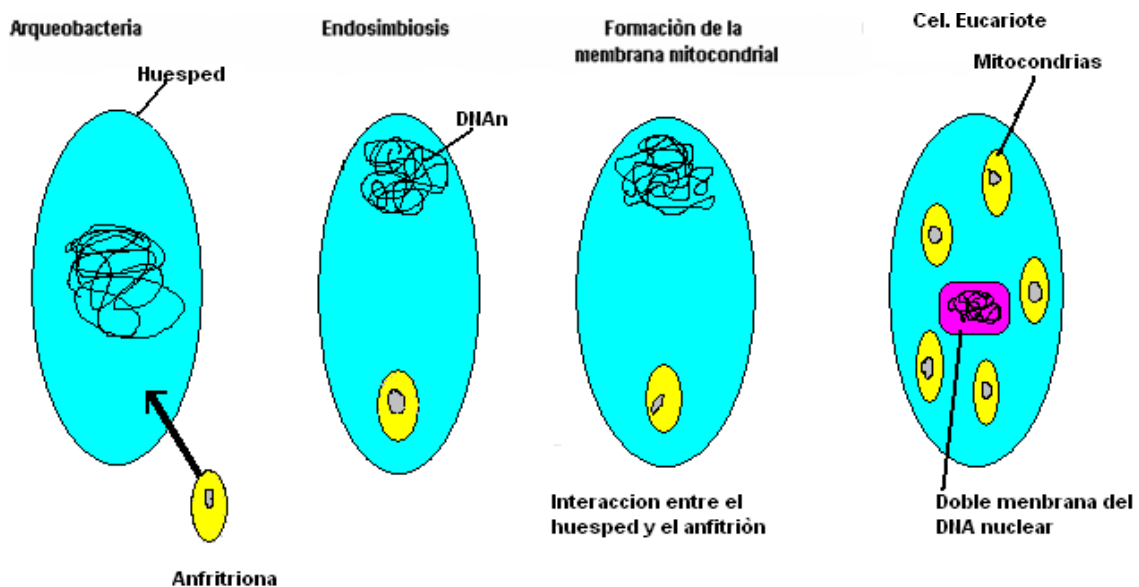


Figura. 1 Esquema donde se muestran los distintos procesos que se llevaron a cabo en la teoría de la simbiosis entre la bacteria y la mitocondria (Dominguez y Huesca. 2007).

Estudios en genética molecular han confirmado el origen bacteriano de las mitocondrias eucariotas, que son los remanentes de protobacterias que colonizaron células anaeróbicas nucleadas hace millones de años, el huésped eucariota proporcionaba alimento y protección, y la bacteria detoxificaba a la célula del dañino oxígeno (Andreu y col., 2004).

1.1.2 Estructura y función de las mitocondrias.

La mitocondria presenta una estructura con dos compartimentos bien definidos matriz y espacio intramembranal, (Fig. 2) delimitados por dos membranas interna y externa con características morfológicas bien definidas y funciones diferentes (Domínguez y Huesca. 2007)

La **membrana interna**, caracterizada morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas crestas, presenta multitud de complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones (CTE), la ATP sintetasa). Es impermeable a la mayoría de moléculas e iones pequeños incluido el protón H^+ . La matriz esta rodeada por esta membrana y es una disolución acuosa altamente concentrada en enzimas e intermediarios químicos que participan en el metabolismo energético. En esta se localizan varias copias del genoma circular (herencia de su pasado procariota), (Tornero y Jordán. 2004).

La **membrana externa**, separa a la misma mitocondria del citoplasma de la célula rodea por completo a todo el organelo y no forma pliegues. Cuenta con la proteína porina conocida en la actualidad como canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), es permeable en condiciones fisiológicas, al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6000 Daltons (Tornero y Jordán. 2004).

El **espacio intermembranal** se encuentra situado entre la membrana externa y la interna, tiene un menor contenido proteico, en ella se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol (Tornero y Jordán. 2004).

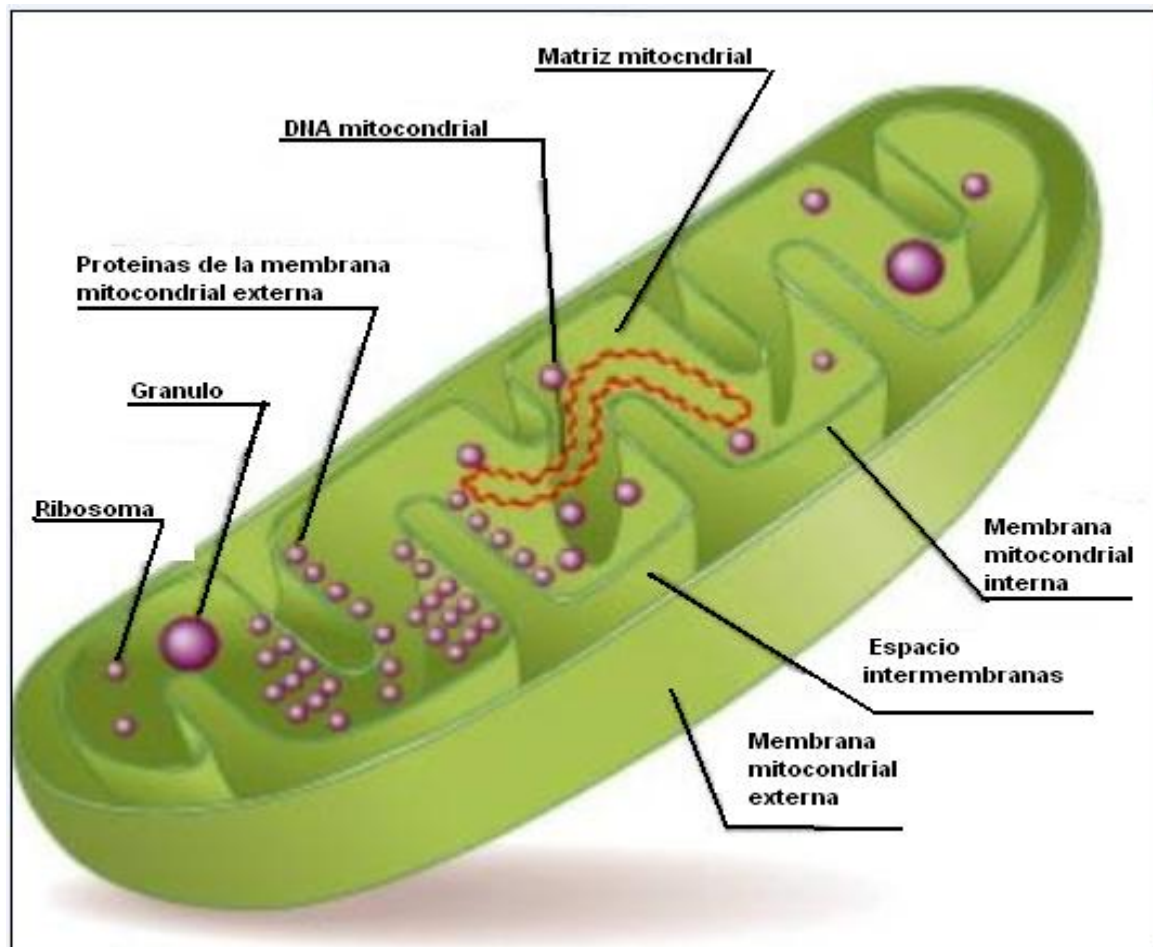


Figura 2 Estructura de la mitocondria, en el esquema se muestran los componentes que tienen la mitocondria como organelos, así como toda su estructura y composición.

1.1.3 Metabolismo mitocondrial.

La mitocondria es la principal fuente de energía para todos los tejidos humanos y contiene muchas vías metabólicas, incluyendo el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), el ciclo de la carnitina, el sistema de la β -oxidación, el metabolismo de aminoácidos y el ciclo de Krebs (Andreu y Sanz. 2004). La cadena respiratoria mitocondrial (CRM), esta compuesta por el sistema OXPHOS (Sistema de Fosforilación Oxidativa), el cual a su vez esta compuesto por cinco complejos enzimáticos intramitocondriales (complejos I a V, tabla 1) responsables de la producción de ATP necesario para las células (Domínguez y Huesca. 2007), y dos moléculas que actúan a modo de nexo, de unión o lanzadera, la coenzima Q y el citocromo C (Eiris y col., 2008).

Tabla 1 Complejos de la cadena respiratoria, estos complejos realizan reacciones de oxidorreducción, que conllevan a un consumo de oxígeno y por otra parte la fosforilación del ADP para producir ATP (Eiris y col., 2008).

| COMPLEJO | NOMBRE | SUBUNIDADES PROTEICAS |
|----------|--|--------------------------|
| I | NADH ubiquinona oxidorreductasa | 46 |
| II | Succinato ubiquinona oxidorreductasa | 4 |
| III | Ubiquinol (QH ₂) citocromo c oxidorreductasa | 11 |
| IV | Citocromo c oxidasa | 13 |
| V | F ₀ -F ₁ ATP sintetasa | 16 |

Todas las proteínas que codifica el DNAm_t forman parte del sistema OXPHOS, el cual a su vez esta compuesto por la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa. El sistema OXPHOS representa un caso único ya que requiere la contribución de dos genomas celulares nuclear y mitocondrial para su función, el genoma mitocondrial codifica solamente un pequeño numero de polipéptidos componentes del sistema OXPHOS y los RNAs necesarios para la síntesis de los mismos (Montoya y col., 2005).

1.1.4 Cadena transportadora de electrones.

También se conoce como cadena respiratoria, es el grupo de enzimas mitocondriales acoplada, que actúan en estrecho contacto físico para catalizar este transporte electrónico. El nombre de cadena transportadora de electrones se refiere a la definición de oxidación y reducción como pérdida o ganancia de electrones, el término de cadena respiratoria apunta a que las reacciones acopladas implican un consumo de O₂, es decir, respiración representa el objetivo final del metabolismo debido a que es la principal fuente de ATP celular, la reducción de equivalentes producida en el ciclo de Krebs y en la β -oxidación son transferidos a lo largo de una serie de complejos localizados en la membrana mitocondrial interna, esta cadena consiste en cuatro complejos enzimáticos multiméricos (I al IV), mas dos pequeños transportadores de oxígeno la coenzima Q (ubiquinona) y el citocromo C (Andreu y col., 2004).

Complejo mitocondrial I Esta representado por la NADH, ubiquinona oxidorreductasa, este complejo cataliza la transferencia de electrones entre el NADH y la coenzima Q (CoQ), consta de 25 polipéptidos diferentes, además de flavina mononucleotido (FMN), complejos hierro-azufre, ubiquinona o CoQ y fosfolípidos. El complejo al cual se acopla la síntesis de ATP en el sitio de acoplamiento 1 posee cuatro centros hierro-azufre (Fe-S) de naturaleza no hémica y fosfolípidos. El complejo I puede separarse en tres fracciones: una hidrofóbica, una hidrofílica y una fracción flavo proteica hidrofílica (Ortiz y Souto, 2006; Domínguez y Huesca. 2007)

El complejo mitocondrial II. (Succinato ubiquinona oxidorreductasa) cataliza la reducción de la CoQ por los electrones removibles del succinato, este complejo contiene FAD, esta compuesto por cuatro polipéptido. Los dos péptidos mas grandes contienen el sitio catalítico para la oxidación del succinato; la subunidad más pequeña de estos dos péptidos contiene un centro Fe_4S_4 . Los otros dos péptidos de menor tamaño poseen un centro de Fe_2S_2 y un citocromo tipo b cuya función no se conoce (Domínguez y Huesca. 2007).

El complejo mitocondrial III Ubiquinona citocromo c oxidorreductasa, también conocido como complejo bc, Este complejo cataliza el ultimo paso del transporte electrónico, la reducción del oxígeno a agua, este complejo contiene hasta 13 cadenas polipeptídicas, 3 de las cuales se sabe están codificadas en el genoma mitocondrial y se sintetizan en el interior de la misma. El resto están codificadas por los genes nucleares. El complejo contiene dos citocromos tipo b, b_{560} y b_{562} ; un citocromo C, C1 y un centro hierro-azufre. Posee también un sitio de fosforilación 2 y produce ATP conforme los electrones fluyen a través del complejo (Domínguez y Huesca. 2007).

El complejo mitocondrial IV (citocromo c oxidasa). Este complejo de 13 subunidades, esta formado en gran medida por hélices transmembrana. Los dos hemo a y a_3 se encuentran cercanos en el interior de la membrana, asociadas con cobre (Cu_A y Cu_B), los dos cobre y los hierros del hemo experimenten una oxidación y una reducción cíclica durante el paso de lo electrones desde el citocromo c al oxígeno, la actividad fundamental de este complejo es el

mecanismo mediante el cual se bombean desde la matriz al espacio intermembranal cuatro protones por molécula de oxígeno reducida. En la figura 3 se esquematizan todos los complejos mitocondriales así como su función y composición (Ortiz y Souto. 2006; Domínguez y Huesca. 2007).

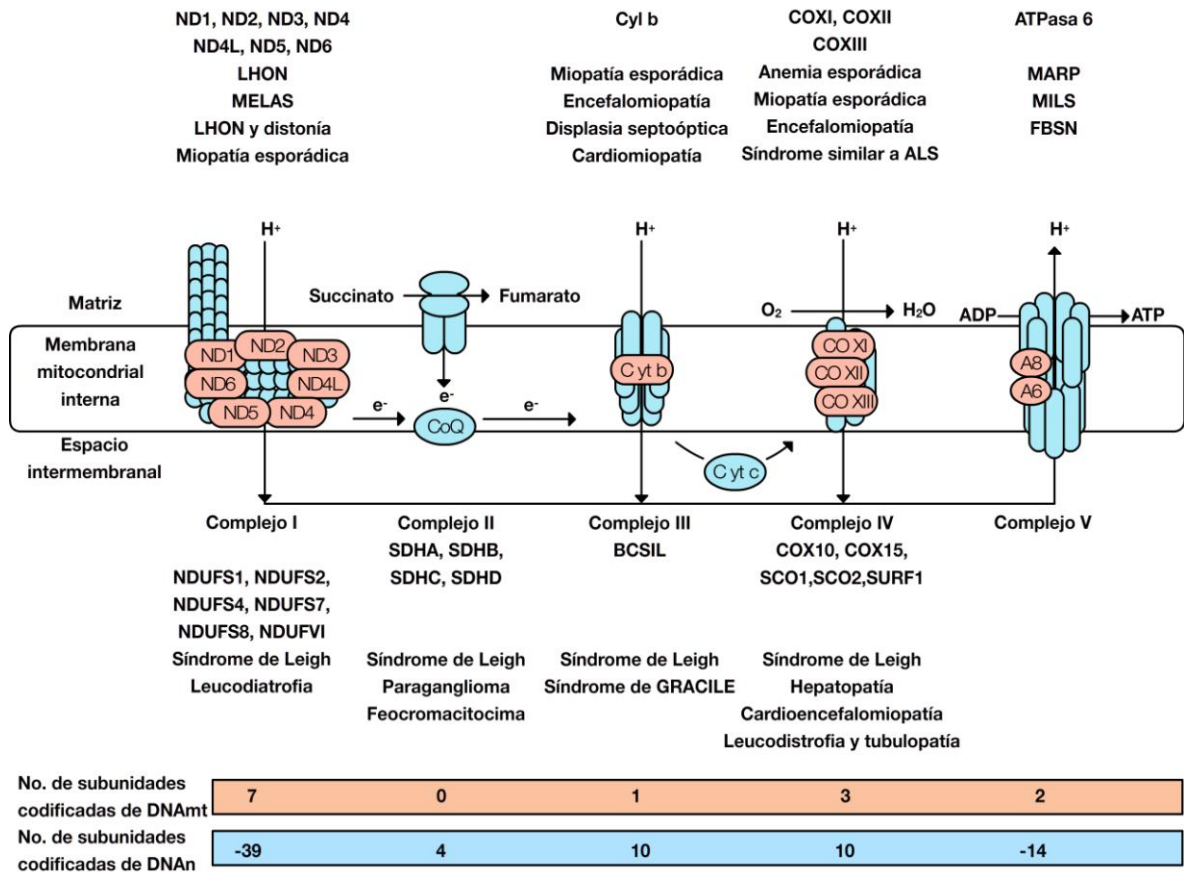


Figura 3 Esquema de los complejos de la cadena respiratoria y la fosforilación. Modificado de DiMauro S. (Medina y col., 2004).

1.1.5 Fosforilación oxidativa.

Complejo mitocondrial V; La ATP-sintasa transportadora de H⁺, la enzima consta de dos partes, una integrada a la membrana como canal protónico (F₀) y una unidad catalítica (F₁) que sobresale a la matriz. La parte F₀ esta compuesta por doce péptidos c que tensan la membrana atravesándola y una subunidad a. La cabeza de la parte F₁ esta formada por tres subunidades α y tres subunidades β, entre las cuales se localizan tres centros catalíticos activos. La base de la estructura entre F₀ Y F₁, esta compuesta por las subunidades γ y ε. Otros dos polipéptidos, b y δ forman una especie de estator, fijando la subunidades α y β en forma relativa en la porción F₀ (Segura y Blair. 2003; Domínguez y Huesca. 2007)

En resumen: Los electrones se dirigen a la cadena respiratoria en la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ por el complejo I, son donados a la ubiquinona, a través del FNM y los centros Fe/S, los electrones procedentes de la oxidación del succinato y de otros sustratos cedidos por medio de la succinato deshidrogenasa, oxida al NADH, el cual proviene del ciclo de krebs, y transfiere los electrones al complejo III, a través de la ubiquinona, el complejo III recupera los electrones del complejo I y II, y los cede al citocromo c, el complejo IV (citocromo c oxidasa), oxida al citocromo reducido y asegura el consumo de oxígeno molecular. La energía liberada por este proceso es útil para transportar protones a través de la membrana interna hacia el exterior gracias a los complejos I, III Y IV, produciendo un gradiente electroquímico aprovechado por el complejo V, para sintetizar ATP.

1.1.6 mitocondrias y estrés oxidativo.

La fosforilación oxidativa se produce en la membrana mitocondrial interna, donde los complejos generan especies reactivas de oxígeno (ROS), engloban aniones súperoxido y peroxido de hidrogeno, la producción mas importante de especies reactivas se da en el complejo I, en una relación 2 a 1, con el complejo III, en el que se generan ROS hacia la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III los produce hacia la cara citoplasmática. Cuando estos radicales se encuentran aumentados atacan las estructuras celulares y pueden producir diferentes enfermedades, del mismo modo esta situación favorece al envejecimiento celular incrementando la posibilidad de padecer mutaciones en el DNAm (Andresen y col., 2006; Cordero y col., 2007).

La célula cuenta con un mecanismo de defensa para contrarrestar la oxidación, la mayor parte de los ROS son neutralizados, tanto por antioxidantes endógenos, como por una situación de deficiencia en la fosforilación oxidativa, aunque produzca una menor cantidad de energía en forma de ATP. De esta manera, se logra una disminución del daño oxidativo y el envejecimiento celular. Además de los antioxidantes sintetizados por el organismo, se pueden aportar factores antioxidantes exógenos, que ayudan en la neutralización de los ROS (Cordero y col., 2007).

1.2 Sistema genético mitocondrial

En 1949, trabajando con levaduras se sugirió la existencia de DNA extracromosómico al observar una serie de fenotipos metabólicos. Los indicios mas tempranos apuntaban hacia la existencia de un DNAm_t, el término de DNAm_t se propuso en 1963, y así se conoce a las moléculas que contienen material genético de forma circular, cerradas y superenrolladas presentes en la matriz mitocondrial que codifica para una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales, las proteínas restantes del DNAm_t son codificadas por el DNA nuclear (Montoya y col., 2005). En el curso de la evolución el DNAm_t ha perdido muchos de sus genes originales, los cuales han migrado hacia el núcleo, así que el sistema ahora es semiautónomo y depende fuertemente del genoma nuclear para la producción de factores necesarios para la transcripción, la traducción y replicación del DNAm_t (Andreu y col., 2004).

1.2.1 Estructura y organización del genoma mitocondrial.

Cada mitocondria contiene varias moléculas de DNAm_t y este no se encuentra como moléculas aisladas sino en asociación con proteínas formando unos complejos conocidos como nucleoides, que contiene entre 2 y 10 moléculas de DNA. El factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA o TFAM), la proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB), la helicasa Twinkle y la DNA polimerasa gamma (POLG), además de otras proteínas todavía no identificadas, son parte de estos nucleoides (Montoya y col., 2005).

Las características moleculares básicas del DNAm_t humano se descifraron al inicio de los años 80 (Ruiz y col., 2006). Tiene una longitud de 16,569 pares bases que involucran a 5,523 codones, que representa la secuencia de Cambridge (primera secuenciación realizada a la mitocondria), (Domínguez y Huesca. 2007). Es de doble cadena y codifica para 37 genes; 2 RNA ribosómicos (rRNAs), 22 RNA de transferencia (tRNAs) y 13 polipéptidos integrantes de los complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS (tabla 2); siete (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) de los 46 polipéptidos del complejo I o NADH ubiquinona oxidoreductasa, un apocitocromo b (cytb), de los 11 polipéptidos del

complejo III o ubiquinol-citocromo c oxidasa; tres COI, COII, COIII de los 13 del complejo IV o citocromo c oxidasa y dos (ATP6 y ATP8) de los 16 de la ATP sintasa o complejo V (Ricoy y Cabello. 2003; Andreu y col., 2004; Ruiz y col., 2006).

Tabla 2 Origen genético de las subunidades proteicas (Tornero y col., 2002).

| Complejo | Nombre | Constituyentes | Acción |
|----------|---|--------------------------------------|---|
| I | NADH: ubiquinona oxidorreductasa. | 25 polipéptidos | Oxidación NADH. |
| II | Succinato: ubiquinona oxidorreductasa. | 5 polipéptidos. | Oxidación de sustratos FADH dependientes. |
| III | Ubiquinol: citocromo C oxidorreductasa. | 11 subunidades. | Oxidación de sustratos NADH FADH ₂ . |
| IV | Citocromo C oxidasa. | 13 subunidades. | Transfiere equivalentes redentores del citocromo C al oxígeno molecular |
| V | ATP sintetasa. | 2 subunidades 12-14 polipéptidos. | Convierte gradiente transmembrana en energía ADP pasa ATP. |

Los dos RNAr, de los 14 RNAt y 12 de los polipéptidos están codificados en la cadena pesada (O_H), mientras que los otro 8 RNAt y el polipéptido restante se localizan en la cadena ligera (O_L). Una zona no codificante de aproximadamente 11000 pb, (también conocida como región hipervariable) contiene el origen de la replicación de la cadena pesada (O_H), los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión del DNA. En la figura 4 se localiza el mapa mitocondrial donde se puede ver su estructura y la posición de los genes (Ruiz y col., 2006).

La característica estructural mas sorprendente del DNAm_t es la organización sin nucleótidos intermediarios ni intrones; tampoco se encuentra asociado con histonas, por lo cual recuerda al DNA bacteriano (Pérez.2002).

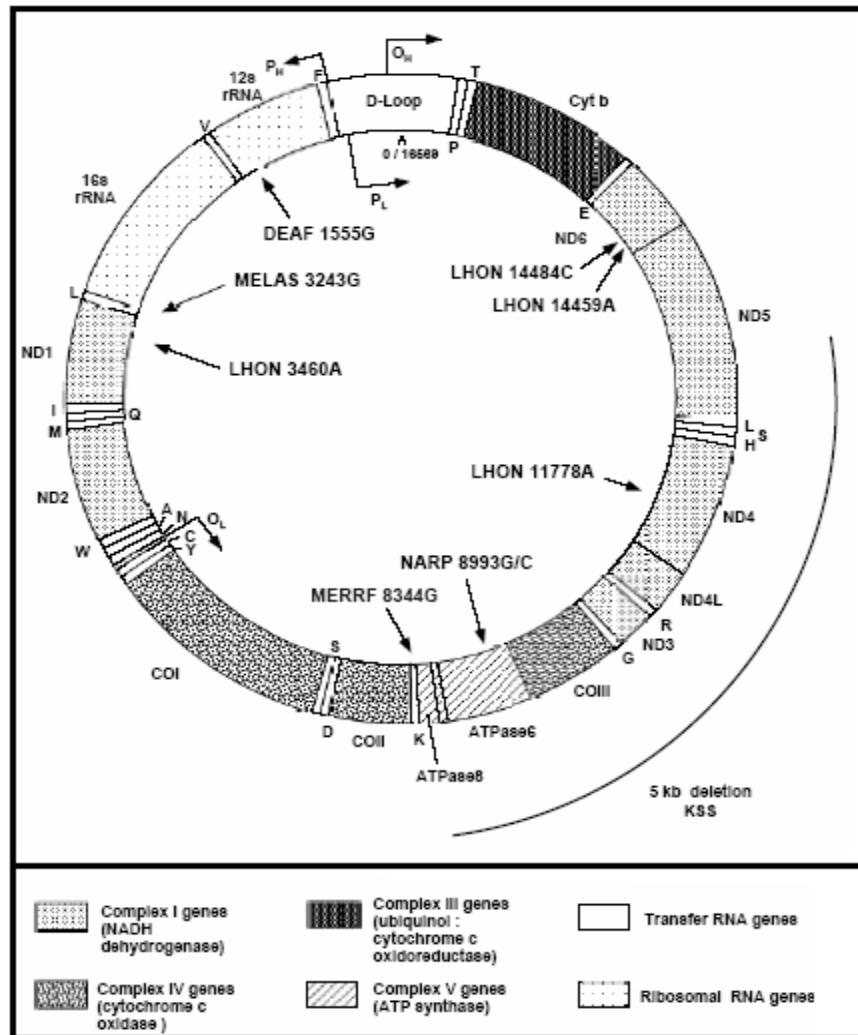


Figura 4 Mapa de la mitocondria, donde se muestran los sitios de los distintos complejos mitocondriales y los sitios de replicación (Medina y col., 2004).

1.2.2 Replicación del DNA mitocondrial.

El DNA mitocondrial no se replica en la forma ordenada y regulada como el DNA nuclear. El DNAm_t se sintetiza durante todo el ciclo celular y no esta coordinado con la síntesis del DNA nuclear. Las moléculas de DNAm_t que se replican en un momento dado parecen ser determinadas al azar; dentro de la misma mitocondria algunas de las moléculas se replican dos o tres veces, mientras que otras no lo hacen ni una sola vez (Benjamín. 2006).

El origen de replicación de la cadena pesada (O_H) se encuentra dentro de la zona conocida como D-Loop. Para comenzar la replicación de la cadena O_H, se requiere la síntesis de un cebador de RNA. Se pensaba que este cebador era

sintetizado por una RNA polimerasa mitocondrial, pero en estudios recientes se ha encontrado actividad transcriptasa reversa, la DNA polimerasa gamma, que es la DNA polimerasa mitocondrial. La cual consta de dos subunidades, una catalítica con actividad de polimerización 5'-3' y exonucleolítica 3'-5', y una segunda, la subunidad accesoria pequeña (b), que se une al DNA de doble hebra, incrementando la afinidad de la enzima por el DNA confiriéndole procesividad a la subunidad catalítica y además se encuentra implicada en el reconocimiento del cebador (López. 2007)

La transición de RNA a DNA tiene lugar en el origen de replicación de la hebra H (O_H), donde el cebador precursor se escinde por una endonucleasa procesadora del RNA mitocondrial, la elongación del DNA mitocondrial se lleva a cabo por la DNA polimerasa gamma. La mayoría de eventos de inicio de la hebra H terminan prematuramente después de aproximadamente 700 nucleótidos y tras una secuencia conocida como secuencia asociada a la terminación, la terminación prematura de la replicación provoca la aparición de una estructura conocida como bucle de desplazamiento (D-Loop) (Montoya y col., 2005).

Cuando la hebra H es capaz de pasar por la región de terminación prematura su elongación continua de forma unidireccional hasta que recorre tres tercios de la molécula, desplaza una secuencia de la hebra H, estableciendo una estructura lazo-tallo que constituye el origen de replicación de la hebra L (O_L) sirve como región de reconocimiento de una DNA primasa específica para mitocondrias, que sintetizará un cebador corto de RNA y después la DNA polimerasa gamma alargará la cadena de forma unidireccional y en sentido contrario al de la hebra H naciente. En este modelo de replicación asimétrica, la síntesis de DNA es continua en las dos hebras y carece de fragmentos de Okazaki. En el diagrama 5 se localizan la posición de las cadenas y las regiones no codificantes (Montoya y col., 2005; López. 2007)

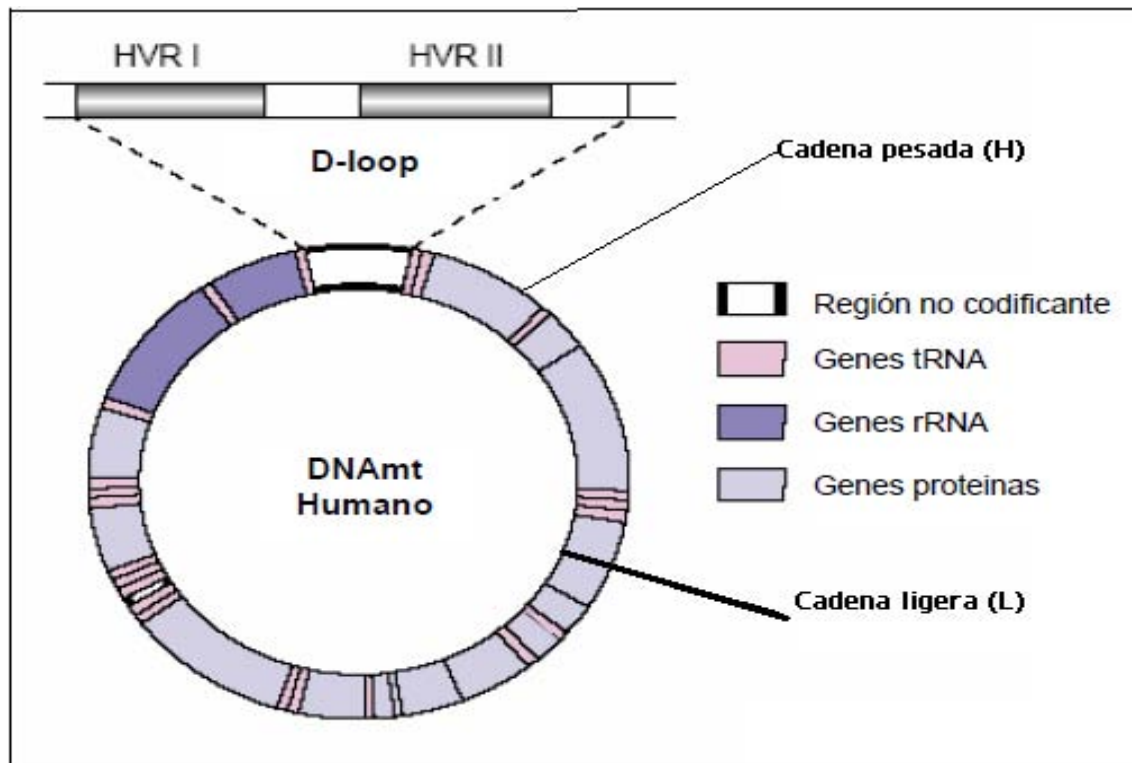


Figura 5 Diagrama del genoma mitocondrial humano en el que se puede ver la región codificante, donde se encuentran los genes, la región no codificante o D-Loop. Y las cadenas tanto la pesada (O_H) como la ligera (O_L) (López, 2007)

Modelo de replicación bidireccional y simétrica. Una prueba importante es que, recientemente, se ha puesto en duda el modelo de replicación de desplazamiento la hebra y ahora basándose en una técnica que utiliza geles bidireccionales, se ha propuesto que el DNAmT se replica de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación a semejanza con el DNA bacteriano. Este modelo promovido no explica, la mayoría de los datos que hasta ahora se tenían con el modelo anterior (Montoya y col., 2005; López.2007)

1.2.3 transcripción del DNA mitocondrial.

La transcripción del DNAmT se inicia a partir de tres promotores diferentes, uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada (H_1 Y H_2) que darán lugar a tres cadenas policistrónicas largas que se procesaran por cortes endonucleolíticos precisos delante y detrás de los RNAt, que actúan como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento, al adquirir la

configuración de hoja de trébol en cadenas nacientes de RNA, dan lugar a los RNAr, RNAt Y RNAm (López. 2007).

La cadena ligera se transcribe mediante una única unidad de transcripción que empieza en el lugar L, cerca del extremo 5' del RNA 7S, dando lugar a 8 RNAt y al único RNAm codificado en esta cadena. La cadena pesada se transcribe mediante dos unidades de transcripción solapadas en la región de los RNAr, la primera que se transcribe muy frecuentemente, comienza en el lugar de iniciación H₁, situado por delante del gen RNAt^{Phe}, termina en extremo 3' del gen para el RNAr 16S y es responsable de la síntesis de los RNAr 12S y 16S, del RNAt^{Phe}, y del RNA^{Val}. El segundo proceso de transcripción, mucho menos frecuente que el anterior, comienza en el punto de iniciación H₂, cerca del extremo 5' del gen RNAr 12S, se extiende mas allá del extremo 3' del gen RNAr 16S y produce un RNA policistrónico que corresponde a casi toda la totalidad de la cadena pesada. Los RNAm de los 12 de los polipéptidos y 14 RNAt, codificados en esta cadena, se originan por procesamiento de este RNA policistrónico (Montoya y col., 2005).

Los 13 polipéptidos codificados en el DNAm_t tienen un tamaño que varia entre 70 y 610 aminoácidos. Los RNAm que los codifican contienen exclusivamente la secuencia del patrón de traducción y una cola de unos 55 nucleótidos en el extremo 3'. Los RNAm mitocondriales humanos comienzan directamente con el codón AUG, AUA o AUU o tienen muy pocos nucleótidos delante de los mismos, carecen de uno de los típicos RNAm de otros sistemas, como es la presencia de un tramo no codificante en el extremo 5'. Tampoco contienen la capucha en el extremo 5'. Asimismo el extremo 3' de la mayor parte de los RNAm carecen de una región no codificante y finalizan U o UA generándose el codón de terminación completo (UAA) por la poliadenilación postranscripcional (Delgado. 2004).

1.2.4 Traducción del DNA mitocondrial.

Los RNA mitocondriales se traducen en el interior de las mitocondrias. Estos organelos contienen ribosomas específicos con los componentes proteicos (78 proteínas ribosómicas) codificados en el DNAn y los RNA en el DNAm_t (Montoya y col., 2005; López. 2007).

Los polipéptidos sintetizados en la mitocondria interaccionan con los componentes del sistema OXPHOS codificados en el DNAn, sintetizados en ribosomas del citosol e importados a la mitocondria para producir el sistema OXPHOS. Así la biogénesis de este sistema depende de la expresión coordinada de los genomas nuclear y mitocondrial (Montoya y col., 2005; López. 2007).

1.3 Genética mitocondrial.

El sistema genético mitocondrial contiene características genéticas muy particulares que lo hacen diferente del DNA nuclear, y en general se diferencia por aspectos fundamentales:

1.3.1 Poliplasmia. Se designa así al elevado número de copias de DNAm_t que existen en cada célula, esto provoca que en la célula se encuentren cientos o miles de copias de moléculas de DNAm_t, dependiendo del tejido, pasando por unos cientos en los espermatozoides y hasta unas cien mil en los oocitos (Montoya y col. 2005). Cada mitocondria contiene entre dos y diez moléculas, que proporcionan caracteres genéticos que los difieren del DNA nuclear (Domínguez y Huesca. 2007).

1.3.2 Heteroplasmía y Homoplasmía. El concepto de heteroplasmía se refiere a la presencia de tipos diferentes de DNAm_t, en la misma mitocondria, es decir que pueden convivir en un individuo estirpe celular con mitocondrias normales y mutadas, e incluso ambas en una misma célula cuyas proporciones pueden variar a lo largo del tiempo. El grado de heteroplasmía de un paciente determina si va a expresar la enfermedad y el grado de severidad que esta va a tener. (Domínguez y Huesca. 2007). Se llama Homoplasmía a la presencia de DNAm_t de un único tipo, esto se da cuando en la división celular, las moléculas de DNAm_t se distribuyen de forma aleatoria entre las nuevas células en tejidos sanos todas las copias de DNAm_t son idénticas (Andreu y col., 2004; Carvajal y col., 2006).

Así una mutación en un DNAm_t creara una población mezclada de moléculas de tipo mutante y de tipo salvaje (heteroplasmía), el porcentaje de DNAm_t mutante puede variar entre 0% (homoplásmico tipo salvaje) a 100% homoplásmico mutante), el reparto de mitocondrias a las células hijas en la división al azar y esto puede provocar variaciones en los porcentajes de mutación a lo largo de las líneas celulares (segregación replicativa), lo que representa las bases de la multisistemía (la proporción de genoma en cantidades diferentes en los distintos tejidos dependiendo de la demanda energética) característica de las enfermedades mitocondriales (Montoya y col., 2005)

1.3.3 Efecto umbral. El fenotipo clínico de una mutación puntual particular en el DNAm_t viene principalmente determinado por la proporción relativa de genomas sano y mutados en los diferentes tejidos dependiendo de la demanda energética de una célula en particular, cuando el número de moléculas mutadas es pequeño la función de estas será complementada por las moléculas de DNAm_t normal y no se manifestara el efecto genético. Sin embargo si el número de copias del DNAm_t mutado es el suficiente como para producir una expresión fenotípica de la mutación, aparecerá la disfunción mitocondrial y los signos clínicos. En la figura 6 se representa el fenómeno de segregación replicativa y del lado derecho se puede ver el efecto umbral cuando alcanza un nivel en el fenotipo provocando la enfermedad (Pérez. 2003; Andreu y col., 2004).

Este umbral es diferente en tejidos distinto, cuando el umbral es sobrepasado , la producción de ATP es menor a la demanda de energía, los tejidos dependen en diverso grado de la energía producida por la mitocondria; por lo tanto, comúnmente se ven afectados, en orden decreciente : el sistema nervioso central, músculo esquelético, renal y endocrino (Pérez. 2003).

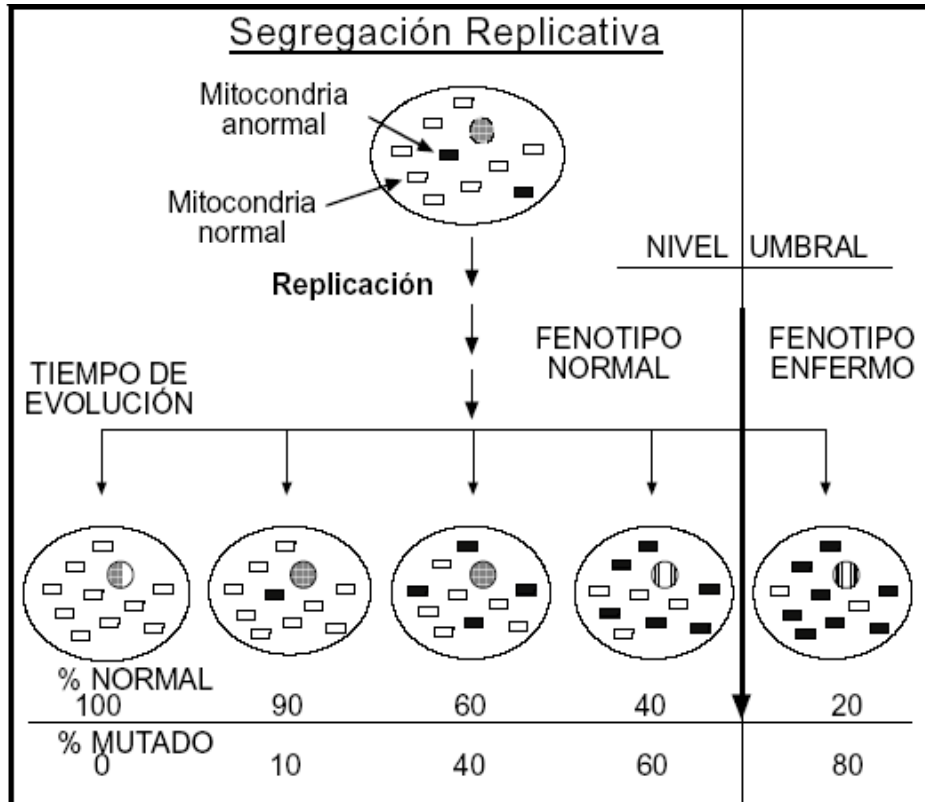


Figura 6 Segregación replicativa y transformación fenotípica al rebasar el nivel umbral (Medina y col., 2004).

1.3.4 Segregación mitótica. Durante la división celular, las mitocondrias se dividen al azar entre las células hijas de esta forma el fenotipo de una estirpe celular puede variar originando tres posibles genotipos figura 7: homoplásmico (toda la población igual) para el DNAMt normal, heteroplásmico (una normal y otra mutada) y homoplásmico para el DNAMt mutado (Pérez. 2003; Andreu y col., 2004; Rubio y Verdecía. 2004).

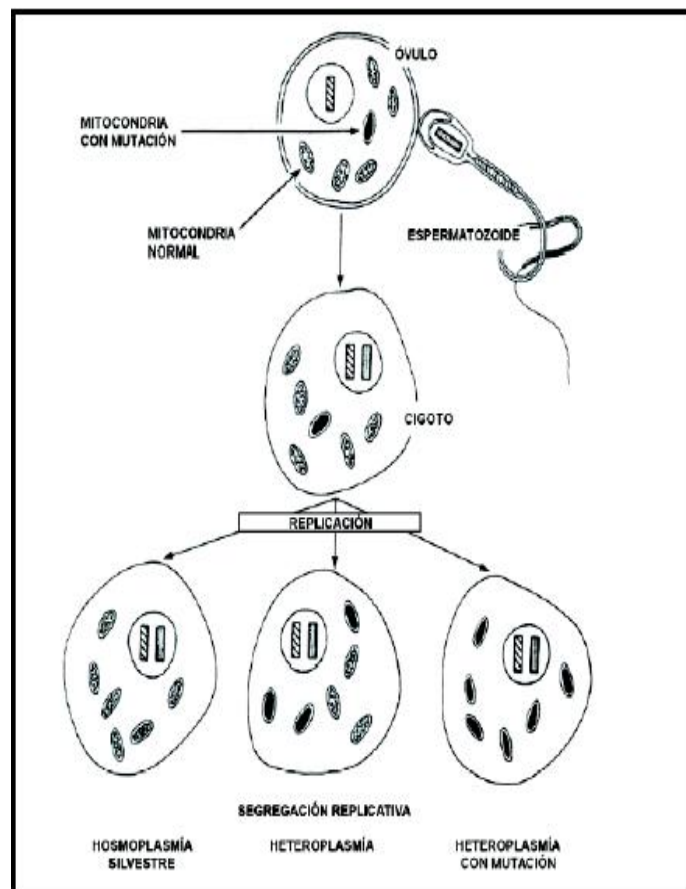


Figura. 7 Herencia materna de mutaciones mitocondriales y el fenómeno de segregación replicativa (Medina y col., 2004).

El fenómeno de segregación mitótica, explica como ciertos pacientes con desordenes relacionados con el DNAMt varían de un fenotipo clínico a otro conforme van aumentando de edad. Durante la mitosis experimental se ha demostrado que si existen diferentes tipos de DNAMt en las células de los padres, la proporción de estas poblaciones puede variar mucho durante subsecuentes generaciones de células mitóticamente activas (Andreu y col., 2004; Domínguez y Huesca. 2007).

1.3.5 Alta velocidad de mutación. La tasa de mutación espontánea del DNAm es 10 veces superior a la del DNA nuclear (Rubio y verdecía. 2004). En consecuencia hay una gran cantidad de variaciones entre individuos escogidos al azar, además de estas diferencias a lo largo de la vida se esta produciendo constantemente heterogeneidad en el DNAm debido a las mutaciones originadas en las células somáticas (Pérez.2003).

Este proceso puede estar causado por que en la mitocondria se producen continuamente radicales de oxígeno como consecuencia de la oxidación final de los compuestos carbonados, que pueden dañar a un DNA que no este protegido por proteínas. Debido a este hecho, la variación de secuencias entre individuos de la misma especie es muy grande hasta unos 70 nucleótidos (Solano y col., 2001) se ha propuesto que las mutaciones se acumulaban sobre todo en los tejidos senescentes, por que en ellos y en las propias mutaciones, disminuyen la capacidad respiratoria, lo que afecta la fosforilación oxidativa. Este mecanismo se propone como responsable al menos en parte, de enfermedades degenerativas como las de Alzheimer y Parkinson, además del envejecimiento (Domínguez y Huesca. 2007).

1.3.6 Tipo de herencia. Es de herencia estrictamente materna con patrón vertical no mendeliano, la madre trasmite su DNA a todos sus hijos pero solo sus hijas lo transmitirán a todos los miembros de la siguiente generación y así sucesivamente (Domínguez y Huesca. 2007).

En la fertilización todas las mitocondrias del cigoto, y por lo tanto, todo el DNAm deriva del oocito. Esto se debe al elevado número de moléculas de DNAm que existen en los óvulos (entre 100.000 y 2000.000 copias) en comparación con unos cientos que hay en los espermatozoides, las mitocondrias de este, que se encuentran en el cuello son desechadas y eliminadas en el núcleo del óvulo. (Domínguez y Huesca. 2007; Andreu y col., 2004). Este proceso es radicalmente diferente de la herencia mendeliana. Una madre que tiene un mutación puntual en su DNAm, lo transmitirá a todos sus hijos (varones y mujeres) pero solo las hijas lo transmitirán a su progenie. Un desorden que se manifiesta en ambos sexos pero sin evidencia de transmisión paterna, es indicativo de una mutación puntual mitocondrial (Andreu y col., 2004; Domínguez y Huesca. 2007).

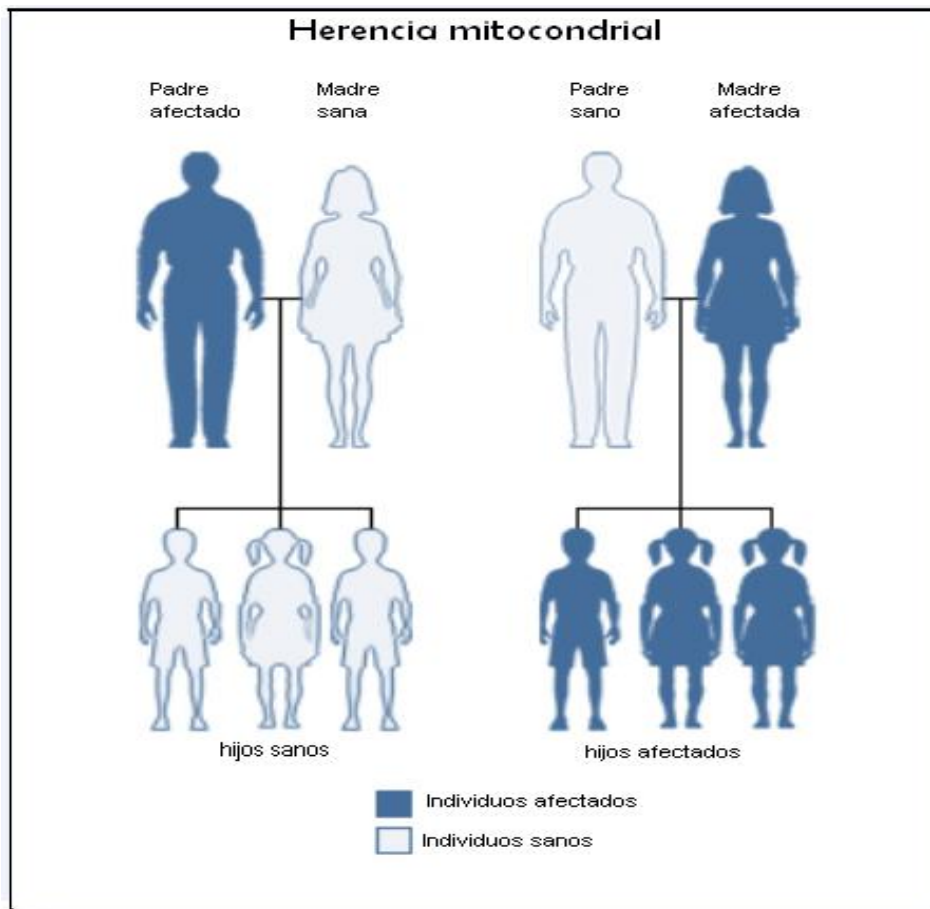


Figura 8. Árbol genealógico, esquematiza la herencia materna, donde la madre es portadora de la mutación y la transmite a su descendencia y solo las hijas la transmitirán.

Este modo de herencia, Figura 8 impide la recombinación de los genomas mitocondriales paternos (Montoya y col., 2005). Sin embargo recientemente se ha revelado la posibilidad de transmisión del DNAm_t por vía paterna, mas concretamente por ambas vías, materna en los linfocitos y paterna en el músculo esquelético (Ricoy y cabello. 2003).

1.3.7 Teoría Cuello de botella. Cada célula puede tener un cierto número de mitocondrias y cada una de ellas puede sufrir una modificación en su información genética. Si esta alteración no compromete su integridad, al dividirse la célula ocurre que una de las descendientes portara parte de las mitocondrias y la otra el resto, una de ellas portara la mitocondria mutada y podrá trasmitirla a su descendencia, además de nuevas posibles mutaciones mitocondriales. La compresión de este proceso se facilita con la denominada teoría del cuello de

botella (Cordero y col., 2007). En la figura 9 se representa esquemáticamente la teoría del cuello de botella. Durante el desarrollo de la línea germinal femenina favorece la rápida desviación al estado homoplásmico además, este criterio no es aplicable a mutaciones homoplásmicas, la variante debe afectar a nucleótidos muy conservados evolutivamente y también a dominios funcionales muy importantes (Ruiz y col., 2006).

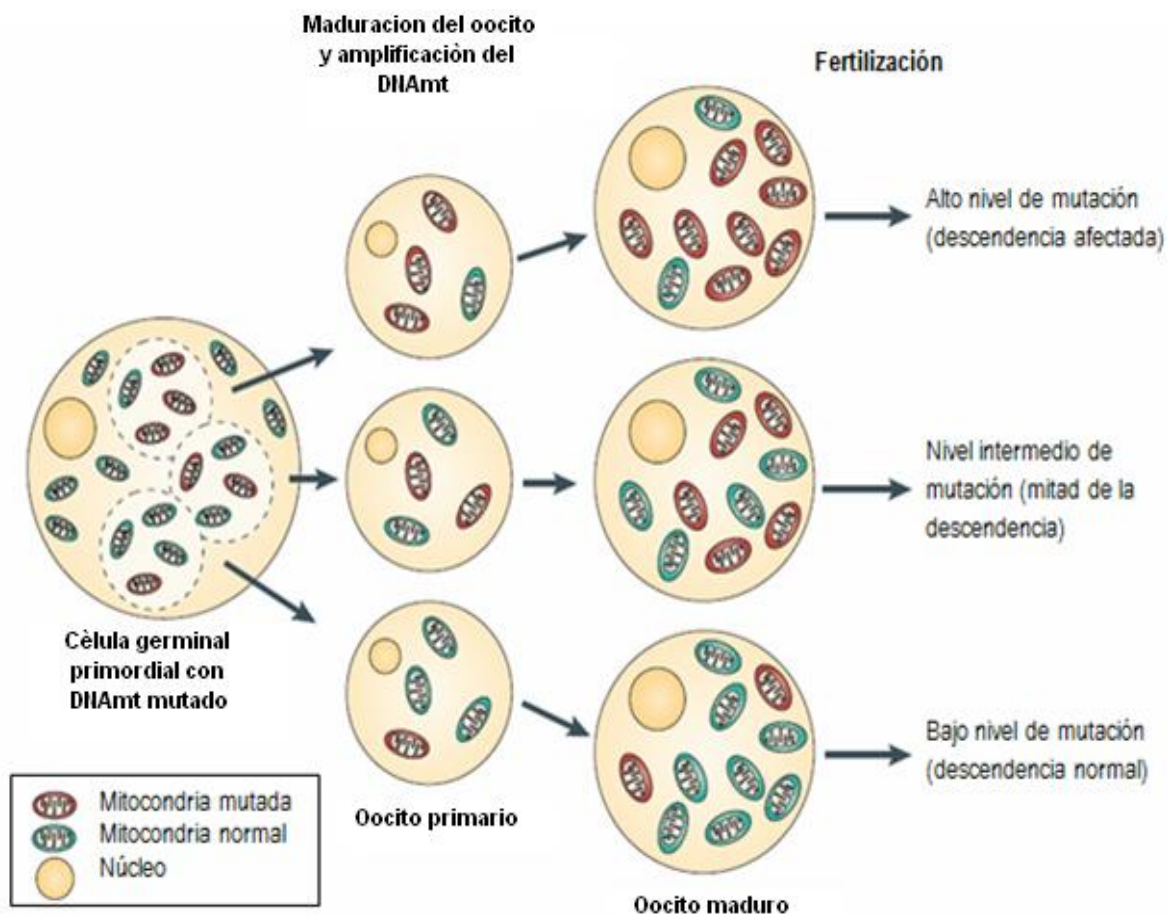


Figura 9. Explicación gráfica de la teoría del cuello de botella mediante el empleo de oocitos, las mitocondrias que contienen DNAMt mutado se muestran en color rojo mientras que las que contienen DNAMt normal en verde (Taylor y col., 2005).

1.4 Enfermedades de origen mitocondrial

Las enfermedades mitocondriales (conocidas con el nombre de encefalomiopatías mitocondriales) constituyen un amplio grupo de desordenes clínicos que se identificaron a principios de los años 1960 (Andreu y col., 2004). Fue en 1962 cuando se encontraron mitocondrias anormales en una biopsia de músculo de una mujer con síndrome hipermetabólico, lo que pronto se denominó con el nombre de síndrome de Luft. Más tarde Shy y Gonatas, introdujeron los conceptos miopatía megaconial y miopatía pleoconial, para referirse a las miopatías mitocondriales con mitocondrias grandes o proliferadas y mitocondrias estructuralmente anormales (Ricoy y Cabello. 2003).

El término patología mitocondrial o mitocondriopatía abarca un amplio espectro de trastornos, pero tradicionalmente se ha utilizado para significar aquellas enfermedades causadas por defectos en el sistema OXPHOS. Desde este punto de vista se puede fechar el origen de esta disciplina en 1988, con el descubrimiento de mutaciones en el DNAm, descritas desde entonces ha crecido enormemente y también se han descrito mutaciones en el DNAnc para componentes OXPHOS. La característica más común de estas enfermedades es la de ser multisistémicas, pues afectan a casi cualquier órgano o tejido, pero principalmente a los que dependen de la energía mitocondrial, como el sistema nervioso, músculo cardíaco y estriado (Ruiz y col., 2006).

Las enfermedades producidas por defectos en el DNAm se pueden dividir en dos grandes grupos:

1) Alteraciones primarias del DNAm, implican mutaciones que afectan algunos componentes de la cadena respiratoria o de los RNA de transferencia; esto altera la producción de energía de algunos órganos, como el corazón, cerebro y los músculos (Domínguez y Huesca. 2007).

2) Enfermedades atribuibles a reorganizaciones del DNAm por inserciones o deleciones (Rubio y Verdecía. 2004; Domínguez y Huesca. 2007).

1.4.1 Enfermedades debidas a alteraciones primarias del DNAm_t. Este grupo de síndromes clínicos incluye los reordenamientos simples y complejos del DNAm_t (deleciones simples y duplicaciones) y las mutaciones puntuales (Andreu y col., 2004).

Mutaciones puntuales desde la primera mutación puntual descrita en 1988, se han descrito hasta la fecha más de 150 mutaciones puntuales patogénicas, mas de 100 deleciones y cerca de 50 mutaciones puntuales (Domínguez y Huesca. 2007). Muchas de las cuales son de herencia materna y multisistemicas, entre las encefalomiopatias de herencia materna, existen cuatro síndromes que destacan, por su prevalencia (Andreu y col., 2004).

- ❖ Síndrome de **MELAS** (Encefalomiopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Episodios parecidos a un accidente vascular encefálico); Además de la triada que le da nombre puede haber migraña, vomito, demencia, epilepsia, ataxia y retinosis pigmentaria. (Rubio y Verdecía. 2004). Su inicio ocurre a cualquier edad, se asocia con la mutación A-G en el RNA_t en la posición 3243 en el 80% de los casos descritos, aunque se han notificado otras mutaciones (Rubio y Verdecía. 2004).
- ❖ Síndrome de **MERRF** (Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojas Rasgadas). Se manifiesta por epilepsia mioclónica, debilitamiento muscular, ataxia, convulsiones generalizadas y miopatía mitocondrial con presencia de fibras rojas rasgadas. Puede aparecer tanto en la infancia como en la edad adulta y su curso es progresivo (Pérez. 2002). La mutación típica del síndrome de MERRF es la A8344G en el gen RNA_t^{Lys}, aunque otras mutaciones puntuales en el mismo gen se han asociado con este síndrome (Andreu y col., 2004).
- ❖ El tercer síndrome se presenta de dos maneras: a) **NARP** (Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa). Que normalmente afecta a personas jóvenes y causa retinitis pigmentosa, demencia, ataques, debilidad proximal y neuropatía sensorial (Andreu y col., 2004). No se encuentra presencia de fibras rojas rasgadas, en la biopsia de músculo, se asocia

a una mutación del DNAMt en la posición T8993G (Rubio y Verdecía. 2004); b) Síndrome de **Leigh** es una enfermedad multisistémica muy grave que suele aparecer en los primeros años de vida (Ruiz y col., 2006). Ambos síndromes son debidos a mutaciones en el gen *ATP6* (Andreu y col., 2004).

- ❖ El cuarto síndrome, **LHON** (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber). Suele aparecer en la segunda o tercera década de vida y afecta mas ha hombres que ha mujeres. Se han descrito ocho mutaciones patológicas en la subunidad ND6 del complejo I. De hecho las tres mutaciones mas comúnmente asociadas a esta enfermedad, en las posiciones G3460A, G11778A y T14484C, explican el 95% de los casos. Por tanto, 15 mutaciones distintas en seis genes estructurales del complejo I, hacen pensar que la disfunción de este complejo sería el factor unificador, que finalmente se traduciría en LHON (Ruiz y col., 2006; Domínguez y Huesca. 2007).

1.4.2 Reordenamientos del DNAMt (deleciones y duplicaciones). Las deleciones se presentan de forma esporádica y han sido asociadas con tres fenotipos clínicos:

- ❖ **Síndrome de Pearson**. Comienza mas temprana y gravemente en la infancia con anemia, leucopenia, trombositopenia y disfunción pancreática exocrina; puede estar asociada con manifestaciones multisistémicas. Los niños que sobreviven ha esta enfermedad evolucionan hacia el síndrome de Kearns-Sayre. (Rubio y Verdecía. 2004). Estos pacientes presentan deleciones grandes y únicas en el DNAMt, que generalmente son esporádicas, aunque se ha descrito alguna caso de herencia materna (Pérez. 2003).
- ❖ **Síndrome de Kearns-Sayre**. Comienza antes de los 20 años, con oftalmoplejia externa, retinosis pigmentaria, alteraciones cardiacas (cardiopatías o defectos de la conducción), diabetes, sordera, ataxia cerebelosa y proteínas en el liquido ceforraquídeo por encima de 1

g/L (Rubio y Verdecía. 2004). No existe una clara relación entre el fenotipo y el taño o porcentaje del DNAm_t suprimido, pues la misma perdida origina fenotipos diferentes (Domínguez y Huesca. 2007).

- ❖ **CPEO** esporádica (Oftalmoplija Crónica Progresiva Externa). Puede presentarse con o sin la debilidad de la musculatura proximal (Andreu y col., 2004), intolerancia al ejercicio. Su forma dominante esta asociada con mutaciones del DNAn y múltiples deleciones del DNAm_t en el músculo o con mutaciones en el RNAt (Rubio y Verdecía. 2004). En el músculo se encuentran fibras rojas rasgadas y COX negativas (Pérez. 2003). Las deleciones pueden variar de tamaño y localización, pero existe una llamada delación común del DNAm_t que comprende 4900 pb y se observa en frecuentemente en pacientes e individuos de edad avanzada, debido a la naturaleza genética de estas alteraciones, las deleciones y duplicaciones pueden coexistir (Andreu y col., 2004),

1.4.3 Enfermedades debidas a alteraciones del DNAn. Todas ellas son transmitidas por herencia mendeliana e incluyen tres grupos principales.

- ❖ Mutaciones en genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria (estructurales y de ensamblaje). Como ya se ha mencionado anteriormente el DNAm_t codifica sólo para 13 subunidades de la cadena respiratoria (sistema OXPHOS), la mayoría de los componentes están en el DNAn, así como todos los factores implicados en su importación a la mitocondria, procesamiento, modificación y ensamblaje en los complejos (Ruiz y col., 2006). Mientras que el DNAn codifica para todas las subunidades del complejo II, la mayoría de los otros cuatro complejos, así como para la coenzima Q10 y para el citocromo c. Recientemente los síndromes debidos a la falta de coenzima Q10, han sido clasificados en tres grupos: a) síndrome predominante miopático, con mioglobinuria recurrente, b) un síndrome predominante encefalopatico con ataxia y atrofia cerebelar, c) una forma generalizada (Andreu y col., 2004).

- ❖ deficiencia en la importación de proteínas mitocondriales. Estas proteínas son necesarias para el funcionamiento del sistema OXPHOS, las proteínas se sintetizan en el citoplasma y se transportan a la mitocondria (Castro y col., 2000). Estas proteínas son necesarias para el correcto ensamblaje de los diferentes complejos de la cadena respiratoria las mutaciones en las proteínas de ensamblaje para citocromo c oxidasa, son las primeras que se han identificado. Mutaciones en SURF1, SCO2, COX10 Y COX15, se ha asociado con el síndrome de Leigh (Andreu y col., 2004).

- ❖ Defectos en la señalización intergenómica, como se ha mencionado el DNAm es altamente dependiente para su correcto funcionamiento y replicación de numerosos factores codificados por genes nucleares. Mutaciones en estos genes son la causa de enfermedades mitocondriales caracterizadas por alteraciones cuantitativas o cualitativas del DNAm (Andreu y col., 2004). Existen dos grupos de enfermedades producidas por alteraciones en la comunicación entre los genomas y son transmitidas por herencia mendeliana, a) Deleciones múltiples del DNAm, es de tipo cualitativo, existen dos trastornos en los que las deleciones múltiples del DNAm, desempeñan un papel fundamental en su patogenia CPEO. Con intolerancia al ejercicio, de herencia autosómica dominante. Existe acidosis láctica y fibras rojas rasgadas y deficiencia y combinada de varios complejos de la cadena respiratoria. CPEO con cardiomiopatía y herencia autosómica recesiva (Castro y col., 2000); b) Depleciones del DNAm, es de tipo cuantitativo, normalmente caracterizadas clínicamente por formas congénitas (Andreu y col., 2004).

1.5 Haplogrupos mitocondriales humanos

Un haplogrupo mitocondrial es un racimo filogenético de genotipos mitocondriales relacionados (haplotipos), estos haplogrupos son definidos por mutaciones antiguas, probablemente la mayor parte no tenía un efecto fenotípico y eran neutrales (Dahmany y col., 2006). Se han encontrado variaciones no patogénicas del DNAm, conocidas como mutaciones polimórficas o polimorfismos que se agrupan para definir los haplogrupos mitocondriales diferentes en las distintas etnias, que parecen predisponer a una mayor resistencia o susceptibilidad según los casos, a determinadas enfermedades (Marcuello y col., 2003). Por ejemplo se ha encontrado que el haplogrupo J aumenta el riesgo de desarrollar ceguera, la cual está asociada con el síndrome de LHON, el haplogrupo T aumenta el riesgo para la depresión, sin embargo otros grupos son protectores contra la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Ruiz y col., 2007).

El DNAm es tan pequeño que en él ocurren solamente una mutación cada 3000 años, estas mutaciones nos permiten rastrear las migraciones humanas, por todo el mundo desde que surgió el ser humano en África hace unos 150,000 (Martínez. 2002); A lo largo de miles de años los polimorfismos del DNAm humano, se fueron acumulando dando como resultado combinaciones específicas de cada continente lo que dio lugar a los haplogrupos mitocondriales (Marcuello y col., 2003).

La mutación que todos los DNAm tienen en común se conoce como el marcador del haplogrupo, todos los DNAm que pertenecen a un haplogrupo tienen que tener el marcador de dicho haplogrupo (Martínez. 2002). La mayor parte del DNAm (7%) el cual no codifica, se encuentra en la zona denominada D-loop, con aproximadamente 1100 pb, lo que muestra un alto grado de polimorfismo en su secuencia (Henríquez y col., 2004). En la región D-Loop se encuentra dos segmentos muy variables denominados HVI (región hipervariable I) y HVII (región hipervariable II). Debido a que tienen regiones no codificantes y no tiene el sistema de reparación como el DNA nuclear, acumulan rápidamente mutaciones en pocas generaciones. Por esta razón HVI y HVII, están siendo

usadas para tener un análisis mas refinado sobre los polimorfismos del DNAm (Estrada y col., 2005)

Existen diferentes Haplogrupos en los distintos continentes, por ejemplo se han reportado que los individuos euroasiáticos occidentales descritos son: H, V, J, T, U, W, I, X. y sus secuencias eran muy similares en todo alrededor de Europa (Dahmany y col., 2006). Varias líneas independientes de evidencia sugieren que los seres humanos entraron en América en más de un tiempo distinto (Torroni y col., 1993). En el continente Americano se ha reportado el haplogrupo nativo americano, en el cual se podrían rastrear a cuatro haplogrupos importantes de origen asiático compartido por poblaciones centrales y suramericanas estos son A, B, C y D, nombrados anteriormente de esta manera en la actualidad los llaman A2, B2, C1 y D1, posteriormente apareció un quinto haplogrupo conocido como X2a, fue descrito en nativos americanos, mas tarde se descubrieron dos haplogrupos mas D2a y D3 (en esquimales), recientemente se han incorporado dos mas D4h3 y C4c, dando como un total de nueve haplogrupos nativo americano (Achilli y col., 2008).

La mayoría de los DNAm indígenas tienen sus orígenes en Asia hace unos 25,000 o 30,000 años (figura 10 se puede ver las distintas migraciones del hombre moderno desde África hacia el resto del mundo); (Martínez. 2002); un grupo de siberianos cruzo al estrecho de Bering, entrando el ser humano así al nuevo mundo, llevándose así la colonización de América (Torroni y col., 1993). Las primeras mujeres que entraron tenían los haplogrupos A, C y D. Es posible que por una ruta alterna mas afín al mar simultáneamente entrara a América el haplogrupo B, que si bien es también Asiático no se encuentra en Siberia hoy en día como los haplogrupos A, C y D, y por ultimo el haplogrupo X que no se encuentra hoy en día en Asia sino en Europa y podría representar una migración independiente, desde Europa vía Groenlandia, ya que este haplogrupo se encuentra únicamente en América del norte (Martínez. 2002). La interpretación de los datos del DNAm ha sido algo polémicos con los panoramas que postulaban los acontecimientos migratorios múltiples de Bering, la localización de un calendario exacto para la llegada de los fundadores del nativo Americano seria esencial solucionar dicha discusión, ya que solo se cuentan con un total de 3000

secuencias completas de DNAm_t y el estudio del DNAm_t del nativo Americano solo se remonta a 15 años por lo cual América sigue siendo el continente del cual se tiene la menor información sobre la variación de las secuencias, pero actualmente se están realizando muchos estudios que a la postre brindaran mucho mayor información acerca de las migraciones ocurridas (Achilli y col., 2008)

DNAm_t y migraciones humanas

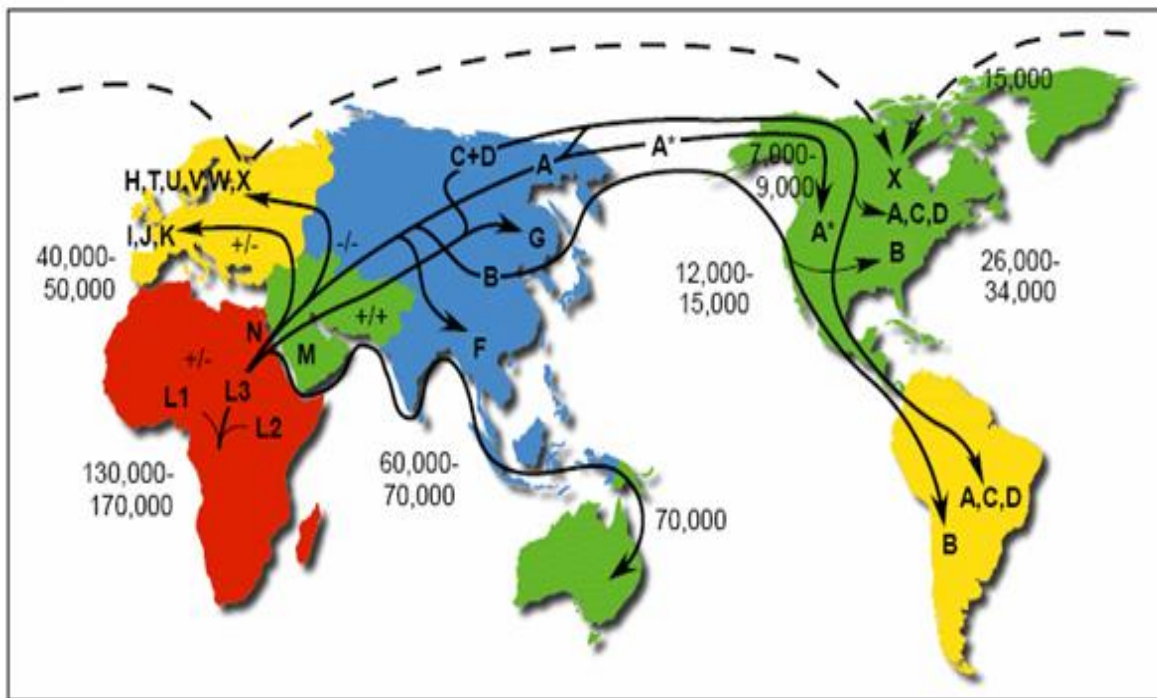


Figura 10 mapa de las diferentes migraciones del hombre moderno desde África hacia el resto del mundo y las distintas distribuciones de los haplogrupos (Mitomap)

Los haplogrupos nativo americano y sus marcadores (polimorfismos) que caracterizan dichos haplogrupos son: El haplogrupo A definido por la ganancia de un sitio para la enzima *Hae III* en la posición 663, El haplotipo B por la delección de un fragmento de 9 pb en la región intergenómica COII/RNAt, el C por la pérdida de un sitio para la enzima *Hinc II* en la posición 13259, el haplogrupo D por la pérdida de un sitio para la enzima *Alu I* en la posición 5176 y para el haplogrupo X la enzima *Acc I* en la posición 14465. El marcador del haplogrupo B es el único que no consiste en un cambio de restricción si no en una delección de 9 pb comenzando en la posición 8272 en una región del DNAm_t conocida como la región V (Martínez. 2002).

1.6 Síndrome de Kearns Sayre (SKS)

1.6.1 Enfermedad y origen.

El síndrome de Kearns Sayre. También se denomina oftalmoplejia plus, degeneración pigmentaria de la retina o síndrome oculocraniosomático (Domínguez y Huesca. 2007). Es una citopatía mitocondrial descrita inicialmente en 1958 por Thomas P. Kearns y el patólogo George P. Sayre (Santolaria y col., 2002). La edad usual para su inicio es antes de los 20 años y los sujetos afectados frecuentemente presentan datos clínicos asociados, como sordera y una alta concentración de proteínas en líquido cefalorraquídeo (Ramírez y col., 2008).

La citopatía mitocondrial SKS (por sus siglas en inglés), se caracteriza clínicamente por la presencia de tres criterios mayores: 1) Inicio de los síntomas antes de los 20 años. 2) Oftalmoplejia progresiva. 3) Retinopatía pigmentaria. Y al menos uno de los siguientes criterios menores: presencia de bloqueo cardíaco, síndrome cerebeloso e hiperproteínorraquia en líquido cefalorraquídeo (LCR), habitualmente superior a 100 mg/dl (Carod y col., 2006). Las características clínicas adicionales incluyen estatura corta, sordera neurossensorial, infarto cerebral, arritmia cardíaca, cardiomiopatía dilatada y retraso mental (Pistilli y col., 2003).

Otras manifestaciones clínicas no neurológicas ocasionalmente descritas son la anemia sideroblástica, diabetes mellitus, hipoparatiroidismo, deficiencia de hormona de crecimiento, disfunción pancreática exocrina, prolapso de la válvula mitral y amenorrea primaria (Carod y col., 2006).

La retinopatía pigmentaria es el mayor criterio diagnóstico del síndrome de Kearns Sayre, y se presenta como retinopatía en sal y pimienta, es más prominente con la edad. Histopatológicamente se observa degeneración del epitelio pigmentario de retina, anomalías en conos y bastones, la pérdida de visión ocurre entre el 50% de los casos y es moderada (González y Lozano. 2005)

El desarrollo de complicaciones cardíacas en el síndrome de Kearns Sayre es frecuente, las manifestaciones clínicas cardíacas ocurren en el 57% de los pacientes con SKS. Entre las principales manifestaciones cardíacas se encuentra el síncope en 45% de los casos, la muerte súbita en el 23% de los casos y la miocardiopatía en el 20% de los casos (Barrera y col., 2005).

Se consideran SKS incompletos aquellos que presentan CPEO, pero faltan algunos de los criterios clínicos o se completa la sintomatología muchos años después de su inicio y muestran las deleciones típicas de la enfermedad (Santolaria y col., 2002).

Las deleciones del DNAm_t asociadas al síndrome de Kearns Sayre, son variables y fluctúan desde 1.3 hasta 8 kilobases (Kb), con distintas cantidades de DNAm_t delecionado presente en varios tejidos, lo que correlaciona con la naturaleza multisistémica del síndrome. El rearrreglo mas frecuente observado en el DNAm_t de pacientes con síndrome de Kearns Sayre es la delación común de 4977 pb, localizada entre los nucleótidos 8482 y 13640 del DNAm_t, la cual se encuentra en el 50% de los casos (Ramírez y col., 2008) Casi todos los pacientes afectados con SKS presentan grandes deleciones únicas en el DNAm_t, el curso de esta enfermedad es progresivo, y la mortalidad esta estrechamente relacionada con las alteraciones en la conducción cardíaca (Santolaria y col., 2001).

No coexiste una clara relación entre el fenotipo y el tamaño o porcentaje del DNAm_t suprimido, pues la misma perdida origina fenotipos diferentes, la mayor parte de las perdidas se flanquean por repeticiones directas de longitud variada (Domínguez y Huesca. 2007); Se piensa que estas mutaciones se originan durante el proceso de replicación del DNAm_t en los oocitos o en las células somáticas durante el desarrollo embrionario precoz, habitualmente no se trasmite a la descendencia y aparece de forma esporádica (Carod y col., 2006); la variabilidad del fenotipo se relaciona con el grado de heteroplasmía, en diversos tejidos, según la penetración de la deleción en diversas estirpes celulares (Francesco y col., 2005).

Tabla 3 Sinapsis clínica del síndrome de Kearns Sayre. (Domínguez y Huesca. 2007).

| | Datos clínicos |
|-------------|---|
| Crecimiento | Estatura pequeña |
| Ojos | Oftalmoplejia progresiva externa crónica, iniciada a los 15 años de edad (es el primer síntoma que se manifiesta). Retinopatía pigmentaria, pérdida visual. |
| Cardiología | Cardiomiopatía con bloqueo de tipo variable |
| Neurología | Síndrome cerebeloso, degeneración cerebral esponjosa, ataxia y demencia. |
| Músculos | Talla baja, debilidad de los músculos faciales, faringeos, tronco y extremidades. |
| Laboratorio | Incremento de las proteínas del fluido cerebroespinal (mayor a 100 mg/dL). Acidosis láctica, fibras rojo rasgadas. |
| Audición | Hipoacusia neurosensorial |
| Genética | Perdida de 5 Kb en el DNAm, incluidas las secuencias para cuatro subunidades del complejo I y para dos del complejo IV Y V. El umbral de acción de las moléculas de DNAm es de 75%. |

1.6.2 Diagnóstico y tratamiento.

El diagnóstico del síndrome de Kearns Sayre, se basa la estrategia que se utiliza para el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales (Pérez. 2003). Primeramente debe reconocerse la presencia clínica: tres patrones fundamentales la describen: 1) Oftalmoplejia progresiva, 2) Intolerancia al ejercicio con o sin reposo, 3) síntomas de alteración del sistema nervioso central (SNC), con miopatía asociada. Los estudios complementarios que pueden ayudar en el diagnóstico son: 1) Biopsia de músculo, 2) Niveles de CPK, pueden ser normales o pueden estar un poco elevados, 3) Medición de ácido láctico sérico, con una relación lactato/piruvato mayor de 20. 4) Análisis molecular para la búsqueda de deleciones en el DNAm (Rubio y Verdecía. 2004).

La biopsia muscular es el tejido de elección cuando se sospecha de una enfermedad de tipo mitocondrial, tanto para estudios morfológicos como para análisis molecular. El marcador morfológico más característico de las miopatías mitocondriales son las fibras rojas rasgadas (FRR), estas deben su nombre al aspecto que tienen con la tinción de Gomori en cortes por congelación, las fibras

dañadas se tiñen de color rojo; tienen bordes irregulares y deshilachados. Estas fibras se tiñen intensamente con las enzimas oxidativas y en el microscopio se encuentran cúmulos de mitocondrias de tamaños diversos, multiformes y en ocasiones con inclusiones cristalinas, la tinción roja con el Gomori se debe a uno de los componentes del colorante que reacciona con los fosfolípidos que son un componente abundante de la membrana mitocondrial. Las FRR se encuentran en el síndrome de Kearns Sayre, MERFF y MELAS, junto con COX permiten orientar el diagnóstico hacia un tipo de mitocondriopatía (Ridaura. 2005).

La oftalmoplejia extrínseca progresiva, el síndrome de Kearns Sayre y las diversas variantes fenotípicas incluidas en el síndrome de oftalmoplejia Plus, comparten signos clínicos que en ocasiones hacen difícil su diagnóstico diferencial. En general los pacientes con síndrome de Kearns Sayre, presentan un fenotipo más grave, un inicio precoz en la infancia. Habitualmente el análisis del DNAm mediante la técnica de PCR y la hibridación Southern (para localizar y evidenciar las deleciones del DNAm), son los estudios para diagnosticar y diferenciar al síndrome de Kearns Sayre de las demás oftalmoplejias, el tejido de preferencia para el estudio del DNAm es aislado de músculo (Carod y col., 2006).

Aun no se dispone de una terapéutica que cure estas afecciones. La conducta médica debe estar dirigida a mejorar la calidad de vida de los pacientes, mejorar su estado nutricional, corregir la ptosis y si se requiere implantar un marcapasos (Rubio y Verdecía. 2004). Debido a la ausencia de una clara comprensión de los mecanismos patogénicos, los tratamientos han sido paliativos, o han comprendido la administración de vitaminas, cofactores y aceptores finales de electrones con la finalidad de mitigar, postergar o eludir el daño a la cadena respiratoria (Andreu y col., 2004).

1.7 Estrategias moleculares para el estudio de las enfermedades mitocondriales

1.7.1 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Los polimorfismos del DNAm_t mitocondrial son utilizados usualmente para el estudio de la diversidad del genoma humano. Esto permite la comparación entre individuos de diferentes poblaciones incluso entre individuos de diferente época (Estrada y col., 2005). El estudio del DNAm_t se ha basado fundamentalmente en el empleo de dos estrategias, metodológicas diferentes, la primera y mas ampliamente utilizada consiste en el estudio de los polimorfismos del DNAm_t (RFLP) mediante el uso de enzimas de restricción, permitiendo la localización de sitios polimórficos, propios de determinada raza o grupos étnicos, la segunda corresponde a la secuenciación directa de las regiones hipervariables I y II del D-Loop y su posterior análisis (Henríquez y col., 2004).

El RFLP es un SNP (Polimorfismo de un Solo Nucleótido) que coincide con el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, su presencia o ausencia determina que la enzima corte o no el segmento de DNA. Solo una pequeña porción de SNP será detectado por la técnica de RFLP. A partir de la combinación de los sitios polimórficos en cada individuo se confeccionan haplotipos que definirán tipos y subtipos de DNAm_t (Estrada y col., 2005). Una endonucleasa de restricción es una enzima que digiere selectivamente el DNA en una secuencia específica, por ejemplo *Alu I* corta al DNA únicamente en los puntos donde el DNA tiene secuencia AGCT. Si hubiera una molécula donde la secuencia estuviera presente en algún punto, esa molécula seria cortada en dos fragmentos por la endonucleasa *Alu I* (Martínez. 2002).

1.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa.

Conocida como PCR por sus siglas en inglés. Esta técnica es considerada como la más revolucionaria del último siglo y fue en 1983, cuando Kary Mullis la desarrolló, con esta se consigue copiar millones de veces, en un par de horas una secuencia predeterminada de DNA (Rodríguez y Barrera. 2004). Inicialmente se empleaba una polimerasa de *Escherichia coli*, pero esta enzima se inactivaba a causa de la elevada temperatura necesaria para la desnaturalización del DNA, por lo que se debía añadir polimerasa fresca manualmente al final de cada ciclo. La técnica se simplificó cuando se introdujo la enzima Taq. Polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus* bacteria termofílica que vive en temperaturas de entre 70 y 80 °C (Rodríguez y Medina. 2001).

El método se basa en las características de la estructura del DNA y su replicación semiconservativa. Es decir, de acuerdo con el modelo de Watson y Crick (Torres y Baca. 1995). La reacción consta, por lo regular de una treintena de ciclos repetitivos conformando cada uno de los tres pasos (fig. 11): El primer consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del DNA, para desnaturalizarlo por lo que se incubó a una temperatura de 95°C, por un minuto. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del DNA blanco, con los denominados cebadores (DNA sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de DNA, Esta temperatura depende de temperatura de fusión (T_m), la cual generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la cual la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres, en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde. (Rodríguez y Medina. 2001; Rodríguez y Barrera. 2004).

Los componentes de la PCR: Son 1) solución amortiguadora, se emplea concentrada por lo general, diez veces y contiene Tris-HCl. 2) Magnesio este tiene una función crítica en la reacción, su concentración oscila por lo general entre 0.5 y 2.5 Mm. 3) Los cuatro dNTPs (las bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que construye las nuevas cadenas de DNA, estos dNTPs captan los iones

de magnesio, por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de Mg^{+2} sea 0.5 a 1.0 mM, superior a la de los dNTPs. 4) Cebadores o iniciadores, estos son el componente mas sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos y su contenido en G-C es entre 40 y 70 %, la concentración en la que se suele emplear es en un intervalo de 0.1-0.5 μM . 5) Enzimas solo se utilizan polimerasas que son capaces de actuar a altas temperaturas, las de uso mas extendido son, la Taq polimerasa y la Vent, su temperatura optima oscila entre los 70°C, temperatura a la que incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo. 6) DNA la cantidad puede ser de tan solo 1 ng y este se utiliza como molde para replicarlo. 7) Agua esta se utiliza como solvente de los demás ingredientes por lo general se utiliza agua libre de endonucleasa.

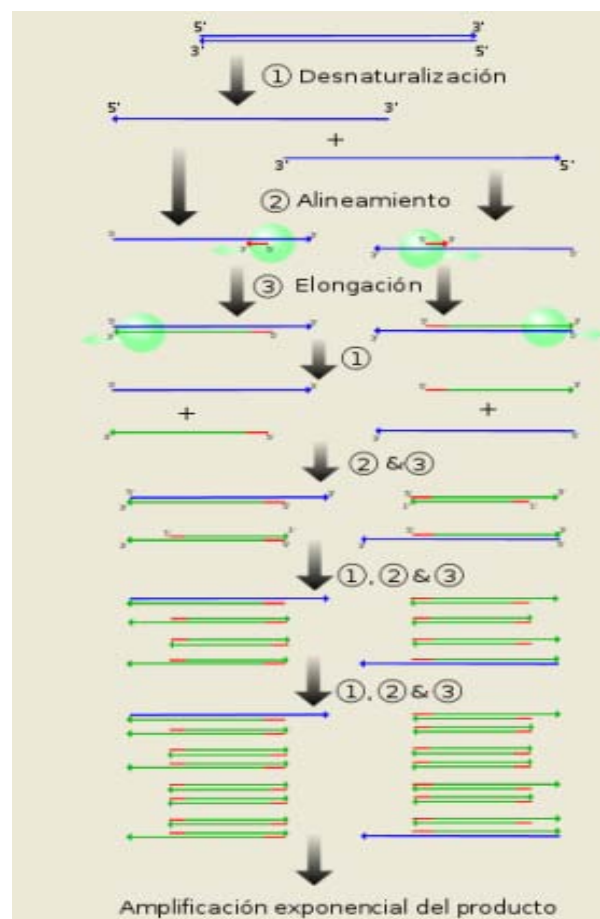


Figura 11 Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se muestran las etapas de la reacción, la desnaturalización, alineamiento y la extensión del DNA (Rodríguez y Barrera. 2004).

1.7.3 Southern blot

El empleo de sondas de hibridación de ácidos nucleicos fue desarrollado por Edward M. Southern en 1975 para la detección de DNA (Southern blot) y posteriormente se aplicó a la detección de RNA (Northern blot); ambas técnicas emplean secuencias específicas (sondas) complementarias a la molécula de ácido nucleico a identificar. Es decir, utilizan la hibridación de ácidos nucleicos para la detección de las moléculas buscadas (Hernández y col., 2007). La técnica se basa en tratar al DNA con enzimas de restricción y separar los fragmentos con electroforesis en un gel de agarosa, esto consiste en la transferencia del DNA desde un gel de agarosa a un soporte sólido (membrana o filtro de nitrocelulosa o nylon) el DNA en la membrana podría ser hibridado con una sonda marcada mediante métodos radioactivos o enzimáticos (Lleonart y col., 1997).

Las principales aplicaciones del Southern blot son:

1. Construcción de mapas de restricción.
2. Detección de polimorfismos
 - *fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)
 - *Número variable de repeticiones en tandem minisatélites (VNTR)
3. Detección de mutaciones (Aranega y col., 2002).

Para la realización de un Southern se requiere una serie de pasos.

- I.- Preparación de la muestra
- II.- Electroforesis en gel de agarosa
- III.- Tratamiento del gel
- IV Transferencia a blotting
- V.- Fijación del DNA a la membrana

Existen diferentes formas de realizar un Southern blot, transferencia capilar, electroblotting, transferencia por vacío y transferencia por presión positiva, de todas la más utilizada es la transferencia capilar (Aranega y col., 2002). El procedimiento para la hibridación Southern es el siguiente:

Preparación y marcaje no-radioactivo con digoxigenina de sondas de DNA mitocondrial humano.

La sonda mitocondrial corresponde a un fragmento de la región rRNA 16S-ND1 (3130-4407; fragmento de 1277 pb). Para realizar estas sondas se amplifica por PCR los fragmentos seleccionados como sondas con un DNA de un donante sano empleando los oligos:

| Oligo | Posición | Secuencia | TM |
|-------|-----------|----------------------|------|
| MS2L | 3130-3149 | AGGACAAGAGAAATAAGGCC | 58°C |
| LBH | 4388-4407 | CTTACTTTAGGATGGGGTGT | 58°C |

Una vez comprobada la amplificación de las sondas, se purifican los amplificados mediante el uso de un kit de purificación de fragmentos de PCR, kit de SIGMA “GenElute PCR Clean-up Kit”, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A continuación se mide la concentración de las sondas mediante la medida de la absorbancia.

Para marcar los amplificados anteriores con digoxigenina se utiliza el kit de Roche “DIG-High Prime”, este kit se basa en la técnica de marcaje al azar e incorporación de digoxigenina-dUTP. Para ello se añade 1 µg del fragmento de amplificación ya purificado se ajusto 16 µl con agua estéril. Esta mezcla se desnaturaliza hirviendo 10 minutos y se enfría en hielo durante 2 minutos. A continuación se añaden 4 µl de DIG-High Prime (enzima *klenow*, dATP 1 mM, dCTP 1Mm, dGTP 1 mM , y dUTP 0.65 mM, este ultimo unido covalentemente a digoxigenina) Se incubo a 37°C por un mínimo de 20 horas. Transcurrida la incubación, la reacción de marcaje se paro con 2 µl de EDTA 0.2 M y para eliminar el dUTP-Digoxigenina no incorporado al DNA se precipito con 2.5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol absoluto 1 hora a 70°C. Para colectar el DNA marcado se centrifugo a 13000 rpm, y el sedimento se lavo con etanol al 70%. Los restos de etanol se eliminaron y finalmente el DNA se resuspendió en 50 µl de TE 10:1 estéril.

Para determinar el rendimiento del marcaje de la sonda, se llevaron a cabo diluciones seriadas de la sonda y del DNA control (suministrado con el kit) A continuación, 1 µl de cada dilución se llevo a un volumen de 200 µl y se cargaron

en un aparato de Slot-Blot, para transferir, mediante vacío, las diluciones a una membrana de nylon. El DNA se fijo con UV (1200 mJ/cm²).

Detección de híbridos de DNA mediante inmunoensayo.

Una vez realizado el proceso anterior, se procedió a la detección inmunológica, los híbridos de DNA mitocondrial los cuales se detectaron mediante enzimmunoensayo mediante al utilización de anticuerpos antidigoxigenina (Boehringer-Manhein). El proceso de detección se describe en el siguiente cuadro. Durante todo el tiempo se requiere que la membrana se encuentre sumergida en las soluciones y en agitación (con ayuda de un balancín, a temperatura ambiente):

Tabla 4 Detección de híbridos de DNA mediante inmunoensayo.

| Paso No | Solución requerida | Tiempo |
|-----------------------------|--|-------------|
| 1.Primer lavado | Solución T1, Ácido maleico.1 M, NaCl 3M, Tween 20 al 3% pH= 8 (ajustado con NaOH) | 5 min. |
| 2.Bloqueo | Solución T2. Ácido maleico 10 mM, NaCl .3M Tween 20 al 3% agente bloqueante al 5% pH=8. | 1 hora |
| 3.Incubación con anticuerpo | Solución T3. Anticuerpo Anti-Dig-AP (Roche) en T2, dilución 1:15 000 | 30 min. |
| 4.Segundo lavado | 50 ml de solución T1 | 4 x 10 min. |
| 5.Pre-detección | Solución T4 Tris HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl ₂ 50 mM, pH=8 | 15 min. |
| 6.Detección | 10 ml de solución de sustrato quimioluminiscente CSPD-Star (Roche) 0.25 Mm, en T4 (dilución 1.100) | 5 min. |

Digestión de DNA total con *Pvu II*. Linearización del DNA mitocondrial.

Con el fin de linearizar el DNA mitocondrial para el análisis de deleciones, se digirieron 5 µg de DNA total con la enzima *Pvu II*, que lineariza el DNA mitocondrial ya que esta enzima tiene un solo sitio de corte en el mismo (posición 2652). La mezcla de reacción (50 µl de volumen final) incluye además 2 µl de RNAsa libre de DNAsa (Boehringer-Manhein), 2 µl de espermidina 50 mM, 5 µl del Buffer 10X correspondiente a la enzima y 2 µl de la enzima *Pvu II* (10U/µl). La

digestión requiere un mínimo de 4 horas bajo incubación a 37°C. Una vez transcurrida la reacción, el DNA se precipito con etanol en presencia de NaCl 0.2 M para limpiarlo de sales y obtener mejores bandas en el Southern. El DNA digerido con *Pvu II* se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0.7% a 100 V, en paralelo se cargo un marcador de peso molecular (DNA del fajo λ digerido con *Hind III* y marcado con digoxigenina), para identificar la banda de DNAm_t de 16.5 Kb y de las posibles moléculas delecionadas.

Transferencia y fijación de DNA a membrana de nylon

La transferencia de DNA a membranas de nylon se realizo siguiendo la técnica de Southern, utilizando un aparato de transferencia al vacío (Vacuum Blotting de Pharmacia) lo cual representa un gran ahorro de tiempo con respecto al método capilar tradicional.

Antes de realizar la transferencia se procedió a la preparación del aparato. Para ello se humedeció en agua destilada el soporte poroso y la membrana de nylon. A continuación se colocó la membrana de nylon entre el soporte del aparato y la máscara en la ventana preparada para ello, después se coloca el gel sobre la ventana encima de la membrana y se conectó la bomba de vacío, en cuanto alcanzo una presión de 50 milibares, se añadió en el siguiente orden: solución de despurinización (HCl 0.25 M), solución de desnaturalización (NaOH 0.5 M), solución de neutralización (Tris-HCl 1 M, NaCl 1.5 M, pH=7.4), solución de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato Trisodico 0.3 M, pH=7.5). Cada una de las soluciones se mantuvo en contacto con el gel por un periodo de 7 minutos, a excepción de la solución de transferencia que se mantuvo durante 20 minutos, el gel se debe de cubrir con todas las soluciones y por supuesto eliminar por completo cada una de las soluciones antes de añadir la siguiente (esto se hace fácilmente inclinando el aparato o bien con ayuda de una pipeta). El paso del DNA del gel hacia la membrana se verifico mediante observación del mismo bajo la luz UV, una vez finalizada la transferencia. La membrana de nylon se lavo con SSC 20X por cinco minutos sometiéndola a radiación UV en un aparato UVCrosslinker con una energía de (120 mJ/cm²).

Hibridación del DNA con sondas no radioactivas

Las membranas de nylon que contenían los fragmentos de DNA fijados (procedimiento anterior), se colocaron en tubos de hibridación (Hybaid HB-OV-BS) con una solución de prehibridación cuya composición era 0.25 M Na_2HPO_4 (pH=7.2), 1 mM EDTA, 20% SDS y 0.5% de agente de bloqueo, debe de adicionarse 2 ml por centímetro cuadrado de membrana, precalentados a 68°C. La prehibridación se llevo a cabo a 68°C por un lapso de 2 horas en horno con rueda giratoria.

Una vez prehibridada la membrana, se retiro la solución de prehibridación y se reemplazo por solución de hibridación, constituida por solución de prehibridación mas sonda cargada con digoxigenina a una concentración de 2.5 μg de DNA marcado por cada ml de solución (durante la hibridación se requieren 0.1 ml de solución por cada cm^2 de membrana). La sonda se desnaturalizo previamente a 95°C por 10 minutos.

Al finalizar la incubación, se decanto la solución de hibridación y se sustituyo por 50 ml de solución de lavado (20 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA y SDS 1%) precalentada a 68°C. Se realizaron tres lavados con esta solución incubando la membrana por 20 minutos en el mismo horno de la hibridación. La solución con sonda puede reciclarse y reutilizarse posteriormente pero debe congelarse hasta un nuevo uso. Una vez lavadas las membranas se colocaron en bandejas donde se llevo a cabo la detección de los híbridos por inmunoensayo (procedimiento anteriormente descrito).

Estudio de deleciones mediante hibridación Southern.

Para realizar el estudio de deleciones por el método descrito anteriormente se empleo la sonda mitocondrial, Dicha sonda, presente en una región que habitualmente no se encuentra delecionada (16S-rRNA), se unirá tanto al genoma normal como al genoma delecionado. De esta forma, si un paciente posee reorganizaciones del DNA mitocondrial, deleciones o duplicaciones, además del DNA normal de un tamaño de aproximadamente 16500 pb, presentara bandas de distintos tamaños. El porcentaje de deleción presente en la muestra se realiza mediante densitometría de las bandas encontradas.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de deleciones en el DNAMt por medio de estrategias genéticas moleculares para confirmar el diagnóstico del síndrome de Kearns-Sayre, en un paciente.

Objetivos particulares.

- Evaluar por PCR larga la presencia de deleciones en el DNA mitocondrial.
- Determinar la concentración del DNA extraído, mediante espectrofotometría para asegurarse que sea la cantidad adecuada para la reacción de PCR.
- Por medio de distintas enzimas de restricción llevar a cabo digestiones del producto amplificado de la PCR larga para localizar la zona de la deleción.
- Por hibridación Southern determinar si existen deleciones dentro del DNAMt y calcular el porcentaje de heteroplasmía.
- Realizar la amplificación con primers apropiados para precisar la ubicación de la deleción.
- Identificar el haplogrupo mitocondrial mediante la localización de polimorfismos presentes en la región hipervariable II.

Hipótesis

El paciente que presenta el cuadro clínico característico del síndrome de Kearns-Sayre, es posible que presente como causas de ello alguna deleción en el DNAMt, el diagnóstico del síndrome se confirmará con técnicas de biología molecular.

3. METODOLOGIA DE INVESTIGACIÓN

3. 1 Materiales y equipos.

Historia clínica

Paciente femenino de 10 años 10 meses de edad, con el diagnóstico de citopatía mitocondrial, Síndrome de Kearns-Sayre. Hasta el momento no se ha valorado por el servicio de cardiología por lo que se envía para valoración, la paciente se encuentra con oftalmoplejia externa progresiva, retinosis pigmentaria, ataxia, hiperproteínorragia, no se ha descartado alteraciones del ritmo cardiaco, en estudios realizados se aprecia disfunción de la vía visual. Actualmente la paciente se encuentra con manejo de oxcarbazepina a dosis de 21 mg/k/d, la madre refiere que el día de ayer presento crisis parciales motoras del hemicuerpo del lado izquierdo. Dado estos hallazgos se deciden incrementar la dosis de oxcarbazepina a 30 mg/k/d. Se han realizado PEV pero no se cuentan con resultados hasta el momento.

Se empleó una muestra de biopsia de tejido muscular de la paciente con fenotipo patológico de síndrome de Kearns-Sayre, la historia clínica que se presento es un resumen general elaborado y proporcionado por el jefe de Neurología Pediátrica del Hospital de Pediatría Centro Medico Siglo XXI, IMSS, que atiende a la paciente.

REACTIVOS

- Kit de soluciones QIAGEN. DNeasy Blood & Tissue®, El cual contiene proteinasa K, Buffer AL, etanol absoluto, Buffer AW1, Buffer AW2 y Buffer EA.
- Kit de soluciones QIAGEN. QIAquick® PCR Purification. El cual contiene Buffer PBI, Buffer PE, Buffer EB.
- ExoSAP-IT® usb. El cual contiene una nucleasa recombinante *Pandalus borealis*, en Buffer de fosfatos alcalino.

- Solución de lisis: Tris-HCl₂ 50 Mm, EDTA 50 mM pH=8.0 y NaCl 250 mM.
- Proteínasa K (Fungal) a una concentración de 20 Unidades/mg. invitrogen®
- Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, ultra puro invitrogen® (Buffer saturado Fenol 50% v/v, Cloroformo 48% v/v, alcohol isoamílico 2% v/v a un pH=8.05-8.35).
- Etanol puro invitrogen®
- Enzima Takara Shuzo co, casa comercial Takara®
- Solución Master Mix de promega, PCR Master Mix®: Taq polimerasa 50 U/ml, dNTPs 400 mM y MgCl₂ 3 Mm.
- Enzimas de restricción invitrogen a una concentración de 10 U/μl.
 - *Ava I* (*Anabaena variabilis*). Buffer Tris-HCl (pH=7.5), EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoethanol 10 mM, BSA 500 μg/ml, glycerol 50% v/v, Triton® 100X 0.1% m/v.
 - *Apa I* (*Acetobacter pasteurianus*) Buffer Tris-HCl (pH=7.5), EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoethanol 5 mM, BSA 500 μg/ml, glycerol 50% v/v, Triton® 100X 0.1% m/v.
 - *Pvu II* (*Proteus vulgaris*) Buffer Tris-HCl (pH=7.4), KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoethanol 10 mM, BSA 500 μg/ml, glycerol 50%, Tween 20® 0.1% m/v.
 - *Nsi I* (*Neisseria sicca*) Buffer Tris-HCl (pH=7.5), NaCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, BSA 500 μg/ml, glycerol 50% v/v.
 - *Xho I* (*Xanthomonas campestris*) Buffer Tris-HCl (pH=7.4), KCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoethanol 5 mM, BSA 500 μg/ml, glycerol 50% v/v, Triton® 100X 0.1% m/v.
- Agarosa ultrapura invitrogen.
- Buffer invitrogen TAE 10X (Tris acetato 400 Mm, EDTA 10 mM)
- Bromuro de etidio CLP® 0.5 μg/ml.
- Buffer de carga invitrogen azul/naranja 6X (azul de bromofenol 0.03%, xileno 0.03%, naranja G 0.4%, Ficoll® 15%, Tris-HCl 10 Mm (pH=8.0).
- Marcador molecular Promega 1 kb 100 μg/ml (Tris-HCl (pH=7.5), EDTA 1 mM).

- Marcador molecular Promega 23 kb 100 µg/ml (Lambda DNA/*EcoRI* + *Hind III*, Buffer Tris-HCl (pH=7.5), EDTA 1 Mm).
- Bases nitrogenadas dNTP Mix 10 mM. Fermentas®
- Oligos invitrogen Long-L, Long-H, 7336L, 16450H, 15977L y 16455H, a una concentración de 25 mM.

MATERIALES

- Tubos eppendorf 1, 1.5 y 2 ml.
- Puntas para pipeta de distintos tamaños.
- Papel parafilm.
- Piceta.
- Gradilla refrigerada.
- Guantes.

EQUIPOS

- Termociclador Apollo ATC401 CLP.
- Fotodocumentador Cleaver Scientific LTD.
- Fuente de poder Power Pac 1000.
- Cámara de electroforesis Apollo by CE para 10 pozos.
- Termomixer compac eppendorf.
- Microcentrifuga minispin plus eppendorf 1400rpm.
- Vortex mixer S0100 Apollo CLP.
- Centrifuga para pulsaciones Iviger CLP.
- Nonodrop ND1000 A113 Abccesolab.
- Bascula Cole Parmer PR410 Equipar 500 mg.
- Pipetas eppendorf de 2, 10, 100, 200 y 1000 µl.

3.2 Métodos

Para realizar el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales se requiere del DNA mitocondrial extraído del músculo del paciente. Para la amplificación del genoma (en el caso del síndrome de Kearns-Sayre), por medio de PCR larga, para después digerir el producto de dicha PCR por medio de enzimas de restricción con el fin de mapear la deleción que se puso de manifiesto, una vez realizada la digestión se procedió a realizar una segunda PCR con el fin de flanquear la deleción y así poder determinar el fragmento de DNA que falta, esto se realizo por medio de secuenciación y se comparo con la secuencia de Cambridge: Para poder realizar la determinación del haplogrupo se utilizo una PCR para la región hipervariable II en la cual se buscaron los polimorfismos característicos de cada haplogrupo.

3.2.1 DNA extraído de músculo por medio de kit.

En el caso de la biopsia muscular se homogeniza el tejido (previamente congelado con nitrógeno liquido o en un congelador convencional) en un mortero una vez macerado el tejido se pesan 25 mg de tejido y son colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se añaden 180 µl de Buffer ATL (todos los Buffer que se utilizan son suministrados en el kit), 20 µl de proteinasa K, se mezclan y se dejan incubando a 56°C hasta que el tejido se haya lisado completamente (mezclar ocasionalmente con el vortex), una vez lisado el tejido añadir 200 µl de Buffer AL, 200 µl de etanol (96-100%) y mezclar bien, pasar la mezcla a una columna de mini spin (suministrada en el kit) la cual esta contenida en un tubo de 2 ml, posteriormente centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, desechar el tubo con el filtrado y pasar la columna a otro tubo colector nuevo y adicionar 200 µl de Buffer AW1 centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, desechar el tubo con el filtrado y pasar la columna a un tubo colector nuevo y adicionar 500 µl de Buffer AW2 centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm esto es para lavar la membrana de la columna, desechar el filtrado y colocar la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml añadiendo 200 µl de Buffer AE directamente en la membrana y se deja incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, volver a centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto para eluir el DNA.

3.2.2 DNA extraído de músculo por medio de fenol

Para llevar a cabo la extracción del DNA es necesario tener el tejido congelado con nitrógeno líquido, colocar un trozo de dicho tejido en un mortero, homogeneizar y pesar 125 mg y colocarlos en un tubo eppendorf al cual se añaden 125 μ l de solución de lisis agitando en vortex hasta que se visualicen pedazos mas pequeños posteriormente añadir 7 μ l de enzima proteasa (20 mg/ml) dejar el tubo incubando en el termomixer por un lapso de 2 horas a 65°C, para desactivar la enzima se deja 1 hora en el termomixer a una temperatura mayor a 65°C.

Una vez desactivada la enzima añadir 250 μ l de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y mezclar el tubo suavemente en vortex posteriormente centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos, transcurrido el tiempo separar la fase acuosa superior que contiene el DNA y trasladar la fase recuperada a 2 tubos nuevos eppendorf a los cuales se añaden 1.5 ml de etanol frío a cada uno de los tubos mezclando suavemente (puede aparecer turbidez y luego desaparecer) posteriormente centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto, decantar el tubo y desechar el etanol incubar a 37°C colocando los tubos en posición horizontal, el DNA debe visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca ya eliminado el etanol añadir agua libre de nucleasas para resuspender el DNA agitando suavemente hasta su completa disolución.

3.2.3 Cuantificación y pureza del DNA

Iniciar el programa en la computadora para la cuantificación de ácidos nucleicos, levantar el brazo del Nanodrop y colocar 2 μ l de agua libre de nucleasas y RNAsas, bajar el brazo y pulsar enter para iniciar el programa, una vez tomada la lectura levantar el brazo y limpiar con papel absorbente la gota y colocar 2 μ l de solución blanco y pulsar leer blanco, levantar el brazo y limpiar la gota con papel absorbente y colocar 2 μ l de la muestra problema y presionar F1 (en cada lectura debe de observarse la burbuja formada por la tensión superficial entre el brazo del espectro y la base donde se coloca la muestra).

3.2.4 PCR larga

La PCR larga se realiza a un volumen final de 50 μ l con: 6 μ l dNTPs (2.5 μ M cada uno), 5 μ l 10X LA-Taq Buffer Takara (suministrado con la enzima), 2 μ l long-L (25 μ M), 2 μ l long-H (25 μ M), (Los primer fueron tomados de López 2007 y la secuencia esta referida en los anexos) 0.5 μ g de templete de DNA y agua para completar 50 μ l, se prepara un tubo blanco (control negativo) en el cual se coloca agua en lugar de DNA. Los tubos preparados se agitan perfectamente para homogenizar la solución y son colocados en el termociclador previamente programado como se presenta en la tabla 5.

Tabla 5 Programa del termociclador para la PCR larga.

| | | |
|-------------------------------|-------------|------|
| Activación inicial (1er paso) | 2 minutos | 95°C |
| 10 Ciclos | | |
| Desnaturalización | 30 segundos | 92°C |
| Alineamiento y elongación | 10 minutos | 68°C |
| 19 Ciclos | | |
| Desnaturalización | 40 segundos | 92°C |
| Alineamiento | 12 minutos | 68° |
| Extensión final | 10 minutos | 72°C |

3.2.5 Amplificación de la región hipervariable II por PCR con un volumen de reacción de 25 μ l.

La PCR para realizar la amplificación de la región hipervariable se prepara a un volumen de final de 25 μ l con: 12 μ l de PCR master mix, 0.5 μ l de primer 15977L (25 μ M), 0.5 μ l de primer 16450H (25 μ M), (Los primers fueron diseñados y comparados con la secuencia de referencia) 1 μ l de templete de DNA y agua para completar 25 μ l, mantener los tubos en hielo o en una gradilla refrigerada, se prepara un tubo blanco (control negativo) en el cual se coloca agua en lugar de DNA. Los tubos preparados se agitan perfectamente para homogenizar la solución y son colocados en el termociclador previamente programado como se presenta en la tabla 6.

Tabla 6 Programa de PCR para la región hipervariable II.

| | | |
|-------------------|-------------------|------|
| Activación | 2 minutos | 95°C |
| 35 Ciclos | | |
| Desnaturalización | 30 s | 95°C |
| Alineamiento | 30 s | 60°C |
| Extensión final | 1 minuto, 30 seg. | 72°C |

3.2.6 Electroforesis para el DNAm

El producto de PCR se separa por medio de electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0.7%, para comprobar las bandas amplificadas el gel se prepara pesando 350 mg de agarosa los cuales se colocan en un matraz erlenmeyer al cual se le adicionan 50 ml de TAE 1X, y se calientan en un horno de microondas a baja potencia hasta que se disuelva completamente, una vez que la muestra se enfría añadir 1 gota de bromuro de etidio (concentrado) y mezclar, una vez frío se vierte en el soporte del gel el cual fue sellado previamente y el peine colocado en su posición se deja en una superficie plana y libre de corriente de aire hasta que se solidifica.

Para la carga y corrida del gel, se retiran los sellos y el peine, se coloca el gel en la base posteriormente se llana la cámara de electroforesis con TEA 1X hasta que el gel queda totalmente sumergido, en un papel parifilm se colocan 3 µl de Buffer de carga (azul naranja 6X correspondiente al número de muestras), 3 µl de bromuro de etidio diluido (0.01 µg/ml) a un costado de la gota del colorante, añadir 5 µl de producto de PCR, blanco y marcador de peso molecular, mezclar por pipeteo y depositar la mezcla en el pocillo correspondiente (realizar este procedimiento para el producto de PCR, blanco y el marcador de peso molecular) una vez colocadas las muestras cerrar la cámara de electroforesis y conectarla a la fuente de poder a ~50V por un lapso de 4 horas, para visualizar el DNA se toma una fotografía utilizando el sistema de fotodocumentación Cleaver Scientific, que cuenta con el software Gene Tools para el análisis de geles.

3.2.7 Digestión con enzimas de restricción

La digestión se realizó en un tubo de 200 µl colocando 5 µl del amplificado de PCR larga, 2 µl de la enzima (*Ava I*, *Apa I*, *Pvu II*, *Ns I* y *Xho I*), 1 µl de Buffer (suministrado con el kit) y 2 µl de agua estéril, se coloca el tubo en el termomixer, dejar el tiempo y la temperatura que se indican en cada una de las enzimas, al término del tiempo especificado se prepara un gel de agarosa al 0.7% (de igual forma que el gel para visualizar el producto de PCR), se toma fotografía del gel para visualizar el corte de la enzima para posicionar la zona de la deleción, ya que se incorpora un control negativo para poder compararlo.

La fotografía se toma utilizando el sistema de fotodocumentación Cleaver Scientific, que cuenta con el software Gene Tools para el análisis de geles.

3.2.8 Purificación del DNA mt

i) Con el kit QIAquick PCR purification de QIAgen.

Adicionar a un tubo eppendorf 5 volúmenes de Buffer PBI (suministrado en el kit), para un volumen de producto de PCR, una vez que el color de la mezcla es amarillo colocarla en una columna (contenida en el kit) la cual contiene un tubo colector, centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo, añadir 0.75 ml de Buffer PE y colocar la columna en el mismo tubo centrifugar por 1 minuto, posteriormente pasar la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml, añadir 500 µl de agua estéril y centrifugar 1 minuto para eluir el DNA, para comprobar la purificación añadir 1 volumen de loading dye por 5 volúmenes del purificado y correrlo en un gel de agarosa al 0.7%.

ii) Con ExoSAP-IT

Mezclar 5 µl de producto de reacción de PCR con 2 µl de ExoSAP-IT para un volumen de total de 7 µl (el ExoSAP-IT debe de mantenerse siempre en hielo) se incuba a 37°C por 15 minutos con el fin de degradar los remanentes de primers y nucleótidos, una vez transcurridos los 15 minutos elevar la temperatura a 80°C por 15 minutos para inactivar el ExoSAP-IT, pasado este tiempo el producto de PCR esta listo para usarse en la secuenciación.

4. RESULTADOS

El estudio característico molecular para diagnosticar el síndrome de Kearns Sayre se basa principalmente en la presencia de deleciones en el DNAm_t y se demuestra de dos formas; una por medio de la hibridación Southern y la segunda por medio del estudio de amplificación por PCR larga, seguida de la ubicación de la zona de deleción por medio del uso de diferentes enzimas de restricción.

Cuantificación del DNA total de la muestra del probable SKS, por medio de espectrofotometría, en la tabla 7 se muestran los resultados:

Tabla 7 Cuantificación del DNA extraído por el método de fenol y por medio de un kit comercial.

| | | | |
|---------------|------------------|-----------|------|
| Kit comercial | biopsia muscular | 347 ng/μl | 1.80 |
| Fenol | biopsia muscular | 60 ng/μl | 1.82 |

Gel resultado de la amplificación del DNA mitocondrial por medio de PCR larga

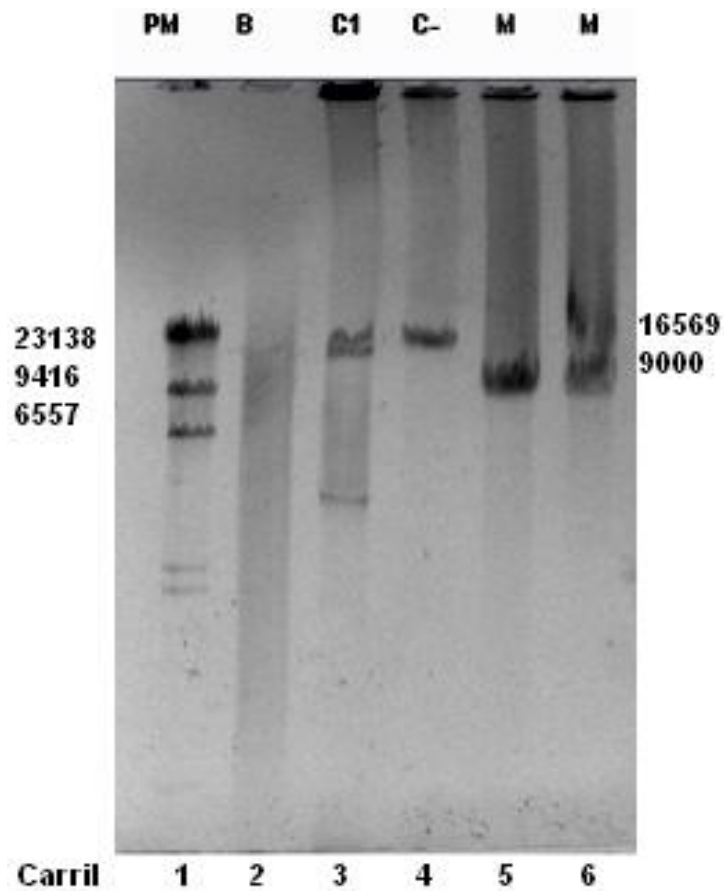


Figura 12 Gel de agarosa al 0.7%, En el carril 1: **PM** marcador de 23 kb, en el carril 2: **B** blanco, en el carril 3: **C1** control positivo (DNAm_t delecionado) y en el carril 4: **C-** control negativo, carril 5 y 6 **M** muestra con probable Síndrome de Kearns Sayre.

En el carril donde se localiza la muestra del probable SKS (Fig. 12) se observa una banda de aproximadamente 9000 pb en comparación con el marcador, con lo que se pone de manifiesto una delección de aproximadamente 7000 pb, por lo que se confirma el diagnóstico del síndrome de Kearns Sayre.

Fragmentos obtenidos tras la digestión del producto de PCR larga, con las enzimas *Ava I*, *Apa I* y *Pvu II*.

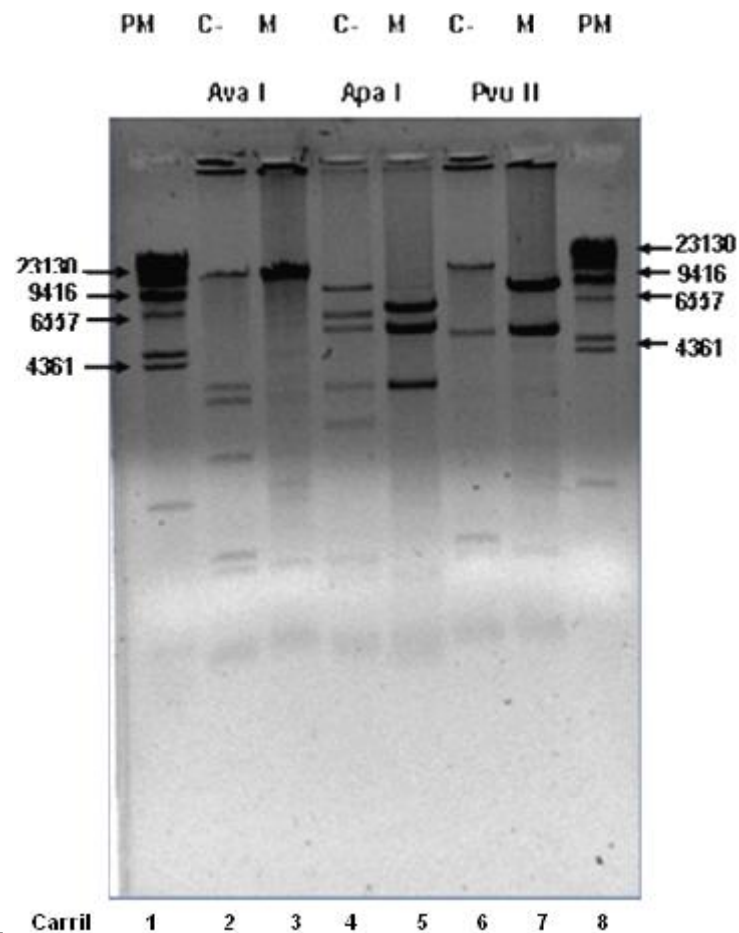


Figura 13 Gel de agarosa al 0.7% donde se observan los Fragmentos obtenidos tras la digestión con las enzimas *Ava I*, *Apa I* y *Pvu II*, del producto de PCR larga. Carril 1 y 8 marcador PM de 23 Kb; Carril 2, 4 y 6 control negativo (DNAm sin delección); Carril 3, 5 y 7 Fragmento obtenido por la PCR larga.

Con la enzima *Ava I* no se obtienen fragmentos, con *Apa I* se pierde un fragmento de 7190 pb y otro de 1010 pb y con *Pvu II* se pierde un fragmento de 13917 pb y se crea uno de 7000 pb. (Fig. 13).

Fragmentos obtenidos tras la digestión del producto de PCR larga, con las enzimas *Ava I*, *Nsi I* y *Xho I*.

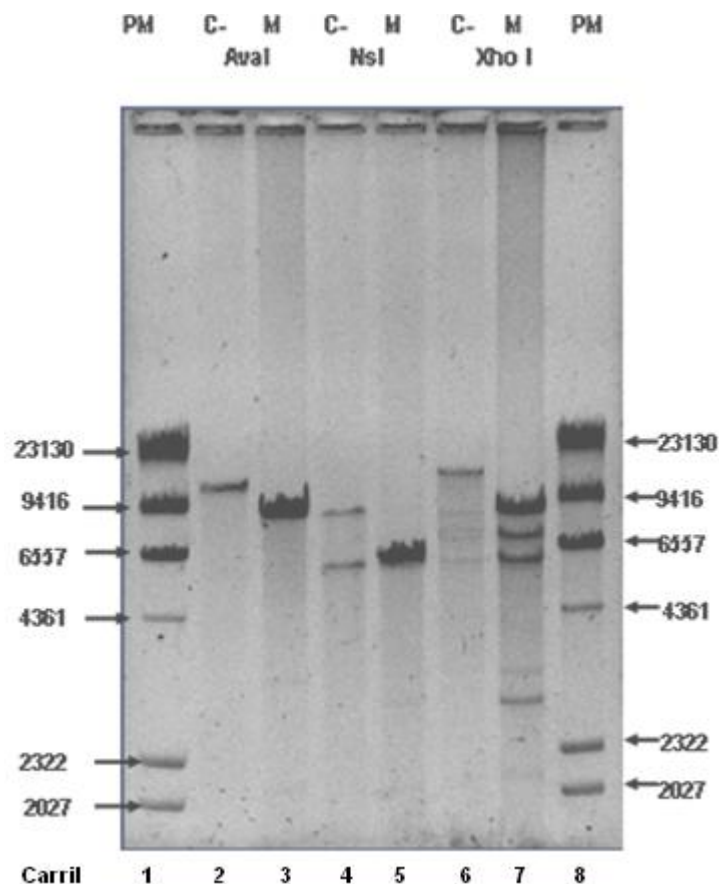


Figura 14 Gel de agarosa al 0.7% donde se observan los fragmentos obtenidos tras la digestión con las enzimas de restricción *Ava I*, *Nsi I* y *Xho I*, del producto de PCR. Carril 1 y 8 marcador de PM de 23 Kb; Carril 2, 4 y 6 control negativo (DNAMt sin deleción); Carril 3, 5 y 7 fragmentos obtenidos por la PCR larga.

Con *Ava I* se pierde un fragmento de 12815 pb y aparece uno de 8500 pb, con *Nsi I* desaparece un fragmento de 9328 pb y se mantiene uno de 6000 pb, y se obtiene uno de 1500 pb, *Xho I* se pierde un fragmento de 14955 pb y se observan dos de 9500 pb y 3500 pb. (Fig. 14).

En la figura 15. Se representa los fragmentos obtenidos con un DNAMt sin deleción. Los números de arriba indican la posición de los cortes en el DNAMt, con la línea de color rojo de la parte inferior se muestra el fragmento que desaparece en el DNAMt de la paciente, con lo que se señala la región que esta delecionada.

Representación grafica de los cortes con las enzimas *Ava I*, *Apa I*, *Pvu II*, *Nsi I* y *Xho I*, a un DNAmT sin deleción.

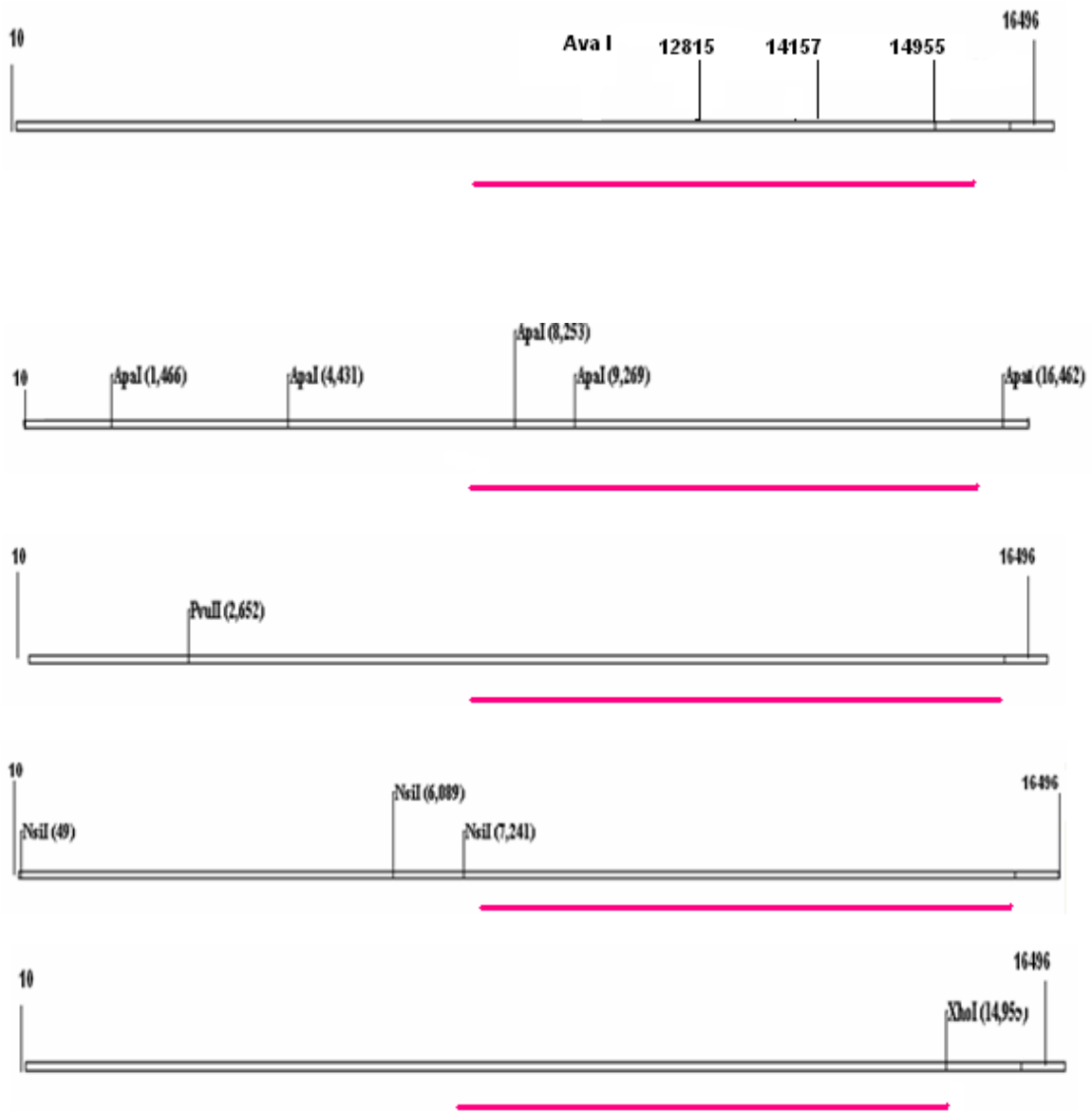


Figura 15 Esquemas que muestran los sitios de restricción y los fragmentos esperados con las enzimas *Ava I*, *Apa I*, *Pvu II*, *Nsi I* y *Xho I*. La línea en rojo muestra el fragmento de DNA delecionado.

Con lo anterior se observa que la zona de la deleción se localiza entre las posiciones 7000 y 16000 del DNAmT, por lo cual se procedió a localizar la posición exacta de la deleción con una amplificación utilizando los primers 7336L y 16450H.

Gel de la amplificación para posicionar la deleción del DNAmT.

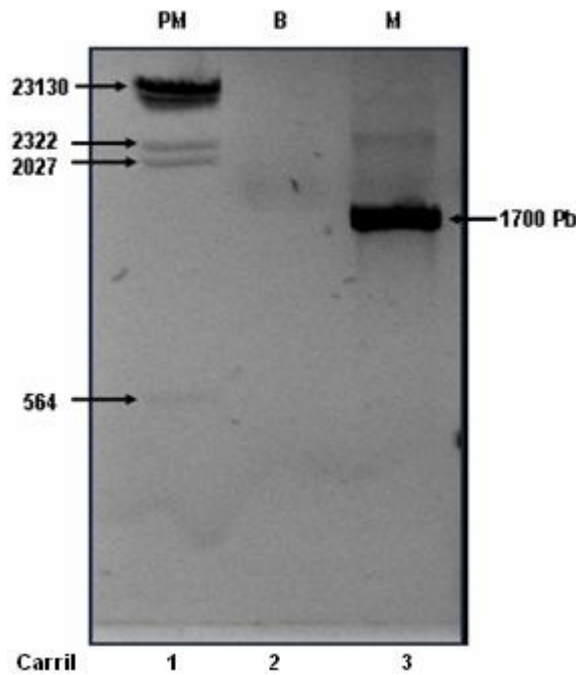
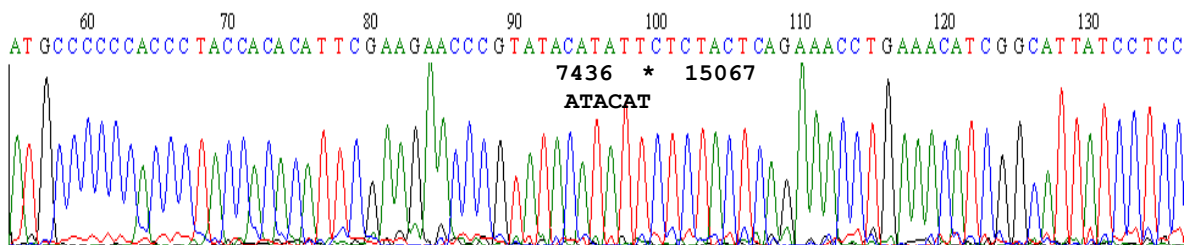


Figura 16 Gel de agarosa al 2%. En el carril 1 **PM** marcador de 23 Kb, en el carril 2 **B** blanco, y en el carril 3 **M** DNAmT delecionado amplificado con los oligos 7336L y 16450H. .

En el carril tres (Fig. 16) se observa una banda de aproximadamente 1700 pb. La cual se purifica y se envía a secuenciar automáticamente de forma bidireccional con los mismos oligos de amplificación para obtener la posición exacta de la deleción.

Al comparar la secuencia obtenida con el DNAmT de referencia se puede observar que la deleción abarca de la posición 7436 hasta 15065, presentando una pérdida de 7630 pb. (En el anexo **A** se localiza la tabla de los genes que no se encuentran a causa de la deleción y en el anexo **C** aparece la secuencia implicada en la pérdida de DNAmT).



CGAAGAACCCGTAT**ACATA** [AAATCTAGACAAAA..... TATATTACGG**ATCAT**] TTCTCTACTCAGAAA

Figura 17 Electroferograma de la secuenciación con ambos oligos, para determinar el sitio exacto de la deleción.

Las secuencias flanqueantes se observan con repeticiones directas de una imperfección de 5/6, ATACAT 7430-7435 y ATCAT 15061-15065.

```

7321 gagaagcctt cgcttcgaag cgaaaagtcc taatagtaga agaaccctcc ataaacctgg
7381 agtgactata tggatgcccc ccaccctacc acacattcga agaacccgta tacata.....
.....
.....
15061 atcatttctc tactcagaaa cctgaaacat cggcattatc ctctgcttg caactatagc
15121 aacagccttc ataggctatg tctcccgtg aggccaaata tcattctgag gggccacagt
    
```

Localización exacta de la deleción donde se muestran las secuencias flanqueantes de color rosa y su posición dentro del genoma mitocondrial a si como la falta de nucleótidos desde la posición 7437 hasta 15065 (MITOMAP).

El mapa siguiente (fig. 18) representa la cadena pesada y ligera del DNAmít linealizado, mostrando los diferentes genes que codifican. En la barra inferior se representa con la línea punteada la región de 7630 pb delecionada del DNAmít. Enmarcada se puede observar las repeticiones directas 5/6 que flanquea la deleción.

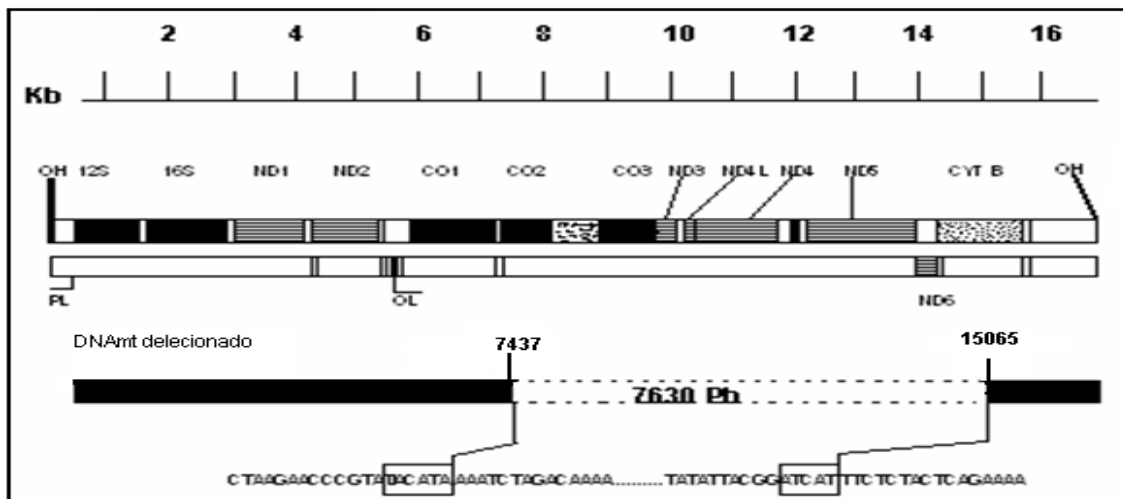


Figura 18 Localización de la deleción en el mapa del DNAmít.

La hibridación Southern para determinar la delección (como un apoyo para complementar el diagnóstico) y el análisis de densitometría fueron realizados en la Universidad de Zaragoza en España y los resultados fueron los siguientes:

Gel de la hibridación Southern para localizar la delección del DNAm_t

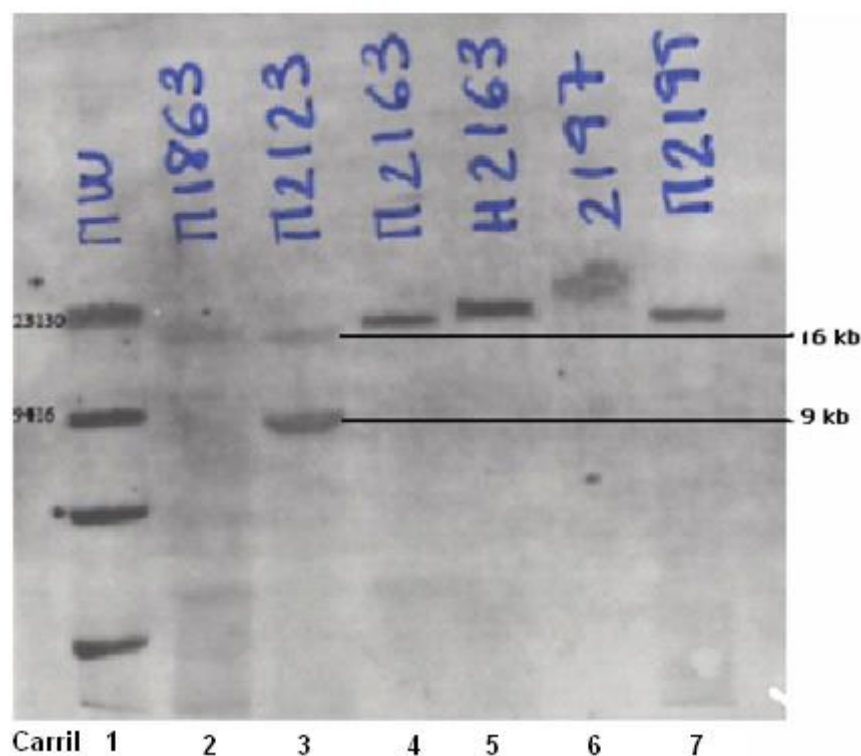


Figura 19 Se observa el resultado final de la hibridación Southern, donde se aprecia en el carril 1 el marcador de **23kb**, en el carril 2 Blanco, en el carril 3 la muestra **2123** (muestra de Kearns Sayre), los demás carriles son muestras que dieron negativo a la delección.

En el carril 3 se localiza la muestra de la paciente con el probable SKS, se observan dos bandas una con poca intensidad correspondientes al DNAm_t normal de 16 kb y de forma muy intensa la banda que corresponde al DNA deleccionado de casi 9 kb, por lo que se pone de manifiesto una delección de aproximadamente 7 kb con lo cual se corrobora el diagnóstico del síndrome de Kearns Sayre. De igual forma se corrieron muestras de otros pacientes los cuales no presentaron delecciones.

Gel de la densitometría para determinar el porcentaje de heteroplasmía

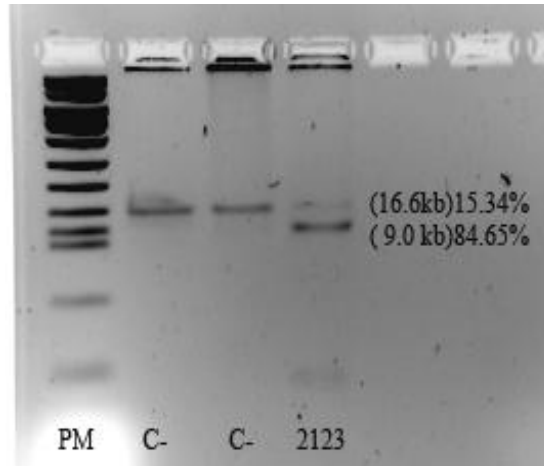


Figura 20 Se observa el análisis por densitometría de las bandas correspondientes al DNA mitocondrial normal de 16500 pb (**15.34%**) y delecionado de aproximadamente 9000 pb (**84.65%**).

Grafica de la densitometría del DNAm_t para determinar el índice de heteroplasmía

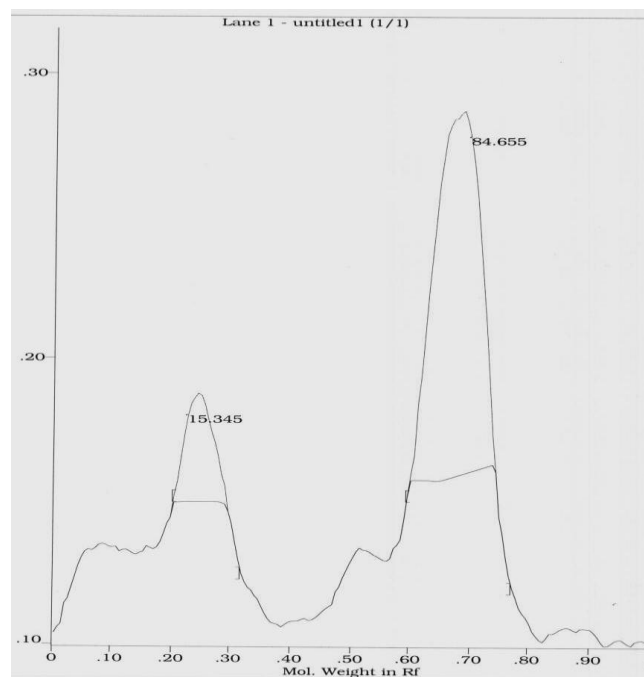


Figura 21 Densitometría donde se puede apreciar el porcentaje de heteroplasmía de la muestra.

Determinación del haplogrupo mitocondrial, para lo cual se realizo un amplificado de la región hipervariable II por medio de PCR.

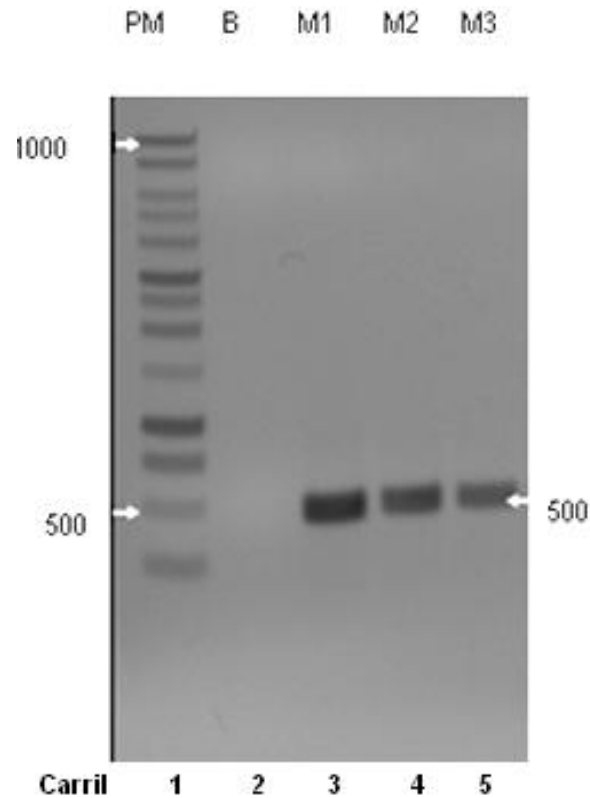


Figura 22 Gel de agarosa al 0.7% (amplificación de la región hipervariable II) en el carril 1 **PM** marcador de 10 KB, en el carril 2 **B** blanco, Carriles 3, 4 y 5 **M1**, **M2** y **M3** muestra problema a distintas diluciones.

En la figura 22 se observa una banda en los carriles 3, 4 y 5 de aproximadamente 500 pb en comparación con el marcador. La cual mando a secuenciar y se analizo con el programa Sequencher para localizar los polimorfismos característicos del haplogrupo mitocondrial. En la figura 23 se muestra la comparación de la secuencia de referencia (secuencia de Cambridge) con la secuencia obtenida

Comparación de las secuencias por medio del programa Sequencher

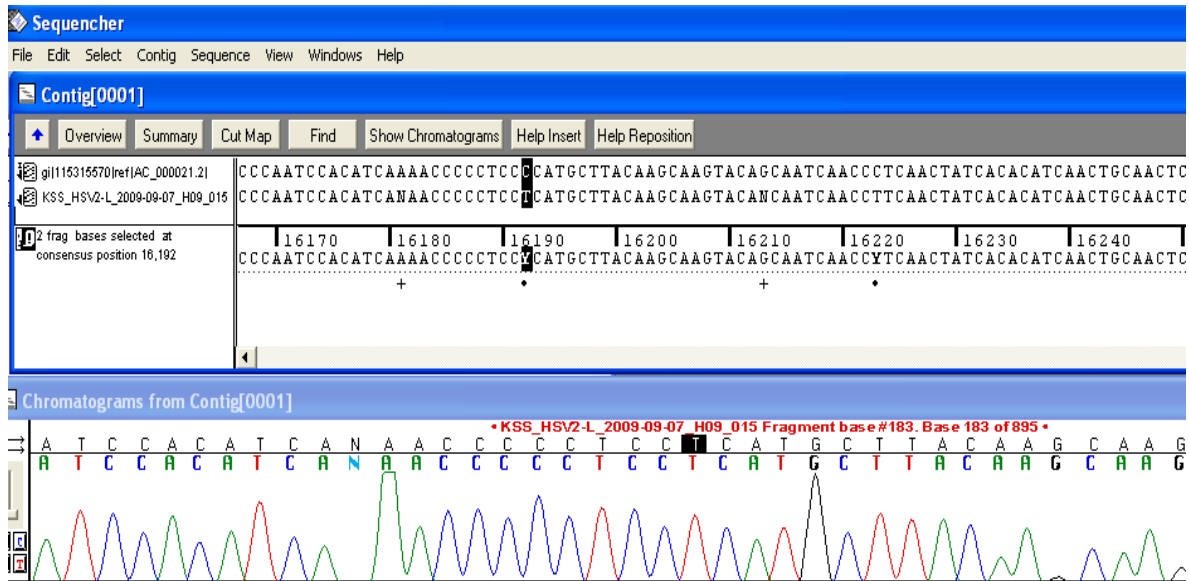


Figura 23 Comparación de la secuencia obtenida de la región hipervariable II.

Al realizar la comparación de la secuencia obtenida con la secuencia de referencia (Cambridge), se puede observar el cambio de una Citosina por una Timina en la posición 16192.

Polimorfismos encontrados al revisar la secuenciación del DNA de la región hipervariable II y el DNA secuenciado para localizar la posición de la delección (ver anexo B) nos permitió conocer que la muestra pertenece al haplogrupo C.

Tabla.8 Donde se muestran los polimorfismos encontrados al realizar la amplificación y secuenciación de la región hipervariable II.

| Polimorfismos encontrados en la región hipervariable II. | Polimorfismos encontrados en la secuencia para localizar la delección. |
|--|--|
| A16181C | G15301A |
| C16192T | A15326G |
| C16223T | A15487T |
| C16286T | |
| T16298C | |
| C16327T | |

5. DISCUSIÓN.

Las enfermedades mitocondriales constituyen un grupo muy amplio de trastornos en los que existe alguna alteración en la cadena respiratoria mitocondrial, estas enfermedades representan un problema tanto en su diagnóstico como en el tratamiento. En México es poco frecuente el estudio de las enfermedades mitocondriales por lo cual es difícil dar un diagnóstico confiable para que el médico pueda tener un mejor manejo de los paciente que sufren estos padecimientos. El síndrome de Kearns Sayre es una enfermedad neuromuscular poco frecuente caracterizada por un inicio antes de los veinte años de edad, los pacientes con este síndrome presentan ptosis bilateral externa como uno de los primeros signos de la enfermedad seguida por oftalmoplejia (Young., 2005). Tanto el SKS como la oftalmoplejia extrínseca y la oftalmoplejia “plus”, comparten signos clínicos que en ocasiones hacen difícil su diagnóstico diferencial, en general los pacientes con SKS presentan un fenotipo más grave, se estima que este síndrome se debe a grandes deleciones del DNA mitocondrial, que van desde 1.800 pb hasta 8000 pb, la mas frecuente de estas deleciones es la llamada deleción común la cual tiene 4997 pb y se encuentra flanqueada por pequeñas secuencias idénticas (Ramírez y col., 2008). En México, se lleva acabo el diagnóstico médico basándose en la sintomatología multisistemica, resultados de laboratorio como el líquido cefalorraquídeo y el electrocardiograma. El principal objetivo de este trabajo fue confirmar a nivel molecular la sospecha del médico ante un cuadro clínico propio del síndrome de Kearns Sayre, en una paciente de origen mexicano

Para poder realizar la PCR larga es conveniente tener DNA procedente de músculo ya que se han reportado casos en los que la deleción del DNAMt no se localiza en sangre en una proporción adecuada para realizar un buen análisis (Carod y col., 2006). Una vez realizada la cuantificación del DNA (tabla 7) con un resultado apropiado, se procedió a realizar la amplificación del DNAMt (16569 pb) de la paciente por medio de PCR larga. Como se puede observar en la figura 12 el gel de la amplicación del DNAMt, se observa una banda muy intensa de aproximadamente 9500 pb, lo que indica que esta presente una deleción de aproximadamente 7000 pb, con lo cual se confirma el diagnóstico del síndrome de

Kearns Sayre. En este gel se puede observar que la amplificación del DNAm_t solo nos da una banda intensa y con esto no se puede determinar el porcentaje de heteroplasmia. Debido al tamaño de la deleción encontrada se procede a realizar digestiones con el fragmento obtenido de la amplificación con enzimas de restricción para localizar la posición exacta de la deleción.

En la figura 13 y 14 se muestran los fragmentos obtenidos con las enzimas *Ava I*, *Apa I*, *Pvu II*, *Nsi I* y *Xho I* para el producto de PCR larga, comparado con un control normal (DNAm_t sin deleción) y con un marcador de pb, se delimito la región delecionada, en la figura 15 podemos observar un ejemplo de los fragmentos esperados a partir de los cortes con las distintas enzimas a un DNAm_t normal, con esto se acoto la región en la posición 7000 -16000, y al amplificarla con lo oligos 7336 y 16450 el resultado, se puede ver en la figura 16 con un amplificado de 1700 pb, al realizar la secuencia de forma bidireccional y al hacer la comparación con la secuencia de Cambridge se localizaron los límites de la deleción en la posición 7437 hasta 15065 de este modo la deleción tiene un tamaño de 7630 pb y se encuentra flanqueada por una repetición de 5/6 pb, esta deleción es única ya que se describe por primera vez, y en un paciente mexicano. A la fecha, no se encuentra reportada en MITOMAP. Se han reportado deleciones de menor tamaño 7436 pb en la posición 8649 a16084 y de mayor tamaño 8430 pb en las posiciones 7509 a 15938 y 9437 pb en la posición 6004 a 15440 (Carod y col., 2006).

La hibridación southern (Realizada en España, al igual que la densitometría con la colaboración de la Universidad de Zaragoza), es de gran utilidad ya que con ésta se confirma la presencia de la deleción, complementando el diagnóstico del síndrome de Kearns Sayre. Como se puede observar en la figura 19, la hibridación nos da una banda muy intensa para el DNAm_t delecionado de aproximadamente 9500 pb y una banda mas tenue de 16500 que corresponde al DNAm_t normal en comparación con el marcador, normalmente el diagnóstico del SKS se realiza primeramente con la hibridación Southern (Carod y col., 2006). En este caso la hibridación llego de España después de que se realizo la PCR larga, con la presencia de una banda tenue y otra mas intensa, lo que nos da una expectativa clara a cerca del índice de heteroplasmia, tanto en el SKS como en

otros trastornos relacionados con el DNAm_t, puede encontrarse una mezcla de DNAm_t mutante y silvestre esta relación es de suma importancia para determinar la severidad del fenotipo en un desorden mitocondrial, en nuestro caso al analizar la densitometría figura 20 se obtiene un valor de 80% de heteroplasmia, para el síndrome de Kearns Sayre no se ha reportado una clara relación entre el tamaño de la delección y la gravedad de las manifestaciones clínicas pero los diferentes grados de heteroplasmia en los tejidos pueden explicar la variabilidad de las manifestaciones clínicas (Carod y col., 2006).

Los haplogrupos mitocondriales son de suma importancia para poder tener un registro poblacional de la incidencia de las desordenes mitocondriales ya que algunos de estos son protectores para distintas enfermedades en un estudio realizado anteriormente se describe al haplogrupo J como protector para la Neuropatía Hereditaria de Leber (Torroni y col. 1993), desde entonces otros haplogrupos se han asociado a diversos fenotipos, como ejemplo se ha descrito que el haplogrupo T aumenta el riesgo a la depresión y otros son protectores para la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Ruiz y col. 2006). En este trabajo se realizo la amplificación del DNAm_t correspondiente a la región hipervariable II, (ya que anteriormente se habían identificado polimorfismos característicos del haplogrupo C en la secuencia realizada para localizar la zona delecionada). En la figura 22 se presenta el amplificado de la región hipervariable II con un tamaño de aproximadamente 500 pb, la cual se mando a secuenciar para su posterior comparación con la secuencia de Cambridge como se muestra en la tabla 8 se localizaron los polimorfismos descritos para el haplogrupo C, la importancia de realizar la determinación del haplogrupo mitocondrial como complemento de este trabajo, es que a la fecha no se han encontrado reportes de la posible relación de un haplogrupo mitocondrial con la presencia de delecciones o mas específicamente con el síndrome de Kearns Sayre.

7. CONCLUSIONES

- Se realizó la extracción del DNA de una muestra proveniente de músculo, dando como resultado una concentración adecuada para poder realizar la PCR
- La amplificación del genoma mitocondrial (16569 pb) se llevó a cabo con la técnica de PCR larga, la cual permitió poner de manifiesto una delección de 7630 pb, confirmando el diagnóstico de síndrome de Kearns Sayre.
- Se llevaron a cabo las distintas digestiones con enzimas de restricción del producto de PCR larga, con lo cual fue posible realizar el mapeo de la delección.
- Fue factible seleccionar los primers para realizar la amplificación, con lo cual se ubicó la posición exacta de la delección; Siendo estos apropiados ya que el fragmento amplificado es de buen tamaño (1700 pb) y al ser secuenciado se obtuvo la posición exacta de la delección.
- Con la técnica Southern blot se realizó la hibridación del DNA mitocondrial confirmando una delección de 7000 Pb dentro del DNA mitocondrial. El análisis de densitometría reveló un alto porcentaje de heteroplasmia el cual es inversamente proporcional a la severidad del síndrome de Kearns Sayre.
- La amplificación del fragmento II de la región hipervariable permitió la identificación de los polimorfismos característicos del haplogrupo mitocondrial C.
- La presente investigación tiene como principal objetivo poner al alcance de la comunidad médica el diagnóstico molecular del síndrome de Kearns Sayre, ya que en este trabajo se plantea la metodología completa para poder realizar el análisis de delecciones dentro del DNAm, pone de manifiesto la importancia del diagnóstico molecular para el estudio de las enfermedades mitocondriales, y la importancia de tener un diagnóstico certero y un mejor manejo de los pacientes, en México no se cuenta con institutos donde se realicen estos estudios, por lo tanto la importancia de este trabajo a un futuro es dar un apoyo al diagnóstico de las enfermedades mitocondriales en México.

7. Anexo A

En el anexo A se muestra la tabla de los genes que se encuentran dentro de la delección del DNAm_t del SKS.

Tabla 9 Genes deletados en el DNA mitocondrial de la muestra problema, mostrando la posición de cada gen a si como su locus y su nombre (MITOMAP).

| Locus | Posición | Abreviación | Descripción |
|---------|-------------|-------------|-----------------------------------|
| MT COI | 5904-7445 | COI | Subunidad I Citocromo C oxidasa |
| MT TS1 | 7446-7516 | S(UCN) | tRNA serina 1 |
| MT NC6 | 7517-7517 | NC6 | Nucleótido no codificante |
| MT TD | 7518-7585 | D | tRNA ac. aspártico |
| MT CO2 | 7586-8269 | COII | Subunidad II Citocromo C oxidasa |
| MT NC7 | 8270-8294 | NC7 | Secuencia no codificante |
| MT TK | 8295-8364 | K | tRNA lisina |
| MT NC8 | 8365-8365 | NC8 | Nucleótido no codificante |
| MT ATP8 | 8366-8572 | ATPasa8 | Subunidad 8 ATP sintasa FO |
| MT ATP6 | 8527-9207 | ATPasa6 | Subunidad 6 ATP sintasa FO |
| MT CO3 | 9207-9990 | COIII | Subunidad III Citocromo C oxidasa |
| MT TG | 9991-10058 | G | tRNA Glicina |
| MT ND3 | 10059-10404 | ND3 | Subunidad III NADH deshidrogenasa |
| MT TR | 10405-10469 | R | tRNA arginina |
| MT ND4L | 10470-10766 | ND4L | Subunidad 4L NADH deshidrogenasa |
| MT ND4 | 10760-12137 | ND4 | Subunidad 4 NADH deshidrogenasa |
| MT TH | 12138-12206 | H | tRNA histidina |
| MT TS2 | 12207-12265 | S(AGY) | tRNA serina2 |
| MT TL2 | 12266-12336 | L(CUN) | tRNA leucina2 |
| MT ND5 | 12337-14148 | ND5 | Subunidad 5 NADH deshidrogenasa |
| MT ND6 | 14149-14673 | ND6 | Subunidad 6 NADH deshidrogenasa |
| MT TE | 14674-14742 | E | tRNA Ac. glutámico |
| MT NC9 | 14743-14746 | NC9 | Secuencia no codificante |
| MT CYB | 14747-15887 | Cytb | Citocromo b |

Anexo B secuencia de los primers para PCR larga y región hipervariable II.

Primer Long-L: 5' TCT ATC ACC CTA TTA ACC ACT CAC GGG AGC T 3' (10-40)

Primer Long-H: 5' CGG ATA CAG TTC ACT TTA GCT ACC CCC AAG TG 3' (16486-16506)

Primer 15977L 5'-CCACCTTAGCACCCAAAGC-3'

Primer 16455H 5'-CGAGGAGAGTAGCACTCTTTG3'

Anexo C

Secuencia del Blast, de la posición 7336 a 16450, donde se localiza la región del DNAm^t deleciónado que va de la posición 7437 hasta 15065.

Score = 1548 bits (805), Expect = 0.0
 Identities = 842/864 (97%), Gaps = 2/864 (0%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 15066 ttcttactcagaacctgaacatcgccattatcctctgcttgaactatagcaacag 15125
 |||
 Sbjct: 1029 ttcttactcagaacctgaacatcgccattatcctctgcttgaactatagcaacag 1088

Query: 15126 cctcataggctatgtctcccgtgaggccaatatcattctgagggccacagtaatta 15185
 |||
 Sbjct: 1089 cctcataggctatgtctcccgtgaggccaatatcattctgagggccacagtaatta 1148

Query: 15186 caaacttactatccgatcccatcattgggacagacctagttcaatgaatctgaggag 15245
 |||
 Sbjct: 1149 caaacttactatccgatcccatcattgggacagacctagttcaatgaatctgaggag 1208

Query: 15246 gtactcagtagacagtcaccctcacagattctttaccttcaacttgcct 15305
 |||
 Sbjct: 1209 gtactcagtagacagtcaccctcacagattctttaccttcaacttgcct 1268

Query: 15306 tcattattgcagccctagcaactccacctctattcttgcagaaacgggatcaaca 15365
 |||
 Sbjct: 1269 tcattattgcagccctagcaactccacctctattcttgcagaaacgggatcaaca 1328

Query: 15366 acccctaggaatcacctcccattccgataaaatcacctccaccttactacacaatca 15425
 |||
 Sbjct: 1329 acccctaggaatcacctcccattccgataaaatcacctccaccttactacacaatca 1388

Query: 15426 aagacgccctcgcttacttctctctctcttaatgacattaacactattctcac 15485
 |||
 Sbjct: 1389 aagacgccctcgcttacttctctctctcttaatgacattaacactattctcac 1448

Query: 15486 cagacctctagcgaccagacaattataacctagccaaccttaaacacctcccc 15545
 |||
 Sbjct: 1449 ctgacctctagcgaccagacaattataacctagccaaccttaaacacctcccc 1508

Query: 15546 acatcaagcccgaatgatatttctattcgctacacaattctccgatccgctcctaaca 15605
 |||
 Sbjct: 1509 acatcaagcccgaatgatatttctattcgctacacaattctccgatccgctcctaaca 1568

Query: 15606 aactaggaggcgctcttgcctattactatccatcctcatcctagcaataatccccatcc 15665
 |||
 Sbjct: 1569 aactannagcgctcttgcctattactatccatcctcatcctagcaataatccccatcc 1628

Query: 15666 tccatatatccaacaacaaagcataatatttgccttaagccaatcaattttattgac 15725

|||
 Sbjct: 1629 tccatataccaacaacaaagcatantatttcgccactaagccaatcactttattgac 1688

Query: 15726 tcctagccgcagacctcctcattctaacctgaatcggaggacaaccagtaagctaccctt 15785
 |||
 Sbjct: 1689 tcctagccgcagancctcctcattctaacctgaatcggaggacaaccagtaagctaccctt 1748

Query: 15786 ttaccatcattggacaagtagcatccgtactatactcacaacaatcctaatac 15845
 |||
 Sbjct: 1749 ttaccatcattggacaagtagcatccgtactatactcacaac-ancctaatac 1807

Query: 15846 caactatcctcaattgaaaacaaaatactcaaatggcctgtcctttagtataaact 15905
 |||
 Sbjct: 1808 caactatcctcaattgaaaacaaaatactnaat-gnctgtcnttnagnnnnact 1866

Query: 15906 aatacaccagtcttgaaccgga 15929
 |||
 Sbjct: 1867 aatacncagcttgnaaanngga 1890

Score = 1517 bits (789), Expect = 0.0
 Identities = 808/818 (98%), Gaps = 1/818 (0%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 15066 ttcttactcagaacctgaacatcggcattatcctctgcttgaactatagcaacag 15125
 |||
 Sbjct: 70 ttcttactcagaacctgaacatcggcattatcctctgcttgaactatagcaacag 129

Query: 15126 ccttcatagctatgtctcccgtgaggccaatatcattctgagggccacagtaatta 15185
 |||
 Sbjct: 130 ccttcatagctatgtctcccgtgaggccaatatcattctgagggccacagtaatta 189

Query: 15186 caaacttactatccgccatccatacattgggacagacctagtcaatgaatctgaggag 15245
 |||
 Sbjct: 190 caaacttactatccgccatccatacattgggacagacctagtcaatgaatctgaggag 249

Query: 15246 gctactcagtagacagtccaccctcacagattctttaccttcacttcatcttaccct 15305
 |||
 Sbjct: 250 gctactcagtagacagtccaccctcacagattctttaccttcacttcatcttaccct 309

Query: 15306 tcattattgcagccctagcaaacctccacctctattcttcacgaaacgggatcaaca 15365
 |||
 Sbjct: 310 tcattattgcagccctagcagcactccacctctattcttcacgaaacgggatcaaca 369

Query: 15366 accccctaggaatcacctcccattccgataaaatcacctccacccttactacacaatca 15425
 |||
 Sbjct: 370 accccctaggaatcacctcccattccgataaaatcacctccacccttactacacaatca 429

Query: 15426 aagacgcctcggcttactctctctctctctctctaatgacattaacactattctcac 15485
 |||
 Sbjct: 430 aagacgcctcggcttactctctctctctctctctaatgacattaacactattctcac 489

Query: 15486 cagacctcctaggcgaccagacaattataccctagccaacccttaaacaccctcccc 15545

| |||

Sbjct: 490 ctgacctcctaggcgaccagacaattataccctagccaacccttaaacaccctcccc 549

Query: 15546 acatcaagcccgaatgatatttctattcgcctacacaattctccgatccgctcctaaca 15605

|||||

Sbjct: 550 acatcaagcccgaatgatatttctattcgcctacacaattctccgatccgctcctaaca 609

Query: 15606 aactaggaggcgtccttgcctattactatccatcctcatcctagcaataatccccatcc 15665

|||||

Sbjct: 610 aactannaggcgtccttgcctattactatccatcctcatcctagcaataatccccatcc 669

Query: 15666 tccatataccaacaacaaagcataatatttcgccactaagccaatcactttattgac 15725

|||||

Sbjct: 670 tccatataccaacaacaaagcatantatttcgccactaagccaatcactttattgac 729

Query: 15726 tcttagccgcagacctcctcattctaactgaatcggaggacaaccagtaagctaccctt 15785

|||||

Sbjct: 730 tcttagccgcaganctcctcattctaactgaatcggaggacaaccagtaagctaccctt 789

Query: 15786 ttaccatcattggacaagtagcatccgtactatacttcacaacaatcctaatac 15845

|||||

Sbjct: 790 ttaccatcattggacaagtagcatccgtactatacttcacaac-ancctaatacctaatac 848

Query: 15846 caactatcctcctaattgaaaacaaaataactcaaatgg 15883

|||||

Sbjct: 849 caactatcctcctaattgaaaacaaaataactcnaatgg 886

Score = 129 bits (67), Expect = 4e-26

Identities = 68/69 (98%)

Strand = Plus / Plus

Query: 7368 tcataaacctggagtgactatatggatgccccccaccctaccacacattcgaagaacc 7427

|||||

Sbjct: 1 tcntaaacctggagtgactatatggatgccccccaccctaccacacattcgaagaacc 60

Query: 7428 gtatacata 7436

|||||

Sbjct: 61 gtatacata 69

Score = 129 bits (67), Expect = 4e-26

Identities = 68/69 (98%)

Strand = Plus / Plus

Query: 7368 tcataaacctggagtgactatatggatgccccccaccctaccacacattcgaagaacc 7427

|||||

Sbjct: 960 tcntaaacctggagtgactatatggatgccccccaccctaccacacattcgaagaacc 1019

Query: 7428 gtatacata 7436

|||||

Sbjct: 1020 gtatacata 1028

BIBLIOGRAFIA.

1. Achilli A, Parego U, Bravi C, Coble M, Kong Q, Woodward S, Torroni A, Bandelt H. the Phylogeny of the four Pan-American DNAMt haplogroups: Implication for evolution and disease. 2008; Vol. 3: (3), 1764-1772.
2. Andresen M, Regueira T, Leighton F. Oxidative stress in critically ill patients. Rev. Med. Chile 2006; 134: 649-656.
3. Andreu A L. y Gonzalo Sanz R. Las enfermedades mitocondriales una clasificación para el siglo XXI. Rev. Neurología 2004; 19 (1): Pág. 15-22.
4. Arànega A. y colaboradores. Aplicación de las técnicas de biología molecular en genética clínica. Universidad de Granada España. 2002. Pág.34-41.
5. Arvelo F. Mitocondrias y apoptosis. Acta científica Venezolana, 2002: 53; 297-305.
6. Barrera Ramírez CF, Barragán Campos H, Sánchez Guerrero J, García Ramos G, Vega Boada F, Estañol B. El otro genoma: el concepto clínico de las citopatías mitocondriales enfermedades de la fosforilación oxidativa. Rev. Invest. Clin. 1999; 51: Pág. 121-134.
7. Barrera Ramírez CF, Barragán Campos H, Hermes Llaraza PI, Ávila Casado MC, Oseguera J. Afección cardíaca en el síndrome de Kearns-Sayre. Rev. Esp Cardiol. 2005; 58; Pág. 443-446.
8. Barrientos A, Casademont J, Nunes V. Reordenamiento del ADN mitocondrial en el síndrome de Kearns-Sayre: ¿es necesario diferenciar las deleciones de las duplicaciones o multimerizaciones? Rev.1996. Vol. 11. Numero 7. Pág. 257-260.
9. Castro Cago M, Novo Rodríguez M, Pintos Martínez E, Campos Y, Arenas J, Eiris Puñal J. Encefalopatías mitocondriales. Rev. Neurol 2000; 31(3): 263-282.
10. Carod Artal JF, López Gallardo E, Solano A, Herrero MD, Montoya J. Deleciones del ADN mitocondrial asociadas al síndrome se Kearns-Sayre. Neurología 2006; 21 (7); Pág. 357-366.
11. Carvajal Cuenca A, Fernández Morales H, Heyden Cordero M. Reporte de la primera familia costarricense con neuropatía óptica hereditaria de Leber y una revisión del tema. Rev. Neuroeje 2006; Vol. 20: 1, Pág. 110-117.

12. Cordero P, Solomon A, Martínez J. Eficiencia y metabolismo mitocondrial: ¿Un eje etiológico de la obesidad? Rev. Med. Univ. Navarra 2007; 51: 3. Pág. 13-18.
13. Dahmany Y, Marcuello A, Montiel F, Montoya J, Diez C, López M, Ruiz P. Mitochondrial lineages in the Spanish population: anticipating association studies. R. Acad. Nac. Farm. 2006. 72: 37-47.
14. Delgado Sánchez R. Diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales: Localización de la mutación A3243G asociada al fenotipo MELAS por medio de la secuenciación completa del DNA mitocondrial. 2004. FES UNAM México.
15. Domínguez López J. E, Huesca Hernández F. Enfermedades de herencia mitocondrial que cursan con sordera (Parte 1) AN. ORL Méx. 2007; Vol.52, num. 2, Pág. 72-77.
16. Domínguez López J. E, Huesca Hernández F. Enfermedades de herencia mitocondrial que cursan con sordera (segunda parte). AN. ORL Méx. 2007; Vol.52, num. 3, Pág. 102-110.
17. Enríquez JF, Martínez Azorin F, Garesse. M, López Pérez I, Pérez Martos A, Montoya J. Sistema genético mitocondrial humano Rev. neurol, 1998; 26. Pág. 21-26.
18. Estrada Cuzcano A, Sandoval J, Guevara Fujita, Ricardo Fujita . Uso de la técnica SSCP para determinar mutaciones puntuales del DNA mitocondrial humano. Rev. Perú biol. 2005; 12(3): 349-358.
19. Francesco E, Pizzini C, Tessa A, Di Giandomenico S, Oneti A, Fillippo M, Bertini E, Rizzoni G. Bartter-like phenotype in Kearns-Sayre syndrome. Pediatr, Nephrol (2006); 21: 355-360.
20. González Olhovich I, Lozano Elizondo D. Alteraciones neuerooftalmológicas en pacientes que presentan enfermedades mitocondriales. Arch. Neurocién. 2005. Vol. 10; (2); Abril-Junio. Pág. 120-129.
21. Hernández Zamora E, Arenas Sordo M, Maldonado Rodríguez R. Diseño de microsondas mediante hibridación virtual para el estudio de variantes en los sitios REP-CMT1A. Acta pediátrica 2002; 64(9) 436-442.
22. Henríquez H, Moraga, Llop E, Rothhammer F. Molecular and genetic characterization of Changos descendants living in Paposos Cove. Rev. Med. Chile. 2004; 132: 663-672.

23. Kotsias B. Las mitocondrias y el verde Jano. Rev. Medicina. 2005; Vol. 65, (i).Pág. 75-79.
24. López E. Defectos en el DNAm asociados a enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa. 2007. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza España.
25. Leonart M, Sánchez R, Martín Duque P. Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnóstico anatomopatológico. Revista Española de patología 1997. Vol. 30 (3):249-253.
26. López de Munain A. Clasificación de las enfermedades mitocondriales. Rev. de neurología, 1998 Vol. 26(sup. 1); Pág. 9-14.
27. Martínez Cruzado J. El uso del DNA mitocondrial para descubrir las migraciones precolombinas al caribe: Resultados para Puerto Rico y expectativas para la República Dominicana. Revista electrónica [http://www.kacike.org/Martinez Español](http://www.kacike.org/Martinez_Espanol). 23-03-2009.Pág. 1-12.
28. Medina V. y col. Bases para el diagnóstico de las citopatías mitocondriales, antecedentes históricos, bases genéticas y bioquímicas. Acta pediátrica México 2004; 25 (4):244-56.
29. Murcuello López A, Montiel Sosa F, Enríquez JA, López Pérez MJ, Díez Sánchez C. Variabilidad del DNA mitocondrial (clados y dosis geonómica) y calidad seminal. MAPFRE MEDICINA, 2003; vol. 14; Pág.279-284.
30. Montoya J, López Pérez MJ, Díaz Sánchez C, Solano A, López Gallardo E, Maman Y, Dolores Herrero M, Ruiz Pesini E. Biogénesis y Patología Mitocondrial. Rev. Real academia de ciencias Zaragoza 2005, 60: Pág. 7-28.
31. Ortiz Gómez J, Souto Ferro M. Anestesia en un paciente con déficit del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Rev. Española Anesthesiol. 2006; 53: 575-579.
32. Panizo Santos A. Patología molecular mitocondrial. Revista Española de patología.1999; Vol. 32, numero 4. Pág. 585-592.
33. Pérez Carrillo A. J. Mutaciones en el DNA mitocondrial: Una respuesta al dilema de los trastornos neuromusculares y multisistémicos de difícil diagnóstico. Medicas UIS 2003; 17: 6-12.
34. Pierce A. Benjamín. Genética un enfoque conceptual. Segunda edición. Editorial. Panamericana Madrid España. 2006; Pág. 592-597.

35. Pistilli D, Cira R, Di Giola T, Scialotano S, Quaglione R, Quitadazo R, Casali C, Gallo P, Santorelli F. Detection of deleted mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome using laser capture micro dissection. *Rev. Human pathology*. 2003; Vol. 34: 10. Pág. 1058-1061.
36. Ramírez Miranda A, Navas Pérez A, Gurria Quintana A, Vargas Ortega J, Murillo Correa C, Zenteno JC. Detección de deleciones en DNA mitocondrial heteroplásmico por medio de PCR en el síndrome de Kearns-Sayre. *arch. Soc. Esp. Oftalmol* 2008; 83; Pág. 155-160.
37. Ricoy Campo R. J. Cabello A. Mitocondriopatías. *Revista de Neurología*. 2003; 37 (8): 775-779.
38. Ridaura Sanz C. La biopsia en el diagnóstico de la enfermedad pediátrica. *Acta pediátrica. Méx.* 2008; 29 (6): 347-54.
39. Rocco P, Morales C, Moraga V, Miguel Nery F, Carvallo P, Rothhammer F. Composición genética de la población Chilena. Distribución de polimorfismos de DNA mitocondrial en grupos originarios y en la población mixta de Santiago. *Rev. Med. Chile* 2002; Vol. 130. P 125-131.
40. Rodríguez Sánchez I. P, Barrera Saldaña H. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia IANL*. Vol. VII (3). Pág. 323-335.
41. Rodríguez Rodríguez O, Medina Castillo D. Reacción en cadena de la polimerasa en lepra. *Rev. Cent. Dermatol Pascua* 2001; 3 Pág. 127-130.
42. Ruiz Pesini E, López Gallardo E, Dahmani Y, Herrero M.D, Solano A, Díez Sánchez C, López Pérez M, Montoya J. Enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial humano. *Revista de Neurología* 2006; 43 (7): 416-424.
43. Ruiz Pesini E, Lott M., Procaccio V, Jason C, Brandon, Mishmari D., Yi c., Baldi P, Wallace C. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Publicación on line* 18 de Diciembre 2006; *Database* Vol. 35: issue D823-D828.
44. Ruiz Sandoval J, García Gonzáles U, Ochoa Plascencia MR, Corona Figueroa MV, León Jiménez E, Barrinagarremertería F. Citopatías mitocondriales. *Rev. Mexicana Neurociencia* 2002; 3(4): 191-204.
45. Rubio Gonzáles T, Verdecia Jarque M. Las enfermedades mitocondriales: Un reto para las ciencias médicas. *MEDISSAN* 2004; 8(1): 43-50.

46. Santolaria López MA, Aràiz Burdio JJ, Villanueva Anadon B, Gutiérrez Cia I, Millastre Benito A. Síndrome de Kearns-Sayre incompleto. *Med. intensiva* 2002;26 (3); Pág. 132-135.
47. Segura C, Blair S. La mitocondria en genero *plasmodium*. *Rev. Biomédica* 2003; 23: 351-363.
48. Solano A, Playà A, López Pérez MJ, Montoya J. Enfermedades genéticas del DNA mitocondrial humano. *Rev. Salud pública México*.2001. Vol. 43, No.2: Pág. 151-161.
49. Taylor RW and Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutation in human disease. *Nature Review Genetics*. 2005; 6:389-402.
50. Torres Tejada A, Eugenia Baca B. Reacción en cadena de la polimerasa. *Rev. Elementos* 1995; vol. 3. Pág. 16-21.
51. Tornero Daniel, Jordán Joaquín. La mitocondria, una diana farmacológica en plena expansión. *Actualidad en farmacología y terapéutica*. Marzo del 2004, Vol. 2. Pág. 44-49.
52. Tornero D, V Ceña, Gonzáles C, Jordán J. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Rev. Neurología* 2002; 35 (4):354-361.
53. Torroni A, Schurr G, Cabell M, Brown M, Neel J, Smith G, Vullo C, Wallace C. Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. *Hum Genet*. 1993: 53; 563-590.
54. Young TJ, Amit K, David I. Kearns Sayre Syndrome: A case Report and Review of Cardiovascular Complications. *Rev. PACE* 2005; 25: 454-457.

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio 8, de la unidad de investigación multidisciplinaria, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la tutela del Doctor José Francisco Montiel Sosa. Con el apoyo y colaboración del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y celular de la Universidad de Zaragoza España.