



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“Diagnóstico molecular de enfermedades  
mitocondriales en población mexicana”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**AISLINN GEORGINA VILLAMIL RODRÍGUEZ**

**ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

D. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales en población mexicana**

Que presenta la pasante: Aislinn Georgina Villamil Rodríguez  
Con número de cuenta: 306329973 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

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 ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. J. Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **AGRADECIMIENTOS...**

A mis papás, Raúl y Rosalba que han sido mi mayor apoyo y guía. Que me dieron la confianza para creer que todo es posible y me impulsaron a superarme y lograr todas mis metas, siendo mi red de seguridad siempre. A mi hermano Raúl que sin su ayuda no hubiera llegado a clases muchas veces y me ha apoyado y ha hecho reír desde que éramos pequeños. A Sara, que es como mi hermana, por todos sus consejos y ayuda. Gracias por su paciencia.

A mi asesor, el Dr. Francisco Montiel quien me brindó la oportunidad de realizar este proyecto y cuyo apoyo y guía han sido invaluable. Gracias por confiar en mí y por ser un ejemplo de académico en la Facultad.

A mi jurado, quienes me dieron su opinión y guía e hicieron posible esta tesis.

A todos mis profesores, en especial a la Maestra Maritere, a la profesora Rosalba y a la Dra. Sandra quienes me enseñaron todo lo que sé de genética, me aconsejaron tanto académica como personalmente y son un ejemplo a seguir como mujeres exitosas en la ciencia.

A todos mis amigos y compañeros de clases, que han hecho que mi vida esté llena de risas y momentos divertidos y siempre han sido la mejor distracción al estrés de la carrera, llevan años haciéndome reír como loca. Gracias por su amistad.

# ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO .....	1
1.1 La mitocondria .....	1
1.1.1 Origen y estructura.....	1
1.1.2 Sistema OXPHOS.....	2
1.2 DNA mitocondrial .....	4
1.2.1 Estructura .....	5
1.2.2 Replicación .....	6
1.2.3 Transcripción .....	6
1.2.4 Traducción .....	8
1.3 Genética Mitocondrial.....	10
1.3.1 Herencia .....	10
1.3.2 Efecto umbral.....	10
1.3.3 Segregación mitótica.....	11
1.3.4 Efecto cuello de botella .....	11
1.3.5 DNA mitocondrial en la evolución humana.....	13
1.4 Mutaciones del mtDNA.....	15
1.4.1 Mutaciones puntuales .....	15
1.4.2 Deleciones y Duplicaciones.....	15
1.5 Enfermedades Mitocondriales .....	16
1.5.1 Clasificación.....	17
1.5.1.1 Enfermedades mitocondriales causadas por defectos en el mtDNA .....	17
1.5.1.2 Enfermedades mitocondriales causadas por defectos en el DNA nuclear.....	18
1.6 Enfermedades mitocondriales diagnosticadas en la UIM .....	20
1.6.1 MELAS .....	20
1.6.2 Síndrome de Kearns-Sayre .....	21
1.6.3 Síndrome de Leigh (MILS).....	22
1.7 Diagnóstico y Tratamiento .....	23
1.7.1 Pruebas clínicas.....	23
1.7.2 Evaluación genética .....	26
1.7.3 Tratamiento.....	30
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS .....	31
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA .....	32
3.1 Guía para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales .....	32
3.2 Casos clínicos.....	32
CAPÍTULO 4: RESULTADOS .....	33
4.1 Protocolo general de diagnóstico.....	34
4.2 Diagnóstico de MELAS .....	35
4.3 Diagnóstico de Síndrome de Leigh.....	36
4.4 Diagnóstico de Kearns-Sayre .....	37
4.5 Determinación de haplogrupo.....	38
4.6 Casos clínicos diagnosticados en la UIM.....	40
4.6.1 Casos de Kearns-Sayre.....	41
4.6.2 Casos de MELAS .....	42
4.6.3 Casos de Síndrome de Leigh .....	45
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	51
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES .....	55

CAPÍTULO 7: PERSPECTIVAS .....	56
CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA.....	57
APENDICE I .....	64
APENDICE II .....	65
GLOSARIO.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.1.</b> Funciones de la mitocondria.....	3
<b>Figura 1.2.</b> Cadena respiratoria.....	4
<b>Figura 1.4.</b> Código genético mitocondrial.....	5
<b>Figura 1.5.</b> Efecto Umbral.....	8
<b>Figura 1.6</b> Efecto cuello de botella.....	12
<b>Figura 1.7.</b> Haplogrupos mitocondriales en migraciones humanas.....	14
<b>Figura 1.8.</b> Sitios del genoma mitocondrial susceptibles a mutaciones y su relación con patologías.....	16
<b>Figura 4.1.</b> Esquema del procedimiento general para el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial.....	34
<b>Figura 4.2.</b> Secuenciación para determinar haplogrupos.....	43
<b>Figura 4.3.</b> Digestión con enzimas de restricción para determinar haplogrupo.....	44
<b>Figura 4.4.</b> Electroforesis para determinar haplogrupo.....	44
<b>Figura 4.5.</b> Representación gráfica de los pacientes diagnosticados en la UIM.....	45
<b>Figura 4.6.</b> Southern blot de paciente con Kearns-Sayre.....	46
<b>Figura 4.8.</b> Electroforesis de paciente con MELAS.....	47
<b>Figura 4.9.</b> Electroforesis de paciente con Síndrome de Leigh.....	50
<b>Tabla 1.1.</b> Resumen de las principales enfermedades mitocondriales.....	19
<b>Tabla 4.2.</b> Determinación del haplogrupo.....	43

## RESUMEN

Las enfermedades mitocondriales son severas patologías catalogadas como poco comunes, causadas por defectos en la cadena respiratoria. Estos defectos son consecuencia de mutaciones que suceden tanto en el DNA mitocondrial como en el nuclear. Debido a que son enfermedades sistémicas su cuadro clínico es complejo y el diagnóstico basado exclusivamente en signos y síntomas es complicado. Es por esto que la biología molecular juega un papel fundamental en su diagnóstico; así como la bioinformática, que ha contribuido al desarrollo de las técnicas moleculares utilizadas para diagnosticar estas y otras enfermedades genéticas.

El laboratorio 8 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en colaboración con la Universidad de Zaragoza en España, ha diagnosticado 12 casos de pacientes mexicanos con las enfermedades mitocondriales MELAS, Síndrome de Leigh y Kearns-Sayre.

El presente trabajo muestra las estrategias de biología molecular y bioinformática empleadas para identificar las mutaciones causantes de estos tres desordenes mitocondriales y presenta los casos clínicos correspondientes a cada mutación.

## **CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO**

### **1.1 La mitocondria**

La mitocondria es un organelo con forma ovalada cuya función, entre otras importantes, es producir energía para la célula a través del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Es el centro metabólico donde se realiza el Ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación; cuyos productos entran al sistema OXPHOS para generar un gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP.

La mitocondria también participa en el metabolismo de aminoácidos, cetonas, urea, pirimidinas, entre otros, además de controlar la concentración intracelular de calcio y la muerte celular por apoptosis, esto aunado a ser el centro de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Horton, 2008).

Todas las células necesitan energía para funcionar adecuadamente, pero ciertos tejidos necesitan más energía que otros. Este es el caso del sistema nervioso central, corazón, músculo, riñón y sistema endocrino que tienen una gran cantidad de mitocondrias en sus células para poder responder a la demanda energética. Cuando por alguna razón la producción de energía disminuye, estos son los primeros órganos en verse afectados, y la disminución progresiva de energía causa la generación de diversos síntomas clínicos (Wallace, 2011).

#### **1.1.1 Origen y estructura**

De acuerdo a la teoría de endosimbiosis propuesta por Lynn Margulis en 1970, la mitocondria deriva de una alfa-proteobacteria la cual fue endocitada por una célula eucariota primitiva. A partir de esta unión se desarrolló una relación de simbiosis entre la bacteria y la célula eucariota en la que ambas se beneficiaban del metabolismo de la otra. Posteriormente, el análisis de la secuencia del DNA mitocondrial probó que existía una similitud entre el DNA mitocondrial y los ribosomas mitocondriales, con los de estas bacterias primitivas (Moreira *et al.*, 1998).



La mitocondria tiene cuatro componentes estructurales principales: membrana externa, membrana interna, espacio intermembranal y matriz mitocondrial.

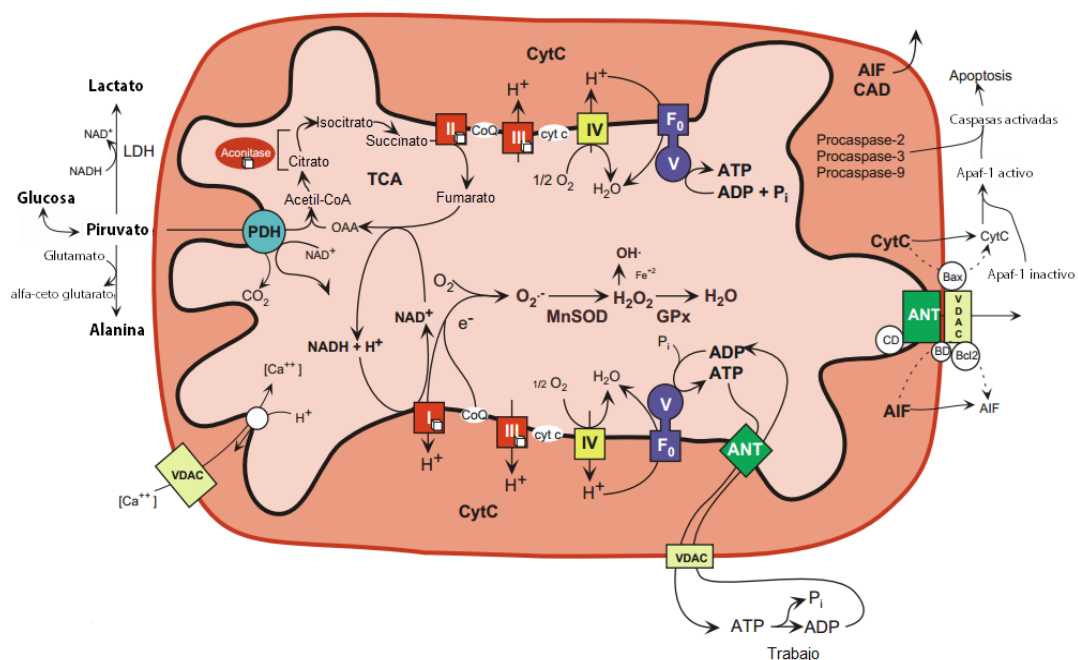
La membrana externa, es similar a la membrana celular y es más permeable que la membrana interna mitocondrial ya que tiene porinas que permiten el paso de diferentes iones y metabolitos. Mientras que la membrana interna solo permite el paso de  $H_2O$ ,  $O_2$  y  $CO_2$ . La entrada de otras moléculas de mayor tamaño o de protones está dado por el transporte activo, por lo que se requiere de energía para que pasen a la matriz mitocondrial (Horton, 2008).

En la matriz mitocondrial se encuentran todas las enzimas del ciclo de Krebs y de la  $\beta$ -oxidación. Así como el genoma mitocondrial y las enzimas necesarias para su replicación y expresión (Koolman & Röhm, 2012).

### 1.1.2 Sistema OXPHOS

Las células de nuestro cuerpo toman los nutrimentos que ingerimos y los transforman en moléculas que sirven para generar energía en forma de ATP. La mitocondria lleva a cabo esta transformación mediante una serie de reacciones enzimáticas que suceden en su matriz (Figura 1.1).

NADH, Acetil coenzima A (Acetil-CoA) y  $FADH_2$  son generados dentro de la mitocondria a partir de la  $\beta$ -oxidación y el piruvato proveniente de la glucólisis. Acetil-CoA es la molécula que inicia el ciclo de Krebs, cuyo propósito es remover los hidrógenos de los hidrocarburos y transferirlos al  $NAD^+$  para generar  $NADH^+$ . Los hidrógenos de  $NADH^+$  reaccionan con el oxígeno en la cadena de transporte de electrones y la energía liberada de esta interacción genera un gradiente de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, este potencial eléctrico activa la conversión de energía electroquímica a energía química (ATP) (Wallace, 2011).



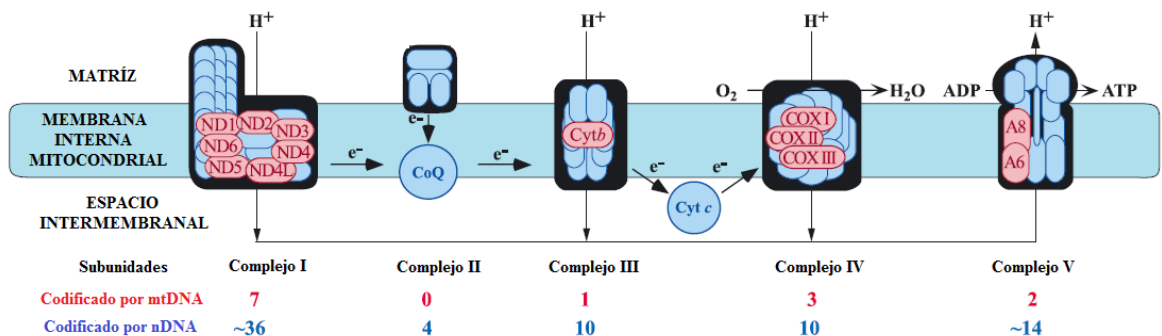
**Figura 1.1.** Funciones de la mitocondria (Modificado de MITOMAP.org, 2013)

La cadena de transporte de electrones está compuesta por tres grandes complejos proteicos integrados en la membrana interna mitocondrial (complejos I, III y IV), y dos moléculas de transferencia móviles: ubiquinona (Coenzima Q) y citocromo C. Pese a que pertenece en realidad al ciclo de Krebs, la succinato deshidrogenasa es considerada el complejo II. La ATP-sintasa suele ser denominada también complejo V a pesar de que no participa en el transporte de electrones (Koolman & Röhm, 2012).

Estos complejos están compuestos por numerosas subunidades y contienen cofactores redox unidos a proteínas. Entre ellas están la flavina (FMN o FAD en los complejos I y II), los centros hierro-azufre (en I, II y III) y los grupos hemo (en II, III y IV).

Los electrones se incorporan a la cadena de transporte a través de diferentes rutas. Durante la oxidación de NADH mediante el complejo I se unen a la coenzima Q por medio de FMN y los centros Fe/S. Los electrones obtenidos a partir de la oxidación de succinato, acetil CoA y otros sustratos se incorporan por medio de la succinato deshidrogenasa y otras deshidrogenasas mitocondriales a la coenzima Q a través de FADH<sub>2</sub> unido a la enzima, y de la flavoproteína transportadora de

electrones (ETF). El ubiquinol transfiere electrones al complejo III, que los traspasa a su vez a la pequeña proteína citocromo C a través de dos grupos hemo. El citocromo C transporta los electrones al complejo IV, la citocromo oxidasa, que tiene como componentes redox activos dos centros de cobre ( $Cu_A$ ,  $Cu_B$ ) y los grupos hemo a y  $a_3$ , a través de los cuales los electrones se incorporan finalmente al oxígeno. Como resultado de la reducción de dos electrones de un átomo de  $O_2$ , se genera el anión  $O_2^-$  fuertemente básico que se convierte en agua al unirse con dos protones. La producción de un gradiente de protones está conectada al flujo de electrones mediante los complejos I, III y IV. Al desplazarse los electrones en la cadena de transporte se produce un incremento en la concentración de  $H^+$ , provocando una disminución en el pH. Por cada molécula de agua formada, se bombean 10  $H^+$  al espacio intermembranal. Cuando los protones fluyen a lo largo del canal proteico de la ATP sintasa se produce un cambio conformacional de la proteína promoviendo la síntesis de ATP (Koolman & Röhm, 2012).



**Figura 1.2.** Cadena respiratoria. La imagen muestra los componentes de la cadena respiratoria. En Rojo se señalan las subunidades codificadas por genes en el mtDNA y en azul los codificados por genes en el nDNA (Modificado de DiMauro *et al.*, 2004).

## 1.2 DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial (mtDNA) fue secuenciado por Anderson y colaboradores en 1981, está constituido por 16,569 pares de bases que constituyen 37 genes. Estos genes codifican 13 proteínas, 22 tRNAs y 2 rRNAs (Fig. 1.3). En humanos el mtDNA representa menos del 1% de la cantidad total de material genético en la

célula. De las 13 proteínas codificadas, 7 corresponden a subunidades del complejo I, una proteína del citocromo b del complejo III, 3 subunidades del complejo IV y dos subunidades del complejo V. El resto de los más de 80 polipéptidos que constituyen la cadena respiratoria son sintetizados en el núcleo y después son importados a la mitocondria. (Koolman & Röhm, 2012).

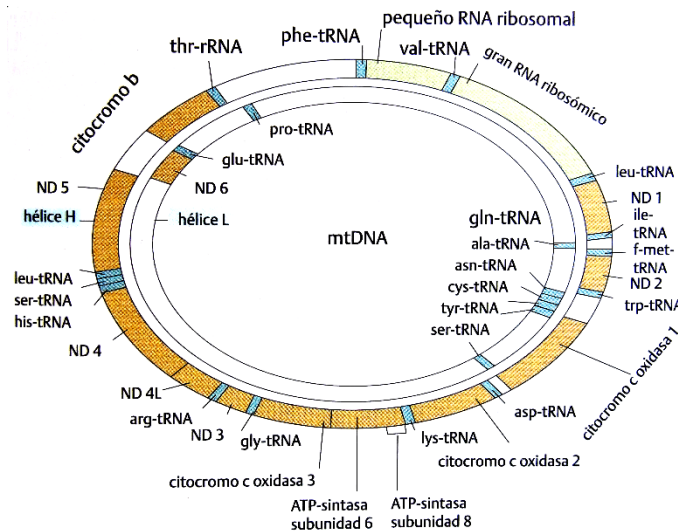


Figura 1.3. Genoma mitocondrial (Koolman & Röhm, 2012)

### 1.2.1 Estructura

El DNA mitocondrial es circular y bicatenario; tiene una cadena ligera (L) rica en citosina y una cadena pesada (H) rica en guanina lo que les da una diferencia de densidad boyante (Aderson *et al.*, 1981). El mtDNA no tiene intrones, a excepción de una región llamada *asa D*, que no codifica, pero contiene importantes unidades reguladoras como el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) y los orígenes de transcripción de las cadenas pesada y ligera (Howell, 1998; Tuppen, 2010).

El origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ) se encuentra en una región llamada “WANCY” constituida por tRNAs (Howell, 1998). En la cadena H se encuentran los genes que codifican 14 tRNAs, 12 proteínas y 2 rRNAs (12S y 16S), mientras que en la cadena L se encuentran los genes que codifican 8 tRNAs y una proteína (Taanman, 1999)

El mtDNA se encuentra organizado con proteínas encargadas de su replicación, mantenimiento, reparación y recombinación en complejos llamados nucleoides (Wang *et al.*, 2006; Holt *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha visto que la estructura de los nucleoides mitocondriales tiene un efecto en el estado bioenergético de la célula (Gilkerson, 2009).

### 1.2.2 Replicación

El proceso de replicación del DNA mitocondrial sucede de manera independiente al ciclo celular. El mecanismo exacto por el cual la mitocondria replica su DNA no se ha determinado completamente, sin embargo se han propuesto dos posibles mecanismos. Uno fue propuesto por Clayton en 1982 y sugiere que la cadena pesada empieza a replicarse y va dejando a la cadena ligera libre; una vez que aproximadamente dos tercios de la cadena pesada se han replicado, el origen de replicación de la cadena ligera queda expuesto y la polimerasa mitocondrial y (POLG) comienza la síntesis en sentido opuesto a la síntesis de la nueva cadena pesada.

El otro mecanismo desarrollado por Holt y colaboradores en el año 2000 propone que la replicación de la cadena ligera sucede poco después que la de la cadena pesada. Este mecanismo involucra la formación de fragmentos de Okazaki, los cuales son después sustituidos por DNA.

Se han determinado algunas de las proteínas que participan en la replicación mitocondrial como la proteína *Twinkle*, que funciona como una helicasa, la proteína mitocondrial de unión a cadena sencilla de DNA (mtSSB), la RNasa H1 y la DNA ligasa III, las cuales son compartidas con el núcleo (Tuppen, 2010 ; Pearce *et al.*, 2013)

### 1.2.3 Transcripción

Dentro del asa D del genoma mitocondrial se encuentran los promotores de transcripción de la cadena ligera (LSP) y de la cadena pesada (HSP). El transcrito de la cadena L comienza en el sitio de LSP, mientras que el de la cadena pesada puede iniciar en dos sitios diferentes: HSP1 y HSP2 (Montoya *et al.*, 1982; Asin-

Cayuela *et al.*, 2007). La transcripción produce tres moléculas policistrónicas. La cadena H se transcribe por dos unidades que se traslapan. Uno de ellos inicia cerca del sitio HSP1, que se encuentra a 16 nucleótidos corriente arriba del gen de tRNA<sup>Phe</sup> y termina en el extremo 3' del RNA 16S. Este RNA policistrónico contiene los dos rRNAs, tRNA<sup>Phe</sup> y tRNA<sup>Val</sup> (Montoya *et al.*, 1983; Kruse *et al.*, 1989)

La otra unidad transcripcional empieza en el sitio HSP2 que se encuentra 2 nucleótidos corriente arriba del gen del rRNA 12S, produce una molécula policistrónica que cubre casi toda la cadena pesada y contiene la secuencia de doce mRNA y catorce tRNAs. El sitio LSP da origen a un RNA policistrónico que inicia en el extremo 5' del RNA 18S y contiene los ocho tRNAs y el mRNA que codifica a la subunidad ND6 del complejo I de la cadena respiratoria (Montoya *et al.*, 2006)

Todos los genes que codifican mRNAs y rRNAs están flanqueados por genes de tRNAs, al cortar los tRNAs se producen mRNAs y rRNAs maduros; este mecanismo se conoce como "modelo de puntuación tRNA" (Ojala *et al.*, 1981)

La polimerasa mitocondrial necesita del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y del factor de transcripción B (TFB1M y TFB2M) para reconocer la secuencia promotora y poder empezar la transcripción. Se ha sugerido que el papel de TFAM es el de desenvolver la región promotora haciendo posible la transcripción (Gaspari *et al.*, 2004; Asin-Cayuela *et al.*, 2007). En cuanto al papel que TFBM tiene en el proceso de transcripción, hay tres posibles modelos que tratan de explicarlo 1) TFB1M o TFB2M se unen al RNA recién sintetizado para evitar la formación de híbridos entre RNA y DNA del promotor, 2) TFB1M o TFB2M interactúan con la cadena de DNA sencilla y estabilizan la burbuja de transcripción o 3) TFB1M o TFB2M interactúan con moléculas de RNA reguladoras que influyen directamente en los niveles de transcripción mitocondrial (Mangus *et al.*, 1994; Asin-Cayuela *et al.*, 2007).

Solo se ha detectado una región terminadora de la transcripción en el transcrito generado por HSP1, este es mTERF, una región en el extremo 3' del tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) (Kruse *et al.*, 1989; Fernández-Silva *et al.*, 1997). Aunque se encuentra en la cadena H, se cree que tiene actividad terminadora de la transcripción de la cadena L (Asin-Cayuela *et al.*, 2005; Shang & Clayton, 1994)

A pesar de que se conocen muchas de las moléculas que coordinan la transcripción del genoma mitocondrial y su regulación, el mecanismo por el cual interactúan permanece siendo un campo abierto, el cual necesita ser investigado para elucidar el panorama de la transcripción mitocondrial.

### 1.2.4 Traducción

Al igual que la traducción del material genético nuclear esta se basa en un código genético. Sin embargo, el código genético mitocondrial es diferente al código universal que conocemos. En el mitocondrial hay 60 codones de sentido (en el universal hay 59) y 4 de paro (UAA, AUG, AGA y AGG). AGA y AGG codifican arginina en el código universal, UGA es un codón de paro en el código universal mientras que en el mitocondrial codifica triptófano y AUA codifica metionina en el mitocondrial en lugar de isoleucina (Watson, 2006).

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

**Figura 1.4.** Código Genético Mitocondrial. En rojo se muestran las diferencias con el código universal. UGA codifica para Trp en vez de paro, hay dos codones de Met y dos codones AGR que indican paro (Modificado de Griffith *et al.*, 2004)

La mitocondria también posee sus propios ribosomas (mitorribosomas), estos se localizan en la matriz mitocondrial y son diferentes a los ribosomas celulares ya que contienen menos rRNA y más proteínas (Pearce *et al.*, 2013).

El mecanismo mitocondrial de traducción, similar al nuclear, se divide en cuatro etapas principales: iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas. Primero IF3<sub>mt</sub> forma un complejo con la subunidad 28S del mitorribosoma (Pearce *et al.*, 2013).

Después que el mRNA se une al complejo IF3<sub>mt</sub> -28S se verifica que haya un codón de inicio para que el formylmethionyl-tRNA (fMet-tRNA) se pueda unir al primer codón. Si esto falla, el complejo se disocia. Luego, IF2<sub>mt</sub> se une al complejo y facilita la unión de la subunidad mayor 39S, cuando GTP se une a IF2<sub>mt</sub> se hidroliza.

Después, los factores de iniciación se van con el ribosoma 55S permitiendo que la elongación comience (Pearce *et al.*, 2013).

Durante la elongación, los complejos terciarios formados por el factor mitocondrial de elongación Tu (EF-Tu<sub>mt</sub>), GTP y aminoacil-tRNAs entran al sitio A del mitorribosoma para mediar la unión codón-anticodón, esta unión provoca que GTP se hidrolice y el complejo EF-Tu<sub>mt</sub> – GDP se libere. La actividad enzimática propia del ribosoma cataliza la transferencia de la cadena peptídica en el tRNA en el sitio P hacia el nuevo aminoacil-tRNA en el sitio A, extendiendo el péptido (Pearce *et al.*, 2013).

Mientras que EFG1 facilita la translocación del ribosoma junto con el mRNA dependiente de GTP, EF-Tu<sub>mt</sub>-GTP se regenera por EF-Ts<sub>mt</sub> y se acompleja con un nuevo aminoacil-tRNA, la elongación continua hasta encontrar un codón de paro, UAA o UAG. Recientemente se ha descubierto que cuando el ribosoma se encuentra con un codón AGA o AGG hace un cambio de marco y trae un codón UAG al sitio A promoviendo el fin de la traducción (Temperley *et al.*, 2010). Una vez que el codón de paro entró al sitio, mtRF1a lo reconoce y se une al ribosoma, esta unión induce la hidrólisis de enlace entre el peptidil-tRNA y el sitio A y se libera el polipéptido maduro del ribosoma. Los factores de reciclaje, mtRRF1 y mtRRF2 entran al sitio A e inducen la liberación del mRNA (Pearce, 2013).



## 1.3 Genética Mitocondrial

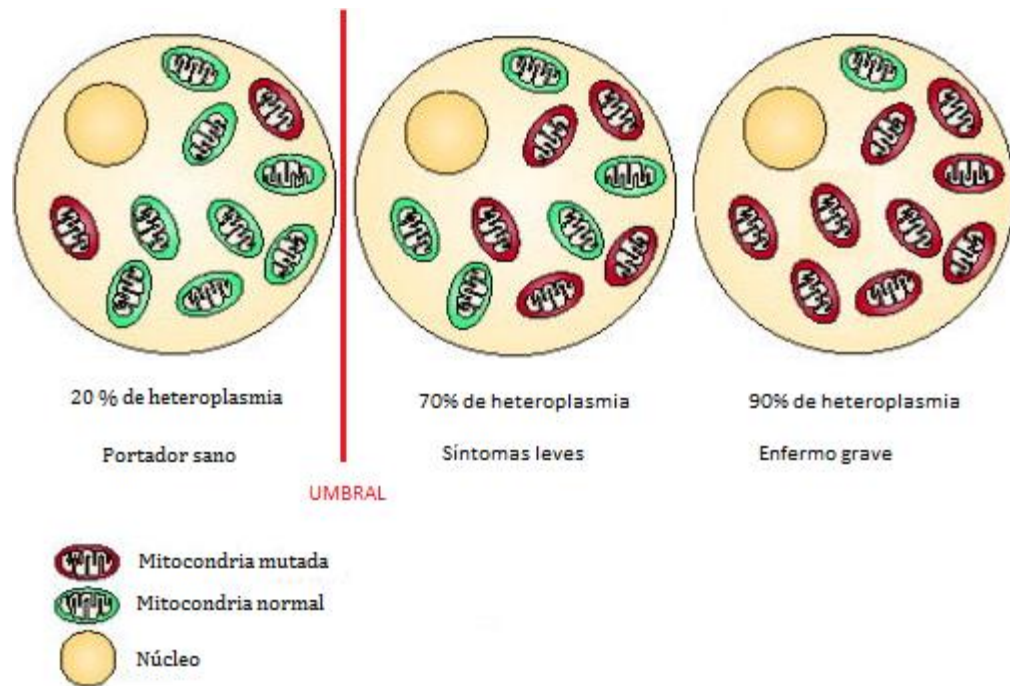
### 1.3.1 Herencia

El mtDNA sigue un modelo de herencia materna estricto ya que todas las copias de mtDNA de origen paterno son eliminadas cuando el espermatozoide fertiliza la ovótida; la región media, en donde se localizan sus mitocondrias se queda fuera de la ovótida por lo que las únicas mitocondrias que se conservan son las de la madre. Se ha reportado una mutación en el gen que codifica en el complejo I que sugiere que podría haber excepciones (Schwartz, 2002). Contrario a esto, en estudios realizados en los que se inyectó DNA mitocondrial de origen paterno a células, no se pudo detectar la presencia de este DNA posteriormente, lo que nos sugiere que hay mecanismos que suprimen la replicación de mtDNA paterno o que éste se diluye a niveles por debajo del límite de detección (Houshmand *et al.*, 1997; Danan *et al.*, 1999; Marchington *et al.*, 2002). Existe evidencia que señala un sistema selectivo de degradación de material genético mitocondrial paterno por parte del óvulo (Sutovsky *et al.*, 2004), cuando este sistema no funciona, el embrión detiene su desarrollo en la etapa de blastocisto (St John *et al.*, 2000). Es por esto que en caso de que sea posible la herencia mitocondrial paterna, no es considerada como relevante y la herencia que predomina es la materna (Schapira, 2006).

### 1.3.2 Efecto umbral

En la genética mitocondrial existen dos conceptos muy importantes: homoplásmia y heteroplásmia. Homoplásmia se refiere a cuando todas las copias de mtDNA en la célula son idénticas. Y heteroplasmia, cuando existen diferentes copias en una sola célula. Cuando una mutación patogénica se presenta en un estado de heteroplásmia, existe un límite o umbral que indica el número máximo de copias de mtDNA mutadas que puede haber, antes de que se presente el fenotipo afectado. Cuando este umbral no es sobrepasado, aun cuando se tenga la mutación, la enfermedad no se manifestará. Una vez que se supera el límite la patología se hace evidente y dependiendo de la cantidad de copias afectadas, será la gravedad de la enfermedad. El nivel de este umbral varía para cada mutación y

tejido. En tejidos con gran actividad del sistema OXPHOS el umbral es menor, y en tejidos que realizan más glucólisis anaerobia, su tolerancia es mayor. Generalmente el umbral se encuentra entre el 60-90% de copias afectadas (Wong 2007; Tuppen, 2010).



**Figura 1.5.** Efecto Umbral. Si la cantidad de mitocondrias mutadas en una célula supera el umbral se presenta la enfermedad (Modificado de Taylor *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Segregación mitótica

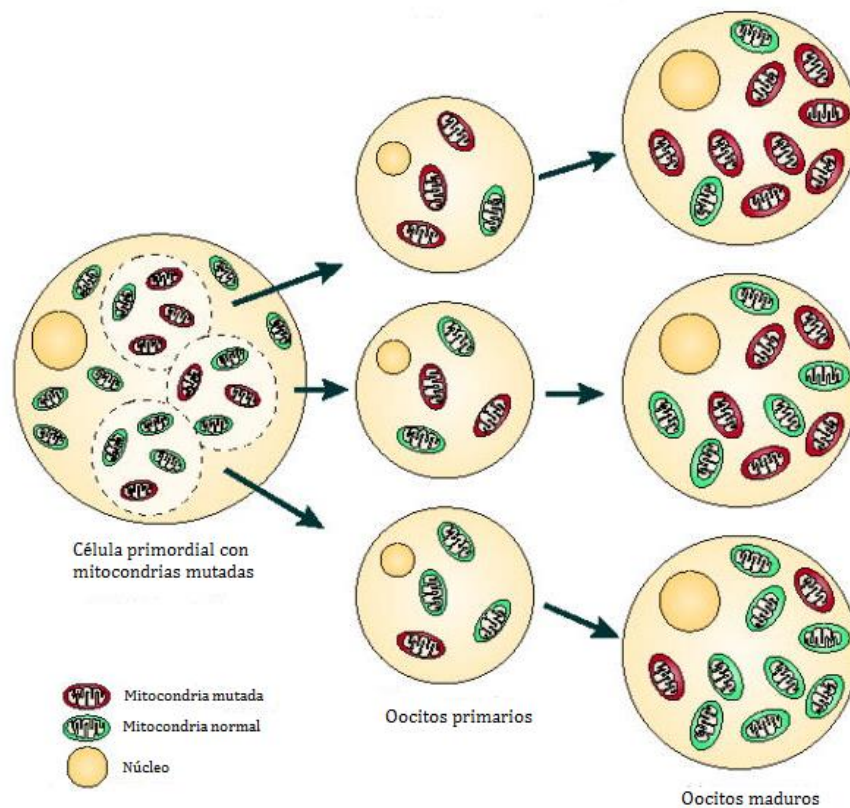
Cuando una célula se divide las mitocondrias son repartidas entre las células hijas de manera aleatoria, por lo que pueden darse dos escenarios: en uno, una de las células hereda mitocondrias con DNA mutado y sobrepasa el umbral provocando así el fenotipo afectado. El otro escenario es que conforme cada división, las copias de mtDNA experimenten deriva génica y se vayan perdiendo, esto sucede principalmente en tejidos que se dividen con rapidez (Tuppen, 2010).

### 1.3.4 Efecto cuello de botella

La frecuencia de copias de mtDNA mutado varía de generación en generación. Esto se debe al llamado efecto cuello de botella y sucede en la etapa

temprana de ovogénesis, primero las células sufren un cuello de botella en el que se reduce considerablemente el número de copias de mtDNA y conforme el oocito madura, hay una rápida replicación del mtDNA. Esta reducción- amplificación causa un cambio en la carga de mtDNA mutado en cada célula (Wallace, 2013).

A pesar de que las mujeres producen millones de pro-oocitos, solo alrededor de 400 maduran y son liberados a las trompas de Falopio para ser fertilizados. Con cada división celular de estos oocitos, las moléculas de mtDNA son transferidas (Wallace, 2013).



**Figura 1.6** Efecto cuello de botella (Modificado de Taylor *et al.*, 2005).

Existen tres teorías para explicar este cuello de botella; la primera dice que la variación en la heteroplasmia es debido a la segregación desbalanceada de mtDNA durante la división celular, la segunda teoría dice que el estado de heteroplasmia puede ser manipulado por la estructura de los nucleoides. Con un nucleoide heterólogo, es decir, que carga en su estructura copias de mtDNA mutado y normal, la heteroplasmia de la célula permanecerá constante, mientras que si las

copias de mtDNA mutado y las sanas se encuentran en nucleoides diferentes, estas podrán ser sujetas a selección, diferentes tasas de replicación, cuello de botella etc. (Jacobs, 2000; Gilkerson, 2009). Y la tercera dice que la variación en heteroplasmia se debe a una replicación selectiva dentro de una sub-población de mtDNA (Chinnery & Hudson, 2013). Se ha detectado también la existencia de un mecanismo de selección pre-fertilización en el que el ovario remueve a aquellos oocitos que albergan mutaciones severas en su mtDNA y deja pasar oocitos con mutaciones menos severas (Fan *et al.*, 2008).

### 1.3.5 DNA mitocondrial en la evolución humana

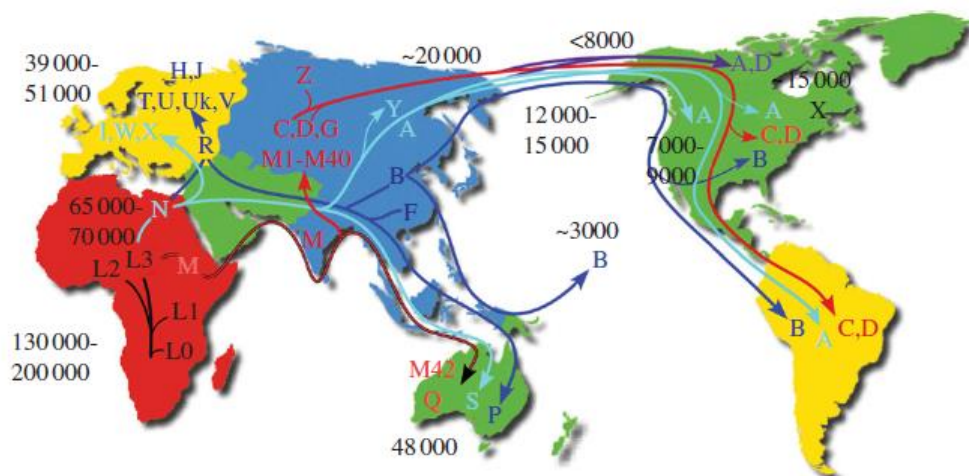
Ya que el mtDNA se hereda exclusivamente por línea materna es posible reconstruir el pasado genético de una población y sus migraciones siguiendo esta línea a lo largo de la historia. Al comparar un árbol de mutaciones de mtDNA, el cual muestra las afinidades genéticas de los nativos con la localización geográfica de la población que alberga ese mtDNA, se pudo obtener un mapa de las migraciones humanas (Figura 1.6). Cada población, tiene un número limitado de conjuntos de haplotipos de mtDNA relacionados. Un haplotipo es un conjunto de alelos, genes o polimorfismos que se heredan como un bloque. Cada uno de estos conjuntos de haplotipos deriva de un mtDNA fundador que albergó una o más variantes funcionales. El mtDNA fundador se dio en una población y conforme la población creció, los descendientes de este mtDNA adquirieron variantes adicionales, creando así conjuntos de haplotipos específicos de la población, llamados haplogrupos (Wallace 2013).

Los haplogrupos también se agrupan a su vez en otros conjuntos superiores, los haplogrupos de África se designaron como “L”, y pertenecen al macrohaplogrupo L. En la región de Etiopía, uno de los haplogrupos L, el L3, dio origen a dos nuevos haplogrupos; el M y el N. Solo los haplogrupos derivados de M y N dejaron África y colonizaron el resto del mundo, generando los macrohaplogrupos M y N. El macrohaplogrupo M migró hacia el sureste de Asia, Australia y luego hacia el norte de Asia para formar los haplogrupos C, D, G y M1-M20. El haplogrupo N en cambio, se desplazó hacia el sureste de Asia, Australia y luego al norte y centro de Asia,

formando los haplogrupos A y Z. También se trasladó a Europa, formando los haplogrupos I, X y W y a Eurasia formando los sub-macrohaplogrupos R. R después dio origen a los haplogrupos H, J, Uk, T, U y V. Y en Asia y formó los haplogrupos B y F. De todos los haplogrupos Asiáticos, solo los A, C y D migraron por el estrecho de Bering para colonizar América, después, los B y X siguieron el mismo camino (Wallace, 2013).

La relación que se ha encontrado entre las variaciones entre mtDNA y la zona geográfica donde se encuentra, habla de cómo estas variaciones están estrechamente relacionadas con la adaptación de los humanos a ciertas regiones geográficas. Variantes dentro de los haplogrupos han demostrado tener un efecto en la actividad de un complejo de la cadena respiratoria, o incluso predisposición a enfermedades.

Por ejemplo, cuando la variante ND1 nt 3394C (Y30H), se presenta en el macrohaplogrupo N, se asocia con una penetrancia mayor de las mutaciones que causan la enfermedad de LHON. El haplogrupo F está asociado a la predisposición a diabetes, (Wallace, 2013). Puede haber también relación entre el haplogrupo UKJT con desórdenes neurodegenerativos relacionados con el envejecimiento como Parkinson (Pyle *et al.*, 2005) y el subhaplogrupo H5 con Alzheimer (Santoro *et al.*, 2010). Con la determinación del haplogrupo, se busca encontrar una posible relación entre las enfermedades mitocondriales que se presentan en la población mexicana y los haplogrupos que las acompañan.



**Figura 1.7.** Haplogrupos mitocondriales en migraciones humanas (Tomado de Wallace, 2013).

## 1.4 Mutaciones del mtDNA

A pesar de que existen mecanismos de reparación, el mtDNA tiene una tasa de mutación muy alta en comparación con el DNA nuclear (nDNA) (Dianov *et al.*, 2001; Souza-Pinto *et al.*, 2009; Tuppen, 2010). Esto se debe al daño oxidativo que el material genético sufre al estar cerca del sistema OXPHOS y de las ROS que se generan, además de que no hay histonas que lo protejan como al nDNA (Tuppen, 2010).

Las mutaciones del mtDNA se dividen en dos grupos; mutaciones puntuales en tRNAs, rRNA o genes codificantes, comúnmente transferidas por herencia materna y rearrreglos como duplicaciones o grandes deleciones que pueden ser transferidas por herencia materna o suceder esporádicamente (Tuppen, 2010).

### 1.4.1 Mutaciones puntuales

Este tipo de mutaciones pueden ocurrir en mRNA, tRNA o rRNA, sin embargo, más de la mitad de las mutaciones asociadas a enfermedades afectan tRNAs. Las mutaciones que suceden en mRNAs afectan la función de la cadena respiratoria, mientras que mutaciones en tRNAs afectan el mecanismo de traducción mitocondrial (Tuppen, 2010).

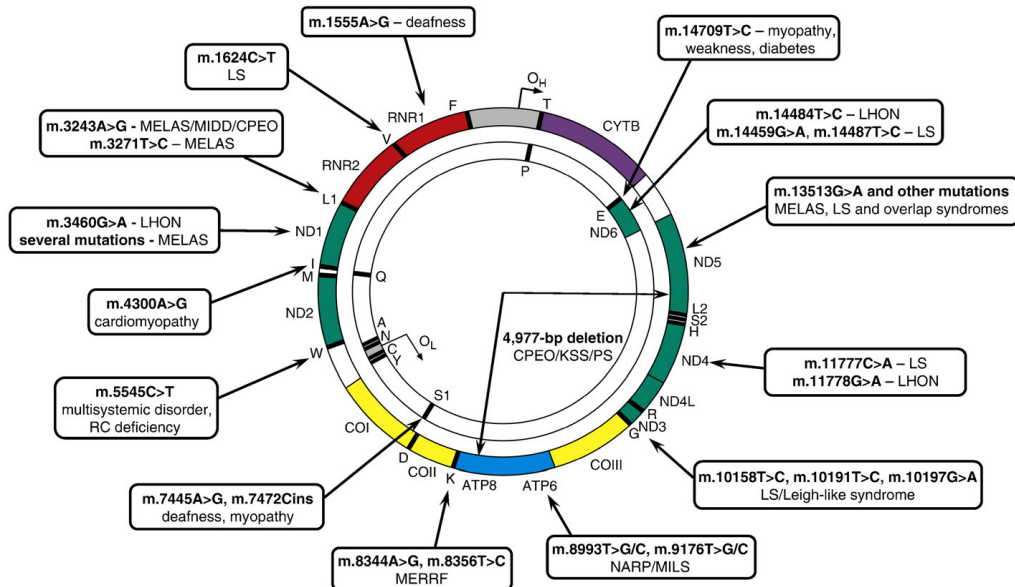
La mayoría de las mutaciones puntuales se presentan en heteroplásmia y son recesivas. Debido a la alta tasa de mutación del genoma mitocondrial y la presencia de polimorfismos en familias o poblaciones es difícil diferenciar entre mutaciones neutrales y patogénicas (Tuppen, 2010)

### 1.4.2 Deleciones y Duplicaciones

La gran parte de los rearrreglos en el genoma mitocondrial son deleciones de entre 1.3 y 8kb abarcando varios genes (Schon *et al.*, 1989). Estas deleciones ocurren esporádicamente y afectan diversos tejidos, la presencia de estas deleciones se puede deber a mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas encargadas de la replicación y mantenimiento del mtDNA como la POLG (Hudson & Chinnery, 2006; Kaukonen *et al.*, 2000; Sepbrink *et al.*, 2001). La acumulación de deleciones ha sido relacionada con enfermedades

neurodegenerativas (Cortopassi *et al.*, 1992; Bender *et al.*, 2006; Kraytsberg *et al.*, 2006).

La mayoría ocurren entre los OH y OL y están flanqueadas por pequeñas secuencias repetidas (Bua *et al.*, 2006; Samuels *et al.*, 2004). La característica más importante para determinar los síntomas de una enfermedad provocada por deleciones en el mtDNA no es el tamaño ni la localización de la deleción sino la cantidad y la distribución en los tejidos (Moraes *et al.*, 1995; Zeviani *et al.*, 1988; Vielhaber *et al.*, 2000). La figura 1.8 muestra las regiones dentro del genoma mitocondrial que han probado ser susceptibles a mutaciones puntuales y deleciones, y la patología a la cual están relacionadas.



**Figura 1.8.** Sitios del genoma mitocondrial susceptibles a mutaciones y su relación con patologías. (Tomado de Tuppen *et al.*, 2010)

## 1.5 Enfermedades Mitocondriales

La primera mutación patológica registrada en el DNA mitocondrial fue en 1988 (Holt *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1988) y se han registrado más de 250 alteraciones (MITOMAP, 2013). Los síndromes asociados a mutaciones en el mtDNA son extremadamente variables y se pueden desarrollar a cualquier edad. La edad a la cual la enfermedad se presenta depende del grado de mutación, la

severidad del trastorno bioquímico que esta provoca, el ambiente y mutaciones en DNA nuclear (Tuppen, 2010).

### 1.5.1 Clasificación

Las enfermedades mitocondriales son muy variables y pueden ser clasificadas de acuerdo a diferentes parámetros, tales como, su origen genético, el defecto bioquímico que causan o la edad a la cual se presentan.

#### 1.5.1.1 Enfermedades mitocondriales causadas por defectos en el mtDNA

Las enfermedades mitocondriales causadas por defectos en el mtDNA se pueden clasificar a su vez en dos grupos:

##### a) Enfermedades causadas por deleciones o duplicaciones

Este tipo de reordenamientos se han asociado a tres enfermedades principalmente:

- i) Síndrome de Pearson, un desorden fatal que se manifiesta en la infancia caracterizado por anemia sideroblástica y disfunción exocrina de páncreas (Tuppen, 2010).
- ii) Síndrome de Kearns-Sayre, un desorden multisistémico que se desarrolla antes de los 20 años de edad y se caracteriza por oftalmoplegia, retinopatía pigmentaria y bloqueo cardíaco (Tuppen, 2010).
- iii) Oftalmoplegia progresiva externa (PEO por sus siglas en inglés), la cual puede ser acompañada por debilidad en las extremidades (Tuppen, 2010).

##### b) Enfermedades causadas por mutaciones puntuales

Estas mutaciones se asocian con una gran variedad de desórdenes, principalmente encefalopatías de herencia materna, los síndromes más comunes son:

- i) MELAS: El nombre se debe al acrónimo en Inglés: *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic acidosis and Stroke-Like Syndrome*. Se caracteriza por encefalomiopatía, acidosis láctica y episodios recurrentes de isquemia cerebral transitoria (Tuppen, 2010).
- ii) MERRF: La epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas (*Myoclonic Epilepsy Ragged Red Fibres*) es una enfermedad progresiva



neurodegenerativa que se presenta en la infancia o adultez temprana y el síntoma característico son movimientos involuntarios del musculo. Es causada por un cambio de A a G en la posición 8344 del gen tRNA<sup>Lys</sup> (A8344G) (Shoffner *et al.*, 1990; Yoneda *et al.*, 1990; Silvestri *et al.*, 1993; Tuppen, 2010). A pesar de que otras mutaciones han sido relacionadas con esta enfermedad (T8356C y G8363C), el 80% de los casos presentan la mutación A8344G, mientras que las otras representan menos del 10% de los casos (López, 2006; Morano & Bonaventura, 2012).

- iii) NARP: La neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (*Neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa*). Se debe a la mutación m.8993T>G en el gen MT-ATP6. La principal característica es la neuropatía periférica, pero también se presentan convulsiones y demencia (Tuppen, 2010).
- iv) LHON: La neuropatía óptica hereditaria de Leber es causada por tres mutaciones principales: m.11778G>A, m.3460G>A y m.1448T>C. La enfermedad ataca a las células ganglionares de la retina causando perdida de la visión, ocurre entre los 20 y 40 años y es más común en hombres (Tuppen, 2010).
- v) Síndrome de Leigh: es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se presenta en la infancia y afecta el tronco cerebral, el diencéfalo y ganglios basales. Este síndrome puede ser causado por defectos en el sistema OXPHOS o en otras enzimas mitocondriales. Las mutaciones causantes pueden tener origen mitocondrial o nuclear (Tuppen, 2010).

### **1.5.1.2 Enfermedades mitocondriales causadas por defectos en el DNA nuclear**

Ya que solo 13 de las más de 80 proteínas que conforman la cadena respiratoria se codifican en el mtDNA, hay una gran probabilidad de que una mutación en genes nucleares que tienen una función en este sistema cause un trastorno metabólico. Se han reportado un gran número de mutaciones nucleares asociadas a enfermedades como Síndrome de Leigh, Encefalopatía Mitocondrial Infantil, Epilepsia, Leucodistrofia, entre otras (López, 2007).

**Tabla 1.1** Resumen de las principales enfermedades mitocondriales (Modificado de Wong, 2013)

<b>Enfermedad</b>	<b>Mutación</b>	<b>Herencia</b>	<b>Signos y Síntomas</b>
<b>Kearns-Sayre</b>	Delección de mtDNA	Esporádica	Ataxia, neuropatía periférica, debilidad muscular, oftalmoplegia, ptosis, retinopatía pigmentaria, anemia sideroblástica, diabetes mellitus, baja estatura, hipoparatiroidismo, cardiomiopatía, pérdida auditiva, síndrome de Fanconi, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas en biopsia de musculo
<b>PEO</b>	Delección de mtDNA	Esporádica	Debilidad muscular, oftalmoplégia, ptosis, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas en biopsia de musculo
<b>S. de Pearson</b>	Delección de mtDNA	Esporádica	Oftalmoplégia, anemia sideroblástica, disfunción pancreática, síndrome de Fanconi, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas en biopsia de musculo
<b>MERRF</b>	Mutación puntual en mtDNA, tRNA anormal	Materna	Convulsiones, ataxia, mioclonias, regresión psicomotriz, neuropatía periférica, debilidad muscular, baja estatura, pérdida auditiva, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas en biopsia de musculo
<b>MELAS</b>	Mutación puntual en mtDNA, tRNA anormal	Materna	Convulsiones, ataxia, mioclonias, regresión psicomotriz, hemiparesia, ceguera cortical, migraña, distonia, neuropatía periférica, debilidad muscular, diabetes mellitus, baja estatura, cardiomiopatía, pseudo-obstrucción intestinal, pérdida auditiva, síndrome de Fanconi, acidosis láctica, fibras rojas rasgadas en biopsia de musculo
<b>NARP</b>	Mutación puntual en mtDNA, mRNA anormal	Materna	Ataxia, neuropatía periférica, debilidad muscular, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, pérdida auditiva
<b>S. de Leigh</b>	Mutación puntual en mtDNA y nDNA, mRNA anormal		Retraso en el desarrollo, convulsiones y pérdida de consciencia, debilidad muscular, desordenes de movimiento, ataxia, temblores, neuropatía periférica
<b>LHON</b>	Múltiples mutaciones puntuales en mtDNA, mRNA anormal	Materna	Distonia, atrofia óptica, defectos cardiacos

## 1.6 Enfermedades mitocondriales diagnosticadas en la UIM

En el laboratorio se diagnostican tres enfermedades mitocondriales: MELAS, Síndrome de Leigh y Síndrome de Kearns-Sayre.

### 1.6.1 MELAS

La enfermedad de MELAS es un desorden neurodegenerativo que describió por primera vez Pavlakis y colaboradores en 1984. Esta enfermedad se presenta generalmente en la infancia tardía y adultez. Los signos y síntomas relacionados a esta patología son convulsiones, episodios de encefalopatías, acidosis láctica, y en algunos casos vómito, migraña, ataxia, deficiencia cognitiva, pérdida del oído, diabetes mellitus, baja estatura, fatiga, retinitis pigmentosa y endocrinopatías (Scaglia *et al.*, 2006, Finsterer *et al.*, 2009). En una resonancia magnética se observan infartos occipitales, calcificación de los ganglios basales bilaterales y atrofia cerebelosa y cerebral (Murphy *et al.*, 2008).

Se han determinado al menos 39 mutaciones que se asocian a MELAS (DiMauro *et al.*, 1993; Koga *et al.*, 2012). Sin embargo, las mutaciones más comunes son un cambio de adenina por guanina en la posición 3243 (A3243G) del gen tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) la cual se observa en el 80% de los casos de MELAS (Lizuka *et al.*, 2010; Goto *et al.*, 1990; Goto *et al.*, 1992; Koga *et al.*, 2012) y el cambio de timina a citosina en la posición 3271 (T3271C) del mismo gen, esta se presenta en 8-15% de los casos de MELAS (Yasukawa *et al.*, 2000; Parra *et al.*, 2005).

Las proteínas mitocondriales que se ven afectadas debido a esta mutación son la ND3 y ND6 del complejo I de la cadena respiratoria, las cuales tienen alto contenido de leucina. Se ha detectado en pacientes con MELAS una deficiencia de tanto el complejo I como el IV (Murphy *et al.*, 2008; Mezghani *et al.*, 2011), lo que causa una disminución en el gradiente electroquímico, afectando así la síntesis de ATP (Finnilä, 2000; Parra *et al.*, 2005)

La mutación produce un cambio en la conformación del tRNA<sup>Leu</sup> (UUR), afectando así el proceso de traducción en términos de la metilación de nucleótidos en el extremo 5' del anticodón. Esta metilación es necesaria para mantener la especificidad con el codón y puede afectar también la aminoacilación (unión a Leu),

ya que se pierde la especificidad de la enzima leucil-transferasa. Esto lleva a la sustitución de Leu por Phe en las proteínas mitocondriales o a una terminación prematura de la traducción (Jacobs & Holt, 2000; Parra *et al.*, 2005).

Otro efecto observado causado por la mutación es la disminución de síntesis de proteínas causada por la reducción en el número de ribosomas (Chomyn *et al.*, 1992; Parra *et al.*, 2005), ya que la mutación afecta la afinidad del factor mTERM al localizarse en su sitio de reconocimiento. Esto produce una disminución de rRNA 16S y la acumulación del precursor RNA 19S que corresponde a un transcrito que contiene los genes contiguos 16S rRNA, tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) y ND1 (Finnilä, 2000; Parra *et al.*, 2005). El efecto final es una disminución en la síntesis ribosomal por falta de la subunidad 16S (Parra *et al.*, 2005). Adicionalmente, puede que afecte el reconocimiento de los tRNA por la enzima encargada del corte del RNA policistrónico (Koga *et al.*, 2012).

### 1.6.2 Síndrome de Kearns-Sayre

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1958; se presenta antes de los 20 años de edad y se asocia con el desarrollo de retinitis pigmentaria, que es el acumulamiento de pigmentos en la retina lo que puede causar ceguera, retinopatía y oftalmoplegia progresiva externa, que consiste en la parálisis de los músculos oculares (Kearns & Sayre, 1958).

Este síndrome es causado por deleciones que varían en tamaño y localización, desde 1.3 a 8 kb y se observan en el mtDNA de diferentes tejidos, es por eso que la enfermedad es multisistémica (Puoti *et al.*, 2003; Mkaouar-Rebai *et al.*, 2010). La deleción más frecuente (50% de los casos) es la llamada “deleción común” de 4977 pb localizada entre los nucleótidos 8469 y 13447 del genoma mitocondrial (Remes *et al.*, 2005). Además de la deleción común, se han reportado deleciones en otros sitios del genoma y mutaciones en el tRNA<sup>Leu</sup> (Seneca *et al.*, 2001; Bosbach *et al.*, 2003; Mkaouar-Rebai *et al.*, 2010)

### 1.6.3 Síndrome de Leigh (MILS)

Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que a diferencia de las enfermedades anteriores, puede ser causada por mutaciones puntuales en el mtDNA o en el DNA nuclear. Se describió por primera vez por Leigh, (1951). En la mayoría de los casos la enfermedad se desarrolla entre los 3 y 12 meses de edad (Rahman *et al.*, 1996; Thorburn & Rahman, 2003). Sin embargo, es posible que se presente en la adultez (McKelvie *et al.*, 2012). Los rasgos característicos de la enfermedad son retraso en el desarrollo, convulsiones y pérdida de consciencia (Huntsman *et al.*, 2005). Otros signos y síntomas asociados son anomalías en el tono y debilidad muscular, desordenes de movimiento, ataxia, temblores, neuropatía periférica, trastorno respiratorio central, síntomas bulbares (disartria y disfagia) y alteraciones en la termorregulación (Lee *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 1996; Thorburn & Rahman, 2003). La mayoría de los pacientes mueren en la infancia debido a insuficiencia respiratoria o falla cardíaca (Lee *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 1996; Thorburn & Rahman, 2003; Marín *et al.*, 2013).

La mutación más frecuentemente observada en estos pacientes es una transversión de T a G en la posición 8993 del gen mitocondrial ATPasa6 que codifica una subunidad del complejo V de la cadena respiratoria (Carelli 2002). El cambio de C por T en la misma posición en el gen también se ha observado pero en este caso la enfermedad solo se presenta cuando existe una heteroplásmia mayor al 50% (Finsterer, 2008). Otros genes que sufren mutaciones relacionadas con este síndrome son MT-TL1, MT-TK, MT-TW, MT-TV, MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND5, MT-ND6 y MT-CO3 (Thorburn & Rahman, 2003).

## 1.7 Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico de las enfermedades mitocondriales se basa en la integración de signos, síntomas, pruebas bioquímicas, histoquímicas, genéticas e historia familiar.

Un análisis de DNA puede realizarse a partir de una muestra de sangre periférica con el fin de buscar en el genoma mitocondrial completo o en genes específicos alguna mutación patogénica.

Un análisis invasivo incluye estudios bioquímicos, histoquímicos y moleculares de biopsias de músculo, hígado o piel. Estos estudios pueden apoyar el diagnóstico y/o señalar al grupo de genes responsable de la enfermedad y así dirigir el análisis genético a esos genes.

### 1.7.1 Pruebas clínicas

#### ***Ácido Láctico y Piruvato***

La proporción lactato/piruvato refleja el estado redox de NADH/NAD<sup>+</sup> citoplasmático. Cuando hay algún defecto en la cadena respiratoria la síntesis de ATP disminuye. Para compensar esto, se acelera el mecanismo de glucólisis para poder proveer a la célula del ATP que necesita. Sin embargo, el ATP producido por la glucólisis no es suficiente y además produce un acumulación de piruvato el cual es transformado en lactato y liberado a sangre, en donde se acumula. Adicionalmente, la hidrólisis de ATP genera H<sup>+</sup> que no se usan y que al acumularse provocan una disminución en el pH produciendo acidosis. La elevación de alanina indica acumulación de piruvato. Defectos en el metabolismo del piruvato como: deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa, deficiencia de piruvato carboxilasa, o deficiencia de biotinidasa causan elevación de piruvato en sangre o LCR (Wong, 2013).

### ***Aminoácidos en plasma y LCR***

Este estudio se hace mediante cromatografía de intercambio iónico seguido de derivación post- columna en un analizador de aminoácidos. Recientemente se usa también espectroscopia de masas en tándem. Una elevación de alanina se considera:

- ✓ Alanina: Lisina > 3:1
- ✓ Alanina: fenilalanina+ tirosina >4:1
- ✓ Un valor absoluto de Alanina > 450mg/dL

La aminoaciduria con acidosis renal tubular y glicosuria se puede encontrar en pacientes con deleciones de mtDNA (Wong, 2013).

### ***Ácidos orgánicos en orina***

Los ácidos orgánicos en orina reflejan los catabolitos de aminoácidos, carbohidratos, y ácidos grasos. En este estudio se busca una elevación de intermediarios del ciclo de Krebs, el ácido etilmalónico y 3-metil glutacónico son comunes pero rara vez se puede diagnosticar una enfermedad mitocondrial específica basado en estos analitos. La aciduria dicarboxilica es otro posible hallazgo que se ha visto relacionado con enfermedades mitocondriales causadas por defectos en la  $\beta$ - oxidación. Particularmente, se puede encontrar una moderada elevación del ácido metilmalónico (MMA) cuando un paciente tiene una mutación en los genes SUCLA2 y SUGL1, lo que causa disminución de mtDNA. El análisis se hace con cromatografía de gases seguido de espectrometría de masas (Wong, 2013).

### ***Carnitina y Acil-carnitina***

La carnitina es una molécula con carga positiva que se necesita para transferir a los ácidos grasos de cadena larga del citoplasma a la matriz mitocondrial para que sean degradados en la  $\beta$ - oxidación, cualquier deficiencia en esta ruta metabólica afecta los niveles de carnitina total y libre en plasma. Adicionalmente, un perfil anormal de acil-carnitina sugiere que hay un defecto en la oxidación de ácidos grasos, lo cual es un efecto secundario de un desorden de la cadena respiratoria.

El estudio cuantitativo de acil-carnitina se hace con espectrometría de masas en tándem o HPLC seguida de ionización por electrospray (Wong, 2013).

### ***Histoquímica e Inmunohistoquímica***

En este estudio se buscan fibras rojas rasgadas, las cuales se deben a la proliferación mitocondrial en musculo esquelético. Estas se observan con la tinción de tricrómica de Gomori como depósitos granulares rojos en el espacio subsarcolemico. Las FRR pueden observarse también de color azul con la tinción de succinato deshidrogenasa (SDH). Esta tinción también es útil para diagnosticar deficiencias del complejo II. Otra evaluación histoquímica es la tinción de citocromo c oxidasa (COX). Cuando las fibras musculares tienen actividad COX normal se tiñen de color café, mientras que si no tienen actividad estas se tiñen muy poco. Si se tiñen después con SDH, las fibras lucen de color azul oscuro. Las tinciones inmunohistoquímicas usan anticuerpos contra las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Esta técnica sirve para identificar si el defecto se debe a un gen codificado en el DNA mitocondrial o en el nuclear dependiendo de qué subunidad se encuentre defectuosa (Wong, 2013).

### ***Microscopia electrónica***

Esta prueba puede mostrar cambios estructurales en la mitocondrias así como número, forma, tamaño o inclusiones (Wong, 2013).

### ***Ensayo Espectrofotométrico***

La actividad de la cadena respiratoria se mide con un ensayo espectrofotométrico de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE).

Se basa en la medición del cambio en la absorbancia del sustrato, ya sea NADH o Cyt C dependiendo del complejo que se esté evaluando. Cuando una mutación afecta a una subunidad o factores de ensamblaje solo se produce deficiencia de un complejo. Mientras que si la mutación sucede en genes nucleares encargados de la



biosíntesis del mtDNA entonces se causa una deficiencia de muchos complejos (Wong, 2013).

### ***Tasa de Consumo de Oxígeno (OCR)***

Este estudio se realiza en células vivas de un tejido fresco para medir el consumo de oxígeno y la síntesis oxidativa de ATP. Se utilizan sustratos del complejo I (glutamato, malato y piruvato) o del complejo II (succinato), se mide la síntesis de ATP en presencia o ausencia de ADP. La tasa de utilización de ADP y consumo de oxígeno refleja la eficiencia de las reacciones de fosforilación oxidativa e indica anomalías en la síntesis o acoplamiento de ATP (Wong, 2013).

### ***Análisis de los complejos de la cadena respiratoria usando Electroforesis Nativa (BN-PAGE)***

Esta técnica detecta defectos en el ensamblaje de los complejos proteicos de la cadena respiratoria. Separa los cinco complejos en el gel y se aplican anticuerpos, si hay algún error en el ensamblaje, el complejo con el defecto no estará presente (Wong, 2013).

### ***Coenzima Q<sub>10</sub>***

Mutaciones en el gen que codifica a la CoQ<sub>10</sub>, causan deficiencia de esta enzima, es por esto que es un marcador de defectos de cadena respiratoria. Su cuantificación se realiza con HPLC y detección electroquímica (Wong, 2013).

## **1.7.2 Evaluación genética**

### ***Detección de mutaciones comunes***

Las mutaciones en el mtDNA se detectan comúnmente por PCR/RFLP o PCR/ASO (oligonucleótidos alelo-específicos). La primera busca las mutaciones individualmente mientras que la segunda consiste en una PCR multiplex de las regiones propensas a mutaciones seguida de un análisis ASO dot-blot. Otros

métodos que se pueden utilizar son ensayos de discriminación de alelos TaqMan o secuenciación (Wong, 2013).

### ***Detección de mutaciones raras o desconocidas***

Algunas de las técnicas utilizadas para detectar nuevas mutaciones son *Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)*, *electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura (TTGE)*, *electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)*, *Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)* y *cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (cHPLC)* (Wong, 2013).

El método de secuenciación de Sanger del genoma mitocondrial completo se hace usualmente amplificando con una PCR utilizando de 24-36 pares de primers que amplifican fragmentos empalmándose y cubren así todo el genoma. Aunque este método es directo no detecta deleciones grandes o cuantifica el grado de heteroplasmia. Además, el genoma mitocondrial es tan polimórfico que la cantidad de SNPs y la interferencia con DNA nuclear puede hacer que los fragmentos de mtDNA no se amplifiquen correctamente, sin embargo esto se soluciona con secuenciación paralela masiva, la cual se usa rutinariamente (Wong, 2013).

### ***Cuantificación de Heteroplasmia***

Para conocer el grado de heteroplasmia y la distribución en los tejidos de las mutaciones se adiciona  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP a la PCR en el último ciclo seguido de la digestión enzimática y la cuantificación de las bandas de DNA con PhosphorImager. También se puede utilizar la técnica de PCR en tiempo real, que al mismo que detecta las mutaciones las cuantifica (Wong, 2013).

### ***Detección de grandes deleciones***

Las deleciones en el mtDNA se detectan comúnmente con Southern blot. Recientemente se ha desarrollado la técnica de hibridación genómica comparativa

con arreglos, *MitoMet*. Esta permite la detección de deleciones, sitios de rompimiento y el porcentaje de heteroplasmia de la deleción (Wong, 2013).

### ***Cuantificación del número de copias de mtDNA***

La alteración del número de copias del mtDNA es una indicación de un desorden mitocondrial. Un aumento sugiere que hay un mecanismo de compensación debido a una función mitocondrial deficiente, mientras que una disminución en el número de copias indica que hay algún defecto en la biosíntesis del material genético, lo que apunta a mutaciones en genes nucleares. La cuantificación del número de copias se realiza con una PCR cuantitativa, ya que este número varía entre tejidos, el número de copias se compara con controles de tejido y edad. El contenido de mtDNA en tejido muscular de pacientes con un síndrome encefalomiopático es 50% menor a un tejido normal, mientras que el de una muestra de hígado de un paciente con un síndrome hepatocerebral es 20% menor. Esta medida puede ayudar a dirigir el diagnóstico hacia genes mitocondriales o nucleares (Wong, 2013).

### ***Secuenciación de Sanger***

Este método ha sido utilizado como estándar de oro para detectar mutaciones en genes específicos al usar primers que amplifican los exones y aproximadamente 50 nucleótidos que flanquean las regiones intrónicas de los genes de interés, seguido de la secuenciación de los fragmentos de PCR. La selección de genes candidatos para ser secuenciados es un reto ya que como se ha mencionado, las enfermedades mitocondriales son genética y clínicamente heterogéneas. Aproximadamente 1500 proteínas codificadas en el núcleo se asocian con la biogénesis de la mitocondria, estructura y función, sin embargo, solo 200 se han reportado como causantes de una enfermedad. La selección de genes para diagnóstico con secuenciación se basa generalmente en la presentación clínica del paciente y la historia familiar así como en el resto de las pruebas que se han descrito.

Por ejemplo, si el contenido de mtDNA de un tejido muestra una disminución, entonces se secuencian un grupo de genes responsables de una forma hepatocerebral de un síndrome de disminución de mtDNA. Si hay indicios de miopatía o PEO y múltiples deleciones, entonces los genes responsables de estos fenotipos se secuencian (Wong, 2013).

### ***Hibridación Genómica Comparativa con arreglos (aCGH)***

Aunque al secuenciar se detectan mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones, no se detectan grandes deleciones. El método de aCGH se ha desarrollado para proveer cobertura de las 16.6kb de genoma mitocondrial y una gran cobertura de los genes nucleares involucrados en la biogénesis, estructura y función mitocondrial. Este método permite identificar puntos de ruptura, grado de heteroplasmia y número de copias de mtDNA (Wong, 2013).

### ***Secuenciación masiva paralela de siguiente generación***

La tecnología de secuenciación de siguiente generación de alto rendimiento es capaz de secuenciar un grupo específico de genes de manera paralela, por lo que es de mucha utilidad para el diagnóstico de enfermedades cuya causa puede deberse a muchos genes.

Esta tecnología se utiliza para el descubrimiento de genes relacionados con enfermedades mitocondriales, y algunos de estos genes han sido incluidos ya en pruebas de diagnóstico clínicas. Esta nueva técnica permite la secuenciación simultánea de múltiples genes con gran cobertura y bajo costo. El genoma mitocondrial es amplificado con primers empalmados para luego ser secuenciado por esta técnica. Se puede detectar el porcentaje de heteroplasmia con una sensibilidad del 5%, sin embargo no detecta deleciones grandes. Este método es prometedor pero para poder aplicado al diagnóstico clínico, aún deben superarse varios obstáculos técnicos (Wong, 2013).

### **1.7.3 Tratamiento**

Actualmente no existe cura ni tratamiento efectivo contra las enfermedades mitocondriales, solo medidas que permitan la mejora de la calidad de vida del paciente. Se han intentado tratar con vitaminas, cofactores enzimáticos, metabolitos y aceptores de electrones para compensar la disfunción de cadena respiratoria, sin embargo este tipo de acercamientos no han probado resultados sobresalientes. La terapia génica ha sido otra fuente de investigación en la que se intenta modificar los niveles de heteroplasmia del individuo, igualando la cantidad de mtDNA normal al mutado y evitar así la expresión de la enfermedad. Otros enfoques son evitar la replicación del mtDNA mutado y la utilización de TALENS (Transcription activator-like effector nucleases) para producir mutaciones que corrijan el mtDNA mutado (Kim et al., 2013; Mercer et al., 2014).

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Mostrar la estrategia de diagnóstico molecular que se sigue para identificar las mutaciones causantes de enfermedades mitocondriales así como los casos clínicos diagnosticados en el laboratorio 8 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC)

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Con ayuda de herramientas bioinformáticas, realizar una guía de diagnóstico molecular para las enfermedades de MELAS, Síndrome de Leigh y Síndrome de Kearns-Sayre.
- Revisar la base de datos del laboratorio y reunir los casos clínicos que han resultado positivos desde el 2007 hasta la fecha.

## CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

### 3.1 Guía para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales

Creación de una guía de diagnóstico, la cual contiene la información teórica necesaria para diagnosticar una enfermedad mitocondrial, datos como:

- a) Protocolo para procesar una muestra
- b) Mutación que se busca
- c) Gen que se ve afectado en la patología
- d) Secuencia de *primers* que se necesitan para amplificar este gen
- e) Enzimas de restricción necesarias
- f) Electroforesis que se observa en una muestra positiva.

### 3.2 Casos clínicos

Se reportan aquellos casos que han sido analizados en la UIM desde el 2007 hasta la fecha y han resultado ser positivos para alguna enfermedad mitocondrial.

Se utilizan las historias clínicas disponibles en el laboratorio, provistas por las instituciones de salud que han solicitado el diagnóstico y los resultados obtenidos por el laboratorio.

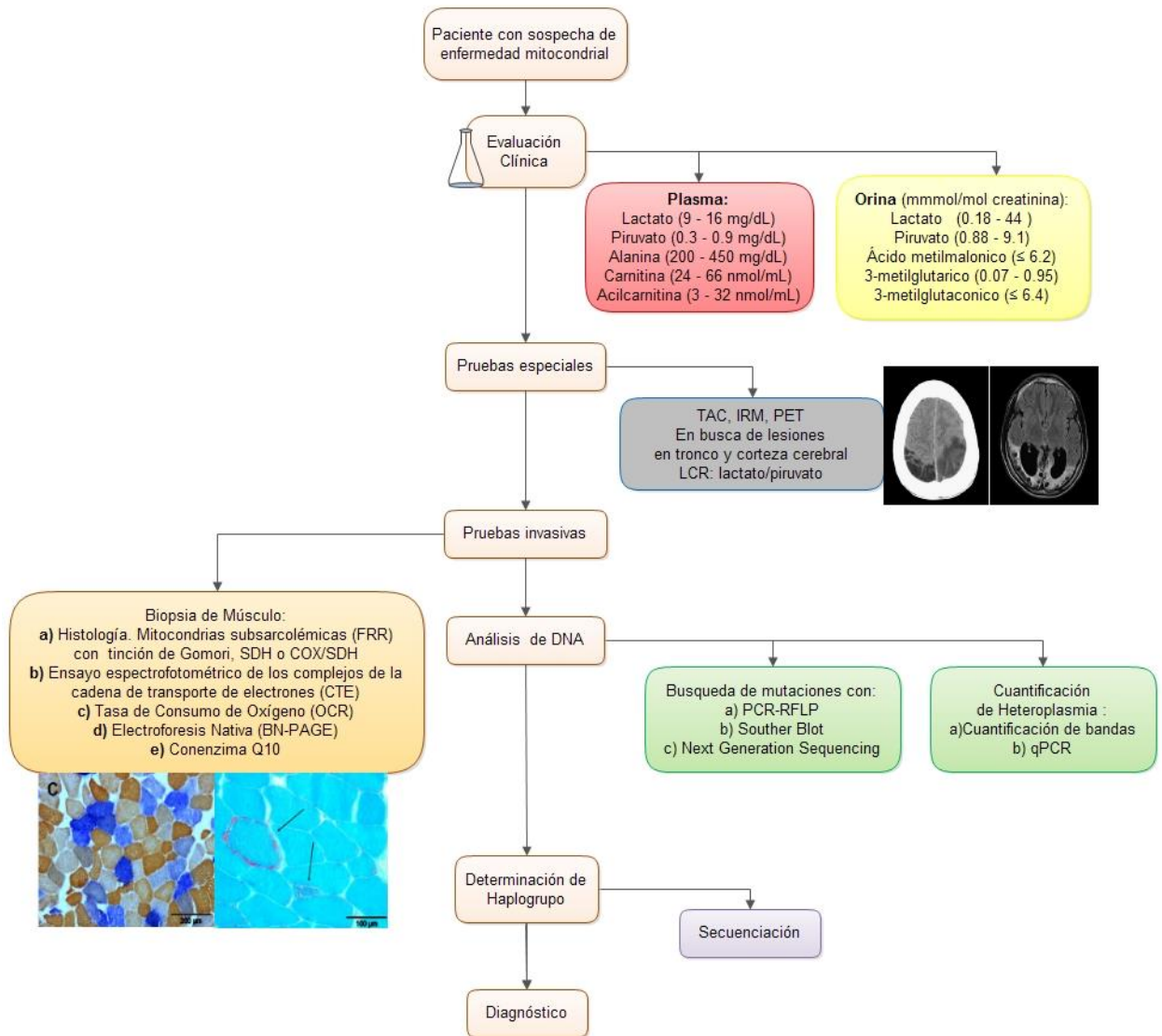
## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### 4.1 Protocolo general de diagnóstico

En el laboratorio se reciben muestras de sangre y musculo de instituciones de salud en diferentes estados de la república. Su transporte es crítico para asegurar la calidad de estas, por lo que se debe seguir un protocolo específico (Ver Apéndice I). Una vez que las muestras llegan al laboratorio de la UIM se realiza la extracción y purificación de DNA utilizando un kit comercial (*DNeasy Blood & Tissue Kit* de Qiagen) y siguiendo el protocolo de extracción del mismo (Apéndice II).

El DNA es amplificado en la región donde se busca la mutación correspondiente a la enfermedad mitocondrial de la que se sospecha. Para verificar que la PCR funcionó se realiza un gel en donde se confirma la presencia del amplificado. Seguido a esto, se utiliza la técnica de RFLP para determinar si está la mutación en cuestión. Una vez que se ha confirmado que se trata de una enfermedad mitocondrial, se determina el haplogrupo al cual pertenece y el porcentaje de heteroplasmia. Toda muestra positiva se envía a la Universidad de Zaragoza en España, en donde se confirma el diagnóstico.





**Figura 4.1.** Esquema del procedimiento general para el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial

## 4.2 Diagnóstico de MELAS

**Mutación:** A3243G

**Gen afectado:** tRNA<sup>Leu</sup> (MT-TL1)

**Longitud:** 75pb (3230-3304)

**Secuencia:**

>gi|251831106:3230-3304 Homo sapiens mitochondrion, complete genome

GTTAAGATGGCAGGCCCGTAATCGCATAAACTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTCTTAACA

↑  
Sitio de la mutación cambio A por G

Primers para amplificar:

	Secuencia 5'-3'	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	Hmt279L-GTCCTAAACTACCAAACCTGC	Positiva	21	2707	2797	56.53	47.62
R	LeuH- AAGGGTTGTAGTAGCCCGTAG	Negativa	21	3452	3432	58.89	52.38

(Saldaña, 2009)

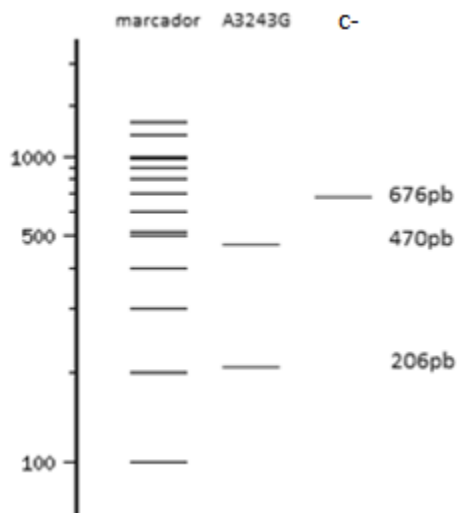
### Fragmento amplificado y digestión

**Longitud:** 676pb (2707-3452)

**Enzima:** ApaI



### Electroforesis



**Mutación:** T3271C.  
**Gen afectado:** tRNA<sup>Leu</sup> (MT-TL1)  
**Longitud:** 75pb (3230-3304)  
**Secuencia:**

>gi|251831106:3230-3304 Homo sapiens mitochondrion, complete genome  
 GTTAAGATGGCAGAGCCCGGTAATCGCATAAACTTAAAAC**T**TTACAGTCAGAGGTTCAATTCC  
 TCTTCTTAACA

Sitio de la mutación cambio T por C

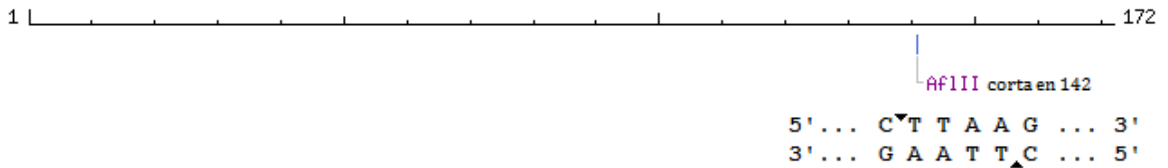
Primers para amplificar:

	Secuencia 5'-3'	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	Ms2L -AGGACAAGAGAAATAAGGCC	Positiva	20	3130	3149	55.1	45.0
R	Ms2H - TAAGAAGAGGAATTGAACCTCTGACCTAA	Negativa	30	3301	3272	64.6	36.7

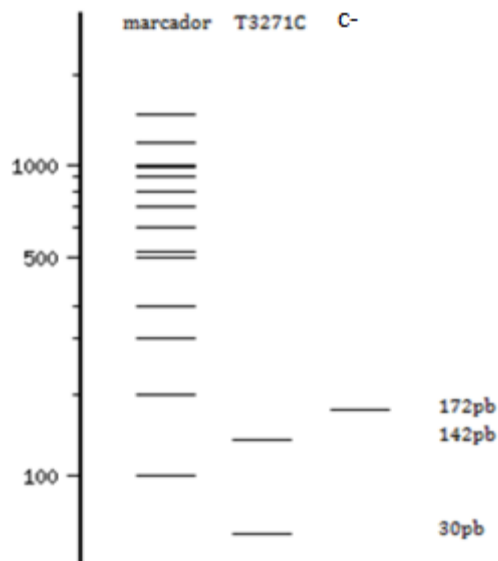
El primer Ms2H tiene un "mismatch" en 3275 G->T y en 3276 T->C para crear una región de reconocimiento para AflII (López, 2007).

**Fragmento amplificado y digestión**

**Longitud:** 172pb (3130-3301)  
**Enzima:** AflII



**Electroforesis**



**Mutación:** T3291C  
**Gen afectado:** tRNA<sup>Leu</sup> (MT-TL1)  
**Longitud:** 75pb (3230-3304)  
**Secuencia:**

>gi|251831106:3230-3304 Homo sapiens mitochondrion, complete genome  
 GTTAAGATGGCAGAGCCCGGTAATCGCATAAACTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAATCC  
 TCTTCTTAACA

Sitio de la mutación cambio T por C

Primers para amplificar:

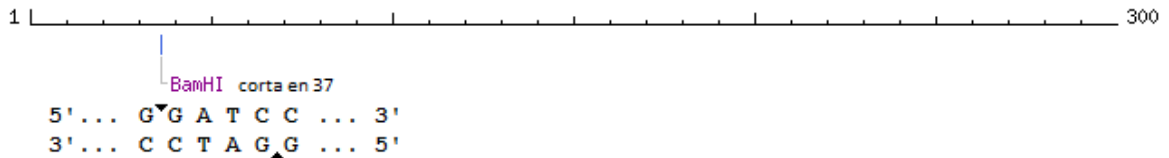
	Secuencia 5'-3'	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	Ms4L - AATCGCATAAACTTAAACTTTACAGTCA GAGGTTGGAT	Positiva	40	3251	3290	70.8	32.5
R	Ms4H-CGATGGTGAGAGCTAAGGTC	Negativa	20	3550	3531	57.5	55.0

El primer Ms4L tiene un "mismatch" en 3287 C->G y en 3288 A->G para crear un sitio de reconocimiento para BamH1 (López, 2007).

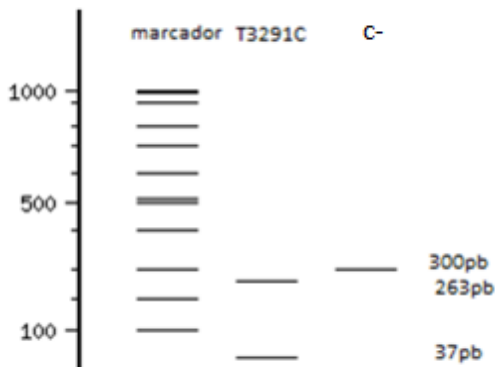
### Fragmento amplificado y digestión

**Longitud:** 300 (3251- 3550)

**Enzima:** BamH1



### Electroforesis



**Mutación:** A11084G  
**Gen afectado:** ND4  
**Longitud:** 1,378 (10,760-12,137)  
**Secuencia:**

>gij251831106:10760-12137 Homo sapiens mitochondrion, complete genome  
 ATGCTAAAATAATCGTCCCAACAATTATATTACTACCACTGACATGACTTTCCAAAAACACATAATTTGAATCAACACAACCCACCCACAGC  
 CTAATTATTAGCATCATCCCTCTACTATTTTTAAACCAAATCAACAACAACCTATTTAGCTGTTCCCAACCTTTTTCTCCGACCCCTAACA  
 ACCCCCTCCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCTCACAAATCATGGCAAGCCAACGCCACTTATCCAGTGAACCACTATCACGAAAAA  
 AACTCTACCTCTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATTATAACATTTCAGCCACAGAATAATCATATTTTATATCTTCTTCGAAAA

↑  
**Sitio de la mutación cambio A por G**

CACACTTATCCCCACCTTGGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAACGCCTGAACGCAGGCACATACTTCTATTCTACACCCTA  
 GTAGGCTCCCTTCCCCTACTCATCGCACTAATTTACACTCACAACACCCTAGGCTCACTAAACATTCTACTACTCACTCTCACTGCCAAGA  
 ACTATCAAACCTCCTGAGCCAACAACCTAATATGACTAGCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCACTTATGACT  
 CCCTAAAGCCCATGTGGAAGCCCCATCGCTGGGTCAATAGTACTTGCCGCAGTACTCTTAAAACCTAGGCGGCTATGGTATAATACGCCT  
 CACACTCATTCTCAACCCCTGACAAAACACATAGCCTACCCTTCCCTTACTATCCCTATGAGGCAT AATTATAACAAGTCCATCTGCC  
 TACGACAAAACAGACCTAAAATCGCTCATTGCATACTCTTCAATCAGCCACATAGCCCTCGTAGTAAACAGCCATTCTCATCCAAACCCCTGA  
 AGCTTACCGGCGCAGTCACTTCTCAT AATCGCCACGGGCTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGCAAACCTCAAACACGCACTC  
 ACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCTACTCCCACTAATAGCTTTTGGATGACTTCTAGCAAAGCCTCGTAACCTCGCC  
 TTACCCCTCCTATTAACTACTGGGAGAATCTCTGTGCTAGTAAACACGTTCTCCTGATCAAATATCACTCTCCTACTACAGGACTCAA  
 CATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCTCTACATATTTACCACAACACAATGGGGTCACTCACCCACCACATTAAACAATAAAAACCTCAT  
 TCACAGGAAAAACCCCTCATGTTTCATACACCTATCCCCATTCTCCTCTATCCCTCAACCCCGACATCATTACCGGGTTTTCTCTT

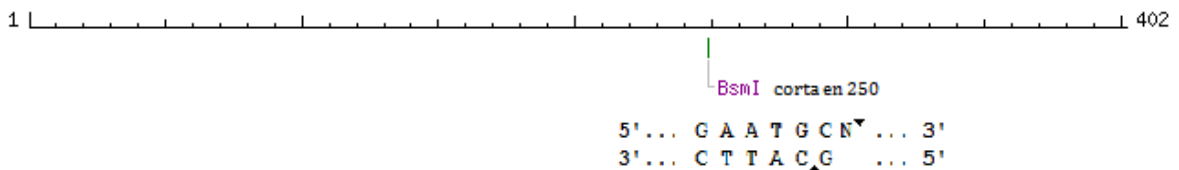
**Primers para amplificar:**

	Secuencia 5'-3'	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	Ms3L - CCTCTCTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATG CTA	Positiva	40	10,835	10,874	67.9	37.5
R	Ms3H -GAGTTTGATAGTTCTTGGGCAGT	Negativa	23	11,236	11,214	58.8	43.5

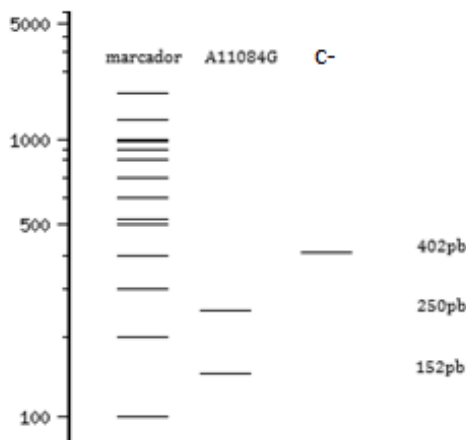
(López, 2007)

**Fragmento amplificado y digestión**

**Longitud:** 402pb (10,835- 11,236)  
**Enzima de restricción:** BsmI



**Electroforesis**



### 4.3 Diagnóstico de Síndrome de Leigh

**Mutación:** T8993G/C  
**Gen afectado:** ATPasa6  
**Longitud:** 681pb (8527-9207)  
**Secuencia:**

```
>gi|251831106:8527-9207 Homo sapiens mitochondrion, complete genome ATGAACGAAA ATCTGTTTCGC
TTCATTCATTGCCCCACAATCCTAGGCCTACCCGCCGAGTACTGATCATTCTATTTCCCTCTATTGATCCCCACCT
CCAAATATCTCATCAACAACCGACTAATCACCACCCAACAATGACTAATCAAACCTCAAACAAATGATAACCATAC
ACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTATACTAGTATCCTTAATCATTATTTATTGCCACAACCTAACCTCGGACTCC
TGCCTCACTCATTACACCAACCACCCAATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCTTATGAGCGGGCACAGTGATT
ATAGGCTTTTCGCTCTAAGATTAATAATGCCCTAGCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCATACT
AGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCC
```



Sitio de la mutación cambio T a G o C

```
ACCGCTAACATTACTGCAGGCCACTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCC
CTCTACACTTATCATCTTACAATTCTAATTCTACTGACTACTCTAGAAATCGCTGTCGCCTTAATCCAAGCCTACGTTTTC
ACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGACAACACATAA
```

Primers para amplificar:

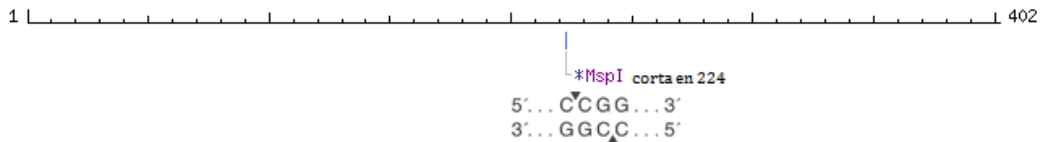
	Secuencia 5'-3'	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	mtF8768-CAACTAACCTCCTCGGAC	Positiva	18	8768	8785	54.01	55.56
R	mtR9169 -TGAAAACGTAGGCTTGGAT	Negativa	19	9169	9151	54.37	42.11

(López, 2007)

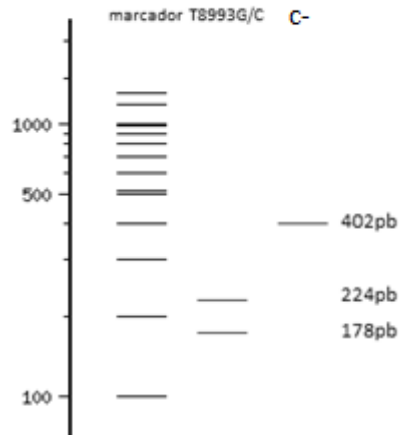
### Fragmento amplificado y digestión

**Longitud:** 402pb (8768-9169)

**Enzima:** MspI



### Electroforesis



**Mutación: T9176C**  
**Gen afectado: ATPasa6**  
**Longitud: 681pb (8527-9207)**  
**Secuencia:**

```
>gil251831106:8527-9207 Homo sapiens mitochondrion, complete genome ATGAACGAAA ATCTGTTCGC
TTCATTCATTGCCCCACAATCCTAGGCCTACCCGCCGAGTACTGATCATTCTATTCCCCCTCTATTGATCCCCACCT
CAAATATCTCATCAACAACCGACTAATCACCACCCAACAATGACTAATCAAACAACTCAAAACAATGATAACCATAC
ACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTTATACTAGTATCCTTAATCATTTTTATTGCCACAACAACTCCTCGGACTCC
TGCCTCACTCATTACACCAACCAACCAACTATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCCTTATGAGCGGGCACAGTGATT
ATAGGCTTTTCGCTCTAAGATTAATAAATGCCCTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCTTATCCCCATACT
AGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCTGGCCGTACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAGGCC
ACCTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACTTCCCCTTACACCTTATCATCTTCACAA
TTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTGCCTTAATCCAAGCCTACGTTTTACACTTCAGTAAGCCTCTACC
TGCACGACAACACATAA
```

Sito de la mutación cambio de T a C

**Primers para amplificar:**

	Secuencia 5'-3'	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	LeighL- GCCCTAGCCCACTTCTTAC	Positiva	19	8896	8914	57.22	57.89
R	LeighH- AGAGGCTTACTAGAAAGTGTG	Negativa	20	9187	9168	53.83	45.00

(López, 2007)

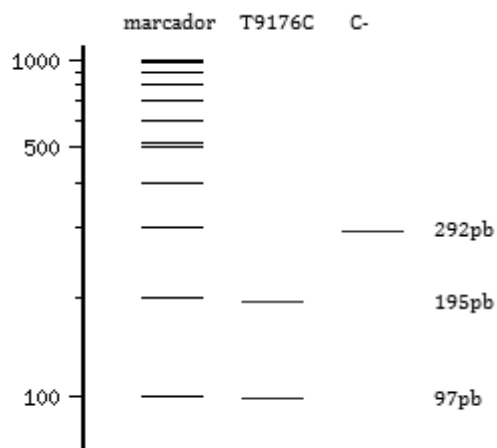
**Fragmento amplificado y digestión**

**Longitud: 292pb (8896-9187)**

**Enzima: ScrF1**



**Electroforesis**



**Mutación:** G14459A  
**Gen afectado:** ND6  
**Longitud:** 525 pb (14,149-14,673)  
**Secuencia:**

```
>gi|251831106:14149-14673 Homo sapiens mitochondrion, complete genome
CCTATTCCCCCGAGCAATCTCAATTACAATATATACACCAACAAACAATGTTCAACCAGTAACTACTACTAATCAACGCC
ATAATCATACAAAGCCCCCGCACCAATAGGATCCTCCCGAATCAACCCTGACCCCTCTCCTTCATAAATTATTCAGCTTC
CTACACTATTAAGTTTACCACAACCACCACCCCATCATACTCTTTCACCCACAGCACCAATCCTACCTCCATCGCTAAC
CCCCTAAAACACTCACCAAGACCTCAACCCTGACCCCATGCCTCAGGATACTCCTCAATAGCCATCCTGTAGTAT
```



Sitio de la mutación cambio de G por A

```
ATCCAAAGACAACCATCATTCCCCCTAAATAAATTAAAAAAATTAATTAACCCATATAACCTCCCCAAAATTCAGAATAAT
AACACACCCGACCACACCGCTAACAATCAATACTAAACCCCATATAATAGGAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCACAAAAC
CCATTACTAAACCCACACTCAACAGAAAACAAAGCATACATCAT
```

Primers para amplificar:

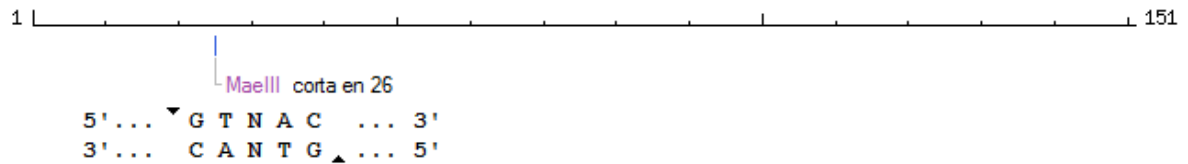
	Secuencia 5'-3'	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	L7L- ATGCCTCAGGATACTCCTCAATAGCCGTC	Positiva	29	14430	14458	70.5	51.7
R	L7H -TTGATTGTTAGCGGTGTGGTCTG	Negativa	22	14580	14559	61.44	50.00

El primer Ms2H tiene un "mismatch" en 14456 A->G para crear una región de reconocimiento para MaeIII (Gutiérrez, 2009).

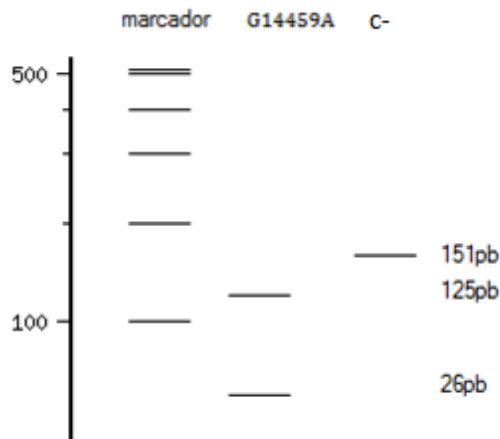
**Fragmento amplificado y digestión**

**Longitud:** 151pb (14430-14580)

**Enzima:** MaeIII



**Electroforesis**





#### 4.4 Diagnóstico de Kearns-Sayre

**Mutación:** Deleción “común” 4977pb

**Gen afectado:** región entre los nucleótidos 8469 y 13447 del genoma mitocondrial

**Sondas para Southern blot:**

MS2L 5´-AGGACAAGAGAAATAAGGCC-3´

LBH 5´-CTTACTTTAGGATGGGGTGT-3´

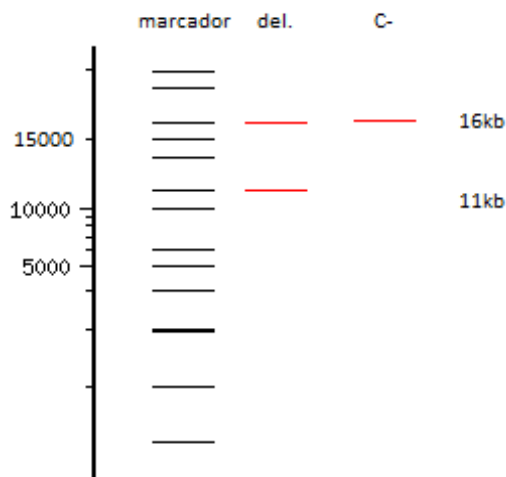
Primers para amplificar:

	Secuencia 5´-3´	Hebra	Longitud	Inicio	Final	Tm	GC%
F	DCL-CTACCCCTCTAGAGCCCAC	Positiva	20	8278	8297	60.47	65.00
R	DCH-TAGCGATGAGAGTAATAGATAGG	Negativa	23	13582	13560	54.19	54.19

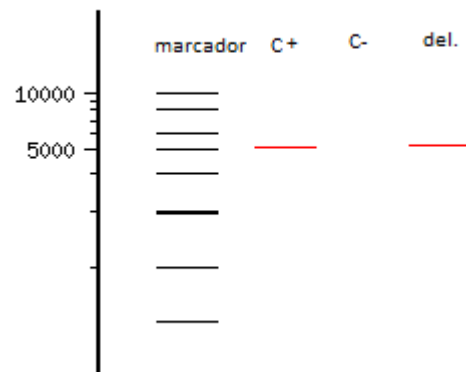
(López, 2007)

**Fragmento amplificado= 5305pb**

**Southern blot:**



**Electroforesis:**



Las deleciones se detectan con un Southern blot. Cuando se trata de la deleción común se observa una banda de alrededor de 11kb. Posteriormente, se flanquea la región donde se encuentra la deleción, si amplifica se confirma la presencia de la deleción, si no amplifica significa que no se encuentra la deleción.

### 4.5 Determinación de haplogrupo

Para la determinación del haplogrupo se pueden estudiar las regiones hipervariables 1 y 2 (HVR-1, HVR-2) y la región codificante. La región HVR1 contiene marcadores para identificar a los haplogrupos de origen asiático A-D presentes en América.

La región HVR1 es secuenciada con el programa *Sequencher* y comparada con la secuencia mitocondrial original en GenBank para detectar SNPs característicos de cada haplogrupo. Adicionalmente, se puede amplificar la región y con enzimas de restricción comprobar el haplogrupo.

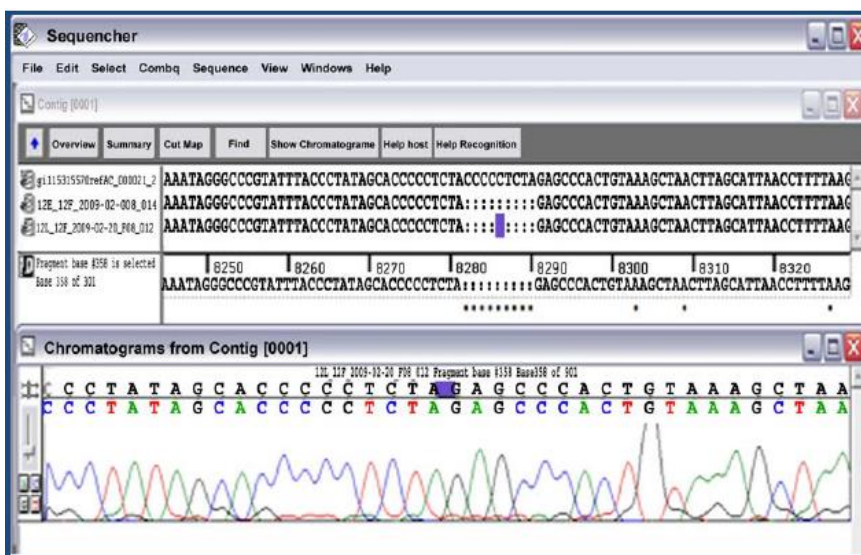


Figura 4.2 . Secuenciación para determinar haplogrupos (Tomado de Saldaña, 2003)

Tabla 4.2. Determinación del haplogrupo

Haplogrupo	SNP característico	Primers (5'-3')	Enzima de restricción	
A	663 A/G	L396- CCAGCCTAACCAGATTTCAA H1067 -GGGGTATCTAATCCCAGTTT	HaeIII GGCC	
B	8280:8290 A[delCCCCCTA]G	L8192- GCTCTGAAATCTGTGGAG H8361 -TATTTAGTTGGGGCATTTCAC	Detectar deleción de 9pb	
C	13263 A/G	L12978 5'- CAAGCCTCACCCCACTACTA H13733- GGTAGAGGGGATTGTTGTT	AluI AGCT	HincII GT(C/T) (A/G)AC
D	5178 C/A	L5042- CCCACATAGGATGAATAATA H5442- GCGATGAGTGTGGGGAGGAA	AluI AGCT	

(Richards *et al.*, 1998)

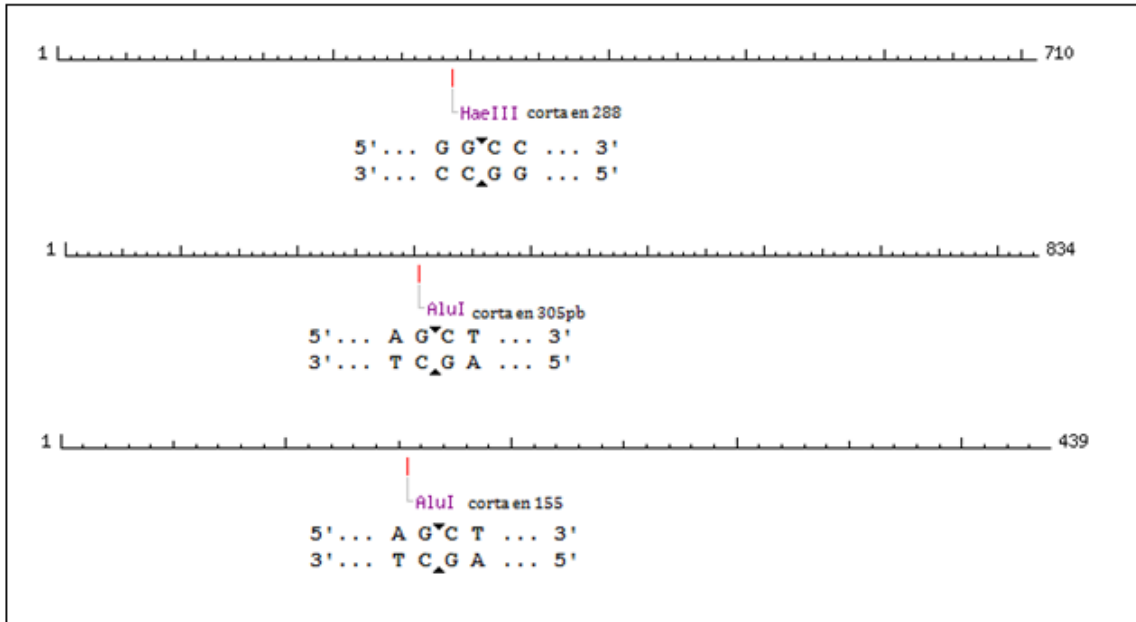


Figura 4.3 . Digestión con enzimas de restricción para determinar haplogrupo

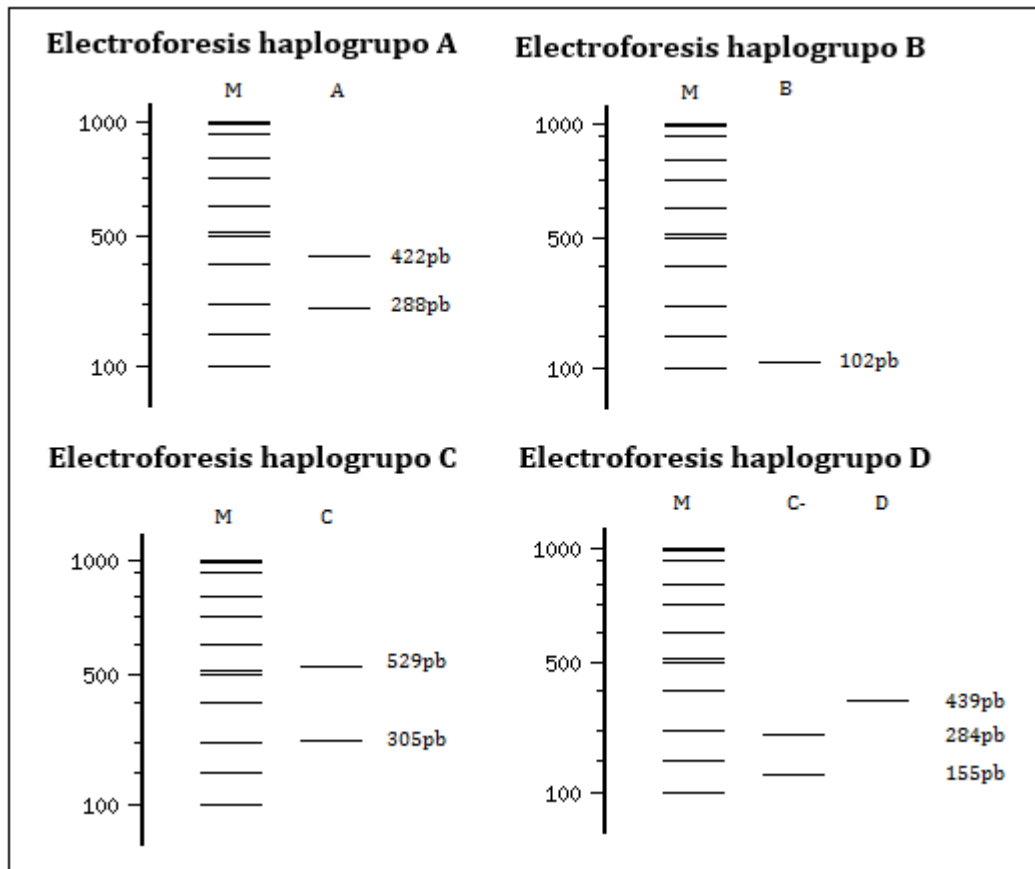
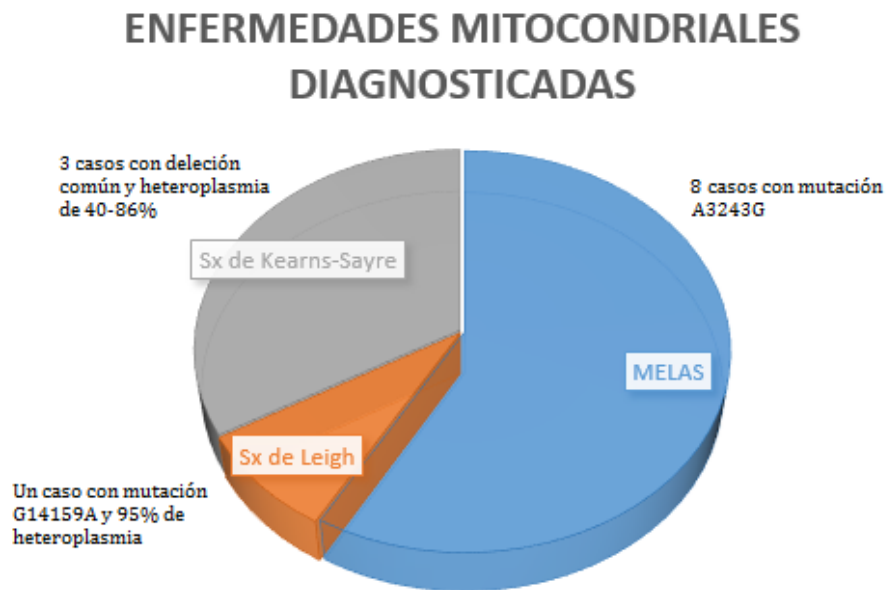


Figura 4.4. Electroforesis para determinar haplogrupo

#### 4.6 Casos clínicos diagnosticados en la UIM

El laboratorio de diagnóstico no. 8 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán ha recibido desde Septiembre del 2007 hasta Diciembre del 2013 un total de 52 muestras de diferentes instituciones de salud del país. De las cuales siete han resultado positivas para MELAS, una para Síndrome de Leigh y tres para Síndrome de Kearns-Sayre.



**Figura 4.5.** Representación gráfica de los pacientes diagnosticados en la UIM.

Los casos clínicos que se han analizado en el laboratorio presentan un porcentaje de heteroplasmia diverso que está siempre relacionado con la gravedad de la enfermedad, a mayor cantidad de mtDNA mutado, más severo el padecimiento. El diagnóstico oportuno, como en todas las enfermedades crónico-degenerativas es de vital importancia para poder aplicar un tratamiento lo antes posible y mejorar la calidad de vida de los pacientes. A continuación se presentan los casos clínicos que se han recibido en el laboratorio y que han resultado positivos para una enfermedad mitocondrial.

#### 4.6.1 Casos de Kearns-Sayre

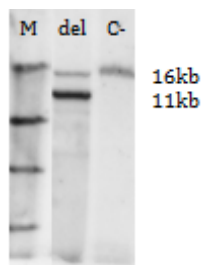
##### **Caso 1. Julio del 2010. Hospital General de México.**

Paciente masculino de 19 años comienza a presentar signos y síntomas seis meses antes de ser referido al médico. Estos incluyen diplopía (visión doble), oftalmoplegia, ptosis (parpados caídos), limitado movimiento ocular y calambres musculares. Extremidades integra, tono muscular normal, miembros torácicos y pélvicos con fuerza muscular proximal y distal y reflejos presentes.

El análisis de mtDNA determinó la presencia de la delección común de 5 kb en su mtDNA con un 40 % de heteroplasmia en células de tejido muscular. Esto se refleja en la relativa levedad de los síntomas y que se conserva el tono y la función muscular.

##### **Caso 2. Julio del 2010. Centenario Hospital Miguel Hidalgo (Aguascalientes).**

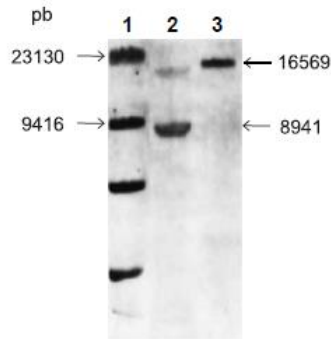
Paciente masculino de 18 años de edad, presenta a los 8 años ptosis, incapacidad para mover los ojos, disminución de audición en oído izquierdo, fatiga al ejercicio, cefalea ocasional occipital punzante, pérdida de peso y desde los 11 años de edad, disminución de la agudeza visual sin oftalmoplegia y con reflejos normales y talla baja. El análisis de mtDNA determinó la presencia de la delección común de 5 kb en su mtDNA con un 75 % de heteroplasmia en células de tejido muscular.



**Figura 4.6.** Southern blot de paciente con Kearns-Sayre. **M:** Marcador de peso molecular, **del:** muestra de paciente, **C-:** Control negativo. El segundo carril muestra dos bandas; una de 16kb, que corresponde a mtDNA normal y una banda de 11kb que corresponde al mtDNA con la delección de 5kb; esta banda es más intensa ya que el paciente tiene un porcentaje de 75% de heteroplasmia (Tomado del laboratorio de la UIM, 2010)

**Caso 3. Agosto 2013.**

Paciente femenino de 10 años de edad, con signos y síntomas característicos de Kearns-Sayre, presentó una delección que no había sido reportada antes de 7629pb con 85% de heteroplasmia y haplogrupo nativo-americano C4c.



**Figura 4.7.** Southern blot de paciente con Kearns-Sayre. 1: marcador de peso molecular, 2: muestra de paciente, 3: control negativo. El segundo carril muestra dos bandas, la primera de 16kb correspondiente al mtDNA normal y la segunda de 8kb que corresponde al mtDNA con una delección nueva de 7629pb, la segunda banda es más intensa debido a que el paciente presenta 85% de heteroplasmia (Tomada de Montiel-Sosa, 2013).

**4.6.2 Casos de MELAS****Caso 1. Septiembre 2007. Centro Médico Siglo XXI.**

Paciente masculino de 10 años 5 meses de edad con historia familiar de epilepsia e hipoacusia, padece asma desde los 2 años, intolerancia a la lactosa desde el año de edad y cinco meses antes de ser referido al médico padece de gastritis. A los 8 años de edad presenta crisis TCG (tónico clónico generalizadas) de larga duración. Al tercer evento de crisis TCG presenta broncoaspiración que lo lleva a paro respiratorio revertido con maniobras de reanimación. En ocasiones las crisis son precedidas por cefalea, vomito, alucinaciones visuales y amaurosis. Ha presentado deterioro cognitivo y se refiere aparente hipoacusia. En el examen físico se observó ptosis, fondo de ojo sin alteraciones de pigmentación, reflejos presentes, sin limitaciones visuales y talla baja. TAC del cráneo muestra hiperdensidad de ganglios basales.

El análisis de mtDNA determinó la presencia de la mutación A3243G y haplogrupo americano A.

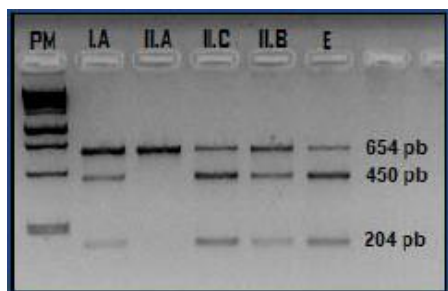
**Caso 2. Septiembre 2007. Centro Médico Siglo XXI.**

Paciente femenino, hermano diagnosticado con MELAS, no se cuenta con historia clínica. El análisis de mtDNA determinó la presencia de la mutación A3243G.

**Caso 3. Noviembre 2008. Instituto de Neurología.**

Paciente femenino de 12 años sin antecedentes familiares importantes. Comienza a presentar episodios de cefalea frontal o universal de aparición súbita, de leve a moderada intensidad con presentación cada 3 a 7 días. A los dos meses de evolución presenta crisis convulsivas TCG. Posteriormente evoluciona con crisis convulsivas de diversos tipos, generalizados o focalizados a hemicuerpo derecho y a veces a hemicuerpo izquierdo, siendo de difícil control. En su evolución llegó a presentar amaurosis de ojo derecho por una hora aproximadamente. TAC de cráneo muestra calcificaciones en ganglios basales y pruebas de laboratorio con lactato elevado.

El análisis de mtDNA determinó la presencia de la mutación A3243G y haplogrupo americano B.



**Figura 4.8.** Electroforesis de paciente con MELAS. IIC: paciente, E: paciente. Banda de 654pb mtDNA no mutado y bandas de 450 y 204pb fragmentos de mtDNA mutado. (Tomado de Saldaña, 2009).

**Caso 4.**

Paciente femenina de 14 años 6 meses de edad con antecedentes de una prima hermana por línea materna con MELAS (fallecida). Presenta cefalea occipital, disminución de agudeza visual, refiere parestesia y dolor en la hemicara derecha y en extremidades inferiores, continúa con debilidad del miembro pélvico derecho lo que ocasiona claudicación durante la marcha. El tono muscular es normal y no se apreció déficit motor. Fondo de ojo con hiperpigmentación de la retina bilateral y

papila óptica pálida en ojo derecho sin evidencia de papiledema. Se reportó lactato elevado.

El laboratorio recibió muestra de sangre periférica y realizó el estudio genético en el que se determinó la presencia de la mutación A3243G y haplogrupo asiático B.

***Caso 5. Septiembre 2009. Centro Médico Siglo XXI.***

Paciente masculino, no se cuenta con historia clínica. El análisis de mtDNA determinó la presencia de la mutación A3243G.

***Caso 6.***

Paciente masculino, no se cuenta con historia clínica. El análisis de mtDNA determinó la presencia de la mutación A3243G.

***Caso 7.***

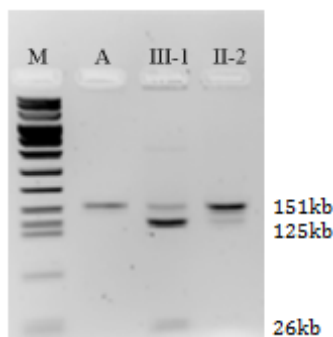
Paciente femenino, no se cuenta con historia clínica. El análisis de mtDNA determinó la presencia de la mutación A3243G.



### 4.6.3 Casos de Síndrome de Leigh

#### **Caso 1. 2009. Centro Médico Siglo XXI.**

Paciente femenino, sin historia clínica. A partir de muestras de sangre y musculo se detectó el primer caso en México con la mutación G14459A relacionada con el Síndrome de Leigh con un 95% de heteroplasmia y haplogrupo europeo H. Se realizó el estudio genético a la familia y se encontró la mutación en la madre con 5% de heteroplasmia sin presentar signos y síntomas.



**Figura 4.9.** Electroforesis de paciente con Síndrome de Leigh. M: marcador de peso molecular, A: mtDNA sano, III-1: paciente, II-2: madre del paciente. La muestra del paciente presenta los dos fragmentos producto de la digestión con MaeIII (125kb y 26kb) y una banda tenue que representa el mtDNA sano (5%). La muestra de la madre presenta los fragmentos de digestión pero en menor proporción (95%) (Modificada de Guitierrez, 2009)

## CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las enfermedades mitocondriales son los padecimientos más genéticamente heterogéneos ya que involucran no solo al genoma mitocondrial sino también al nuclear. Como se ha descrito a lo largo de este trabajo, el llegar a un diagnóstico certero basado solamente en los signos y síntomas del paciente es prácticamente imposible, por lo que es necesario hacer uso de herramientas de biología molecular para delimitar al diagnóstico a una patología específica.

A pesar de que un desorden mitocondrial puede ser causado por un defecto en el DNA mitocondrial o en el nuclear, el diagnóstico clínico se ha concentrado en el genoma mitocondrial debido a su tamaño y simpleza, además de que ya se tienen identificadas varias mutaciones que se presentan con frecuencia y son causantes de enfermedades mitocondriales.

Desde la secuenciación del genoma humano en el 2001, la medicina genómica ha avanzado de tal manera que se han caracterizado miles de genes asociados con patologías. El desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico molecular ha ayudado a los médicos a responder múltiples preguntas clínicas. Las técnicas que se desarrollaron en laboratorios de investigación para estudiar al genoma mitocondrial son ahora técnicas de rutina en el laboratorio clínico.

La bioinformática ha jugado un papel fundamental en este proceso, desde las bases de datos que contienen millones de secuencias de genes de diversos organismos hasta herramientas bioinformáticas más complejas que permiten hacer análisis genómicos, transcriptómicos, proteómicos, de poblaciones etc.

Es con estas herramientas que se diseñaron los métodos de diagnóstico que el laboratorio de la UIM utiliza para diagnosticar las enfermedades mitocondriales. Para realizar la guía de diagnóstico presentada en este trabajo se hizo uso de programas como GenBank, MITOMAP, PrimerBlast, Primer3, DNAMAN, y NEBcutter. Se pudo así visualizar el proceso de diagnóstico partiendo de la secuencia del genoma mitocondrial tomada de la base de datos mitocondrial oficial, MITOMAP; esta base de datos contiene información acerca de todas las mutaciones patogénicas identificadas, funciones de los genes, haplogrupos etc. Posteriormente,

se determinó con PrimerBlast y Primer3, la región que se buscaba amplificar partiendo de las secuencias de *primers* reportadas para cada mutación. Algunos de los *primers* no podían ser analizados con estos programas ya que tenían regiones no homologas con la secuencia original, insertadas para crear los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción. Este es un ejemplo de cómo el conocimiento del genoma mitocondrial nos permite manipular su secuencia a nuestro antojo en este caso para desarrollar una técnica de diagnóstico.

Una vez delimitado el fragmento amplificado, se modificó la secuencia para simular la presencia de la mutación de interés y se insertó en NEBcutter para generar el mapa de restricción. El programa corta el amplicón y permite visualizar los fragmentos como se verían en una electroforesis.

Este análisis bioinformático es el procedimiento que cualquier persona que quisiera diseñar una prueba de diagnóstico basado en la identificación de una mutación tendría que seguir, los programas pueden ser diferentes pero el fundamento es el mismo. Con este análisis se comprobó teóricamente que los métodos utilizados para diagnosticar molecularmente una enfermedad mitocondrial funcionan y que pueden ser implementados por el laboratorio de la UIM.

Sin embargo, estos métodos solo sirven para identificar mutaciones conocidas. Para poder encontrar nuevas mutaciones o mutaciones raras, se tendría que seguir otro procedimiento como lo es la secuenciación de siguiente generación en la que se detecta cualquier cambio en la secuencia problema con respecto al genoma mitocondrial, esto también tiene sus desventajas ya que el genoma mitocondrial es altamente polimórfico y no todos los cambios en las secuencias son causantes de patologías, por lo que se tiene que hacer la caracterización de cada mutación encontrada antes de asegurar que el fenotipo presentado es causado por esta.

Además, las técnicas presentadas son exclusivas para el mtDNA, por lo que aún queda el DNA nuclear para poder ser analizado, la UIM no busca mutaciones en el DNA nuclear como parte del protocolo de diagnóstico para una enfermedad mitocondrial, por lo que se podría suponer que algunas de las muestras que han resultado negativas para las mutaciones más comunes en el mtDNA pero el cuadro

clínico coincide con el de un desorden mitocondrial, pueden llegar a tener un origen nuclear sin detectarse. El incluir al DNA nuclear dentro del análisis genético ampliaría el espectro de diagnóstico, por lo que puede ser un objetivo para la UIM en el futuro.

Como parte complementaria a este trabajo se presentó el trabajo que la UIM ha realizado en cuanto al diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales.

A pesar de que la cantidad de muestras positivas es pequeña, esto es proporcional a la baja incidencia que estas enfermedades tienen. Debe considerarse también que muchos pacientes no son diagnosticados, ya sea debido al poco conocimiento y experiencia que los médicos pueden llegar a tener en enfermedades mitocondriales, o a que el paciente muere antes de poder recibir atención médica orientada hacia un desorden mitocondrial.

El cuadro clínico tan complejo, aunado al hecho de que la cantidad de médicos que han tratado o están familiarizados con los síndromes es mínima, hace que la probabilidad de que un paciente con una enfermedad mitocondrial sea diagnosticado sea baja. Al analizar los casos clínicos recibidos en el laboratorio de la UIM, muchos de los signos y síntomas que los pacientes presentan se traslapan entre un síndrome y otro, lo que puede llegar a causar confusión y demorar el diagnóstico. La dificultad de identificar este tipo de trastornos basado en signos y síntomas se ve reflejada en la cantidad de muestras que han resultado positivas con respecto a las que se reciben. Es por esto, que es necesario que la información se lleve a más personas, tanto de la comunidad científica como médica y al público en general. Entre mayor información y dialogo haya, mayor es la posibilidad de que estas enfermedades “raras” dejen de ser un misterio clínico.

En el laboratorio de la UIM solo se diagnostican tres de los más de 40 trastornos asociados a defectos de la cadena respiratoria (United Mitochondrial Disease Foundation, 2013). Los esfuerzos entonces, son dirigidos a desarrollar el diagnóstico para más trastornos mitocondriales, y cubrir así otras patologías que tal vez afectan a la población pero continúan si ser diagnosticadas, al igual que incorporar al DNA nuclear en la búsqueda de mutaciones patogénicas.

## CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mayoría de los casos presentados en este trabajo forman parte de tesis y artículos publicados con anterioridad. Esto se debe a que el estudio de estas enfermedades en nuestro país, es relativamente nuevo y se han encontrado mutaciones poco comunes. Desafortunadamente, no existen datos epidemiológicos que nos permitan saber a ciencia cierta que síndromes se han presentado, con que incidencia, la mutación que prevalece etcétera, lo cual es otra meta para la investigación de enfermedades mitocondriales en México y para la UNAM.

## **CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES**

Se realizó un análisis bioinformático para crear una guía de diagnóstico basado en la detección de las mutaciones en el mtDNA más comunes asociadas a MELAS, Síndrome de Kearns-Sayre y Síndrome de Leigh.

Se presentaron doce casos clínicos recibidos en el laboratorio 8 de la UIM, ocho de los cuales fueron positivos a MELAS, uno a Síndrome de Leigh y tres a Síndrome de Kearns-Sayre.

## **CAPÍTULO 7: PERSPECTIVAS**

El diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales debe ser orientado al análisis tanto del genoma mitocondrial como del nuclear para poder compensar la complejidad y heterogeneidad genética de estos desordenes, lo cual puede ser un objetivo para el laboratorio de diagnóstico 8 de la UIM.

El diagnóstico molecular de enfermedades complejas como las mitocondriales puede ser revolucionado con el uso de tecnologías de secuenciación de siguiente generación, como la secuenciación paralela masiva, la cual permite analizar el genoma mitocondrial, al detectar y cuantificar mutaciones puntuales en mtDNA y deleciones en un solo paso.

El desarrollo de nuevas herramientas de bioinformática puede ayudar al área clínica en el diagnóstico, análisis y predicción de enfermedades.

## CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA

- Agapitos E, Pavlopoulos PM, Patsouris E, Davaris P. 1997 Subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's disease): a clinicopathologic study of ten cases. *Gen. Diagn. Pathol.* **142**, 335–341.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nat.* **290**, 457–465.
- Asin-Cayuela J. et al. 2005 The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is fully active in vitro in the nonphosphorylated form. *J. Biol. Chem.* **280**, 25499–25505.
- Asin-Cayuela J, Gustafsson CM. 2007 Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 32(3), 111-7
- Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM. 2006 High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease, *Nat. Genet.* **38**, 515–517.
- Bosbach S, Kornblum C, Schröder R, Wagner M. 2003 Executive and visuospatial deficits in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns–Sayre syndrome. *Brain* **126**, 1231–1240.
- Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM. 2006 Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 469–480.
- Carelli V, Baracca A, Barogi S, et al. 2002 Biochemical-clinical correlation in patients with different loads of the mitochondrial DNA T8993G mutation. *Arch Neurol* **59**, 264-70.
- Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M. et al. 1992 MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Pros Natl Acad Sci USA* **89**, 4221-5
- Clayton DA. 1982 Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693–705.
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. 1992 A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7370–7374.
- Cotney J and Shadel GS. 2006 Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor b family and maintenance of Rrna methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *J. Mol. Evol.* **63**, 707–717
- Danan C, Sternberg D, Van Steirteghem A, et al. 1999 Evaluation of parental mitochondrial inheritance in neonates born after intracytoplasmic sperm injection. *Am J Hum Genet* **65**, 463–73.
- Dianov GL, Souza-Pinto N, Nyaga SG, Thybo T, Stevnsner T, Bohr VA. 2001 Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**, 285–297.
- DiMauro S. 2004 Mitochondrial diseases. *Bioch. et Bioph. Act.* **1658**, 80-88.



- DiMauro S, Hirano M., Kaufmann P., Tanji K., Sano M., Shungu DC, Bonilla E, DeVivo DC. 2002 Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. *Adv. Neurol.* **89**, 217–229.
- DiMauro S. and Hirano M, Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens CK and editors (1993) MELAS. Seattle (WA), University of Washington Seattle, Gene reviews [Internet; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1233/>] actualizado 2010 Oct 14
- Enriquez JA, Chomyn A and Attardi G. 1995. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of Trna(lys) and premature translation termination. *Nat Genet.* **10**, 47-55
- Falkenberg M., Larsson NG, Gustafsson CM. 2007 DNA replication and transcription in mammalian mitochondria, *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 679–699.
- Fan W et al. 2008 A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Sci.* **319**, 958–962.
- Fernandez-Silva P et al. 1997 The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO J.* **16**, 1066–1079
- Finister J. 2007 Genetic, pathogenetic and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation. *Acta Neurol. Scand.* **116**, 1–14.
- Finnilä S. 2000 Detection of mutations in patients with occipital stroke. In: *Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA*. Oulu: Oulu University Library 1-71.
- Finsterer J. 2007 Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation. *Acta Neurol. Scand.* **116**, 1–14.
- Finsterer J. 2008 Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr. Neurol.* **39**, 223-235.
- Finsterer J. 2009 Manifestations of the mitochondrial A3243G mutation. *Int. J. Cardiol.* **137**, 26–60.
- Fish J, Raule N, Attardi G. 2004 Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Sci.* **306**, 2098–2101.
- Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. 1980 Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? *J. Neurol. Sci.* **47**, 117–133.
- Gaspari, M. et al. 2004 The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *EMBO J.* **23**, 4606–4614
- Gilkerson R. 2009 Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *The Int. J of Bioch. & Cell Bio.* **41**, 1899–1906
- Goto Y, Horai S, Matsuoka T, Koga Y, Nihei K, Kobayashi M, Nonaka I. 1992 *Neuro.* **42**, 545–550.
- Goto Y, Nonaka I, Horai A. 1991 A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Nat.* **1097**(3), 238-240.
- Gutiérrez, A. Saldaña-Martínez, R. García-Ramírez, D. Rayo-Mares, M. Carreras, M.J. López-Pérez, E. Ruiz-Pesini, J. Montoya, J.F. Montiel-Sosa Síndrome de Leigh causado por la mutación G14459A del ADN mitocondrial en una familia mexicana. *rev neurol* 2009;49:248-250

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. 1988 Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nat.* **331**, 717–719.

Holt IJ, He J, Mao CC, Boyd-Kirkup JD, Martinsson P, Sembongi H, Reyes A, Spelbrink JN. 2007 Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mit.* **7**, 311–321.  
Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. 2000 Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**, 515–524.

Horton HR et al. 2008. Principios de Bioquímica. Horton. Cuarta edición. Prentice Hall

Houshmand M, Holme E, Hanson C, Wennerholm UB, Hamberger L. 1997 Is paternal mitochondrial DNA transferred to the off spring following intracytoplasmic sperm injection? *J Assist Reprod Genet* **14**, 223–27.

Hudson G, Chinnery PF. 2006 Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease, *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2: 244–252.

Huntsman RJ, Sinclair DB, Bhargava R, Chan A, 2005 Atypical presentations of Leigh syndrome: a case series and review. *Pediatr. Neurol.* **32**, 334–340.

Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. 2000 Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nat* **408**, 708–713.

Jacobs HT, Holt IJ. 2000 The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don't. *Hum Mol Genet* **9**: 463-5

Jacobs HT, Lehtinen SK, Spelbrink JN. 2000 No sex please, we're mitochondria: a hypothesis on the somatic unit of inheritance of mammalian mtDNA. *Bio.* **22**, 564–72.

Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen. 2000 A. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance, *Sci.* **289**, 782–785.

Kearns TP, Sayre GP. 1958 Retinitis pigmentosa, external opthalmoplegia and complete heart block. *Arch Ophthal.* **60**, 280-9

Kim, Y., Kweon, J., & Kim, J. S. 2013 TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures. *Nat Methods* **10**, 185.

Koolman J, Röhm KH. 2012. Bioquímica: Texto y atlas. Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana.

Korhonen JA, Pham XH, Pellegrini M, Falkenberg M. 2004 Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J.* **23**, 2423–2429.

Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. 2006 Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons, *Nat. Genet.* **38**, 518–520.

Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. 1989 Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* **58**, 391–397

Lee HF, Tsai CR, Chi CS, Lee HJ, Chen CC. 2009 Leigh syndrome: clinical and neuroimaging follow-up. *Pediatr. Neurol.* **40**, 88–93.

- Leigh D. 1951 Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **14**, 216–21.
- Leshinsky-Silver E et al. 2003 Neonatal liver failure and Leigh syndrome possibly due to CoQ-responsive OXPHOS deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **79**, 288- 293.
- Lopez E. 2007 Defectos en el DNA mitochondrial asociados a enfermedades del Sistema de fosforilación oxidativa. Universidad de Zaragoza
- Mangus DA et al.1994 Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. *J. Biol. Chem.* **269**, 26568–26574
- Marchington DR, Scott Brown MS, Lamb VK, et al. 2002. No evidence for paternal mtDNA transmission to off spring or extra-embryonic tissues after ICSI. *Mol. Hum Reprod.* **8**, 1046–49.
- Margulis, L. (1970). *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press.
- Marín S, Mesterman R et al. 2013 Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to novel mutations in *NDUFV1* and *NDUFS2*. *Gene* **516**, 162-167.
- Matsumoto J, Saver JL, Brennan KC et al. 2005 Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke (MELAS). *Rev. Neurol. Dis.* **2**, 30–34.
- McKelvie P, Infeld B, Marotta R et al. 2012 Late-adult onset Leigh syndrome. *Journal of Clinical Neuro.* **19**, 195-202.
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. 2009. <http://www.mitomap.org>. Consultado: 2013.
- Mercer J. 2013 Mitochondrial bioenergetics and therapeutic intervention in cardiovascular disease. *Pharma. & Theras***141**, 13-20
- Mkaouar-Rebai E et al. 2010 A case of Kearns–Sayre syndrome with two novel deletions (9.768 and 7.253 kb) of the mtDNA associated with the common deletion in blood leukocytes, buccal mucosa and hair follicles. *Mit.* **10**, 449 455
- Montiel-Sosa J. 2013 Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in a patient with Kearns–Sayre syndrome containing a novel 7629-bp deletion. *Mit. DNA* **24**, 420–431
- Montoya J, Gaines GL, Attardi G. 1983 The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* **34**, 151–159
- Montoya J. et al. 1982 Identification of initiation sites for heavy strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7195–7199
- Montoya J et al. 2006 Mitochondrial DNA transcripton and diseases: Past, present and future *Bioch. et Biophy Act.* **1757**, 1179–1189
- Moraes CT, Sciacco M, Ricci E, Tengan CH, Hao H, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S. 1995 Phenotype–genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. *Musc. Ner.* **3**, 150–S153.
- Morano A, Di Bonaventura C. 2012 Basal Ganglia Progressive myoclonic encephalopathies: From phenomenology to genes and proteins. **2**, 249–255.

- Moreira D, Lopez-Garcia P. 1998 Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J. Mol. Evol.* **47**, 517–530.
- Murphy R, Turnbull DM, Walker M. 2008 Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet. Med.* **25**, 383–399.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. 1981 tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nat* **290**, 470–474.
- Parra MV, Fermin P, Cornejo JW, et al. 2006 Genética de la citopatía mitocondrial MELAS (Encefalomiopatía Mitocondrial, Acidosis Láctica y Apoplejia). *Méd. UIS.* **19**, 15-5
- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. 1984 *Ann. Neurol.* **16**, 481–488.
- Pearce S *et al.* 2013 Mitochondrial diseases: Translation matters. *Mol. and Cel. Neuro.* **55**, 1-12.
- Puoti G, Carrara F, Sampaolo S, De Caro M, Vincitorio CM, Invernizzi F, Zeviani M. 2003 Identical large scale rearrangement of mitochondrial DNA causes Kearns–Sayre syndrome in a mother and her son. *J. Med. Genet.* **40**, 858– 863.
- Pyle A, Foltynie T, Tiangyou W et al. 2005 Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol.* **57**, 564–7
- Rahman S et al. 1996 Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* **39**, 343–351.
- Rantanen A. et al. 2003 Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mamm. Genome* **14**, 1–6
- Remes AM, Majamaa-Voltti K, Kärppä M, Moilanen JS, Uimonen S, Helander H, Rusanen H, Salmela PI, Sorri M, Hassinen IE, Majamaa K. 2005 Prevalence of large-scale mitochondrial DNA deletions in an adult Finnish population. *Neuro.* **64**, 976–981.
- Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ y Sykes BC. “Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe”. *Ann. Hum. Genet.*, 1998; 62:241-260.
- Saldaña A. 2009. Diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales: confirmacion de la mutacion A3243G en el ADNA mitocondrial asociada a la patología MELAS por medio de PCR-RFLP en familias mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Samuels DC, Schon EA, Chinnery PF. 2004 Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet.* **20**, 393–398.
- Santoro A, Balbi V, Balducci E et al. 2010 Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer’s disease. *PLoS One* **5**, 20-37
- Scaglia F, Northrop L. 2006 The mitochondrial myopathy encephalopathy, lacticacidosis with stroke-like episodes (MELAS) syndrome: a review of treatment options. *CNS Drugs* **20**, 443–464.
- Scarpulla RC. 2008 Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* **88**, 611–638.
- Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S. 1989 A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA, *Science* **244**, 346–349.

- Schwartz M, Vissing J. 2002 Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* **347**, 576–80.
- Seidel-Rogol BL et al. 2003 Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat. Genet.* **33**, 23–24
- Seneca S, Verhelst H, De Meirleir L, Meire F, Ceuterick-De Groote C, Lissens W, Van Coster R. 2001 A new mitochondrial point mutation in the transfer RNA (Leu) gene in a patient with a clinical phenotype resembling Kearns Sayre syndrome. *Arch. Neurol.* **58**, 1113–1118
- Shahwan A, Farrel M, Delanty N. 2005 Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects. *Lancet Neurol.* **4**, 239–248.
- Shang J. and Clayton DA. 1994 Human mitochondrial transcription termination exhibits RNA polymerase independence and biased bipolarity in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**, 29112–29120
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. 1990 Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* **61**, 931–937.
- Silvestri G, Ciafaloni E, Santorelli FM, Shanske S, Servidei S, Graf WD, Sumi M, DiMauro S. 1993 Clinical features associated with the A→G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology* **43(6)**, 1200-6
- Sohm B, Frugier M, Brule H, Olszak K, Przykorska A, Florentz C. 2003 *J. Mol. Biol.* **328**, 995–1010.
- Souza-Pinto NC, Mason PA, Hashiguchi K, Weissman L, Tian J, Guay D, Lebel M, Stevensner TV, Rasmussen LJ, Bohr VA. 2009 Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria DNA. *Repair (Amst)* **8**, 704-719.
- Spelbrink JN *et al.* 2001 Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* **28**, 223–231.
- St John J, Sakkas D, Dimitriadi K, et al. 2000 Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet* **355**, 200.
- Sumi M, DiMauro S. 1993 Clinical features associated with the A→G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology* **43**, 1200–1206.
- Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. 2004 Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online* **8**, 24–33.
- Taanman, JW. 1999 The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta* **1410**, 103-123
- Tay SK et al. 2005 Unusual clinical presentations in four cases of Leigh disease, cytochrome C oxidase deficiency, and SURF1 gene mutations. *J. Child Neurol.* **20**, 670–674.
- Temperley R, Richter R, Dennerlein S, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM 2010. Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes. *Science* **327**, 301.

- Thorburn D, Rahman S. 2003 Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. Gene Reviews <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1173/>.
- Tuppen H, Blakely E, Douglas M *et al.* 2010 Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**, 113-128.
- Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS. 2000 Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **123**, 1339–1348.
- Wallace DC. 2011 Bioenergetic Origins of Complexity and Disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**, 1-16
- Wallace DC. 2013 Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. Royal Society Publishing **368**, 1-9
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas II LJ, Nikoskelainen EK. 1988 Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**, 1427–1430.
- Wang Y, Bogenhagen DF. 2006 Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* **281**, 25791–25802.
- Watson J. 2006 *Biología Molecular del Gen*. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Wong LJ. 2007 Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. *Mitochondrion* **7**, 45–52.
- Wong L.-J. C. 2003 *Biochemical and Molecular Methods for the Study of Mitochondrial Disorders*. Springer Science, Business Media
- Yamakawa T. *et al.* 2001 Glomerulocystic kidney associated with subacute necrotizing encephalomyelopathy. *Am. J. Kidney Dis.* **37**, E14.
- Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ueda T, Ohta S and Wanatanabe K. 2000. Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett* **467**, 175-178.
- Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohia S, Watanabe K. 2000 Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem.* **275**, 425 1-7.
- Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, Holt IJ. 2006 Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J.* **25**, 5358–5371.
- Yoneda M, Tanno Y, Horai S, Ozawa T, Miyatake T, Tsuji S. 1999 A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA(Lys) of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem. Int.* **21**, 789–796.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. 1988 Deletions of mitochondrial DNA in Kearns–Sayre syndrome. *Neurology* **38**, 1339-1346.

## APENDICE I

### Protocolo de Transporte de Muestras para Análisis

- **Sangre**

Recolectar la muestra de sangre (3ml) en un tubo de ensaye con EDTA y mantener en frío.

- **Biopsia**

La muestra debe ser de aproximadamente 2.5cm x 0.5cm cortada en dirección paralela a la fibras musculares.

*Tejido Fresco:* Se prefiere al tejido congelado, se debe envolver la biopsia en una gasa húmeda con solución salina. NO sumergir la muestra en solución salina ya que puede interferir con el análisis. Guardar en un contenedor con hielo y procesar lo antes posible.

*Tejido Congelado:* Si la muestra no puede ser procesada dentro de una hora después de haberse tomado, debe congelarse. En un contenedor metálico verter 200ml de isopentano y agregar pedazos de hielo seco para enfriar el líquido, rodear el contenedor con hielo para mantenerlo frío. Estirar la muestra sobre una tarjeta y sumergirla en el líquido, esta técnica permite que la muestra se congele de manera uniforme, cuando esté lista empacar en hielo seco y enviar al laboratorio.

## APENDICE II

### Protocolo de Extracción de DNA a partir de sangre

Se realiza con el kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* de Qiagen.

1. Preparar un tubo Eppendorf de 1.5 o 2ml de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Muestra
Sangre	200 µl
Buffer AL	200 µl
Proteinasa K	20 µl

2. Mezclar en vortex e incubar a 56°C por 10 minutos.
3. Agregar 200 µl de etanol (96-100%) y agitar en vortex hasta tener una mezcla completamente homogénea.
4. Transferir la mezcla a una columna DNeasy Mini spin, contenida en un tubo de colector de 2ml.
5. Centrifugar a 8000rpm por 1 min.
6. Descartar el filtrado del tubo receptor y adicionar 500 µl de Buffer AW1 a la columna.
7. Centrifugar a 8000rpm por 1 min.
8. Descartar el filtrado del tubo receptor y adicionar 500 µl de Buffer AW2 a la columna.
9. Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm para secar la membrana de la columna.
10. Descartar el filtrado.
11. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 o 2 ml y adicionar 200 µl de Buffer AE directamente en la membrana e incubar a temperatura ambiente por 1 min.
12. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto.
13. Descartar la columna y conservar el tubo.



**Extracción de DNA a partir de tejido.**

Se realiza con el kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* de Qiagen.

1. Preparar un tubo Eppendorf de 1.5ml de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Muestra
Tejido	25mg
Buffer ATL	180 µl
Proteinasa K	20 µl

2. Mezclar en vortex e incubar a 56°C hasta que el tejido se haya lisado completamente. Mezclar en vortex ocasionalmente para promover la lisis.
3. Mezclar en vortex por 15 segundos y agregar lo siguiente al tubo de reacción, mezclando entre cada reactivo y al final.

Reactivo	Muestra
Buffer AL	200 µl
Etanol (96-100%)	200 µl

1. Transferir la mezcla (incluyendo el precipitado) a una columna DNeasy mini spin contenida en un tubo de 2ml.
2. Centrifugar a 8000rpm por 1 min.
3. Descartar el filtrado del tubo receptor y adicionar 500 µl de Buffer AW1 a la columna.
4. Centrifugar a 8000rpm por 1 min.
5. Descartar el filtrado del tubo receptor y adicionar 500 µl de Buffer AW2 a la columna.
6. Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm para lavar la membrana de la columna.
7. Descartar el filtrado.
8. Colocar la columna en un nuevo tubo receptor de 1.5ml y adicionar 200 µl de Buffer AE directamente en la membrana e incubar a temperatura ambiente por 1 min.
9. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto.
10. Descartar la columna y conservar el tubo colector.

## GLOSARIO

**Anemia sideroblástica:** trastorno en el que la médula ósea produce sideroblastos anillados en vez de glóbulos rojos sanos.

**Ataxia:** signo clínico que se caracteriza por provocar la descoordinación en el movimiento de las partes del cuerpo

**ATP:** Trifosfato de adenosina.

**Diencéfalo:** parte del encéfalo situada entre el telencéfalo y el mesencéfalo (cerebro medio).

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**DNTPs:** Desoxirribonucleosidos trifosfato.

**FADH<sub>2</sub>:** Flavín adenín dinucleótido

**Haplogrupo:** un grupo grande de haplotipos,

**Haplotipo:** combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos.

**Hemiparesia:** disminución de la fuerza motora o parálisis parcial que afecta un brazo y una pierna del mismo lado del cuerpo.

**Heteroplasmia:** Cuando no todas las copias de mtDNA de un individuo son idénticas.

**Hipoparatiroidismo:** trastorno causado por la hipofunción de las glándulas paratiroides, caracterizada por una muy baja concentración de hormona paratiroidea (PTH)

**Homoplasmia:** Cuando todas las copias de mtDNA de un individuo son iguales.

**HSP:** cadena pesada

**HVS:** Región hipervariable.

**IF<sub>mt</sub>:** Factor de iniciación mitocondrial

**IRM:** Imagen de resonancia magnética.

**Kb:** Kilobase.

**KSS:** Síndrome de Kearns-Sayre.

**LHON:** Neuropatía óptica hereditaria de Leber.

**LSP:** cadena ligera

**MELAS:** Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro vasculares.

**MERRF:** Epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas.

**MILS:** Síndrome materno hereditario de Leigh.

**Micologías:** movimientos involuntarios, breves, bruscos y repentinos, a modo de sacudidas.

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.

**mtDNA:** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

**mTERF:** Factor de terminación mitocondrial

**NADH:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.

**NARP:** Neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa.

**nDNA:** Ácido desoxirribonucleico nuclear.

**Neuropatía periférica:** insuficiencia de los nervios que llevan la información hasta y desde el cerebro y la médula espinal, lo cual produce dolor, pérdida de la sensibilidad e incapacidad para controlar los músculos.

**Nucleoide:** nivel organizacional del genoma mitocondrial

**Oftalmoplegia:** trastorno del sistema oculomotor que produce la incapacidad para mover voluntariamente el globo ocular.

**OH:** Origen de replicación de la cadena H.

**OL:** Origen de replicación de la cadena L.

**OXPPOS:** Fosforilación oxidativa.

**Pb:** Pares de bases.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PDH:** Piruvato deshidrogenasa

**PET:** Tomografía por emisión de positrones

**POE:** Oftalmoplégia externa progresiva.

**POLG:** DNA polimerasa gamma.

**POLRMT:** RNA polimerasa mitocondrial.

**mtSSB:** proteína mitocondrial de unión a cadena sencilla de DNA

**Ptoxis:** descenso permanente del párpado superior

**Retinitis pigmentosa:** conjunto de enfermedades oculares crónicas de origen genético y carácter degenerativo que se agrupan bajo este nombre. Se caracteriza por una degeneración progresiva de la estructura del ojo sensible a la luz, la retina, que poco a poco va perdiendo las principales células que la forman, los conos y los bastones.

**RFLP:** Polimorfismo en los fragmentos largos de restricción.

**RM:** Resonancia magnética.

**RRF:** Fibras rojo rasgadas.

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosomal.

**Síndrome de Fanconi:** enfermedad del riñón que se caracteriza por una alteración en los túbulos renales proximales que hace que se eliminen por la orina cantidades excesivas de varias sustancias: glucosa, fosfatos, bicarbonato y aminoácidos.

**TAC:** tomografía axial computarizada

**TCG:** Crisis tónico clónico generalizadas.

**TFAM:** Factor de iniciación de la transcripción.

**TFB1:** Factor de transcripción B1.

**TFB2M:** Factor de transcripción B2.

**tRNA:** Ácido ribonucleico de transferencia.

**tRNA<sup>Leu</sup>:** RNA de transferencia para leucina.

**tRNA<sup>Phe</sup>:** RNA de transferencia para fenilalanina.

**tRNA<sup>Ser</sup>:** RNA de transferencia para serina.

**tRNA<sup>Val</sup>:** RNA de transferencia para valina.