



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

“Identificación de variantes en el genoma
mitocondrial de población indígena mexicana
asociadas a Diabetes Mellitus Tipo 2”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

CARLOS JHOVANI PÉREZ AMADO

ASESOR: DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES

COASESOR: M. EN C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS



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**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR 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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de variantes en el genoma mitocondrial de población indígena mexicana asociadas a Diabetes Mellitus Tipo 2.

Que presenta el pasante: Carlos Jhovani Pérez Amado

Con número de cuenta: 307191991 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Febrero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Azucena Lee Mendoza	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

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

DEDICATORIAS

A mi padre, Juan Pérez, por darme las herramientas para construir mi camino...

A mi madre, Bruna Amado, por otorgarme la dedicación y el amor para realizar las cosas...

A mi hermana Claudia, por armarme con un carácter fuerte para seguir adelante...

A mi hermano Armando, por enseñarme a no perder la humildad en el camino...

A mis sobrinos Alan y Yatzil, quienes comienzan en la formación de su camino, para demostrarles que los objetivos se alcanzan con paciencia, voluntad y dedicación...

Y a la vida, por llenarme de experiencias únicas y darme la facultad y la capacidad para interpretarlas, manteniendo así la vista en el trayecto.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), por brindar los recursos y la infraestructura necesaria para la realización de este proyecto.
 - ❖ A la Dra. Silvia Jiménez Morales, por acogerme en su equipo de trabajo y darme su confianza, asesoría y enseñanzas para la elaboración de este proyecto, así como el otorgarme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación genómica y animarme a continuar con mi desarrollo académico y profesional.
 - ❖ A la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del INMEGEN, por enseñarme la metodología empleada para la secuenciación masiva. Así como a los miembros del grupo de Asma-Obesidad del INMEGEN, por permitirme formar parte de él y hacer amena mi estancia gracias a su apoyo y compañerismo.
 - ❖ A la UNAM, con cariño especial a la FES Cuautitlán por ser mi casa de estudios y fomentar mi desarrollo tanto personal como académico, sembrando las bases del conocimiento a través de todos sus académicos.
 - ❖ A la M. en C. Maritere Domínguez Rojas, por su coasesoría y por brindarme los fundamentos teóricos y prácticos en el área de Biología y Genética Molecular, los cuales fueron de suma importancia en formación profesional.
 - ❖ A los profesores de la sección de Bioquímica y Farmacología Humana, con distinción especial para la Dra. Gilda Flores Rosales, la QFB. Rosalba Bonilla Sánchez, la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y nuevamente a la M. en C. Maritere Domínguez Rojas, quienes sentaron los fundamentos básicos para ejercer mi profesión y aumentaron mi gusto por la genética, así como el orgullo de ser un Bioquímico Diagnóstico.
 - ❖ A quienes formaron parte de mi entorno durante todo este trayecto, mis amigos y colegas: Gaby Baez, Diego Lezama, Karina Albarrán e Irais Gutiérrez, con quienes aprendí un nuevo concepto de compañerismo y amistad, así como el de trabajar y colaborar académicamente.
 - ❖ A Angel Ponce, por llegar a mi vida y caminar este trayecto a mi lado, demostrándome su apoyo incondicional a cada momento y por enseñarme que la confianza nace a partir de uno mismo.
-

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
1 GENERALIDADES.....	3
1.1 Mitocondria.....	3
1.2 Estructura y función mitocondrial.....	3
1.3 Biogénesis mitocondrial	5
1.4 Genoma mitocondrial.....	7
1.5 Organización del DNA mitocondrial	8
1.6 Sistema genético mitocondrial.....	9
1.6.1 Replicación.....	10
1.6.2 Transcripción	10
1.6.3 Traducción	12
1.7 Genética mitocondrial.....	13
1.7.1 Modo de herencia	13
1.7.2 Poliplasmia.....	14
1.7.3 Heteroplasmia y Homoplasmia	14
1.7.4 Segregación mitótica	15
1.7.5 Expresión umbral.....	16
1.7.6 Alta tasa de mutación.....	18
1.8 Haplogrupos mitocondriales	19
1.9 Enfermedades Mitocondriales	21
1.9.1 Enfermedades causadas por mutaciones puntuales	22
1.9.2 Enfermedades causadas por rearrreglos.....	23
1.9.3 Enfermedades causadas por depleciones.....	25
1.10 Epidemiología de las enfermedades mitocondriales.....	26
1.11 Diabetes Mellitus.....	26
1.12 Prevalencia de DM en México.....	27
1.13 Diabetes Mellitus Tipo 2.....	29
1.14 Mutaciones mitocondriales asociadas a DM2.	31
1.15 Efecto de las mutaciones mitocondriales en el mecanismo de secreción de insulina.....	32
1.16 Diagnóstico genético de enfermedades mitocondriales.....	34
1.17 Secuenciación	34
1.17.1 Secuenciación de Sanger	35
1.17.2 Secuenciación de Siguiete Generación (NGS).....	36
1.17.3 Secuenciación Ion Torrent.....	37
2 JUSTIFICACIÓN	39
3 HIPÓTESIS	39
4 OBJETIVOS	40

4.1	Objetivo General	40
4.2	Objetivos Particulares.....	40
5	MEDOTOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	41
5.1	Estrategia general.....	41
5.2	Población de estudio	41
5.3	Materiales, equipos y reactivos.....	42
5.4	Análisis molecular	42
5.4.1	Evaluación de integridad de las muestras.....	42
5.4.2	Secuenciación Ion Torrent.....	42
5.5	Análisis de datos.....	51
5.6	Validación de resultados.....	51
5.6.1	PCR Touchdown.....	51
5.6.2	Purificación de Amplicones	52
5.6.3	Reacción de secuenciación.....	53
6	RESULTADOS.....	54
6.1	Población analizada	54
6.2	Análisis molecular.....	56
6.2.1	Controles de calidad para la secuenciación masiva	56
6.2.2	Número y naturaleza de las variantes identificadas.....	57
6.2.3	Variantes nuevas	58
6.2.4	Diversidad interindividual y haplogrupos	61
6.2.5	Diversidad interétnica	63
6.2.6	Variantes asociadas a DM2	64
7	DISCUSIÓN	66
8	CONCLUSIONES.....	73
9	REFERENCIAS	74
10	ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema general de la estructura mitocondrial..	5
Figura 2: Biogénesis mitocondrial..	7
Figura 3: Mapa del genoma mitocondrial	9
Figura 4: Esquema del proceso de transcripción y replicación del mtDNA.	12
Figura 5: Patrón de herencia mitocondrial.....	14
Figura 6: Genotipos mitocondriales	15
Figura 7: Segregación mitótica	16
Figura 8: Expresión Umbral.	17
Figura 9: Variabilidad clínica de los defectos mitocondriales.	18
Figura 10: Haplogrupos mitocondriales.....	20
Figura 11: Mapa de enfermedades mitocondriales.	21
Figura 12: Deleciones mitocondriales	25
Figura 13: Prevalencia mundial de DM..	28
Figura 14: Prevalencia de DM en México	29
Figura 15: Mecanismo molecular de la excreción de la insulina.....	33
Figura 16: Secuenciación Automática de Sanger	36
Figura 17 Secuenciación por Ion Torrent	37
Figura 18: Fundamento de la secuenciación por Ion Torrent	38
Figura 19: Población analizada	54
Figura 20: Número de lecturas obtenidas.....	56
Figura 21: Porcentaje de densidad de ISP cargadas al semiconductor	56
Figura 22: Datos del alineamiento de la secuencia obtenida con la del mtDNA	57
Figura 23: Electroferograma de la variante 311C-ins en la muestra AM1299	59
Figura 24: Electroferograma de la variante 311C-ins.....	59
Figura 26: Electroferograma de la variante 8271 ACCCCCTCTAC-del	60
Figura 25: Electroferograma de la variante 514 CA-del	60
Figura 27: Localización de las variantes en el genoma mitocondrial.....	61
Figura 28: Diagrama de Venn.	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Mutaciones puntuales del mtDNA asociadas a fenotipos específicos	23
Tabla 2: Rearreglos mitocondriales asociadas a fenotipos	24
Tabla 3: Reactivos para la PCR larga.....	43
Tabla 4: Condiciones de termociclaje para PCR larga	43
Tabla 5: Condiciones de sonicación para la fragmentación del mtDNA.	45
Tabla 6: Reactivos de la ligación de adaptadores a las bibliotecas.....	46
Tabla 7: Condiciones de termociclaje para la ligación de adaptadores a la biblioteca	47
Tabla 8: Condiciones de termociclaje para la PCR de amplificación de bibliotecas.	48
Tabla 9: Condiciones de termociclaje para qPCR	48
Tabla 10: Componentes de la emPCR	50
Tabla 11: Reactivos por reacción para la PCR Touchdown.	52
Tabla 12: Programa de termociclaje PCR Touchdown.	52
Tabla 13: Condiciones de termociclaje para secuenciación por electroforesis capilar.	53
Tabla 14: Datos demográficos y bioquímicos de los pacientes seleccionados para el estudio	55
Tabla 15: Total y tipos de variantes encontradas.....	58
Tabla 16: Características de las variantes sugeridas como nuevas.....	58
Tabla 17: Características de las variantes validadas	60
Tabla 18: Número de variantes por individuo.....	62
Tabla 19: Variantes compartidas por todas las etnias y los individuos analizados.....	64
Tabla 20: Variantes identificadas en pacientes con DM2.	65

ABREVIATURAS

ADP: Adenosin difosfato	mTERF: Factor mitocondrial de terminación de la transcripción
ATP: Adenosin trifosfato	mTFA: Factor de transcripción mitocondrial
CBS: Bloque de secuencias conservadas	mtSSB: Proteína de unión al DNA de hebra única
CCM: Clivaje químico por desajuste	NARP: Neuropatía Ataxia y Retinitis Pigmentosa
CPEO: Oftalmoplejia crónica progresiva externa	nDNA: DNA nuclear
DM: Diabetes Mellitus	O_H: Origen de replicación de la cadena pesada
DM1: Diabetes Mellitus Tipo 1	O_L: Origen de replicación de la cadena ligera
DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2	OPA: Proteína de Atrofia Óptica
DMHM: Diabetes Mellitus de herencia materna	OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa
Drp: Proteína tipo dinamina	PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
EMC: Encefalomiopatía	PEO: Oftalmoplegia progresiva externa
emPCR: PCR en emulsión	PGM: Personal Genome Machine
ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	PPAR: Receptor activado proliferador de peroxisomas
FBSN: Necrosis estriatal bilateral familiar	PPK: Queratoderma palmoplantar
FID: Federación Internacional de Diabetes	qPCR: PCR cuantitativa
HVR: Región hipervariable	rCRS: Secuencia revisada de referencia de Cambridge
ISP: Partículas Ion Sphere	RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
IT_H: Sitio de inicio de la transcripción de la cadena pesada	ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
IT_L: Sitio de inicio de la transcripción de la cadena ligera	rRNA: RNA ribosomal
KSS: Síndrome de Kearns Sayre	SIDS: Síndrome de Muerte Infantil Repentina
LHON: Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber	tRNA: RNA de transferencia
LS: Síndrome de Leigh	VDCA: Canal aniónico dependiente de voltaje
MELAS: Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares	
MERRF: Epilepsia miocrónica con fibras rojo-rasgadas	
Mfn: Mitofusina	
MODY: Diabetes de inicio temprano en jóvenes (del inglés Maturity Onset Diabetes of the Young).	
mRNA: RNA mensajero	
mtDNA: DNA mitocondrial	

RESUMEN

La Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) es una enfermedad en cuya etiología se ven implicados factores tanto ambientales como genéticos. Dentro de estos últimos, se ha descrito la participación de variantes en la secuencia del genoma mitocondrial. El objetivo de este estudio fue la identificación de variantes en el DNA mitocondrial (mtDNA) potencialmente asociadas a DM2 en individuos indígenas de México. Para ello, se incluyeron 25 individuos pertenecientes a los grupos étnicos Huasteco, Maya, Mazateco, Mixe, Náhuatl, Otomí, Seri, Tarahumara y Zapoteco, cuyo DNA mitocondrial fue secuenciado a través de la plataforma de Secuenciación de Nueva Generación Ion Torrent. Los resultados mostraron un total de 198 variantes, de las cuales 12 (6.1%) no se encontraron registradas en MITOMAP, validándose la 310C-ins, 311C-ins, 514CA-del y la ACCCCCTCT-del. Los haplogrupos identificados fueron con mayor frecuencia el A, C, B y D. Interesantemente se detectó que las variantes que han sido asociadas a DM2 en otras poblaciones tienen una alta frecuencia en México, por ejemplo los polimorfismos A1438G, A10398G, T16189C y C5178A estuvieron representados en el 100%, 32%, 16% y 8% de la población total, respectivamente. Nuestros resultados sugieren la existencia de una gran heterogeneidad genética tanto individual como entre los diferentes grupos étnicos analizados. Así mismo, muestran la necesidad de nuevos estudios que ayuden a determinar el efecto biológico de las variantes descritas y a conocer su asociación con el desarrollo de la DM2 y otras entidades humanas.

INTRODUCCIÓN

Nuestras células son elementos altamente informativos, el DNA contenido en ellas que codifica todo lo que somos, reside no solo en el núcleo, sino también en las numerosas mitocondrias localizadas en el citoplasma. Dado el gran papel de la mitocondria como generadora de la energía necesaria para la supervivencia celular, se ha descrito su participación en un gran número de procesos bioquímicos cuya disfunción conlleva a la presentación de diversas patologías humanas. Éstas constituyen un grupo de entidades altamente heterogéneas, en sus manifestaciones clínicas, conocidas como enfermedades mitocondriales. Estudios recientes han demostrado que una de estas enfermedades es la DM2, patología que actualmente es el centro de una gran cantidad de estudios debido al drástico aumento de su prevalencia a nivel mundial en los últimos años. México, no se queda atrás, pues la prevalencia de DM2 también ha ido en aumento. Algunos estudios atribuyen este comportamiento al predominio del componente genético indígena de la actual población mexicana, el cual ha demostrado tener una contribución importante en la susceptibilidad para ésta y otras entidades metabólicas. Como las investigaciones realizadas en población mexicana se centran en el estudio del DNA nuclear (nDNA), este trabajo hace empleo de tecnologías de secuenciación de nueva generación, tal y como lo es la secuenciación masiva a través de la plataforma Ion Torrent, para encontrar variantes contenidas en el mtDNA que se encuentren asociadas a DM2.

1 GENERALIDADES

1.1 Mitocondria

La mitocondria es un organelo semiautónomo y autorreproducible, localizado en el citoplasma de las células eucariotas. Su tamaño y forma asemejan al de una típica bacteria. La función principal de la mitocondria es la producción de energía celular en forma de trifosfato de adenosina (ATP) a través de la fosforilación oxidativa (Solano et al, 2001; Area-Gomez, 2014).

El nombre de “mitocondria” fue atribuido por Carl Benda en 1894 y deriva de las raíces griegas *mitos*, hilo, y *condros*, gránulo (Jiménez, 2003). Numerosas investigaciones indican que las mitocondrias evolucionaron de α -protobacterias que fueron endocitadas por células ancestrales que contenían un núcleo eucarionte, formando endosimbiontes. A lo largo del tiempo evolutivo, la mayoría de los genes bacterianos que codifican para los componentes de los orgánulos fueron transferidos al núcleo; sin embargo las mitocondrias actuales retienen material genético que codifica para elementos esenciales en su funcionamiento (Lodish et al, 2006).

1.2 Estructura y función mitocondrial

La mitocondria es un organelo con un tamaño que va de 0.5 a 1 μm aproximadamente. A nivel estructural, su forma semeja al de un frijol con numerosos gránulos. Posee dos membranas (Fig. 1); la que se encuentra en contacto con el citoplasma se conoce como membrana externa, la cual a su vez, genera un espacio intermembranal al rodear a otra denominada membrana interna. Esta última, limita al espacio interno conocido como matriz mitocondrial (Jiménez, 2003).

La membrana externa es permeable a moléculas con un peso molecular de hasta 10 000 Daltons, contiene canales de membrana no selectivos y está compuesta por cantidades similares de proteínas y lípidos (Akouchekian, 2008).

La membrana interna tiene una composición del 20% de lípidos y 80% de proteínas aproximadamente, lo que la convierte en una de las membranas celulares con más proteínas en su composición y altamente impermeable; de hecho todas las moléculas y iones requieren de un transportador especial para atravesarla. Esta membrana está organizada en invaginaciones que se proyectan hacia el interior de la matriz, las cuales se denominan crestas y contienen los complejos enzimáticos del proceso de fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP (Akouchekian, 2008).

En cuanto a su estructura interna, la mitocondria presenta numerosos pliegues formados por las crestas (Fig. 1). La matriz contiene cientos de enzimas partícipes de las rutas metabólicas así como varias copias de mtDNA, ribosomas, tRNAs y enzimas requeridas para la transcripción y traducción de los genes mitocondriales. También existen sitios de contacto entre las membranas interna y externa que son formadas durante el transporte de precursores proteicos (codificados en el núcleo) hacia el interior de la matriz mitocondrial (Akouchekian, 2008).

La mitocondria está íntimamente relacionada con la homeostasis celular. Juega un papel importante en la señalización intracelular, en la apoptosis y la regulación de calcio; así mismo funge como intermediario en el desarrollo de numerosas rutas del metabolismo energético como el Ciclo de Krebs, la β -oxidación, el metabolismo de aminoácidos, del colesterol, de esteroides, de nucleótidos, el ciclo de la urea y la producción de ATP a través de la cadena respiratoria (Bendelt et al, 2006).

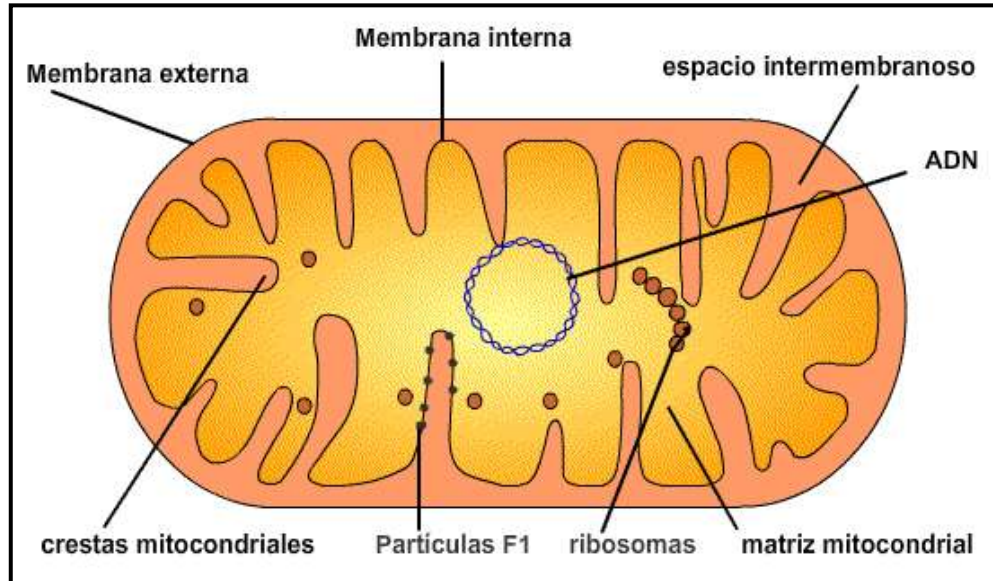


Figura 1: Esquema general de la estructura mitocondrial. Se ilustran las partes principales de la mitocondria: membrana interna, membrana externa, crestas, espacio intermembranoso, matriz mitocondrial, DNA, ribosomas y partículas F1 (correspondientes a la porción F1 del Complejo V de la cadena respiratoria).

1.3 Biogénesis mitocondrial

La expresión de los genomas mitocondrial y nuclear debe coordinarse con el fin de producir nuevas mitocondrias, pero hasta ahora se conoce muy poco acerca de los mecanismos que regulan la interacción de ambos sistemas genéticos. Aunque los genes nucleares codifican más del 95% de las proteínas mitocondriales, la mitocondriogénesis requiere de la producción de las proteínas más hidrófobas de la cadena transportadora de electrones, así como tRNA y rRNA codificados por el mtDNA (López-Lluch et al, 2008).

Las mitocondrias son capaces de llevar a cabo 2 procesos: 1) Fusión, el cual es necesario para ayudar a mitigar el estrés oxidativo por medio de la mezcla de los contenidos de una mitocondria parcialmente dañada y una sana, siendo una forma de complementación proteica y de reparación al DNA dañado; y 2) Fisión, a fin de generar nuevas mitocondrias que son necesarias durante el crecimiento y división celular (Fig. 2). Hasta la fecha, las proteínas mejor caracterizadas que intervienen en la dinámica mitocondrial son la mitofusina 1 y 2 (Mfn1, Mfn2, mediando la fusión de la membrana

externa mitocondrial), la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1, implicada en la fusión de la membrana interna mitocondrial), y la proteína tipo dinamina 1 (Drp1, impulsando la fisión mitocondrial). (Eynon et al, 2011; Youle and Van der Bliek, 2012 y Chen et al, 2014).

A nivel molecular, varios factores de transcripción y cofactores están implicados en la activación y regulación de la mitocondriogénesis. Estos factores se pueden agrupar en tres grupos principales: los factores de transcripción ubicuos (SP1, YY1, CREB, MEF-2 / E-box), factores respiratorios nucleares (NRF-1, -2, REBOX / OXBOX, MT-1 a - 4) y coactivadores (PGC-1a, 1b, PCR). Todos ellos participan en una red compleja que también incluye componentes de la vía de señalización inducidas por hormonas. El conjunto de factores de transcripción implicado en la adaptación metabólica, incluye a la familia del Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas (PPAR) y el receptor X del Hígado (LXR), los cuales junto con PGC-1a, incrementan la biogénesis mitocondrial y el catabolismo de ácidos grasos (López-Lluch et al, 2008).

A pesar de la complejidad de las diversas vías de señalización que convergen para regular la biogénesis mitocondrial, todas estas vías parecen compartir el componente clave común de la familia PGC-1 de los factores co-transcripción. Específicamente se ha demostrado que PGC-1a actúa como un mediador intracelular común durante la biogénesis inducida por factores hormonales tiroideos. Así mismo parece que PGC-1a actúa como un regulador maestro de metabolismo de la energía y la mitocondriogénesis mediante la integración y coordinación de la actividad de múltiples factores de transcripción, tales como NRF-1, NRF-2, PPARα y mtTFA (López-Lluch et al, 2008).

Se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y PGC-1a podrían ser mediadores clave en la biogénesis y la remodelación mitocondrial, los cuales estimulan la síntesis del factor de iniciación de la transcripción mitocondrial (mtTFA), este último, un efector final para la activación de la replicación del mtDNA (Eynon et al, 2011; López-Lluch et al, 2008).

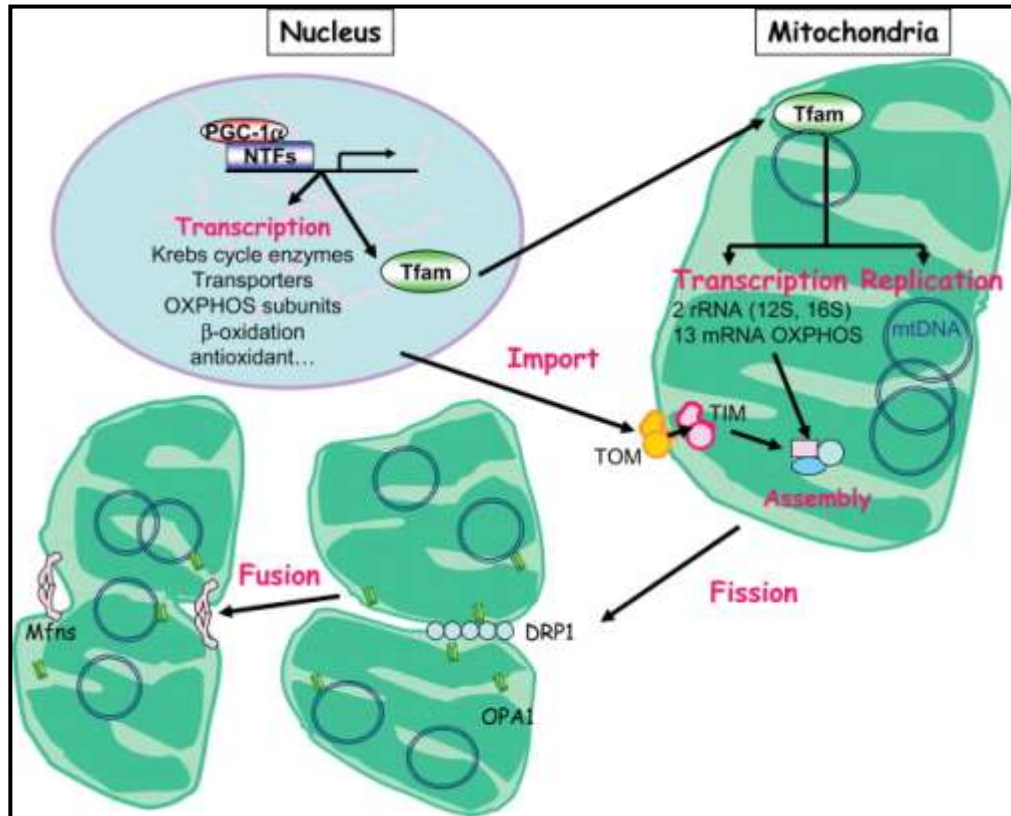


Figura 2: Biogénesis mitocondrial. Se esquematiza la interacción núcleo-mitocondria, así como los procesos de fusión y fisión realizados en favor de la homeostasis de la función mitocondrial (Ventura-Clapier et al, 2008).

1.4 Genoma mitocondrial

El mtDNA humano fue la primera molécula de DNA en ser secuenciada y se realizó en 1981 por Anderson y colaboradores (Akouchejian, 2008) a partir de una muestra de placenta humana que posteriormente, fue resecuenciada por Andrews y su grupo de Cambridge., secuencia denominada rCRS (Revised Cambridge Reference Sequence) y que actualmente se constituye como la referencia (Bendelt et al, 2006).

El tamaño del mtDNA, el número y la naturaleza de las proteínas que codifica y aun el mismo código genético mitocondrial presentan notables variaciones en distintos organismos. Se ha descubierto que en todos ellos, este genoma codifica para rRNA, tRNA y proteínas mitocondriales esenciales. Todas las proteínas codificadas por el mtDNA son sintetizadas sobre ribosomas mitocondriales y corresponden a subunidades

de los complejos multiméricos que componen el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Lodish et al, 2006).

1.5 Organización del DNA mitocondrial

El mtDNA es una pequeña molécula duplohelicoidal circular cerrada que consta de 16 569 pb. Tiene dos cadenas, una denominada cadena H (heavy o pesada) que es rica en guanina y una cadena L (light o ligera) rica en citosinas (Akouchejian, 2008). Codifica para un total de 37 genes que corresponden a 2 rRNA encontrados en los ribosomas mitocondriales (12S rRNA y 16S rRNA), los 22 tRNA utilizados para traducir los mRNA mitocondriales y 13 subunidades proteicas que forman parte de cuatro de los cinco complejos enzimáticos necesarios en el sistema OXPHOS (Fig. 3) (Lodish et al, 2006; López-Pérez, 2012). Estos péptidos corresponden a siete subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6) del Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa); una subunidad (Cyt b) del Complejo III (Ubiquinona-Citocromo C oxidoreductasa); tres subunidades (COI, COII y COIII) del Complejo IV (Citocromo C reductasa); y dos subunidades (A6 y A8) del Complejo V (ATP sintetasa) (Anderson, 1981; López-Pérez, 2012).

El mtDNA tiene una organización extremadamente compacta: no contiene intrones, algunos genes se llegan a sobrelapar y es difícil encontrar pares de bases que no formen parte de un gen. A excepción de la región D-loop, sólo 87 pb forman parte de regiones intergénicas (Lewin, 1994).

La única zona del mtDNA no codificante es un fragmento de 1.1 kb que corresponde al 7% del DNA, denominado D-loop, bucle de desplazamiento o región control que se localiza alrededor del origen de replicación de una de las cadenas. El D-loop está envuelto en la regulación de la transcripción y replicación de la molécula. Se extiende de la posición 16 024 a la 576 y contiene tres regiones hipervariables (HVR, del inglés Hypervariable Region) cortas, HVRI, HVR2 y HVR3, las cuales a comparación del resto del

genoma, poseen una secuencia altamente variable a nivel poblacional (López-Pérez, 2012; Bendelt et al, 2006).

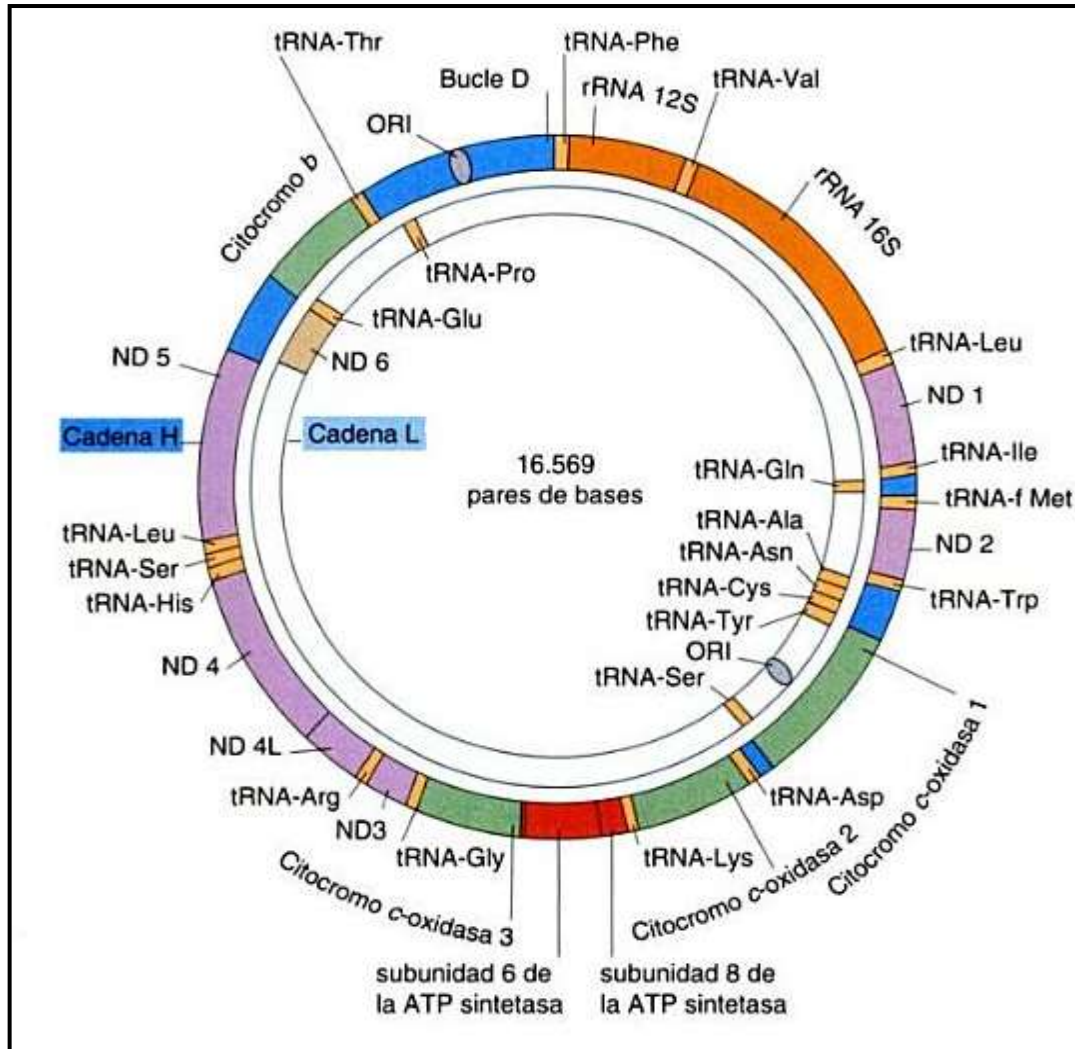


Figura 3: Mapa del genoma mitocondrial. Se esquematiza la estructura del mtDNA indicando las regiones que codifican para rRNA, tRNA para los diferentes aminoácidos y las regiones codificantes de proteínas (Passarge, 2007).

1.6 Sistema genético mitocondrial

Una de las características singulares de la mitocondria es la de poseer un mecanismo genético propio con toda la maquinaria necesaria para la síntesis de DNA, RNA y de proteínas; procesos que ocurren de manera independiente al ciclo celular y de la

maquinaria genética nuclear. Sin embargo, las mitocondrias no son autónomas del todo, ya que tanto la formación del orgánulo como la expresión de su genoma dependen de un gran número de proteínas codificadas en el núcleo, las cuales son sintetizadas en los ribosomas citoplásmicos e importadas a la mitocondria. Dentro de estas proteínas destacan la mtDNA polimerasa γ (Pol γ), la RNAm polimerasa, el factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA o TFAM), la proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB), la helicasa Twinkle y otras proteínas no identificadas aún (López-Pérez et al, 2012; Akouchekian, 2008; Montoya, 2005).

1.6.1 Replicación

El modelo de replicación más aceptado consiste en una replicación unidireccional y asimétrica que sugiere que las dos hebras se replican de manera continua a partir de dos orígenes de replicación ampliamente separados (Fig. 4), uno en la cadena pesada (O_H) y otro en la cadena ligera (O_L) (Akouchekian, 2008; Montoya, 2005).

La síntesis del DNA se inicia en O_H y es realizada por una polimerasa específica de la mitocondria, la DNAPoly. Ésta alarga un primer de RNA, el cual surge del procesamiento de un transcrito primario que se sintetiza a partir del promotor L. La síntesis de la cadena naciente continúa elongándose de modo unidireccional hasta alcanzar el origen de replicación de la cadena ligera O_L , momento en el cual se establece una estructura lazo-tallo que constituye el origen de replicación de la hebra L. Este punto sirve como región de reconocimiento de una DNA primasa mitocondrial que sintetizará un cebador corto de RNA, a partir de cual, la DNAPol γ elongará la cadena de forma unidireccional en sentido opuesto a la síntesis de la cadena pesada. La cadena ligera naciente termina su síntesis poco después que la cadena pesada naciente (López-Pérez et al, 2012; Montoya, 2005).

1.6.2 Transcripción

El modelo de transcripción y de procesamiento del RNA que se ha descrito es denominado por puntuación por tRNAs. Este sistema establece que la transcripción del

mtDNA se inicia a partir de tres puntos de iniciación diferentes, uno para la cadena ligera (IT_L) y dos para la cadena pesada (IT_{H1} y IT_{H2}) (Fig. 4). Este mecanismo da lugar a tres moléculas policistrónicas largas que se procesan por cortes endonucleolíticos precisos delante y detrás de los tRNAs, los cuales actúan como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento y dan lugar a los rRNAs, tRNAs y mRNAs maduros (Bendelt et al, 2006) Para llevar a cabo este proceso de transcripción se necesita una RNA polimerasa específica (h-mtRPOL), dos factores de iniciación de la transcripción (mtTFA y mtTFB) y uno de terminación (mTERF), todos ellos codificados en el nDNA (López-Pérez et al, 2012; Montoya, 2005).

La cadena ligera se transcribe mediante una única unidad de transcripción que empieza en el lugar de iniciación IT_L , dando lugar a 8 tRNAs y al único mRNA codificado (ND6) en esa cadena. El inicio de la síntesis del mtDNA depende de la actividad de esta unidad de transcripción, ya que se sintetiza el cebador necesario para el proceso de replicación. La primera unidad de transcripción de la cadena pesada que se genera comienza en el lugar de iniciación IT_{H1} , y es responsable de la síntesis de los rRNAs 12S y 16S, del tRNA^{Phe} y del tRNA^{Val}. Un factor de terminación (mTERF) actúa uniéndose en el gen del tRNA^{Leu} en una secuencia inmediatamente posterior al gen del rRNA 16S. El segundo proceso de transcripción, comienza en el punto de iniciación IT_{H2} y produce un RNA policistrónico que corresponde a casi la totalidad de la cadena pesada. Los mRNAs de los 12 péptidos y 14 tRNAs, codificados en esta cadena, se originan por procesamiento de este RNA policistrónico (López-Pérez et al, 2012; Montoya, 2005).

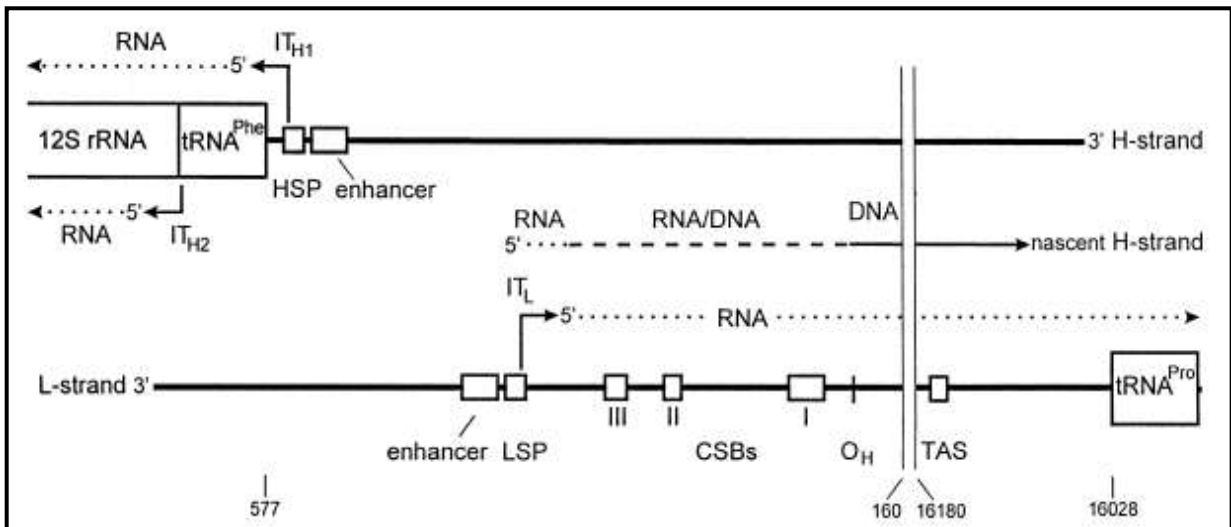


Figura 4: Esquema del proceso de transcripción y replicación del mtDNA. Se representa la región control o D-loop. Los cuadros grandes muestran los genes adyacentes y los cuadros pequeños corresponden a las secuencias implicadas en el control de la transcripción y replicación. IT_{H1} e IT_{H2} son los sitios de iniciación de la transcripción de la cadena pesada, mientras que IT_L es el sitio de inicio de la transcripción de la cadena ligera. O_H señala el origen de replicación de la cadena pesada. Las líneas punteadas indican la dirección de la transcripción. La línea discontinua muestra la posición del cebador que comienza la replicación mientras que la línea continua corresponde a DNA sintetizado. LPS: promotor de la cadena ligera; HSP: promotor de la cadena pesada (Taanman, 1999).

1.6.3 Traducción

Los mRNA mitocondriales se traducen en los mitorribosomas, los cuales son ricos en proteínas ya que están compuestos por 78 proteínas ribosómicas. Éstas son codificadas en el nDNA y los RNA en el mtDNA. Los rRNAs mitocondriales son más pequeños que los citosólicos, por lo que han reclutado nuevas proteínas para sustituir las funciones perdidas con los segmentos de rRNA eliminados (Montoya, 2005).

Por otra parte, el código genético utilizado por la mitocondria es diferente al código genético universal. En la mitocondria humana, el codón UGA codifica para el triptófano en lugar de ser uno de los codones de terminación. Los codones AUA, AUU y AUG, se utilizan como codones de iniciación, y AGA, AGG, los cuales son codones de arginina en el código universal, en la mitocondria señala la terminación de la traducción. Los

polipéptidos sintetizados en la mitocondria interaccionan con los componentes del sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria (OXPHOS, del inglés Mitochondrial Oxidative Phosphorylation). Los componentes del complejo OXPHOS son codificados en el nDNA, sintetizados en ribosomas del citosol e importados a la mitocondria (López-Pérez et al, 2012).

1.7 Genética mitocondrial

Las diferencias entre el mtDNA y el nDNA no sólo existen a nivel estructural de la molécula, la localización del sistema genético mitocondrial en un orgánulo citoplasmático implica que la herencia de este genoma difiere de la del nDNA. El núcleo y su DNA se duplican antes de cada división celular, originando una copia idéntica, de forma que las células reciben una misma dotación genética. Sin embargo, esto no ocurre en la mitocondria y su DNA, donde el proceso de división puede tener lugar por bipartición, estrangulación o gemación. Además, la división mitocondrial no tiene por qué coincidir con el periodo de división de la célula (López-Pérez et al, 2012).

1.7.1 Modo de herencia

El mtDNA presenta una herencia vertical no mendeliana, siendo heredado exclusivamente por vía materna (Fig. 5). Esto a causa del elevado número de copias de mtDNA que contiene el óvulo y a que en el gameto masculino, las mitocondrias se localizan predominantemente en la cola del espermatozoide, por lo que no participa en la fecundación (Rodríguez-Violante et al, 2010). Las mitocondrias del espermatozoide que logran entrar al ovocito son marcadas selectivamente con ubiquitina y aparentemente removidas. Recientemente se ha observado que incluso antes de la eliminación de las mitocondrias del espermatozoide, el mtDNA es degradado (Montoya, et al, 2009). Por tanto la madre transmite el genoma mitocondrial a todos sus hijos pero solo las mujeres lo transmiten de nuevo a la siguiente generación.

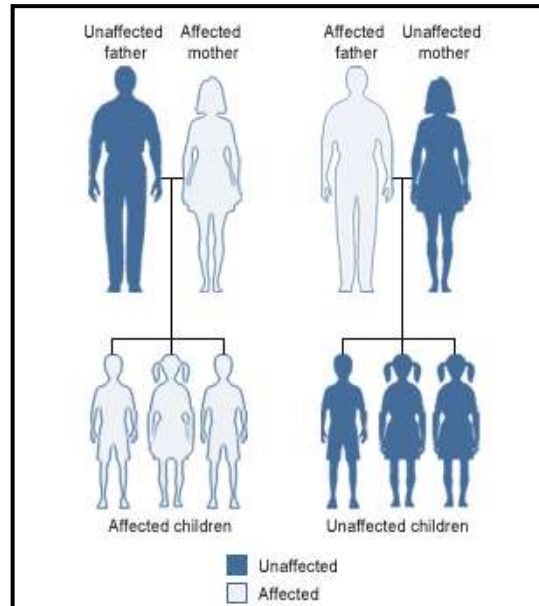


Figura 5: Patrón de herencia mitocondrial. Cuando la madre es afectada toda la descendencia presenta la afección (izquierda). Al contrario de cuando el padre es el afectado, ya que la afección no se establece en la descendencia (derecha).

1.7.2 Poliplasmia

Se designa así el elevado número de copias de mtDNA que existe en cada mitocondria y, por extensión, en la célula. Una mitocondria puede contener entre 2 y 10 moléculas de mtDNA, por lo que el número de copias de mtDNA por célula oscila entre 1000 y 10000. Tal particularidad hace muy recomendable el estudio de mtDNA en los casos en los que el material genético de partida es muy escaso o está muy degradado, como acostumbra a suceder en los restos antiguos (Montoya, et al, 2009).

1.7.3 Heteroplasmia y Homoplasmia

El concepto de *heteroplasmia* se refiere a la presencia de dos o más tipos diferentes de DNAm_t en la misma mitocondria, célula o individuo; puede producirse por errores en su replicación o por el daño causado por radicales libres resultantes del metabolismo oxidativo. La heteroplasmia afecta a las moléculas de mtDNA del ovocito y por tanto puede transmitirse a la descendencia, que habitualmente manifiesta niveles variados de

la misma debido a la segregación aleatoria de las mitocondrias durante la ovogénesis. En contraposición, se denomina *homoplasmia* a la presencia de un único tipo de mtDNA en la misma mitocondria, célula o individuo (Solano et al, 2001; López-Pérez et al, 2012).

1.7.4 Segregación mitótica

El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular ya que las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas, cuando existe una heteroplasmia, pueden dar lugar a tres posibles genotipos: homoplásmico normal, homoplásmico mutante y heteroplásmico (Fig. 6), con porcentajes variables de DNAm_t mutado. En consecuencia, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje y naturaleza del DNA mutado que contenga (Fig. 7). Como los diferentes tejidos y órganos se forman a partir de un grupo de estas células, una de las características de las enfermedades mitocondriales es que suelen ser multisistémicas (Solano et al, 2001).

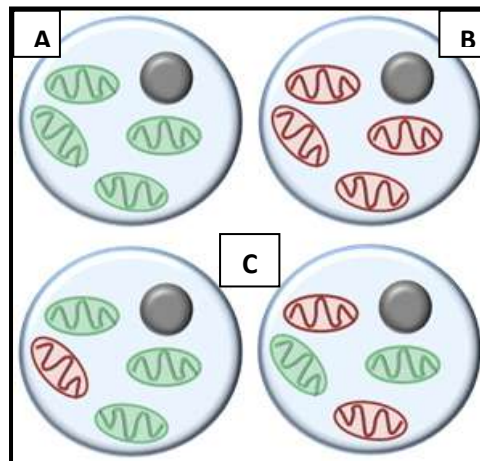


Figura 6: Genotipos mitocondriales. A) Homoplasmia de mitocondrias normales, B) Homoplasmia de mitocondrias dañadas, y C) Heteroplasmia en diferentes grados.

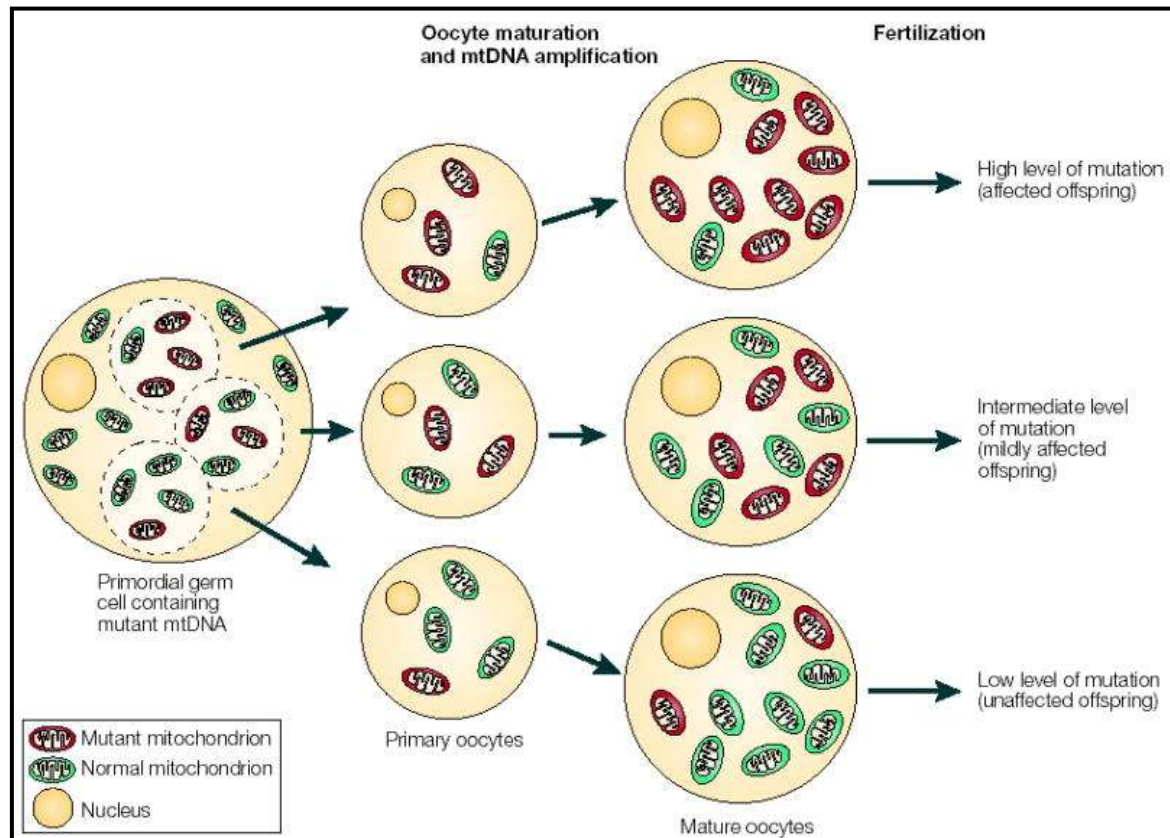


Figura 7: Segregación mitótica. Se esquematiza la segregación al azar de las mitocondrias durante la división celular, generando células descendientes con diferente tipo de mitocondrias (Taylor, 2005).

1.7.5 Expresión umbral

Se refiere al porcentaje mínimo de mtDNA mutado necesario para que se exprese alguna condición patológica (Campos et al, 2007). El fenotipo de una célula en heteroplasmia dependerá del porcentaje de DNA dañado que exista en la célula (Fig. 8); es decir, del grado de heteroplasmia de una mutación. Cuando el número de moléculas de mtDNA mutadas es pequeño, el DNAm normal es capaz de mantener la función mitocondrial. Sin embargo, cuando el número de copias de mtDNA mutado sobrepasa un umbral determinado, la producción de ATP decrece por debajo del mínimo necesario para la función tisular, llevando al desarrollo de una patología (López-Pérez et al, 2012).

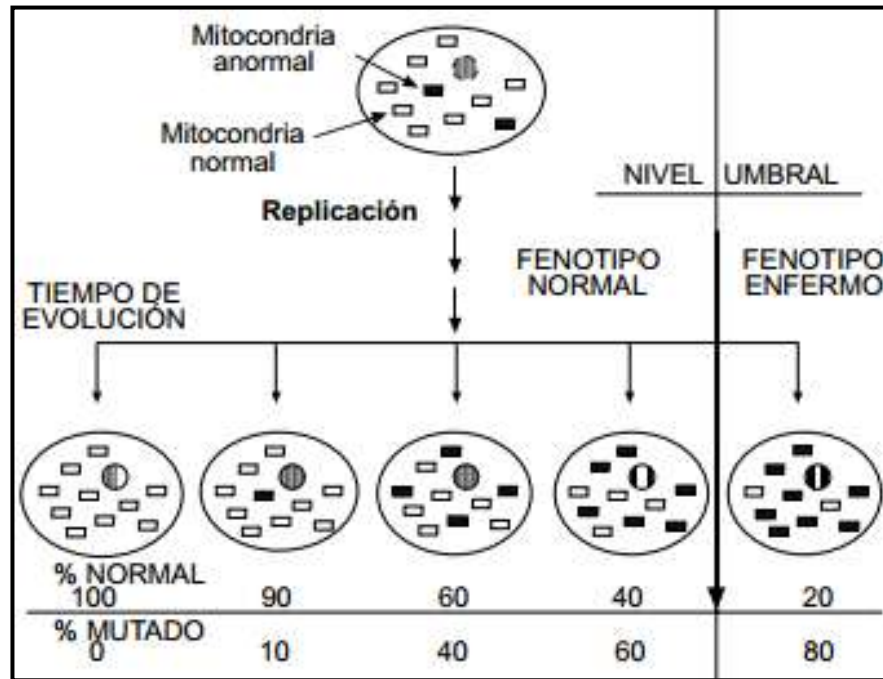


Figura 8: Expresión Umbral. Se esquematiza el efecto umbral de la cantidad de mtDNA contenido en una célula. Cuando esta cantidad alcanza un cierto nivel, el fenotipo celular cambia a un estado patológico (Medina-Crespo, 2004).

El número de mitocondrias y por tanto de moléculas de DNA es diferente en cada órgano y tejido según la cantidad de energía requerida para su funcionamiento, lo que origina una gran variabilidad en la expresividad clínica de las enfermedades mitocondriales. Los órganos preferentemente afectados son aquellos que dependen en mayor grado de la producción de energía, tales como el sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, óptico, islotes pancreáticos, riñón e hígado (Fig. 9) (Campos et al, 2007; Solano et al, 2001).

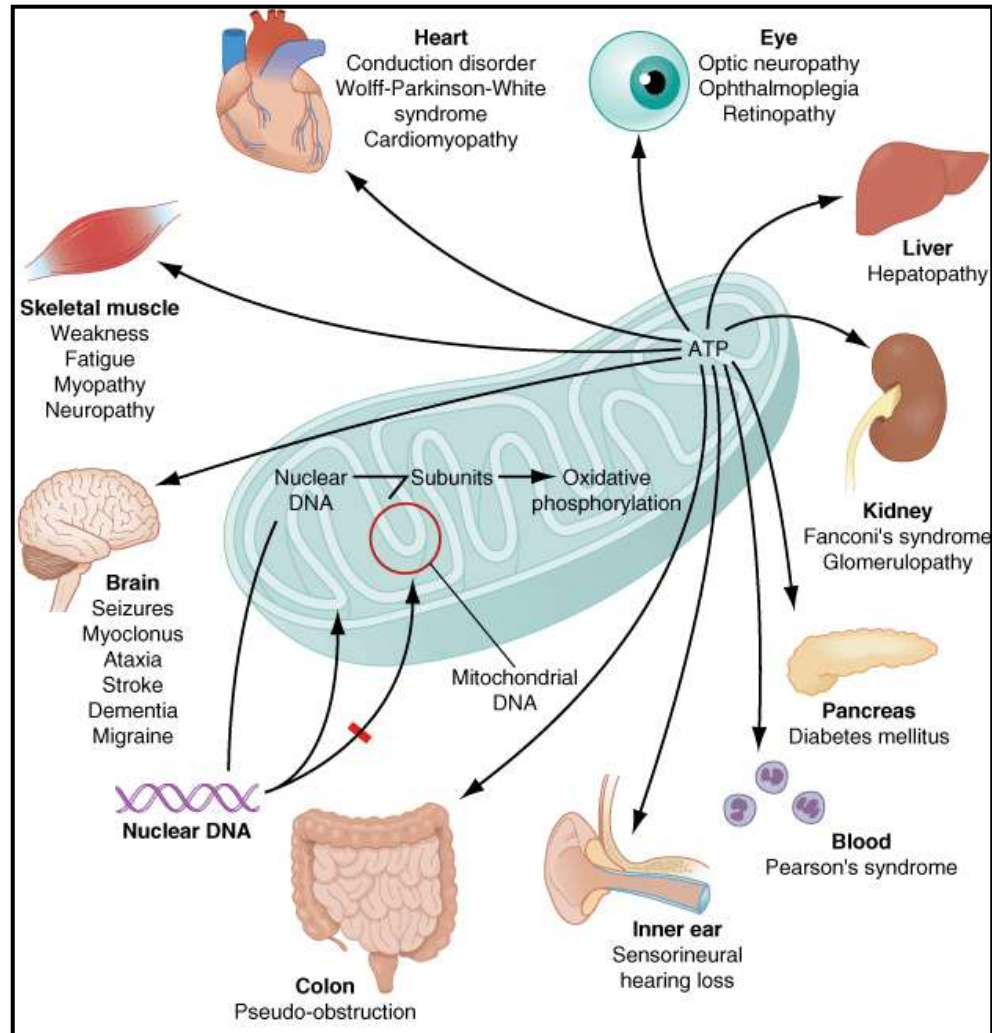


Figura 9: Variabilidad clínica de los defectos mitocondriales. Se ilustran los órganos de alto requerimiento energético que generalmente son los más afectados durante la presencia de daños mitocondriales y algunos estados patológicos comunes relacionados con los mismos (Johns, 1995).

1.7.6 Alta tasa de mutación

El mtDNA es muy vulnerable y presenta una tasa de mutación espontánea entre 10 y 20 veces superior a la del nDNA. Este hecho se explica por la alta producción de radicales de oxígeno originados constantemente en la mitocondria que dañan a un DNA con información genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y en el que los mecanismos de reparación parecen ser insuficientes. (López-Pérez et al, 2012).

Como consecuencia de esto, hay una gran variación de secuencias entre especies e incluso entre individuos de una misma especie. Se puede calcular que dos individuos tienen al menos unos 50-70 nucleótidos de diferencia en su secuencia. Además de estas diferencias, en un individuo determinado se está produciendo continuamente, a lo largo de la vida, una heterogeneidad en el mtDNA como consecuencia de las mutaciones que se están originando en sus células somáticas. Por tanto, es posible que una acumulación de este daño mitocondrial sea la causa de la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos en donde tiene lugar el envejecimiento (López-Pérez et al, 2012; Solano et al, 2001).

1.8 Haplogrupos mitocondriales

La alta tasa de mutación del mtDNA también genera mutaciones inocuas que se fijan en la población como polimorfismos, produciendo un genotipo diferente que da lugar a una nueva línea mitocondrial (López-Pérez, 2012). Así, los haplogrupos son familias de mtDNA que comparten una mutación dentro de una población. Por otro lado, un haplotipo es un segmento de DNA que se hereda como una unidad y por lo tanto no tiene recombinación. De tal manera que dos mtDNA que pertenecen a un mismo haplogrupo se pueden distinguir entre sí por mutaciones adicionales que pertenecen a haplotipos distintos (Muñoz et al, 2010).

Los haplogrupos son caracterizados por letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F, etc.) y estudios en muestras provenientes de diferentes continentes reveló la existencia de haplogrupos exclusivos de población africana, europea y asiática (Fig. 10). Esta característica ha resultado ser de extrema utilidad para la inferencia de patrones migratorios dentro y fuera de cada continente, así como para establecer relaciones entre poblaciones antiguas y contemporáneas (Torroni et al, 1992; Muñoz et al, 2010).

El estudio del mtDNA ha permitido determinar que todos los linajes maternos actuales provienen de la llamada “Eva Africana”. El haplotipo más antiguo corresponde al haplotipo L1, originado en África hace más de 130,000 años y se encuentra restringido a ese continente. Estudios filogenéticos han sugerido que hace aproximadamente 60,000-80,000 años, hubo una expansión de los habitantes con haplotipos L2 y L3 que provocó la migración fuera de África y dio origen a los haplogrupos M y N, los cuales mutaron hace aproximadamente de 60,000-30,000 mutaron para dar origen a los haplogrupos fundadores A, B, F y D (Muñoz et al, 2010).

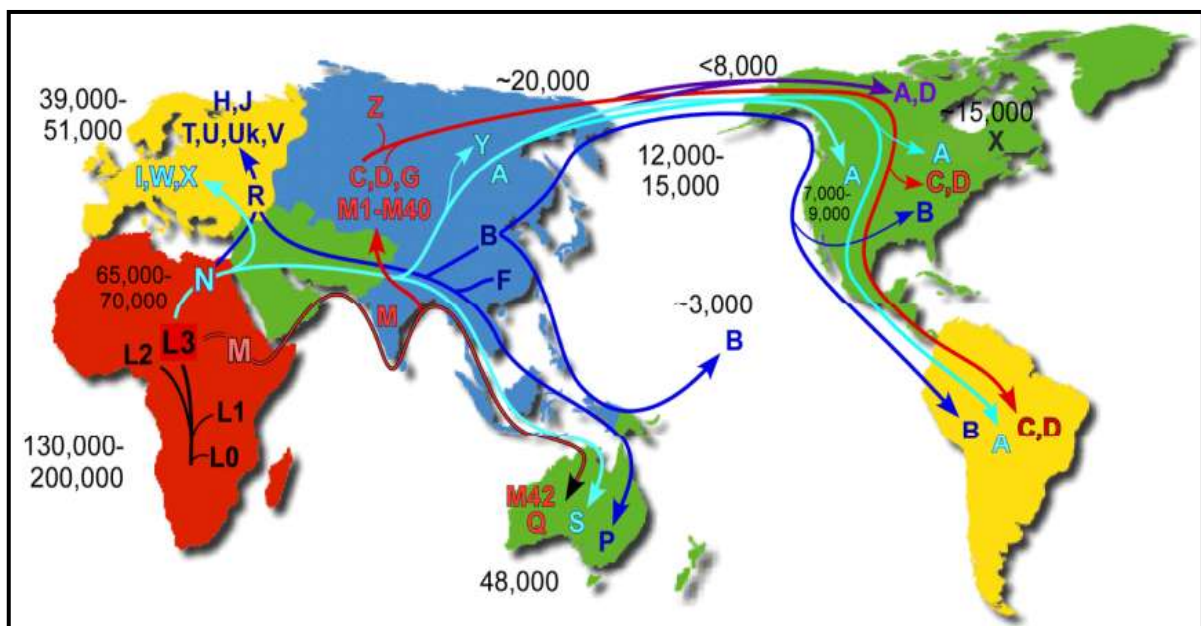


Figura 10: Haplogrupos mitocondriales. Mapa mundial que ilustra el establecimiento de los haplogrupos mediante las migraciones poblacionales (MITOWEB, 2014).

Estas enfermedades son generalmente multisistémicas y de manifestaciones clínicas heterogéneas con solapamiento entre diversos síndromes (Fig 11). Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran desórdenes motores, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, demencia, intolerancia al ejercicio, ptosis, oftalmoplejia, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera, cardiomiopatía, disfunciones hepáticas y pancreáticas, diabetes, defectos de crecimiento, anemia sideroblástica, pseudo obstrucción intestinal, nefropatías, acidosis metabólica y otras más secundarias (Solano et al, 2001; Chinnery and Turnbull, 1997).

En la severidad y heterogeneidad de las manifestaciones de la enfermedad intervienen varios factores como la naturaleza de la mutación, el grado de heteroplasmia, los requerimientos energéticos del tejido y la capacidad del tejido para compensar el daño celular (Solano et al, 2001).

Las enfermedades mitocondriales se pueden clasificar de acuerdo con las características genético-moleculares de las mutaciones que las causan a pesar de que, en algunos casos, una misma mutación pueda dar lugar a fenotipos clínicos diferentes. Así, las enfermedades producidas por daños en el mtDNA se pueden dividir en tres grandes grupos: 1) asociadas a mutaciones puntuales, 2) a rearrreglos o 3) a disminución de número de copias de mtDNA (López-Pérez et al, 2012; Chinnery et al, 1999).

1.9.1 Enfermedades causadas por mutaciones puntuales

La frecuencia de las enfermedades mitocondriales es alta, sin embargo solo algunas de las mutaciones puntuales del mtDNA están asociadas a la mayoría de los casos (Montoya, 2009).

El alto índice de mutación del mtDNA implica la posibilidad de poder encontrar un gran número de mutaciones puntuales, las cuales consisten en el cambio de una base por otra. Sin embargo, no todas las mutaciones puntuales son patológicas ya que la mayoría representan polimorfismos que se han fijado en la población durante la evolución (López-Pérez et al, 2012).

Las mutaciones patológicas se pueden encontrar tanto en los genes de tRNA, de rRNA, como en los codificantes de proteínas, y responden siempre a un tipo de herencia materna (Tabla 1) (Solano et al, 2001).

Tabla 1: Mutaciones puntuales del mtDNA asociadas a fenotipos específicos (Montoya et al, 2009).

Phenotype	Mutation	Gene
LHON	m.3460G>A	MT-ND1
	m.11778G>A	MT-ND4
	m.14484T>C	MT-ND6
Leigh (MILS)/NARP	m.8993T>G	MT-ATP6
MELAS/diabetes	m.3243A>G	MT-TL1
MERRF	m.8344A>G	MT-TK
Non-syndromic deafness	m.1555A>G	MT-RNR1

1.9.2 Enfermedades causadas por rearrreglos.

Un rearrreglo genómico es una modificación del genoma a gran escala causado por una deleción, inversión, duplicación, inserción o translocación (Damas et al, 2014). El mtDNA se caracteriza por una gran variación estructural y puede sufrir la pérdida de parte del mismo (deleciones) o la adición de un nuevo fragmento (duplicaciones), teniendo así, consecuencias patológicas. Se han descrito más de 100 tipos de deleciones y sólo unos cuantos casos de inserciones (Tabla 2) que suelen ser espontáneas y se presentan en forma heteroplásmica, ya que la homoplásmica sería incompatible con la vida. Los tres tipos de síndromes más comunes en los que se presentan deleciones son los de Pearson, oftalmoplejia progresiva externa crónica y Kearns-Sayre (López-Pérez et al, 2012).

Estas tres enfermedades están causadas por deleciones de 2 a 9 kb en el mtDNA que suelen aparecer de forma espontánea. En general, la deleción es única, pero también se han descrito casos de deleciones múltiples (Solano et al, 2001).

La deleción más común (frecuencia hasta en 50%) elimina un tramo de DNA de 4977 pb entre los nucleótidos 8483 y 13460, que comprende los genes localizados entre la

subunidad 8 de la ATPasa y ND5. La pérdida de genes, especialmente la de los tRNA, hace que estos genomas no se puedan traducir (López-Pérez et al, 2012).

Existen otras enfermedades como una diabetes con sordera y atrofia óptica; miopatías en general; el síndrome de encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal; el de DM, diabetes insípida, atrofia óptica y sordera, etcétera, que están asociadas a la presencia de deleciones en el mtDNA (Fig. 12) (Solano et al, 2001).

Las duplicaciones pueden ser también esporádicas o de herencia materna. Se han encontrado en pacientes de Kearns-Sayre, Pearson, diabetes mellitus, tubulopatía renal y miopatía mitocondrial e incluso en individuos normales. El mecanismo por el cual pueden causar la enfermedad no está nada claro todavía (Damas et al, 2014; Solano et al, 2001).

Tabla 2: Rearreglos mitocondriales asociados a fenotipos (Zeviani and Antozzi, 1997).

Phenotype	mtDNA mutation	Inheritance
KSS	Large scale deletion	Sporadic
	Large scale duplication	
CPEO	Large scale deletion	Sporadic
Pearson's syndrome	Large scale deletion	Sporadic
	Deletion-duplication	Sporadic
Diabetes, deafness	Large scale duplication	Maternal
Diabetes, deafness, optic atrophy	Large scale deletion	Sporadic
Tubulopathy, diabetes, ataxia	Large scale duplication	Maternal
Ataxia, leukodystrophy	Large scale deletion	Sporadic
Chronic diarrhoea, villous atrophy	Deletion-duplication	Sporadic
Myopathy	260 bp duplication	Sporadic
Familial CPEO	Multiple deletions	AD
Familial recurrent myoglobinuria	Multiple deletions	AR
Myopathy	Multiple deletions	AR
Sideroblastic anaemia, myopathy	Multiple deletions	AR
Encephalomyopathy	Multiple deletions	AD
Familial cardiomyopathy	Multiple deletions	AD
MNGIE	Multiple deletions	AR
Hypertrophic cardiomyopathy	Multiple deletions	Sporadic
Fatal infantile myopathy	Severe depletion	AR
Fatal infantile hepatopathy	Severe depletion	AR
Myopathy, nephropathy	Severe depletion	AR
Myopathy of childhood	Partial depletion	AR

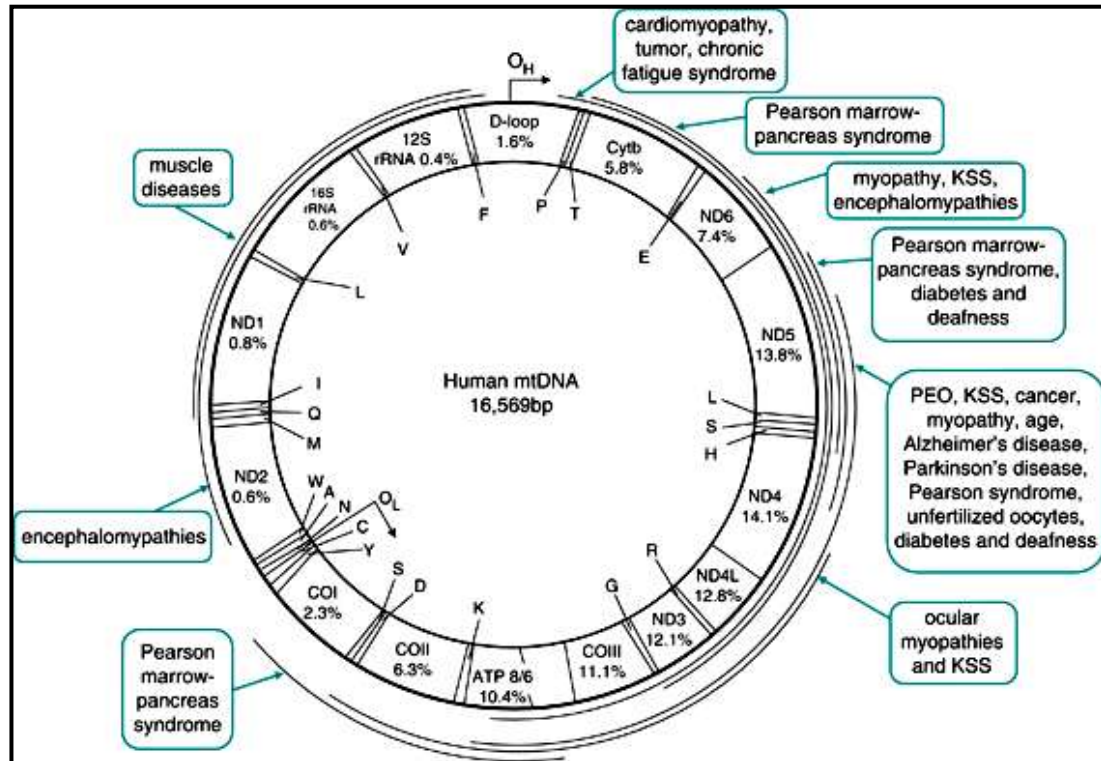


Figura 12: Delecciones mitocondriales. Mapa del genoma mitocondrial que esquematiza las regiones de delección más frecuentes asociadas a algún fenotipo. Los números dentro del gen representan la frecuencia de delección del mismo (Chen et al, 2011).

1.9.3 Enfermedades causadas por depleciones

Estas entidades no se deben a mutaciones propiamente dichas sino a una disminución del número de copias de mtDNA. Los casos descritos hasta ahora afectan fundamentalmente a niños con combinaciones variables de miopatía, nefropatía o hepatopatía, miopatía infantil fatal por fallo respiratorio y algún otro con implicación multisistémica. (Solano et al, 2001).

No se ha identificado ninguna mutación en el mtDNA que pudiera ser responsable del fenómeno de depleción, así que podrían estar producidas por mutaciones en genes nucleares que rigen el proceso de replicación (Solano et al, 2001; López Pérez et al, 2012).

1.10 Epidemiología de las enfermedades mitocondriales

Los pocos estudios epidemiológicos realizados han establecido que las mutaciones son encontradas en alrededor de 1 de 8000 individuos europeos y que las enfermedades mitocondriales afectan a 1 de cada 15000 individuos adultos (Bandelt et al, 2006, Solano et al, 2001).

A pesar de la importancia que las enfermedades mitocondriales tienen últimamente, hasta ahora no se han realizado estudios exhaustivos sobre su prevalencia en la población general. En primera instancia, debido a la complejidad de sus manifestaciones clínicas, a la necesidad de biopsias musculares para establecer su diagnóstico (no siempre se pueden detectar las mutaciones en muestras de sangre) o de técnicas de secuenciación del genoma mitocondrial para localizar mutaciones no detectadas hasta ahora. Pero por otro lado, los problemas éticos para realizar análisis genéticos presintomáticos en niños o diagnóstico erróneo de muchos pacientes al no ser atendidos en centros especializados, etc. son variables que dificultan el estudio de estas patologías (Solano et al, 2001). Sin embargo, recientemente ha crecido un gran interés por investigar la relación entre las alteraciones en el genoma mitocondrial con el desarrollo de enfermedades altamente comunes y de relevancia socioeconómica como el cáncer y la DM2.

1.11 Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) corresponde a un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por la elevación crónica de la glucosa en sangre, así como la predisposición a desarrollar complicaciones de la micro y macrovasculatura, entre ellas neuropatía, retinopatía, nefropatía y enfermedad cardiovascular (Tusié et al, 2012).

La DM se puede clasificar en cuatro grupos principales: Tipo 1 (DM1), Tipo 2 (DM2), Diabetes gestacional y otros tipos de diabetes.

Mientras que la DM1 se caracteriza por un déficit absoluto de secreción de insulina debida a una reacción autoinmune que deriva en la destrucción de las células β del

páncreas, la DM2 es de etiología, manifestaciones clínicas y modo de herencia más compleja que se relaciona con diferentes grados de resistencia a la insulina, un déficit no autoinmune de la secreción de insulina así como un aumento de la producción hepática de glucosa en ayunas postingesta (González, 2010; Carnea and Dobreanu, 2013).

Por su parte, la diabetes gestacional se presenta como intolerancia a la glucosa durante el embarazo, atribuyéndose a alteraciones metabólicas y hormonales. En cuanto a los otros tipos de diabetes, se incluyen las tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young, diabetes del adulto de inicio juvenil), la diabetes mitocondrial y otros ocasionados por defectos genéticos en la acción de la insulina, pancreopatías, endocrinopatías, inducidas por fármacos y causadas por síndromes genéticos (González, 2010).

1.12 Prevalencia de DM en México

La prevalencia global de la DM está aumentando rápidamente como resultado del envejecimiento de la población, la urbanización y los cambios asociados al estilo de vida (Fig. 13). En el año 2012, la Federación Internacional de Diabetes (IFD, por sus siglas en inglés) estimó que más de 371 millones de personas presentaron DM y que 4.8 millones de personas murieron a causa de la misma. Por otro lado, a nivel mundial se estima que para el año 2030 el número de personas diabéticas se incremente a 552 millones, lo que representaría el 7.7% de la población adulta (de 20 a 79 años) del mundo (FID, 2013).

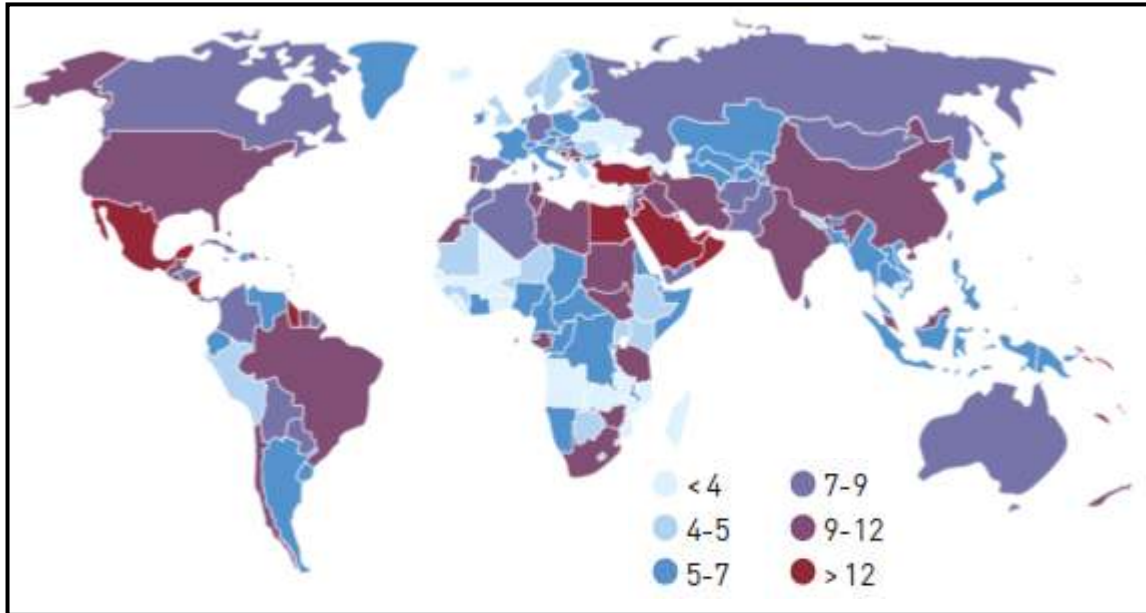


Figura 13: Prevalencia mundial de DM. Se muestran los países con las prevalencias de DM descritas. Se observa que México ocupa uno de los lugares con una prevalencia mayor a 12% (FID, 2013).

México no es la excepción, ya que el número de personas que padece DM se ha incrementado y actualmente, esta enfermedad figura entre las primeras causas de muerte en el país. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del año 2012 reportó que 6.4 millones de personas adultas refirieron haber sido diagnosticados con DM2, dando una prevalencia nacional para DM2 de 9.2%. Un aumento importante a diferencia de las encuestas anteriores: ENSA 2000 4.6%, ENSANUT 2006 de 7.3%. Sin embargo se estima que el número de personas con DM2 podría ser incluso el doble ya que muchas personas aun desconocen su condición. A su vez se observó una diferencia en las prevalencias por entidad federativa, observándose entre las más altas el Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí (Fig. 14) (ENSANUT, 2012; FID, 2013).

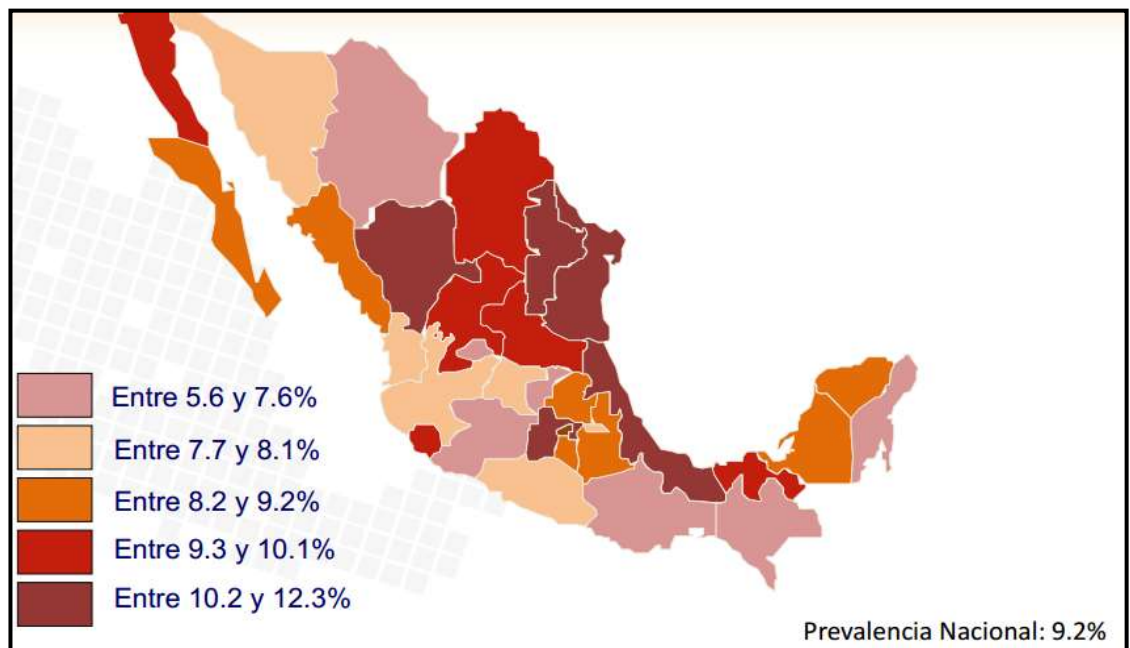


Figura 14: Prevalencia de DM en México. Se muestra la prevalencia de DM de acuerdo a la entidad federativa (ENSANUT, 2012).

La prevalencia de DM2 presenta fluctuaciones importantes entre poblaciones de distinto origen étnico. Por ejemplo, es más frecuente en grupos de origen amerindio (indios pima e indígenas oji-cree), así como en la población mestiza mexicana, en comparación con distintas poblaciones europeas. Estas fluctuaciones pueden ser el resultado de diferencias genéticas entre las poblaciones o bien de factores culturales o ambientales asociados al riesgo de enfermedad como lo son el sedentarismo, el tipo de dieta y otros factores sociales como la pobreza o la escolaridad (Tusié et al, 2012).

1.13 Diabetes Mellitus Tipo 2

Esta forma de diabetes representa entre el 90 al 95% de la población diabética se refiere a individuos con resistencia a la insulina y que presentan un déficit de la secreción de la misma. Frecuentemente este tipo de diabetes no es diagnosticada por

muchos años debido a que la hiperglicemia se desarrolla gradualmente y al inicio no se presentan síntomas severos (Tusié et al, 2012; Alpizar, 2007).

Un cuadro clínico de la DM2 es creado por las influencias conjuntas de factores genéticos y ambientales. Dos de los principales defectos fisiopatológicos que coexisten en esta enfermedad son el deterioro de la secreción de insulina por las células β y la disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Malecki et al, 2001).

El riesgo de desarrollar la DM2 aumenta con la edad, obesidad y sedentarismo. Ocurre más frecuentemente en mujeres con historia de diabetes mellitus gestacional y en individuos con obesidad, hipertensión arterial y dislipidemias (Alpizar, 2007).

Los estudios genéticos de DM2 se vuelven cada vez más importantes debido a su importancia científica, en el pronóstico, tratamiento profiláctico y terapéutico de la enfermedad, sin embargo, el fondo molecular de la enfermedad sigue siendo en su mayoría desconocido. Hasta ahora varios genes diferentes se han asociado con una herencia autosómica dominante de DM2, cuya forma temprana se conoce MODY y se caracterizan por un defecto en la secreción de insulina. La MODY2 autosómica dominante se produce en las familias de varias generaciones posteriores con alta penetrancia entre los portadores de las mutaciones. Sus diferentes formas muestran alguna evidencia de heterogeneidad clínica. Algunos de los genes identificados hasta ahora son el de la Glucoquinasa, factores de transcripción relacionadas con el gen de la insulina, mutaciones en el factor nuclear hepático HNF-1 α , el receptor gamma activador de la proliferación del peroxisoma PPAR- γ , Calpaina 10, etc. (Malecki et al, 2001).

Otra forma de la enfermedad definida a nivel molecular es la DM2 de Herencia Materna (DMHM). Esta forma de diabetes se encuentra ligada con diferencia en las secuencias del mtDNA. Se caracteriza por un deterioro de la secreción de insulina, una edad de diagnóstico temprana, usualmente entre la tercera y quinta década de vida, y que se acompaña con frecuencia de problemas de audición o sordera (Malecki et al, 2001, Cataldo et al, 2013).

1.14 Mutaciones mitocondriales asociadas a DM2

La DM es un padecimiento muy reconocido dentro de fenotipos asociados a mutaciones en el mtDNA, siendo la afección endocrina más común a causa de una deficiencia en la secreción de insulina en las células β pancreáticas que se origina por un desbalance del proceso de fosforilación oxidativa (Schaefer et al, 2013; Wang et al, 2013).

Existen evidencias de ciertas supresiones, inserciones o mutaciones puntuales en el mtDNA que se asocian con DM. De ellos, la mutación A3243G del gen que codifica para el tRNA^{Leu} de Leucina ha sido la más referida y se conoce que causa deficiencias en el procesamiento del RNA, aminoacilación, modificación postranscripcional del tRNA y la traducción. Los portadores de la mutación demuestran una alteración en la síntesis de ATP y un estado clínico de DM que en su patrón de diagnóstico incluye herencia materna y sordera neurosensorial pre-senil, considerándose así como un subgrupo de DM (Schaefer et al, 2013; Wang et al, 2013).

Sin embargo, debido a las diferentes poblaciones de estudio y tamaño de la muestra, existe una inconsistencia en la literatura sobre la prevalencia de la mutación A3243G y si otras mutaciones se asocian con DM. Se ha observado que la prevalencia de la mutación A3243G en la población diabética puede variar entre el 0% y el 2,8%, por lo que resulta importante y valioso evaluar su prevalencia en los distintos grupos étnicos. (Malecki et al, 2001; Schaefer et al, 2013).

Al lado de la mutación 3243, otras 20 mutaciones pueden estar asociados con el desarrollo de DM, entre ellas han sido descritas la 3256 en el gen tRNA^{Leu}, 12258 en tRNA^{Ser} y la 14709 en tRNA^{Glu}, misma que ha sido reportada en forma heteroplásmica en algunos pacientes. La 8296 que fue identificado en 0,9% de los pacientes japoneses no relacionadas con la diabetes y en 2,3% de casos con diabetes y sordera, la mutación 8344 y la 8363 se encuentra en tRNA^{Lys}. Mientras tanto, las mutaciones 3316, 3394 y 3426 se localizan en ND1 y la 12 026 en el gen ND4 (Schaefer et al, 2013; Wang et al, 2013).

1.15 Efecto de las mutaciones mitocondriales en el mecanismo de secreción de insulina

La célula β adulta del páncreas es un tipo celular altamente especializado que se encarga de controlar la producción, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de insulina en respuesta a cambios en metabolitos, hormonas y neurotransmisores (Lazo-de-la-Vega, 2009).

La relación entre el fenotipo clínico de la DM2 y las mutaciones mitocondriales se observan al nivel de la secreción de insulina. Muchas de las mutaciones patológicas se encuentran localizadas en los genes que codifican para los tRNA, lo cual genera fenotipos clínicos muy complicados. Los tRNA mitocondriales son considerados "Hotspots" (sitios con gran frecuencia de mutaciones) para mutaciones patológicas y más de 200 mutaciones en ellos se han relacionado con diversas enfermedades. A menudo, estas mutaciones impiden la tRNA aminoacilación, lo cual afecta a la síntesis de proteínas, su expresión, plegamiento y la función de las enzimas del sistema OXPHOS (Abbott et al, 2014).

El mecanismo molecular de secreción de insulina se inicia con la detección de la glucosa por parte de la célula β . La glucosa entra a la célula β por el transportador GLUT1. Una vez dentro de la célula, es fosforilada para formar glucosa-6-fosfato por la glucocinasa. El aumento en la relación ATP/ADP debido a la generación de ATP por la glucólisis y el metabolismo mitocondrial provoca el cierre del canal de K^+ mediante las subunidades de receptor sulfonilurea (SUR1) y las unidades adyacentes KIR 6.2 altamente sensible a ATP. Este evento ocasiona una despolarización de la membrana plasmática, la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y un flujo de calcio extracelular al interior de la célula. Un proceso que favorece la exocitosis de los gránulos de insulina mediante la fisión de los gránulos con la membrana plasmática (Fig. 15) (Lazo-de-la-Vega, 2009).

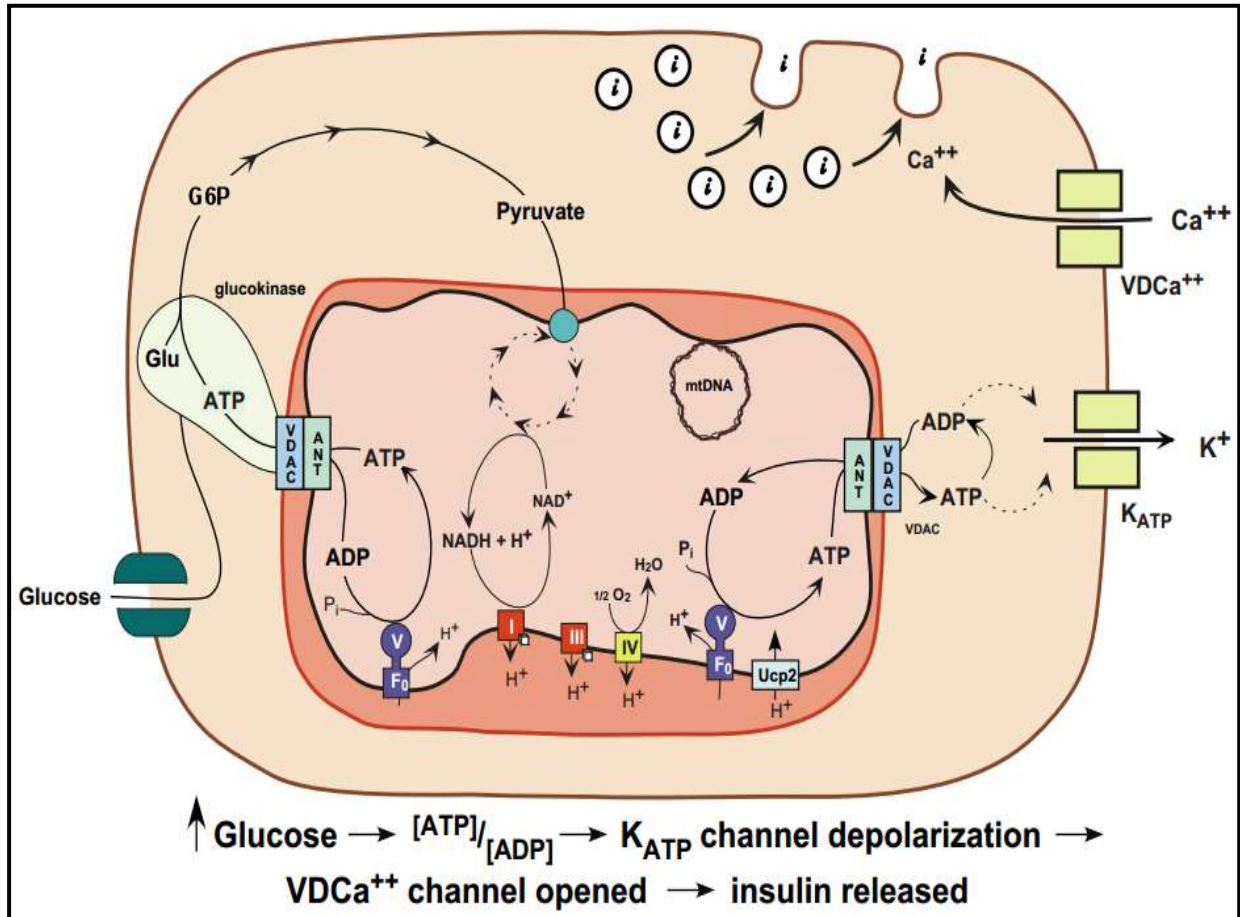


Figura 15: Mecanismo molecular de la excreción de la insulina. Se muestran las vías de señalización que ocurren en condiciones normales que favorecen la excreción de la insulina. El aumento de la producción de ATP a partir de la glucosa promueve la despolarización de la membrana plasmática generando un aumento en las concentraciones de calcio que favorecen el proceso de exocitosis por el cual se libera la insulina (MITOWEB, 2014).

Sin embargo, una mutación en el gen de tRNA como la A3243G, promueve una modificación en la estructura del tRNA que impide la correcta traducción en el mitorribosoma y la consiguiente alteración de los componentes de sistema OXPHOS codificados en el mtDNA, de tal forma que se genera una producción de ATP ineficiente para bloquear el canal de K⁺ y permitir la entrada de calcio, el cual es esencial para el proceso de exocitosis requerido para liberar la insulina. (Cataldo et al, 2013).

1.16 Diagnóstico genético de enfermedades mitocondriales

El diagnóstico de estas enfermedades depende de los resultados obtenidos en diversos tipos de análisis clínicos, de laboratorio, histoquímicos, bioquímicos y genéticos. El espectro de fenotipos relacionados con mutaciones en el mtDNA está aumentando continuamente y es posible que muchos fenotipos con presentación clínica muy leve queden sin diagnosticar (López-Pérez et al, 2012).

Para la realización de un diagnóstico genético, el primer paso es investigar la presencia de mutaciones del mtDNA escogiéndose los tejidos más afectados, ya que en ellos la probabilidad de detección aumenta. Las mutaciones investigadas corresponden a mutaciones puntuales, deleciones, duplicaciones y depleciones (Campos et al, 2007).

Para el diagnóstico de mutaciones puntuales, se emplean métodos como el de la secuenciación directa, RFLPs (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica), clivaje químico por desajuste (CCM) u oligonucleótidos alelo específicos para hibridación, entre otros. Estos métodos presentan diferentes rangos de sensibilidad, además de requerir reactivos y equipos sofisticados que aumentan su complejidad y costo operativo (Estrada-Cuzcano et al, 2005).

1.17 Secuenciación

La secuenciación es el procedimiento mediante el cual se determina el orden de los nucleótidos que conforman un fragmento de DNA. Por ello, el escalamiento de los métodos de secuenciación, desarrollados en la década de 1970 revolucionaron de forma significativa el mundo de la Genética Molecular (Passarge, 2007).

La estrategia básica de la secuenciación de ácidos nucleicos involucra: a) La degradación específica y el fraccionamiento de los polinucleótidos de interés a fragmentos suficientemente pequeños para ser secuenciados; b) La secuenciación de los fragmentos pequeños; y c) El ordenamiento de los fragmentos a través de la repetición de los pasos anteriores, usando un procedimiento de degradación que produce una serie de

fragmentos de polinucleótidos que traslapan el punto de corte en la primera serie (Necochea y Canul, 2004).

Originalmente se describieron dos métodos de secuenciación: el método de Maxam-Gilbert y el método de Sanger. Aunque ambos métodos producen abundancia de fragmentos marcados de distinta longitud, los cuales son separados por electroforesis, estos métodos son conceptualmente distintos (Oliva et al, 2006; Pessarge, 2007).

El método de Maxam-Gilbert está basado en la degradación química parcial de la cadena original de DNA, mientras que el método de Sanger se basa en la síntesis de una nueva cadena de DNA cuya elongación se detiene mediante la incorporación de una base modificada. Este último método constituye en la actualidad el método de secuenciación más popular y más utilizado de forma rutinaria en el laboratorio (Oliva et al, 2006).

1.17.1 Secuenciación de Sanger

Este método aprovecha análogos químicos de los cuatro nucleótidos marcados con un fluorocromo diferente denominados dideoxinucléotidos (ddNTPA, ddNTPT, ddNTPC, ddNTPG) por carecer del grupo hidroxilo 3' terminal en su desoxirribosa que impide la incorporación de un nuevo nucleótido. Si estos son incorporados en una cadena creciente de DNA elongada por la DNA polimerasa, se interrumpe la cadena en formación, teniéndose así fragmentos de tamaño variable. Las cadenas finalizadas son separadas mediante electroforesis y el nucleótido dideoxi responsable de la terminación es identificado a través de su fluorocromo (Nussbaum et al, 2008).

La posibilidad de usar un fluorocromo distinto permite automatizar el método, de forma que se detecten simultáneamente las hebras marcadas (Fig. 16). Las moléculas de menor tamaño, salen primero del gel y se sigue consiguiendo la separación de moléculas mayores, ampliándose así el número de nucleótidos que se pueden secuenciar en un solo experimento. (Luque y Herráez, 2001).

Este método enzimático o dideoxi, se ha convertido en la base de las variantes utilizadas actualmente para la secuenciación a gran escala del DNA. En él no se degrada el DNA si

no que se acude a la interrupción controlada de la síntesis de una hebra complementaria durante una replicación in vitro (Luque y Herráez, 2001).

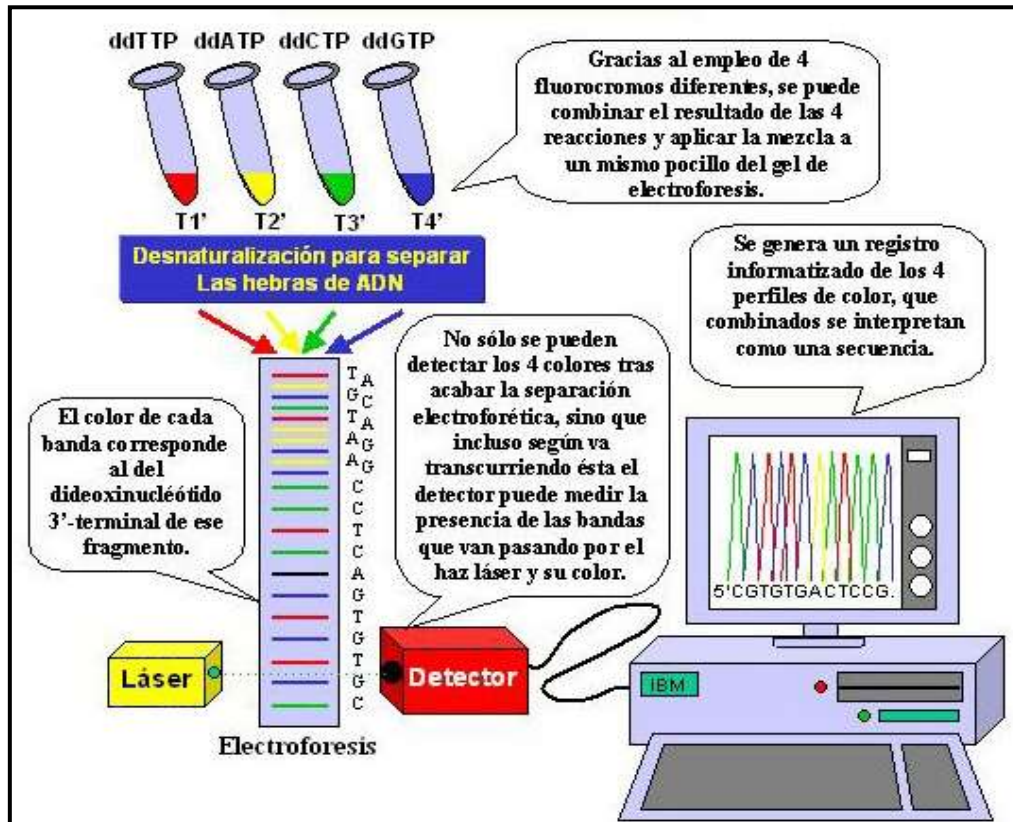


Figura 16: Secuenciación Automática de Sanger. Se ilustra de forma general el procedimiento de secuenciación automática de Sanger por electroforesis capilar. Tras las PCR con los primers y ddNTP que generan polinucleótidos marcados de diferente tamaño, estos son sometidos a electroforesis donde su fluorocromo es detectado (Luque y Herráez, 2001).

1.17.2 Secuenciación de Siguiete Generación (NGS)

La mejor técnica para detectar las mutaciones desconocidas es la secuenciación directa, sin embargo suele ser laboriosa y costosa para ser usada rutinariamente (Estrada-Cuzcano et al, 2005). En la actualidad se han desarrollado las tecnologías de Secuenciación de Siguiete Generación (NGS, Next Generation Sequencing) como la pirosecuenciación, plataforma Illumina, Ion Torrent, SMRT, Helicos, etc. que tienen el potencial de incrementar significativamente tanto el procesamiento de número de

muestras, como la eficacia del proceso global, facilitando así el establecimiento de las bases de datos más grandes en tiempos relativamente cortos (Parson et al, 2013).

1.17.3 Secuenciación Ion Torrent

Recientemente la plataforma de secuenciación Ion Torrent basada en el empleo de un semiconductor de secuenciación ha evadido en gran medida muchas limitaciones de la secuenciación masiva. Su metodología consiste en la formación de una biblioteca génica que es adaptada a un semiconductor en el cual se realiza la secuenciación (Fig. 17). Se fundamenta en la incorporación de desoxinucleótidos no modificados a través de una DNA polimerasa estándar, empleando un semiconductor basado en la detección de iones hidrógeno (H^+) liberados durante cada ciclo de polimerización del DNA. Cada nucleótido incorporado dentro de la cadena complementaria creciente de DNA causa la liberación de un ión hidrógeno, el cual es detectado por un sensor (Fig. 18) Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) puede generar a 10 Mbp's de datos de secuenciación en el Chip 314 de primera generación en pocas horas (Xu et al, 2014). Esta tecnología tiene varias ventajas sobre el método habitual de secuenciación de Sanger por electroforesis capilar, tal como la capacidad de secuenciar hasta 2.0 gigabases de nucleótidos a gran profundidad. Sin embargo el uso rutinario de estas tecnologías provee limitaciones como el costo y el procesamiento de la muestra que suele ser tardado (Xu, et al, 2014).

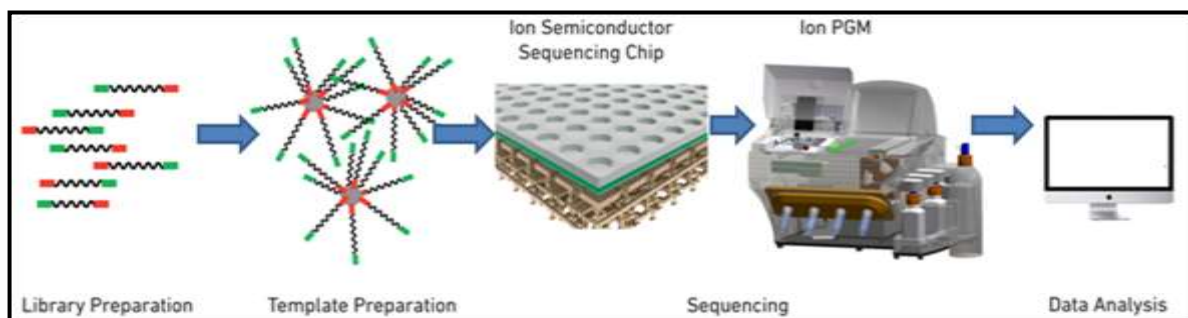


Figura 17 Secuenciación por Ion Torrent. Se ilustra el procedimiento general de la secuenciación por ion torrent. Primeramente se forma la biblioteca genómica y posteriormente se acopla a adaptadores que son reconocidos por el semiconductor, se realiza la reacción en el secuenciador y se lleva a cabo el análisis de los datos.

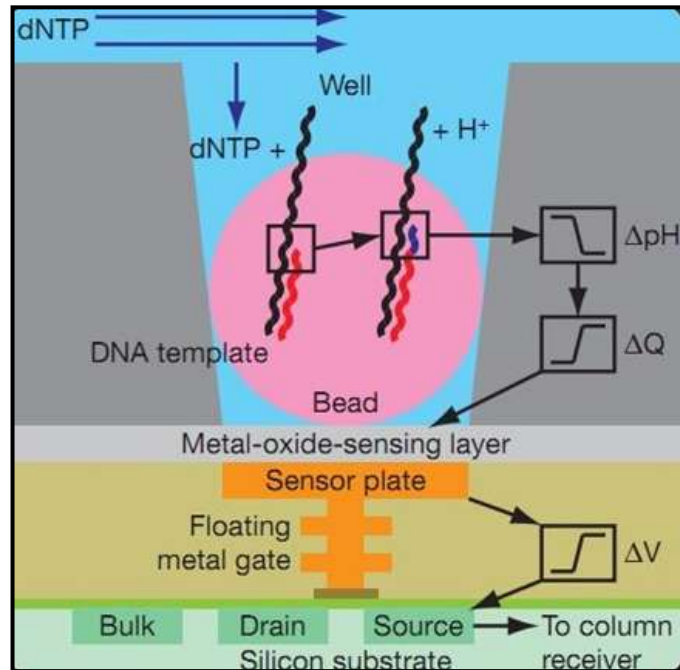


Figura 18: Fundamento de la secuenciación por Ion Torrent. Los adaptadores con la muestra a secuenciar se depositan en los pozos del semiconductor, cuando se incorpora un dNTP en la cadena creciente se libera un ion H⁺, que genera un cambio en el pH (ΔpH) el cual es traducido a una señal química (ΔQ) que es canalizada a la placa sensor donde se transforma a una señal eléctrica (ΔV) y posteriormente en una digital.

2 JUSTIFICACIÓN

La DM2 se ha convertido en un grave problema de salud pública en México, con un número de incidencia de casos cada vez mayor. Está ampliamente documentado que el componente genético de la población mexicana tiene una importante contribución en la susceptibilidad al padecimiento de esta enfermedad. Por otra parte existen diversos estudios que señalan que algunos de los factores genéticos de riesgo para DM2 están contenidos en el genoma mitocondrial. Sin embargo la ausencia de estudios de este tipo en México hace que la contribución de estas variantes en el desarrollo de esta enfermedad en la población mestiza e indígena mexicana sea aún desconocido.

3 HIPÓTESIS

La presencia de variantes, ya sea polimorfismos o mutaciones, contenidas en el mtDNA confieren a la población indígena mexicana un aumento en la susceptibilidad y riesgo para el desarrollo de DM2. Además, algunas de éstas y otras variantes podrían ser exclusivas de los grupos indígenas de México.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar variantes en el genoma mitocondrial a través del empleo de tecnologías de secuenciación de nueva generación como el Ion Torrent, que confieran riesgo para desarrollar Diabetes Mellitus Tipo 2 en población indígena mexicana.

4.2 Objetivos Particulares

- Secuenciar el genoma mitocondrial de individuos pertenecientes a las etnias Maya, Tarahumara, Otomí, Mazateco, Nahuatl, Huasteco, Mixe, Seri y Zapoteca.
- Identificar variantes asociadas al padecimiento de Diabetes Mellitus Tipo 2.
- Identificar nuevas variantes contenidas en el genoma mitocondrial.

5 METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

5.1 Estrategia general

Para realizar la identificación de variantes asociadas a DM2 contenidas en el genoma mitocondrial, así como la presencia de variantes exclusivas, se procedió a secuenciar la totalidad del mtDNA a través de la plataforma Ion Torrent. Para esto se aplicaron los controles de calidad con el fin de evaluar las muestras de DNA total. Posteriormente se amplificó el genoma mitocondrial a partir de dos PCR largas cuyos amplicones sobrelapados corresponden a un tamaño de aproximadamente 8.5 Kb. Los productos fueron purificados y fragmentados a un tamaño aproximado de 200 pb, reparando extremos y colocando los adaptadores adecuados para llevar a cabo la formación de la biblioteca. Los fragmentos fueron adaptados a las esferas de secuenciación mediante una PCR en emulsión y colocadas en un chip semiconductor en la que finalmente se llevó a cabo la reacción de secuenciación. Los datos obtenidos fueron comparados con las bases de datos de MITOWEB (www.mitomap.org/MITOMAP) y se validaron algunas variantes que no se encontraron registradas, es decir potencialmente nuevas.

5.2 Población de estudio

Se incluyeron un total de 25 individuos de los grupos étnicos representativos del territorio nacional. Tres pertenecientes al grupo Náhuatl, tres al Maya, tres al Tarahumara, tres al Otomí, tres al Mazateco, tres al Seri, tres al Mixe, dos al Huasteco y dos al Zapoteco. Las muestras se obtuvieron del banco de DNA del laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Se incluyeron individuos mayores de 35 años no relacionados, que firmaron la carta de consentimiento informado y que refirieron padres y abuelos que pertenezcan al grupo étnico de referencia. Sólo se aceptaron muestras de pacientes que contaron con datos demográficos y antropométricos, glucosa, perfil de lípidos y colesterol total.

5.3 Materiales, equipos y reactivos

La lista del equipo, material y reactivos empleados se detalla en el Anexo A.

5.4 Análisis molecular

5.4.1 Evaluación de integridad de las muestras

Las muestras de DNA total fueron cuantificadas mediante espectrofotometría a través del NanoDrop ND-1000. Para ello se homogenizaron las muestras en vórtex por 30 segundos y se centrifugaron en la microcentrífuga Sprout™ por 10 segundos para hacer descender en el fondo del tubo la totalidad de la muestra. Se abrió el software del NanoDrop y se lavó el sensor con agua de grado molecular. Se calibró el equipo con 2 μ L de agua tomando la medición, se limpió el sensor con un pañuelo limpio y se procedió a la cuantificación de las muestras colocando sólo 1 μ L de las mismas y limpiando el sensor entre cada medición. Se cuantificaron dos muestras de concentración conocida que sirvieron como controles. Las muestras consideradas como óptimas fueron aquellas que presentaran una concentración mayor a 50 ng/ μ L y cuyas relaciones 260/280 y 260/230 fueran lo más cercano a 2.0, indicando así que se encontraban fuera de contaminantes proteicos y de disolventes orgánicos respectivamente.

5.4.2 Secuenciación Ion Torrent

5.4.2.1 Amplificación PCR Larga

Para la generación de la biblioteca genómica de secuenciación del DNA mitocondrial, se procedió a realizar una amplificación del mismo a través de la realización de dos PCR largas cuyos productos resultan en dos amplicones sobrelapados de aproximadamente 8.5 kb. La reacción fue realizada mediante el Kit SequalPrep™ Long PCR y 2 pares de primers denominados Mito1 y Mito 2 los cuales fueron diseñados con la finalidad de cubrir la totalidad del genoma.

Para la realización de las PCR largas fue necesario diluir las muestras a una concentración de 5 ng/ μ L. Se elaboraron 2 master mixes con los reactivos necesarios

para cada reacción de acuerdo al volumen descrito en la tabla 3, ajustando el volumen al número de reacciones necesarias, con la única diferencia de que en una master mix se añadió los primers Mito1 (master mix 1) y en la otra los primers Mito2 (master mix 2).

Tabla 3: Reactivos para la PCR larga

Master Mix	
Componente	Volumen (µL)
SequalPrep™ Buffer 10X	2
DMSO	0.4
SequalPrep™ Enhancer B	1
SequalPrep™ Polimerasa	0.36
Agua libre de DNAsas	14.24
Set Primer Mito1 ó Set Primer Mito2	1
Total	19 MI

Se pipetearon 19 µL de master mix 1 en un tubo para PCR y se completó con 1 µL de la dilución de DNA total, alcanzando un volumen final de 20 µL por reacción. Se repitió el mismo procedimiento para el master mix 2. Se taparon los tubos, se mezclaron las soluciones por 20 segundos en vórtex y se centrifugaron por 10s en la microcentrífuga. Este procedimiento se realizó para todas las muestras. El termociclador fue ajustado de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 4.

Tabla 4: Condiciones de termociclaje para PCR larga

Temperatura	Tiempo	Estado
94°C	2 min	Hold
94°C	10 s	30 ciclos
60°C	30 s	
68°C	8 min	
72°C	5 min	Extensión final
4°C	∞	Hold

Una vez concluido el tiempo de termociclaje, los productos de PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa E-Gel® SizeSelect™ al 0.8 % para verificar la presencia de los amplicones de 8kb. Se mezclaron 5µL de producto de PCR con 15 µL de Intercalante SYBR® Gold (diluido 1:500 µL de agua de grado molecular) y fueron cargados sobre el gel colocado en la unidad E-Gel® iBase™ y el transiluminador E-Gel®

Safe Imager™. En un carril se añadieron 10µL de marcador de pesos de 1Kb (diluido 1:40 µL de agua de grado molecular). Se colocó la tapa de la base y se realizó el corrimiento mediante la selección del programa Run SizeSelect 1% por 15 minutos. El transiluminador incluido en la cámara de electroforesis permitió verificar el desplazamiento de la muestra y observar el tamaño del amplicón.

5.4.2.2 Purificación de productos de 8Kb

La purificación de los productos generados de la PCR Larga se realizó mediante el kit Agencourt® AMPure® XP el cual se basa en el empleo de perlas magnéticas que se unen al DNA por medio de su carga, permitiendo la separación del mismo del resto de los compuestos contenidos en la solución. Los 15 µL de producto de la PCR larga fueron transferidos a un tubo LoBind de 1.5 µL, y se añadieron 27 µL de perlas magnéticas (de acuerdo a las especificaciones de añadir 1.8 µL de perlas magnéticas por 1 µL de producto) mezclando por pipeteo y dejando incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se colocaron los tubos en la gradilla magnética por 5 minutos (o hasta que el sobrenadante se vió traslúcido) y se retiró el sobrenadante. Enseguida se lavaron las perlas con 200 µL etanol al 70% recién preparado, nuevamente se retiró el sobrenadante y se dejaron secar las perlas a temperatura ambiente por 3 minutos. Se realizó la elución de los productos purificados con 40 µL de agua de grado molecular, se resuspendió el botón de perlas y se centrifugó el tubo en la microcentrifuga por 30 segundos, colocándolo enseguida en la gradilla magnética por 5 minutos. Por último se tomaron 38 µL del producto purificado y se cuantificaron en el NanoDrop, siendo muestras óptimas aquellas que tuvieran concentraciones mayores a 20 ng/µL y relaciones 260/280 y 260/230 cercanas a 2.

5.4.2.3 Pool de Amplicones

Para la construcción de la biblioteca genómica fue necesario generar una mezcla que contenía ambos amplicones (PCR1 y PCR2) para asegurar una cobertura total del genoma mitocondrial en la secuenciación. Para ello fue requerido que el pool de amplicones contuviera una concentración total de 100 ng/µL de tal forma que de

acuerdo a las concentraciones obtenidas por el NanoDrop se realizaron los cálculos para tener el volumen indicado: 50 ng/ μ L del producto de la PCR1 y 50 ng/ μ L de la PCR2.

5.4.2.4 Fragmentación de los productos de PCR larga

La secuenciación por medio del Ion Torrent requiere de productos de aproximadamente 200 pb. Para ello se realizó la fragmentación de los productos de la PCR larga a través del ultrasonificador Covaris®. Para esto, los Pools de amplicones fueron llevados a un volumen final de 130 μ L con Low TE y se transfirieron a un microtubo para sonicación. Se llenó el depósito del sonicador con agua a una temperatura de 4°C y se colocó el microtubo en el adaptador de carga, se cerró verificando que el agua del depósito cubriera totalmente la muestra. Se seleccionó el programa de fragmentación “200pb mitDNA” y se corrió, verificando previamente las condiciones descritas en la tabla 5. Al finalizar, se transfirió el producto a un tubo nuevo y se corroboraron los fragmentos en una electroforesis en gel de agarosa E-Gel® SizeSelect™ al 2% empleándose como intercalante SYBR® Gold y marcador de pesos de 50 pb. El patrón adecuado de la electroforesis correspondió a un barrido que fue de la banda 100 a 500 pb del marcador de pesos.

Tabla 5: Condiciones de sonicación para la fragmentación del mtDNA.

Propiedad	Especificación
<i>Number cycles</i>	6
<i>Bath temperatura</i>	5°C
<i>Bath temperatura limit</i>	30°C
<i>Mode</i>	Frecuency sweeping
<i>Watter Quality Testing Function</i>	OFF
<i>Duty cycle</i>	10%
<i>Intensity</i>	5
<i>Cycle/Horst</i>	100
<i>Time</i>	60 seg

5.4.2.5 Reparación de extremos

La reparación de los extremos de los fragmentos se realizó con la finalidad de que estos no pudieran unirse entre sí por causa de la complementariedad de bases. Para ello a 125 μL del producto fragmentado se le añadieron 33 μL de agua de grado molecular, 40 μL de End Rapir Buffer y 2 μL de Enzyme Repair. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 20 minutos y se purificó por medio de perlas magnéticas de acuerdo al protocolo descrito por el kit Agencourt® AMPure® XP.

5.4.2.6 Formación de biblioteca: Ligación de adaptadores

Los adaptadores son pequeñas secuencias empleadas como señales de reconocimiento para los primers que amplifican los fragmentos de la biblioteca. Se añaden Barcodes específicos para cada muestra que sirven como identificador de la misma en el chip de secuenciación. Para ello se emplearon los kits Ion Xpress™ Plus Fragment Library y el Ion Xpress™ Barcode Adapters. Los reactivos fueron añadidos a un tubo de PCR de acuerdo al volumen descrito en la tabla 6 para cada una de las muestras. Se empleó un Ion Xpress™ Barcode diferente para cada biblioteca.

Tabla 6: Reactivos de la ligación de adaptadores a las bibliotecas

Barcoded Libraries	
Componente	Volumen (μL)
DNA fragmentado	25
10X Ligase Buffer	10
Ion Xpress™ P1 Adapter	2
Ion Xpress™ Barcode X	2
dNTPs Mix	2
Nuclease-free Water	49
DNA ligase	2
Nick Repair Polymerase	8
Total	100 μL

Una vez añadidos los reactivos se incubaron en el termociclador bajo las condiciones descritas en la tabla 7. Por último se transfirieron los productos a un tubo LoBind y se realizó la purificación de los fragmentos ligados mediante perlas magnéticas con el kit

Agencourt® AMPure® XP, empleándose 140 µL de perlas (1.4 µL de perlas por volumen de muestra) y un volumen de 20 µL de Low TE como eluyente.

Tabla 7: Condiciones de termociclaje para la ligación de adaptadores a la biblioteca

Temperatura	Tiempo	Estado
25°C	15 min	Hold
72°C	5 min	Hold
4°C	∞	Hold

5.4.2.7 Size-select: selección de la biblioteca no amplificada

Este paso consiste en la separación de los fragmentos de aproximadamente 200 pb para consolidar la biblioteca a secuenciar. Se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa E-Gel® SizeSelect™ al 2 %. Se agregaron 5 µL de Intercalante SYBR® Gold (diluido 1:500) sobre los pozos destinados a ser ocupados por las muestras y posteriormente se añadieron 20 µL de producto de DNA ligado. En los carriles de los extremos añadieron 10µL de marcador de pesos de 50 pb (diluido 1:40) y sobre los pozos colectores 10 µL de agua de grado molecular. Se colocó la tapa de la base y se realizó el corrimiento mediante la selección del programa “Run SizeSelect 2%” por 15 minutos monitoreándolo por el transiluminador. Se detuvo el corrimiento cuando la banda de 250 pb se posicionó antes del pozo colector. Se colectó el contenido del pozo colector y se añadieron 10 µL más de agua. Se continuó con el corrimiento y se detuvo hasta que la banda de 350 pb se posicionó sobre el pozo colector y se retiró el contenido del mismo, se añadieron 10 µL de agua para lavar el pozo y se colectó junto con el resto. Se continuó con el corrimiento para verificar que se haya seleccionado la banda requerida.

5.4.2.8 Amplificación de Librerías

Se realizó una amplificación de las librerías con el Kit Ion AmpliSeq™ Library para obtener una mayor concentración de fragmentos. A 25 µL de cada biblioteca se le añadieron 100 µL de Platinum® PCR Super Mix y 5 µL de Library Amplification Primer

para obtener un volumen final de 130 μL . Se mezclaron y centrifugaron por 30 segundos. Se colocaron las bibliotecas en el termociclador de acuerdo con las condiciones indicadas en la tabla 8.

Tabla 8: Condiciones de termociclaje para la PCR de amplificación de bibliotecas.

Temperatura	Tiempo	Estado
95°C	5 min	Hold
95°C	15 s	8 ciclos
58°C	15 s	
70°C	1 min	
4°C	∞	Hold

5.4.2.9 Cuantificación de la biblioteca

La cuantificación de la biblioteca no amplificada se realizó mediante una PCR cuantitativa (qPCR) empleando el kit Ion Library Quantitation. En primera instancia se prepararon las diluciones de los estándares 1, 2 y 3, mezclando 6 μL de los mismos con 54 μL de agua. Las muestras fueron diluidas 1:1000, se tomó 1 μL y se añadieron 99 μL de agua. Las reacciones fueron preparadas sobre una placa de 96 pozos. Cada reacción fue realizada por triplicado y para cada una de ellas se añadieron 10 μL de Ion Library Amplification Mix, 1 μL de Taqman® Assay y 9 μL de muestra (estándar, biblioteca o control). Se selló la placa con las películas adheribles, se centrifugó a 3000 rpm por 1 minuto para descender todo el líquido y se introdujeron en el sistema de PCR Tiempo Real 7900 HT Fast System VIIA™ 7, verificando las condiciones de termociclaje descritas en la tabla 9 y proporcionando los datos requeridos por el software.

Tabla 9: Condiciones de termociclaje para qPCR

Temperatura	Tiempo	Estado
50°C	2 min	Hold
95°C	20 seg	Hold
95°C	1 seg	40 ciclos
60°C	20 seg	
4°C	∞	Hold

5.4.2.10 Análisis de fragmentos en bioanalizador

Se empleo el Kit High Sensitivity DNA Analysis (Agilent Technologies) el cual sirve para visualizar fragmentos complejos de DNA o librerías con una alta precisión. Las muestras depositadas en un chip atraviesan una matriz donde son separadas por tamaño y detectadas por métodos ópticos permitiendo conocer su concentración. Primeramente se preparó la matriz para posteriormente cargar el chip de acuerdo al protocolo descrito por el kit. Se cargaron las muestras, el marcador de peso molecular y se insertó el chip en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer.

5.4.2.11 PCR en emulsión (emPCR)

La emPCR es una reacción en la que los fragmentos de la biblioteca son adaptados a las partículas esféricas (ISP, siglas de su nombre en inglés: Ion Sphere Particles, que serán depositadas en cada uno de los micropozos del chip de secuenciación) y que son amplificadas en un microrreactor generado por las micelas formadas en la emulsión, de tal manera que así se obtiene un mayor número de lecturas de una misma región. Primeramente se preparó la mezcla de emulsión o fase acuosa, para esto se formó un Pool de librerías adicionando 10 μL de cada una con concentración 20 pM y se agregaron los reactivos del kit Ion PGMTM Template OT2 200 con los volúmenes descritos en la tabla 10. A la mezcla de emulsión se añadieron 100 μL de Ion SphereTM Particles (ISP's), se mezcló, centrifugó y se colocó la fase acuosa sobre el tubo central del dispositivo de carga, lentamente cuidando de no formar burbujas. Posteriormente se añadieron lentamente 1000 μL del Ion PGMTM OT2 Oil Reaction en el mismo canal, se tomaron 500 μL más y se volvieron a añadir. Se encendió el equipo Ion OneTouchTM 2, se presionó RUN, se seleccionó el protocolo "Ion PGM OT2 200", asistente y se siguieron las instrucciones del manejo de los dispositivos. El dispositivo de carga con la mezcla fue invertido cuidadosamente y se comenzó la corrida. Al final se hizo el cálculo del porcentaje de ISP's que fueron adaptadas a los fragmentos, tomándose como valor aceptable un porcentaje de ISP's entre el 10 y 30%.

Tabla 10: Componentes de la emPCR

emPCR	
Reactivo	Volumen (μL)
Agua libre de nucleasas	25
Ion PGM TM Template OT2 200 Reagent Mix	500
Ion PGM TM Template OT2 200 PCR Reagent	300
Ion PGM TM Template OT2 200 Enzyme Mix	50
Pool de Librería (20 pM)	25
Total	900 μL

5.4.2.12 Enriquecimiento de ISP's

El enriquecimiento consiste en seleccionar las ISP's que fueron adaptadas a los fragmentos, para ello se empleó el equipo Ion OneTouchTM ES (Enrichment System) que selecciona los IPS's templados a través de una afinidad entre los adaptadores externos de los fragmentos de la librería y la solución de enriquecimiento, generando un tipo de selección positiva parecida a la purificación por medio de perlas magnéticas. Para ello se agregó la mitad de la solución de ISP's obtenidas en el equipo y se inició la corrida.

5.4.2.13 Secuenciación Ion Torrent PGM

La reacción de secuenciación se realizó en un Chip 314 que cuenta con 1 millón de pozos y con capacidad de secuenciación hasta de 10 megabases (mb). Para ello se transfirió la mitad del volumen enriquecido de ISP's a un tubo de PCR y se adicionaron 5 μL de Control Ion SphereTM. Se mezclaron y centrifugaron. Se removió el sobrenadante y se agregaron 3 μL de Sequencing Primer, llevándose a un volumen final de 6 μL con Annealing Buffer. Se metieron al termociclador por 2 minutos a 95°C y 37°C por 2 minutos. Posteriormente se agregó 1 μL de Ion PGM Sequencing 200 v2 Polymerase para obtener un volumen final de 7 μL y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. En el chip previamente revisado se cargaron los 7 μL de muestra en el canal de carga, aproximadamente 1 μL por segundo para evitar la formación de burbujas. Se centrifugó 30 segundos y se mezcló la muestra lentamente con la pipeta evitando la formación de burbujas. Este proceso se repitió una vez más y por último se colocó el

chip en el equipo Ion Torrent Sequencer PGM, se seleccionaron los protocolos y se ejecutó la corrida.

5.5 Análisis de datos

Los datos de secuenciación por Ion Torrent fueron analizados a través del programa Ion Torrent Software Suite Vs. 3.2. El análisis de las variantes encontradas tras la secuenciación fueron buscadas y comparadas con la secuencia de referencia del genoma mitocondrial rCRS (Revised Cambridge Reference Sequence) de la base de datos MITOMAP (<http://mitomap.org/MITOMAP>). Se compararon las variantes con las reportadas en las bases de datos y se identificaron aquellas descritas como asociadas al riesgo a padecer DM2, así como aquellas no registradas, las cuales fueron validadas.

5.6 Validación de resultados

La validación de las variantes no registradas se llevó a cabo mediante una secuenciación capilar basada en el método de Sanger. Para ello se realizó el diseño de primers mediante el programa Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) y cuyo amplicón contuviera la variante de interés.

5.6.1 PCR Touchdown

Se realizó la amplificación del fragmento que contuviera la variante a validar mediante una PCR Touchdown, la cual consiste en variar 5 grados la temperatura de alineación para generar una mayor especificidad en el flanqueo de los primers con el templado. Se añadieron los reactivos descritos en la tabla 11 llevando la reacción a un volumen final de 50 μ L. Se seleccionó el programa de termociclaje Touchdown PCR verificando las condiciones descritas de la tabla 12. Posterior a la corrida se evaluaron los fragmentos amplificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Tabla 11: Reactivos por reacción para la PCR Touchdown.

Master Mix	
Componente	Volumen (μL)
Buffer 10X	5
MgCl ₂	5
dNTP's	2
DNA polimerasa	1
Agua	28
Primer F	2
Primer R	2
DNA muestra	5
Total	50 μL

Tabla 12: Programa de termociclaje PCR Touchdown.

Temperatura	Tiempo	Estado
95°C	7 min	Hold
95°C	20 s	10 ciclos
65°C*	20 s	
68°C	30 s	
95°C	20 s	45 ciclos
60°C	20 s	
68°C	30 s	
72°C	7 min	Extensión final
4°C	∞	Hold

5.6.2 Purificación de Amplicones

Los amplicones fueron purificados a través de columnas con el kit QIAquick PCR Purification. Se agregaron 200 μL del Buffer PB al producto de PCR, mezclando y transfiriendo la solución a la columna del Kit. Se centrifugó a 13 mil rpm por 1 minuto, se desechó el filtrado y se añadieron a la columna 750 μL del buffer PE, centrifugando a 13 mil rpm por 1 minuto. Se eluyó el producto en 25 μL de agua grado molecular. Se cuantificaron los productos purificados en el NanoDrop y se realizaron las diluciones de los productos a 15 ng/ μL en un volumen de 20 μL para realizar la reacción de secuenciación.

5.6.3 Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el Kit BigDye Terminator v3.1 en el Secuenciador ABI 3130X. Se tomaron 5 μ L de la muestra y se adicionaron 8 μ L de Terminator Ready Reaction Mix, 1 μ L de primer (forward o reverse) y 6 μ L de agua desionizada teniendo un volumen final de 20 μ L. Se aplicaron las condiciones de termociclaje descritas en la tabla 13 y se purificaron los productos previos a la separación electroforética. Las muestras fueron corridas por duplicado añadiendo en una el primer forward y en la otra el primer reverse.

Tabla 13: Condiciones de termociclaje para secuenciación por electroforesis capilar.

Temperatura	Tiempo	Estado
96°C	1 min	Hold
96°C	10 s	25 ciclos
50°C*	5 s	
60°C	4 min	
4°C	∞	Hold

6 RESULTADOS

6.1 Población analizada

La población total de estudio correspondió a 25 individuos de diferente grupo étnico entre los cuales se incluyeron 2 Huastecos (8%), 3 Mayas (12%), 3 Mazatecos (12%), 3 Mixes (12%), 3 Náhuatl (12%), 3 Otomí (12%), 3 Seris (12%), 3 Tarahumaras (12%) y 2 Zapotecos (8%) (Fig.19). Los individuos presentaron una edad promedio de 61 años, abarcando un rango de 22 a 84 años. Del total de ellos, 13 (52%) fueron hombres y el 12 (48%) fueron mujeres; a su vez, 12 (48%) de los individuos estudiados fueron sanos, mientras que la presencia de DM2 se documentó en 13 (52%), con un promedio de 130 mg/dL de glucosa. De estos pacientes con DM, 5 (38.5%) presentaron hipercolesterolemia y 11 (84.6%) triacilgliceridemia (Tabla 14).

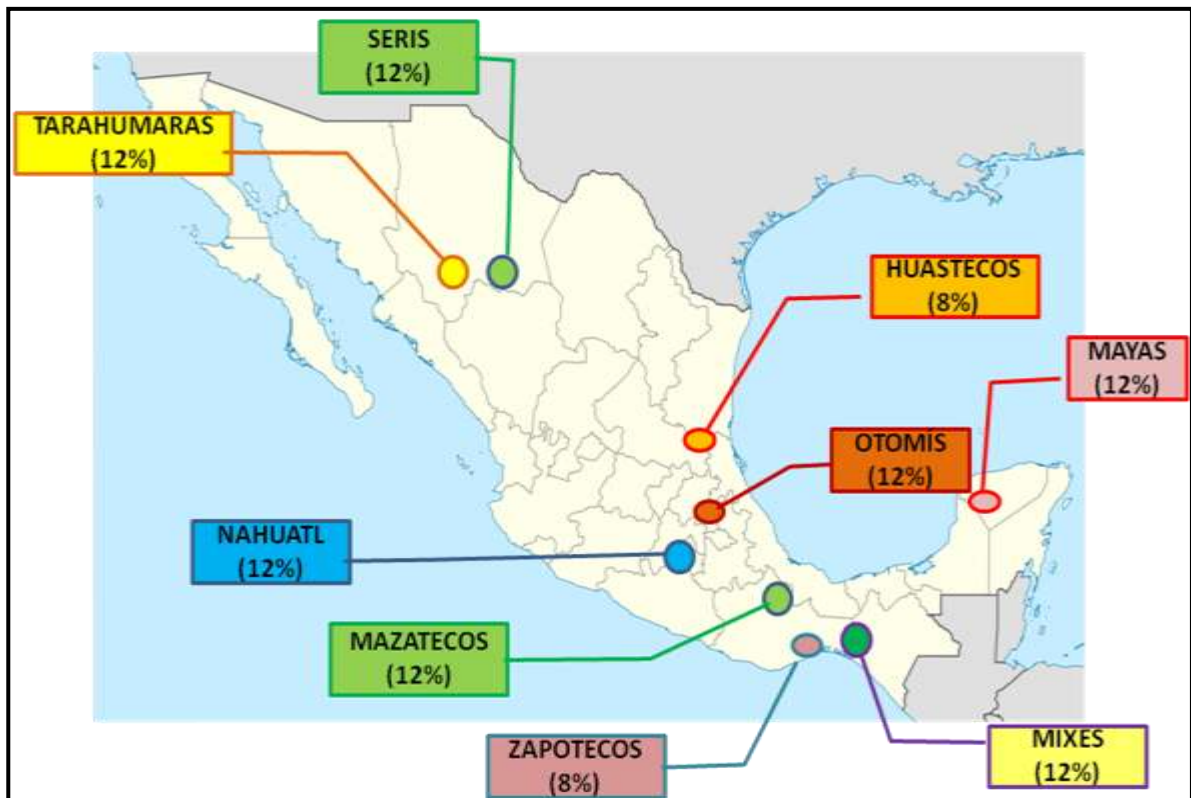


Figura 19: Población analizada. Distribución geográfica de las etnias de estudio

Tabla 14: Datos demográficos y bioquímicos de los pacientes seleccionados para el estudio

ID	Sexo	Edad	Etnia	Glucosa	Tgl	Col	Dx
AM1465	1	60	Huasteco	102	173	177	2
AM1520	1	70	Huasteco	180	170	113	2
AM0058	2	40	Maya	112	205	189	2
AM0080	1	41	Maya	103	487	212	2
DM0300	2	53	Maya	86	260	194	1
AM0815	2	77	Mazateco	86	150	131	1
AM0816	1	53	Mazateco	89	174	181	2
AM0805	2	66	Mazateco	91	240	163	1
AM2028	2	22	Mixe	76	94	172	1
AM2044	1	84	Mixe	106	225	186	2
AM2064	2	55	Mixe	80	226	148	1
AM0064	1	49	Náhuatl	249	97	215	2
AM0995	1	89	Náhuatl	84	139	123	1
AM1299	2	58	Náhuatl	101	354	269	2
AM0122	1	47	Otomí	96	310	188	1
AM1101	2	84	Otomí	128	180	212	2
AM1140	1	75	Otomí	79	113	143	1
AM0076	1	40	Seri	115	190	193	2
AM0767	1	80	Seri	96	207	202	1
AM0769	2	69	Seri	71	113	177	1
AM0654	2	74	Tarahumara	130	206	185	2
AM0665	2	53	Tarahumara	92	267	200	1
AM0692	1	74	Tarahumara	92	142	143	1
AM0057	2	48	Zapoteco	169	650	290	2
AM0084	1	64	Zapoteco	103	69	136	2

DM: >100 mg/dL glucosa en ayuno
 Hipertrigliceridemia: >150 mg/dL
 Hipercolesterolemia: >200 mg/dL
 (Criterios ATPIII)

Sexo: 1= Hombre 2= Mujer
 Dx: 1= Sano 2= DM2

6.2 Análisis molecular

6.2.1 Controles de calidad para la secuenciación masiva

En el estudio se alcanzó una densidad del 90 % de ISP cargadas y la secuenciación de 16.3Mb (Fig 20). Del 90% de pozos ocupados con ISP, el 83% correspondieron a ISP's policlonales (ISP con fragmentos de la biblioteca distintos). Mientras que el 17% consistió de ISP monoclonales (ISP's con secuencias iguales). De ese 17%, el 58% corresponde a ISP óptimos que fueron secuenciados (Fig. 21).

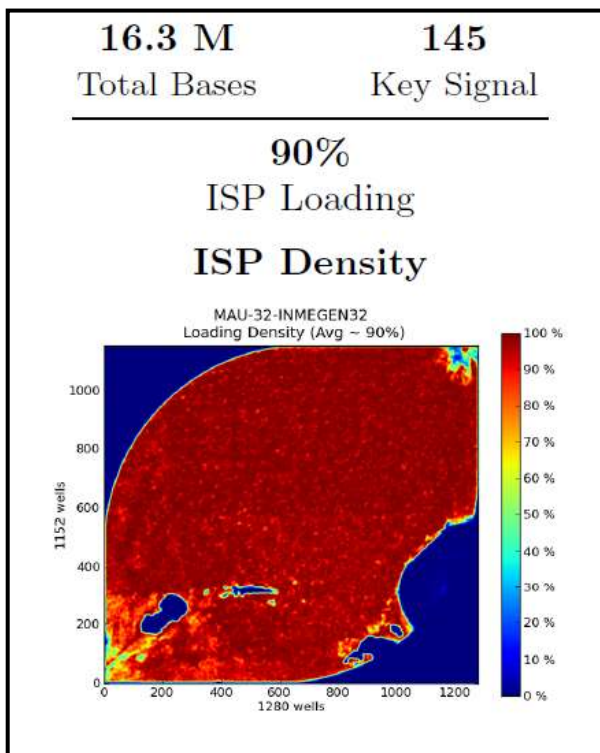


Figura 20: Se señala el total del número de lecturas obtenidas, así como la cantidad de ISP que fueron óptimas.

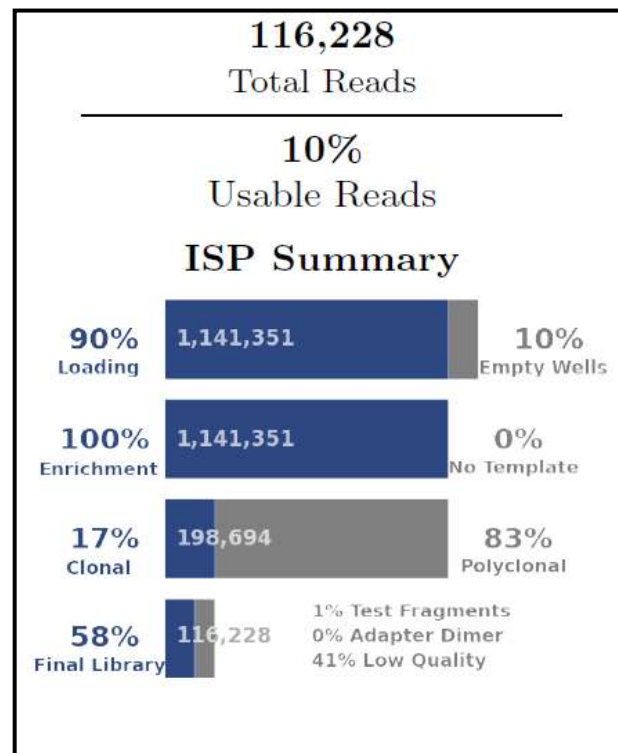


Figura 21: Porcentaje de densidad de ISP cargadas al semiconductor. Se señala el número total de bases secuenciadas

El ensamblaje y alineación de los datos generados con la secuenciación del genoma mitocondrial de referencia demostró que de todas las secuencias obtenidas un 93% correspondió a genoma mitocondrial, obteniéndose una cobertura de 100X y una profundidad de 183.6X (Fig. 22).

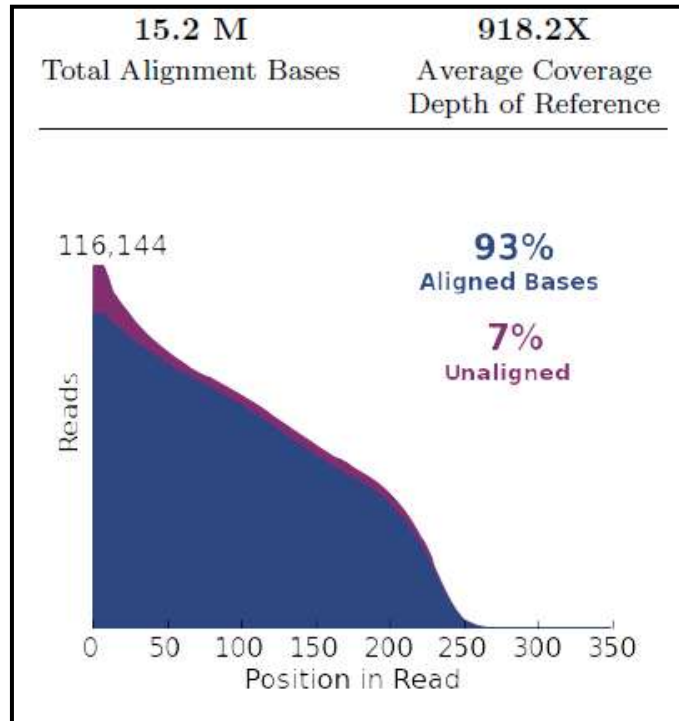


Figura 22: Datos del alineamiento de la secuencia obtenida con la del mtDNA.

6.2.2 Número y naturaleza de las variantes identificadas

En el estudio se identificaron un total de 198 variantes distribuidas en el mtDNA de 25 participantes (Anexo B). De ellas, 70 (35.4%) se localizaron en la región no codificante y 128 (64.6%) en la región codificante. La naturaleza de las variantes codificantes incluyen sinónimos (74: 57.8%), no sinónimos (27: 21.1%), frameshift (4: 3.1%) y variantes localizadas en tRNA (7: 5.5%) y rRNA (16: 12.5%) (Tabla15).

Tabla 15: Total y tipos de variantes encontradas

Total de variantes					
198					
Región NO codificante	Región Codificante				
70 (35.4%)	128 (64.6%)				
	Sinónimos	No sinónimos	Frameshift	Genes tRNA	Genes rRNA
	74 (57.8%)	27 (21.1%)	4 (3.1%)	7 (5.5%)	16 (12.5%)

6.2.3 Variantes nuevas

Se identificaron 12 (6.1%) variantes no descritas en las bases de datos, las cuales se presentaron con una frecuencia del 4 al 12% de la población analizada. De éstas, el 41.7% correspondió a deleciones de más de una base, el 41.7% a cambios de una o dos bases y finalmente el 16.6% a inserciones de sola una base (Tabla 16).

Tabla 16: Características de las variantes sugeridas como nuevas.

Posición	Cambio	Gen/Región	Frecuencia
55	TA-CC	D-Loop	4 %
234	AA-GG	D-Loop	8 %
311	C-ins	D-Loop	8 %
514	CA-del	D-Loop	12 %
1525	C-T	RNA1	4 %
4247	T-del	ND1	8 %
8272	CCCCCTCTAC-del	No codificante	8%
8860	G-ins	ATP6	8%
8946	AC-GT	ATP6	4 %
9166	T-C	ATP6	4 %
9545	A-del	CO3	8 %
10814	A-del	ND4	4 %

Cuatro variantes potencialmente nuevas fueron validadas mediante secuenciación capilar. En la variante 311C-ins se observó la inserción de una Citosina en la posición 310 que recorre a la inserción descrita en la posición 311, encontrándose así una inserción doble (Fig. 23 y Fig. 24). Las otras dos variantes corresponden a la 514CA-del (Fig. 25) y a la 8271ACCCCTCT-del (Fig. 26). La 310C-ins y la 311C-ins se localizan en la región D-loop (Tabla 17), HV2 dentro de la zona del CBS (Fig. 27). Por otro lado la 514CA-del también se encuentra dentro del D-loop, sin embargo no se le ha encontrado función alguna (Fig. 27), y finalmente la 8271ACCCCTCT-del también se encuentra en una región no codificante y es tomado en cuenta como uno de los marcadores del haplogrupo B (Tabla 17).

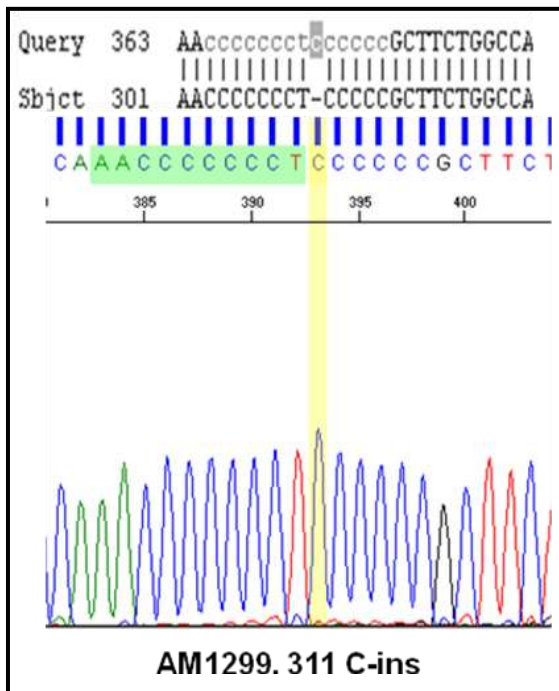


Figura 23: Electroferograma de la variante 311C-ins en la muestra AM1299. En la parte superior se muestra el BLAST entre la secuencia obtenida y la de comparación. Se señala en amarillo la inserción.

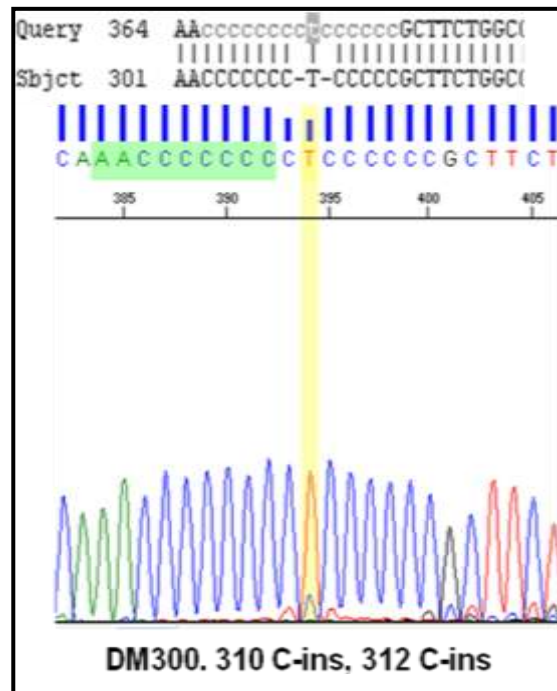


Figura 24: Electroferograma de la variante 311C-ins en la muestra DM300. En la parte superior se muestra el BLAST entre la secuencia obtenida y la de comparación. Se señala en amarillo la timina que separa la nueva inserción de aquella descrita por el Ion Torrent.

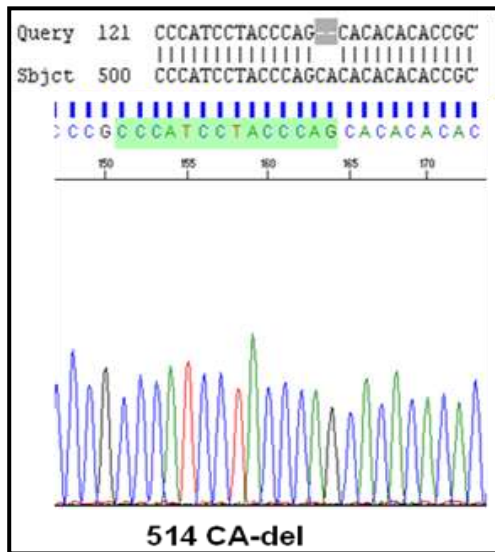


Figura 26: Electroferograma de la variante 514 CA-del. En la parte superior se muestra el BLAST entre la secuencia obtenida y la de comparación. Se señala en gris la posición de la delección en la muestra comparada con la secuencia del DNAm.

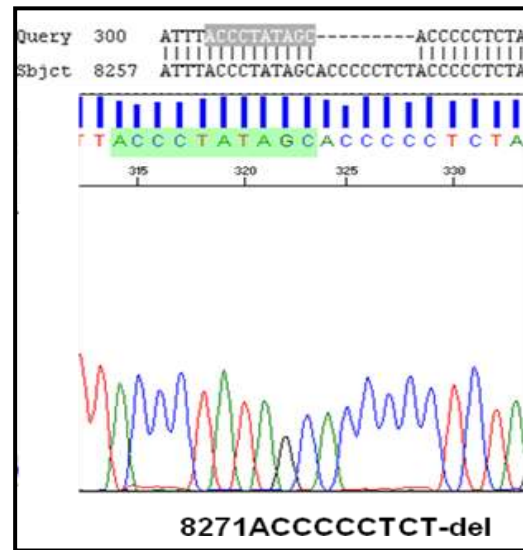


Figura 25: Electroferograma de la variante 8271 ACCCCCTCTAC-del que corresponde a la presencia del marcador del haplogrupo B.

Tabla 17: Características de las variantes validadas.

Posición	Variante	Región	Función
311	C-ins	D-loop, HV2	CBS2
310	C-ins	D-loop, HV2	CBS2, Origen de replicación cadena H
514	CA-del	D-loop	No codificante
8271	ACCCCTCT-del	No codificante	No codificante

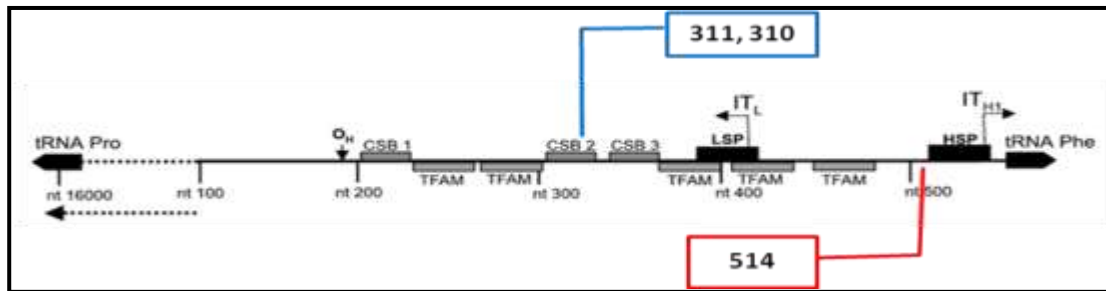


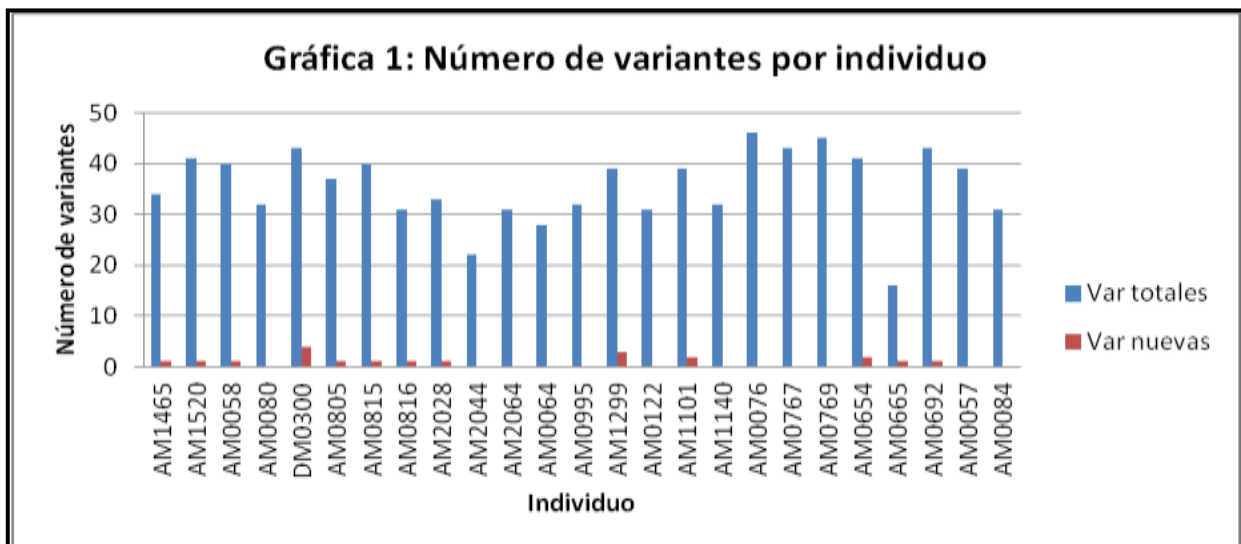
Figura 27: Localización de las variantes en el genoma mitocondrial.

6.2.4 Diversidad interindividual y haplogrupos

Se encontraron entre 16 y 46 ($\bar{X}=35$) variantes por individuo. Los individuos con mayor y menor diversidad fueron los Seri y Mixe con un promedio de 45 y 29 variantes, respectivamente. El mayor número de variantes no descritas en las bases de datos fue identificado en los mayas, en tanto que en los Seris y Zapotecos no se detectó ninguna (Gráfica 1). Por otro lado el haplogrupo (Anexo C) predominante en los individuos de estudio fue el A (10; 40%), seguido del C (7; 28%), el B (6; 24%) y por último, en menor frecuencia el haplogrupo D (2; 8%) (Tabla 18).

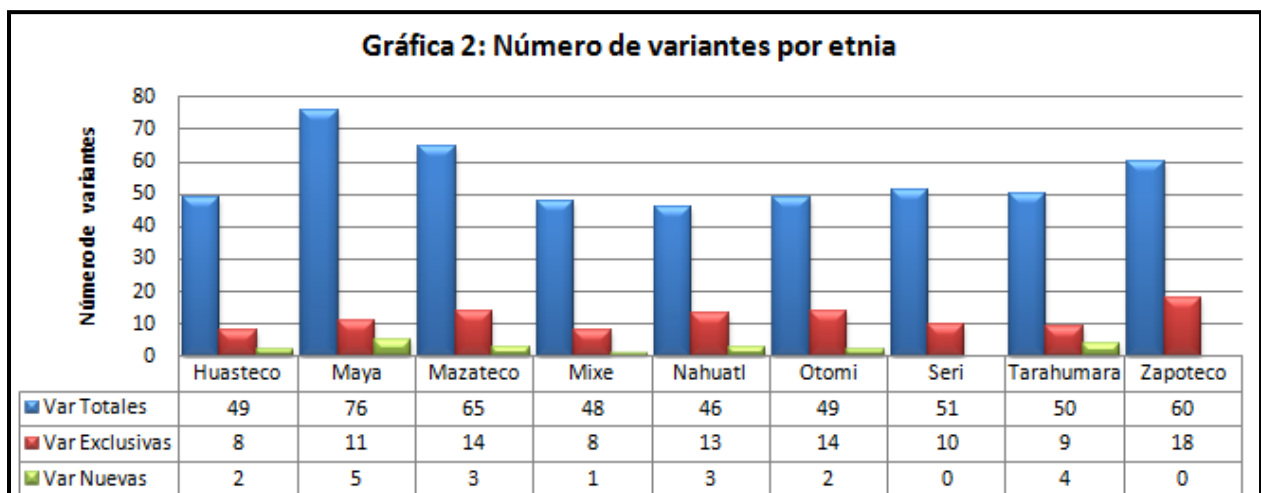
Tabla 18: Número de variantes por individuo.

Muestra	Etnia	Total Variantes	Nuevas Variantes	Haplogrupo
AM1465	Huasteco	34	1	B
AM1520	Huasteco	41	1	B
AM0058	Maya	40	1	C
AM0080	Maya	32	0	A
DM0300	Maya	43	4	A
AM0805	Mazateco	37	2	B
AM0815	Mazateco	40	1	D
AM0816	Mazateco	31	1	B
AM2028	Mixe	33	1	A
AM2044	Mixe	22	0	B
AM2064	Mixe	31	0	A
AM0064	Náhuatl	28	0	A
AM0995	Náhuatl	32	0	A
AM1299	Náhuatl	39	3	A
AM0122	Otomí	31	0	A
AM1101	Otomí	39	2	A
AM1140	Otomí	32	0	A
AM0076	Seri	46	0	C
AM0767	Seri	43	0	C
AM0769	Seri	45	0	C
AM0654	Tarahumara	41	2	C
AM0665	Tarahumara	16	1	C
AM0692	Tarahumara	43	1	C
AM0057	Zapoteco	39	0	D
AM0084	Zapoteco	31	0	B



6.2.5 Diversidad interétnica

Se observó que los grupos étnicos presentaron un número total de variantes entre 46 y 76 ($\bar{X}=55$), siendo los Mayas, aquellos que mostraron el número mayor de variantes ($n=76$) en relación con el resto de las etnias; por el contrario el grupo Náhuatl presentó el menor número ($n=46$) de variantes en la secuencia del genoma mitocondrial. Cada grupo étnico presentó un número de variantes exclusivas o propias que no se presentaron en otro grupo, este número fue mayor para los Zapotecos ($n=18$) y el menor para los Mixes ($n=8$) y Huastecos ($n=8$) (Ver Anexo D). Por otro lado, los Mayas también mostraron un número mayor de variantes nuevas ($n=5$) a diferencia de los Seris y Zapotecas, que no presentaron ninguna (Gráfica 2).

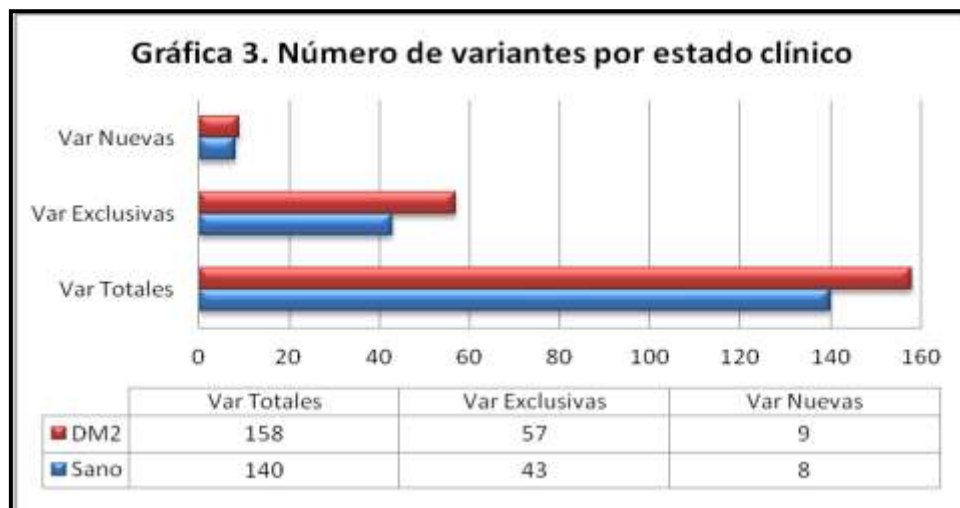


De todas las variantes encontradas por el Ion Torrent, solo 12 fueron compartidas entre los grupos étnicos de estudio y sólo 6 variantes fueron identificadas en las 25 muestras (Tabla 19).

Tabla 19: Variantes compartidas por todas las etnias y los individuos analizados

	Variantes
Encontradas en todas las etnias	A73G, A263G, C309T, A750G, A1438G, A2706G, A4769G, C7028T, A8860G, G11719A, C12705T, A15326G, C16223T
Encontradas en todos los individuos	A750G, A1438G, A2706G, A4769G, C7028T, A8860G

Las variantes también fueron contadas y agrupadas con respecto a la ausencia y presencia de DM en los individuos, observándose un número de variantes totales, exclusivas y nuevas mayor en aquellos con DM que en los controles (Gráfica 3).



6.2.6 Variantes asociadas a DM2

De las variantes del mtDNA descritas a la fecha como asociadas a DM se identificaron la A1438G, la C5178A, la A10398G y la T16189C, mismas que estuvieron representadas en el 100%, 8%, 32% y 16% de la población total, respectivamente. Cuando se realizó el análisis comparativo entre pacientes afectados con DM e individuos sanos, la distribución de estas variantes no reveló diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) (Tabla 20). Por otro lado, la distribución de las variantes asociadas a DM en las

muestras, reveló que solo la AM815 contiene las cuatro variantes identificadas en el análisis (Fig 28).

Tabla 20: Variantes identificadas en pacientes con DM2.

Variante	Gen	Función	Casos	Controles	P
A1438G	RNA1	rRNA	13/13 (100%)	12/12 (100%)	1
C5178A	ND2	NS: L-M	1/13 (7.7%)	1/12 (8.3%)	0.95
A10398G	ND3	NS:T-A	3/13 (23.1%)	4/12 (33.3%)	0.56
T16189C	D-loop	Control	2/13 (15.4%)	2/12 (16.6%)	0.93

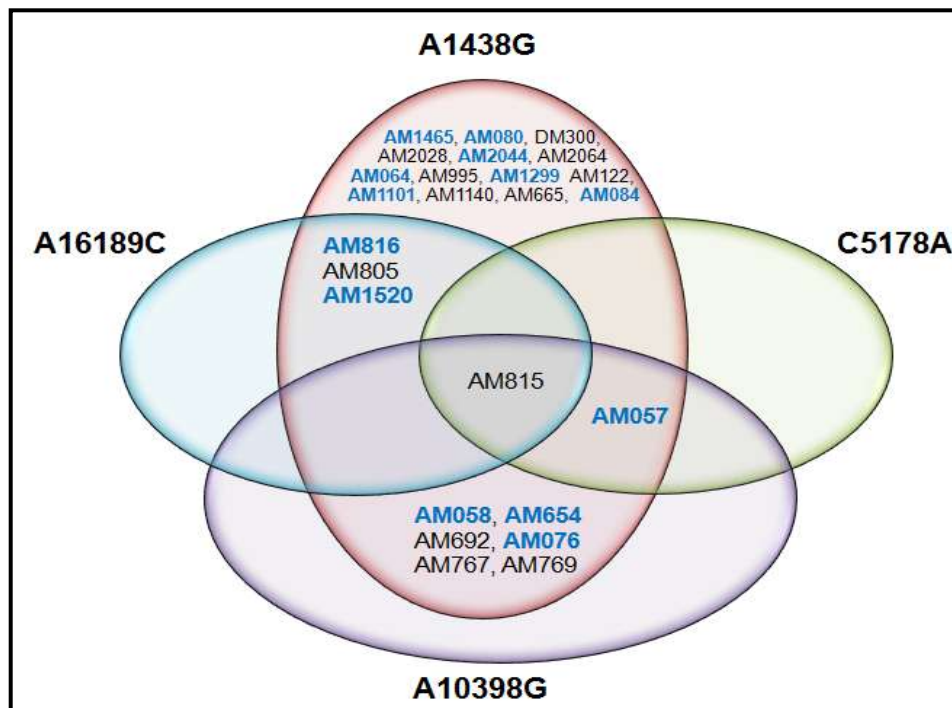


Figura 28: Diagrama de Venn que muestra las variantes compartidas asociadas a DM2 que se identificaron en las muestras. Los individuos marcados con azul representan aquellos que están diagnosticados con DM2.

7 DISCUSIÓN

Las enfermedades mitocondriales corresponden a un grupo de trastornos basados en una deficiencia en la cadena respiratoria, misma que puede ser causada por variaciones en el mtDNA. Sin embargo la presencia de estas enfermedades se ve subestimada y su diagnóstico puede ser gravemente sesgado por la alta heterogeneidad clínica que presentan los padecimientos. Una de las patologías a las cuales recientemente se le ha puesto mayor atención es la DM2 ya que su prevalencia ha aumentado drásticamente en todo el mundo en los últimos años, convirtiéndose en un gran problema de salud pública. México no es la excepción pues datos de la ENSANUT del año 2012 indican que la prevalencia de DM2 para ese año llegó a ser del 9.2% con variaciones de acuerdo a la entidad federativa. Así mismo datos de la Federación Internacional de Diabetes indican que actualmente México tiene una prevalencia de DM2 del 13%.

La etiología de la DM2 es multifactorial donde los factores genéticos nucleares de riesgo tienen una contribución fundamental. Sin embargo, existen evidencias de la existencia de un vínculo entre esta entidad con variantes en la secuencia del genoma mitocondrial. La mayoría de los estudios se han realizado en población europea y asiática, en donde se ha reportado que alrededor del 1% de los casos se asocia a la presencia de mutaciones en el mtDNA.

Así, considerando lo anterior, aunado a la historia de la población mexicana y al patrón de herencia (materno) del genoma mitocondrial es posible que variantes génicas únicas otorgadas por el componente genético indígena constituye un factor de riesgo para padecer DM2 en la población mexicana.

Mediante técnicas de secuenciación masiva (plataforma Ion Torrent) se analizó el mtDNA de 25 individuos indígenas de México. A pesar de presentar limitaciones como el hecho de que sólo se generaron lecturas de 116,228 potenciales, el presente estudio reveló que esta tecnología de secuenciación masiva es útil para conocer la estructura del genoma mitocondrial de las poblaciones indígenas analizadas. Aunque a la fecha la secuenciación de

Sanger es el estándar de oro para la identificación de mutaciones o polimorfismos, esta resulta hasta 50% más costosa que la secuenciación masiva. Lo anterior, aunado a que el tiempo de análisis se reduce considerablemente, confiere al método de secuenciación masiva basado en Ion Torrent importantes ventajas sobre otras técnicas de esta naturaleza (Liu, et al, 2012).

Componente genético de la población indígena.

En el presente trabajo se identificaron 198 variantes en relación a la secuencia de referencia. La alta tasa de mutación es característica del mtDNA, el cual es diez veces mayor a la del nDNA, un fenómeno que podría también explicar que 34.3% de las mutaciones se localizaran en las regiones hipervariables HV1, HV2 y HV3 pertenecientes al D-loop. La alta tasa de mutación del mtDNA resulta del hecho de que ésta es una molécula desnuda que no se encuentra protegida por proteínas, además de que se encuentra en un medio en el que coexisten gran cantidad de especies reactivas de oxígeno que pueden provocar una alteración en su secuencia. En este sentido, estos factores podrían explicar también el que la mayoría de los cambios documentados fueran de una sola base (95%) y tan solo el 5% fueran de deleciones o inserciones. Cabe hacer notar, que por secuenciación capilar solo se validaron cuatro variantes, por lo que es importante la validación de cada una de ellas, en partículas las que se presentan en baja frecuencia con el objetivo de descartar la posibilidad de que sean el resultado de errores introducidos durante la generación de las librerías genómicas.

Por otro lado, el análisis de haplogrupos reveló que los más frecuentes fueron el haplogrupo A (40%), C (28%) y B (24%), mientras que el D, se presentó solo en el 8%. Estos hallazgos son concordantes con los reportados previamente para las poblaciones latinoamericanas, incluyendo mestizos e indígenas de México, donde los haplogrupos A-D son considerados como los haplogrupos fundadores, es decir aquellos que trajeron los pobladores que llegaron de Asia a través del Estrecho de Bering (Guardado-Estrada, et al 2008).

Pocos son los estudios que se han realizado en población mestiza de México, donde se reporta al haplogrupo A como de mayor frecuencia y el D como el menos representado. Sin

embargo, son más escasos los estudios de mtDNA en poblaciones amerindias. Un estudio realizado por Peñaloza et al (2007) en siete grupos indígenas, incluyendo tarahumara, náhuatl, otomí y mixteca reportó que el grupo indígena tarahumara no tienen el haplogrupo A, mientras que la otomí, náhuatl y mixteca solo tienen el haplogrupo C. Este estudio es el primero que analiza más grupos étnicos y nuestros datos mostraron que las poblaciones del norte del país, tarahumara y seri, se caracterizan por ser portadores del haplogrupo C, mientras que los grupos étnicos del centro como los náhuatl y otomí portan el haplogrupo A. La distribución heterogénea de los haplogrupos mitocondriales son un reflejo de la historia del mestizaje en nuestra población.

Nuevas variantes

Del total de las variantes identificadas, 12 (6.1%) son potencialmente nuevas (MITOMAP), las cuales se encuentran tanto en región codificante como en la región control del mtDNA. Muchas de ellas corresponden a deleciones, siendo la 514CA-del la más frecuente ya que se presentó en tres individuos (maya, mixteco y náhuatl). El efecto funcional de esta variante es desconocido pero dado que se localiza en una región no codificante, es posible que sea un polimorfismo no funcional. Por su parte, la 310C-ins y la 311C-ins, se localizan en la región CBS2 (Bloque de Secuencias Conservadas 2), por lo que podría tener un efecto funcional. Aunque, se desconoce la función precisa de las regiones CBS, la presencia de estos en la región control de todos los vertebrados examinados hasta ahora, ha llevado a especular sobre su posible participación en la transcripción y la replicación del mtDNA. La evidencia bioquímica para muchas de estas funciones es ahora considerable, particularmente con respecto a CBS2 ya que se han identificado al menos tres endonucleasas que tienen especificidad de sustrato para este sitio. Además se ha visto que corresponde a un sitio sustrato-específico preferencial para la proteína de unión a DNA de una sola hebra, así como para el sitio de unión del Factor de Transcripción Mitocondrial MFT (Gemmell et al, 1996). Dada estas funciones atribuibles a la región CBS2, podría deducirse que las inserciones podrían modificar la afinidad por el sitio de unión de las enzimas sobre el DNA, generando así una alteración en la regulación de la transcripción del genoma mitocondrial.

Por último, la variante 8271ACCCCTCT-del, corresponde a una delección de 9pb en la región no codificante situada entre los genes CYT b y tRNA^{lys}, no se ha observado función biológica alguna, sin embargo se ha documentado su presencia principalmente en pobladores del Este de Asia, estableciéndose como un marcador que designa el haplogrupo B.

Es importante hacer notar que la presencia de estas variantes, hasta ahora solo descritas en los individuos analizados de la población mexicana, apoya la hipótesis de que algunas podrían ser exclusivas de nuestra población y abre paso al desarrollo de proyectos de investigación encaminados a conocer el efecto biológico de las mismas.

Variabilidad interétnica e interindividual

El análisis comparativo entre individuos de diferentes grupos étnicos, mostró que los individuos de origen maya, mazateco y zapoteco presentaron el mayor número de variantes identificadas y reportadas. Los zapotecos y mazatecos, además de los otomíes y náhuatls observaron mayor número de variantes exclusivas, es decir que no se presentaron en ningún otro grupo étnico. Así mismo, el mayor número de variantes nuevas se registró en los mayas, mazatecos, náhuatls y tarahumaras. Estos reflejan la gran diversidad genética entre las poblaciones indígenas de México, mismo que puede estar influenciando por los aspectos socioculturales de cada grupo étnico.

Se ha encontrado que la variación genética que existe entre los distintos grupos poblacionales de los seres humanos es aproximadamente 5 a 15% y que el resto de la variación es observada entre individuos que conforman una población, de hecho se ha estimado que cada individuo es portador de 50 mutaciones mitocondriales en promedio (Logan, 2007; Guardado-Estrada et al, 2008). Esto aunado a la historia cultural de las poblaciones indígenas, explica los hallazgos en los seris, quienes presentaron el mayor número de variantes por individuo, mientras que por etnia fueron los mayas. Lo anterior, pone de manifiesto que la diversidad genética interindividual es mayor a la poblacional.

Notablemente muchas de las variantes compartidas por todos los grupos étnicos y aquellas que fueron compartidas por todos los individuos analizados (Tabla 19) no se encuentran en

las regiones hipervariables ni corresponden a marcadores de haplogrupo (a excepción de la 16223), encontrándose mayoritariamente en zonas codificantes. Lo anterior, resalta la necesidad de desarrollar líneas de investigación que conduzcan al entendimiento del efecto biológico de estas variantes y su participación en el desarrollo de entidades metabólicas.

Variantes asociadas a DM2.

Todas las variantes que se obtuvieron tras la secuenciación fueron buscadas en las bases de datos de MITOWEB para conocer su asociación con entidades humanas (Ver anexo E). De todas ellas, la A1438G, C5178A, A10398G y A16189C se han descrito como asociadas a DM2.

Uno dato que llamó la atención fue la variante A1438G, la cual se halló en todas las muestras analizadas. Esta mutación ha sido asociada con DM2 en población japonesa y se ha reportado en una prevalencia de 2.37 % en pacientes con esta enfermedad, mientras que en los individuos sanos se ha detectado en el 0.29 % (Tawata et al, 1998). Esta variante se ha descrito como una mutación que surgió hace cerca de 60,000 años (Logan, 2007), por lo que nuestros datos sugieren que podría tratarse de una variante aportada por los primeros fundadores de América, sin embargo su asociación con DM2 en la población mexicana debe ser más investigado.

Para la variante C5178A, los estudios de asociación realizados también en pacientes japoneses revelan que el alelo 5178C se presenta en mayor frecuencia (65.9 %) en pacientes con DM2 que en individuos sanos (57.9%) y que a su vez, el alelo 5178A está relacionado con resistencia en la aparición temprana de DM2 (Kokaze, 2005; Wang, 2001). Para los resultados obtenidos en la población indígena, solo dos individuos presentaron la variante y corresponden a uno diabético y a uno sano. Sin embargo estos individuos presentaron el alelo 5178A, el cual que se ha relacionado con niveles bajos de tolerancia a la glucosa en sujetos con índice de masa corporal menor a 22 (Kokaze, 2005). Hacen falta más estudios para determinar la contribución de estas variantes en la susceptibilidad a padecer DM2, además de que se requiere de un análisis de la heteroplasmia, así como a los factores ambientales que predisponen a la gravedad de la misma.

Las variantes A16189C y A10398G se han analizado en poblaciones asiáticas, siendo más prevalente la A10398G en sujetos de la India, sin embargo el estudio concluye que la segregación haplotípica de ambas variantes contribuye a una mayor susceptibilidad al padecimiento de DM2 (Bhat et al, 2006). No se conoce el papel biológico de las variantes A16189C y A10398G, pero se ha sugerido que pueden alterar la respuesta al estrés oxidativo y aumentar la producción de ROS respectivamente (Bhat et al, 2006). En los individuos indígenas analizados en este estudio, la variante A10398G fue la segunda más prevalente, presentándose tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos.

En cuanto a las variantes C5178A y A16189C forman parte de los marcadores que establecen los haplogrupos D y B respectivamente. Esto sugiere que estas variantes se pueden segregar de acuerdo al haplogrupo, y siendo que el haplogrupo B es uno de los más prevalentes en México, podría explicar que sea una de las variantes que hace a la población mexicana más susceptible al desarrollo de DM2. Diversos estudios indican que la variante A16189C está presente en una proporción significativa de las personas con DM2 en todo el mundo, con una prevalencia de 93% en polinesios y 50% en los indios Pima. En Reino Unido la prevalencia de la variante 16189 ha sido del 11% en los individuos diabéticos y se muestra un incremento de la frecuencia con respecto a los niveles de insulina en ayuno (Poulton, 2002).

Resulta interesante el hecho de que el individuo mazateco AM815 fue el único que presentó las 4 mutaciones descritas con asociación a DM2 y no posee un diagnóstico de esta enfermedad, mientras que pacientes con el diagnóstico clínico presentaron solo una o dos de las variantes de riesgo. Estos hallazgos ponen nuevamente de manifiesto la complejidad etiológica para el desarrollo de DM2, donde las mutaciones o polimorfismos no son determinantes y se requiere de la influencia otros factores como los ambientales e incluso el grado de heteroplasmia con la que se presentan dichas variantes, aunado a factores genéticos contenidos en el genoma nuclear.

Como lo muestran los resultados, ninguno de los individuos presentó la mutación A3243G que es la frecuentemente asociada al padecimiento de DM2 en otras poblaciones

principalmente de origen asiático. Las mutaciones que se identificaron se encuentran en diferentes regiones que codifican tanto para proteínas como RNA e incluso son parte de la región control (Tabla 20) cuyo efecto en el producto génico o función biológica no se ha dilucidado por completo. Sin embargo al ser el mtDNA partícipe del mantenimiento óptimo del sistema OXPHOS, los daños ocasionados por las mutaciones pueden afectar el rendimiento en cualquier punto de la cadena respiratoria, disminuyendo así la eficiencia para la producción de ATP y por ende la excreción de la insulina.

La heteroplasma es un evento común de todas las poblaciones, mismo que difiere incluso entre los distintos tejidos de un organismo. De hecho, un estudio realizado en nueve tejidos diferentes de 100 individuos se reportó que solamente el 12% de ellos no mostraron heteroplasma, mientras que el 88% restante reveló por lo menos una posición heteroplásmica dentro de los tejidos analizados. Aunque la sangre presentó un bajo porcentaje de heteroplasma (19.8%-16.2)(Nahue et al, 2014), este fenómeno deberá ser investigado con más detalle para determinar su asociación con el desarrollo o gravedad de la DM2.

8 CONCLUSIONES

- El análisis de individuos indígenas pertenecientes a las etnias maya, tarahumara, otomí, mazateco, náhuatl, huasteco, mixe, seri y zapoteca permitió la identificación de 198 variantes, de las cuales el 6.1% son potencialmente nuevas.
- Se observó heterogeneidad genética individual de los sujetos de estudio, siendo los individuos seri y mixe los que mostraron el mayor y menor número de variantes, respectivamente.
- EL haplogrupo A fue el más prevalente con una frecuencia del 40% en la población estudiada.
- La variante A3243G reportada como de riesgo para el padecimiento de DM2 no se detectó en la población analizada. Pero por otro lado, se encontraron diferencias en la frecuencia de la variante A1438G entre nuestra población con respecto a otras poblaciones.
- El grupo étnico maya fue el que presentó un número mayor de variantes totales y nuevas, mientras que los zapotecos presentaron un número mayor de variantes propias.
- El grupo de casos con DM2 presentó un número mayor de variantes propias, es decir, que no fueron encontradas en los sujetos sanos,
- Existe una alta heterogeneidad genética interétnica e interindividual en la población analizada.
- Se requieren de más estudios para determinar el efecto biológico de las variantes descritas y conocer su asociación con el desarrollo de la DM2 y otras entidades humanas.

9 REFERENCIAS

1. Aassen, J., et al. (2004). *Mitochondrial Diabetes: Molecular Mechanisms and Clinical Presentation*. *Diabetes* 53(Supp 1): S103-S109.
2. Abbot, J., et al. (2014). *Transfer RNA and human disease*. *Frontiers in Genetics* 5(158): 1-18.
3. Akouchekian, M. (2008). *Investigation of human mitochondrial DNA abnormality in colon cáncer*. Ed Cuvillier Verlag Göttingem: 8-20.
4. Alpizar, S. (2007). *Guía para el manejo integral del paciente diabético*. Segunda Edición. México. Tomo 1: 247.
5. Anderson, S., et al. (1981). *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. *Nature* 290(5806): 457-465.
6. Area-Gomez, E., et al. (2014). *Mitochondrial Genetics and Disease*. *Journal of Child Neurology* 29(15): 1-8.
7. Bandelt, H., et al. (2006). *Human mitochondrial DNA and evolution of Homo sapiens*. *Nucleic Acids and Molecular Biology*: 3-33.
8. Bhat, A., et al. (2007). *The possible role of 10398A and 16189C mtDNA variants in providing susceptibility to T2DM in two North Indian populations: a replicative study*. *Human Genetics* 120(6): 821-826.
9. Campos, Y., et al. (2007). *Libro de Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos del metabolismo*. Crespo Mead-Jonhson a Bristol Myers Squib SA company España: 355-432.
10. Cao, Y., et al. (2014). *Molecular diagnosis of hyperphenylalaninemia using Next-Generation Sequencing-based on a custom AmpliSeq™ panel and Ion torrent PGM sequencing*. *Mol Genet Metab* 113(4): 261-266.
11. Carnea, S. y Dobreanu, M. (2013). *Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications*. *Biochemia Medica* 23(3): 266-280.
12. Cataldo, L., et al. (2013). *Heteroplasmia de la mutación del ADN mitocondrial m.3243A >G en la diabetes de sordera de herencia materna*. *Rev Med Chile* 141: 305-312.
13. Che, L., et al. (2014). *Mitochondrial dynamic changes in health and genetic diseases*. *Molecular Biology Reports* 41(11): 7053-7062.

14. Chen, T., et al. (2011). *The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells*. Journal of Human Genetics 56: 689-694.
15. Chinnery, P. y Turnbull, D. (1997). *Mitochondrial medicine*. Q J Med 90:657-667.
16. Chinnery, P., et al. (1999). *Clinical mitochondrial genetics*. J Med Genet 36: 425-436.
17. DiMauro, S. y Schon, E. (2001). *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. American Journal of Medical Genetics 106(1): Pp 18-26.
18. Estrada-Cuzcano, A. et al. (2005). *Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano*. Revista Peruana de Biología 12(3): 349-348.
19. Eynon, N., et al. (2011). *The champion's mitochondria: is it genetically determined? A review on mitochondrial DNA and elite athletic performance*. Physiological Genomics 43: 789-798.
20. Federación Internacional de Diabetes. (2013). *Atlas de la Diabetes de la FID*. Sexta Edición: 38.
21. Gemmell, N., et al. (1996). *Evolution of the Mammalian Mitochondrial Control Region- Comparisons of control Region Sequences between Monotreme and Therian Mammals*. Molecular Biology and Evolution 13(6): 798-808.
22. González, M., (2010). *Determinación de la frecuencia alélica de la variante polimórfica rs1800961 en el gen HNF4A en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2*. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Medicina, IPN: 15-28.
23. Guardado-Estrada, M., et al. (2008). *Diversidad genética en la población mexicana: Utilización de marcadores de ADN*. Revista Médica del Hospital General de México 71(3): 162-174.
24. Jiménez, F. (2003). *Biología Celular*. Pearson Educación: 296-313.
25. Johns, D. (1995). *Mitochondrial DNA and Disease*. New England Journal of Medicine 333 (10): 636-644.
26. Kokaze, A., et al. (2005). *Longevity-associated mitochondrial DNA 5178 C/A polymorphism is associated with fasting plasma glucose levels and glucose tolerance in Japanese men*. Mitochondrion 5(6): 418-425.
27. Lazo-de-la-Vega, M. y Fernández-Mejía, C. (2009). *Factores transcripcionales de la célula*

- β adulta*. Revista de Investigación Clínica 61(5): 428-446.
28. Liu, L., et al. (2012). *Comparison of Next-Generation Sequencing Systems*. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012: 1-11.
29. Lodish, H., et al. (2006). *Biología Molecular y Celular*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana: 438-432.
30. Logan, I. (2007). *A suggested genome for mitochondrial Eve*. Journal of Genetic Genealogy 3(2): 72-77.
31. López-Lluch, G., et al. (2008). *Mitochondrial biogenesis and healthy aging*. Experimental Gerontology 43: 813-819.
32. López-Pérez, M. (2012). *Sistema Mitocondrial: Un reto en la medicina humana*. Instituto de España. Real Academia de Farmacia: 31-46.
33. Luque, J. y Herráez, A. (2001). *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Editorial Harcourt: 231-240.
34. Malecki, M., et al. (2001). *Search for mitochondrial A3243G tRNA^{Leu} mutation in Polish patients with type 2 diabetes mellitus*. Medical Science Monitor 7(2): 246-250.
35. Medica-Crespo, V., et al. (2004). *Bases para el diagnóstico de las citopatías mitocondriales. Antecedentes históricos, bases genéticas y bioquímicas (I de IV partes)*. Acta Pediátrica de México 25 (4): 244-256.
36. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2013.
37. Montoya, J. (2005). *Biogénesis y Patología Mitocondrial*. Revista de la Real Academia de Ciencias Zaragoza 60: 7-28.
38. Montoya, J., et al. (2009). *20 years of human mtDNA pathologic point mutation: Carefully reading the pathogenicity criteria*. Biochimica et Biophysica 1787: 476-483.
39. Muñoz, L., et al. (2010). *La genética de poblaciones prehispánicas mexicanas y su importancia*. Mensaje bioquímico UNAM 34.
40. Naue, J., et al, (2014). *Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA*. Mitocondrion 16: 82-91.
41. Necochea, R. y Canul, J. (2004). *Secuenciación de ácidos nucleicos*. Proyecto de Investigación. Instituto de Biotecnología, UNAM: 17.

-
42. Nussbaum, R., et al. (2008). *Thompson & Thompson, Genética en medicina*. Séptima Edición. El Sevier: 52-55.
 43. Oliva, R. y Vidal-Taboada, J. (2006). *Genoma Humano: Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. Universidad de Barcelona: 45-47.
 44. Oliva, R., et al. (2004). *Genética Médica*. Tercera Edición. Universidad de Barcelona: 293.
 45. Parson, W., et al. (2013). *Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)*. Forensic Science International: Genetics 7: 543-549.
 46. Passarge, E. (2007). *Genética: Texto y Atlas*. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana: 62-68.
 47. Peñaloza-Espinosa, R., et al. (2007). *Characterization of mtDNA haplogroups in 14 Mexican indigenous populations*. Hum Biol 79 (3): 313-320.
 48. Poulton, J., et al. (2002). *The presence of a common mitochondrial DNA variant is associated with fasting insulin levels in Europeans in Auckland*. Diabetic Medicine 19(11): 969-971.
 49. Quail, M., et al. (2012). *A tale of three Next-Generation Sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Bioscience and Illumina MiSeq sequencers*. BMC Genomics 13(345): 1-13.
 50. Ramírez-García, et al. (2013). *Implicaciones en la atención primaria en salud de la genética y genómica en la Diabetes Mellitus Tipo 2*. Revista Médica. IMSS. 51(3): 6-26.
 51. Rodríguez-Violante, M. et al. (2010). *Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas*. Arch Neurocién México 15(1): 39-46.
 52. Rojas, R. et al. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, ENSANUT 2012*. Secretaría de Salud. Instituto de Salud Pública: 108.
 53. Saldaña, A. (2009). *Diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales: confirmación de la mutación A3243G en el ADN mitocondrial, asociada a la patología MELAS por medio de PCR-RFLP en familias mexicanas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM: 10-26.
 54. Schaefer, A., et al. (2013). *Endocrine disorders in mitochondrial disease*. Molecular and

- Cellular Endocrinology 379 (12): 2-11.
55. Solano, A. et al. (2001). *Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano*. Salud Pública de México. 43(2): 151-161.
56. Stumvoll, M., et al. (2005). *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. The Lancet 365(9467): 1333-1346.
57. Taanman, J. (1999). *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. Biochimica et Biophysica 1410: 103-123.
58. Tawata, M. et al. (1998). *New mitochondrial DNA homoplasmic mutations associated with Japanese patients with type 2 diabetes*. Brief Genetics Reports. 47: 276-277.
59. Taylor, R. y Turnbull, D. (2005). *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Nature Review Genetics. 6(5): 389-402.
60. Torroni, A., et al. (1993). *Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs*. Human Genetics. 53: 563-590.
61. Tusié, M., et al. (2012) *La arquitectura genética de la diabetes*. Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias. 63(1): 10-17.
62. Ventura-Clapier, R., et al. (2008). *Transcriptional control of mitochondria biogenesis: The central role of PGC-1 α* . Cardiovascular Research. 79: 208-217.
63. Wang, D., et al. (2001). *Association of the mitochondrial DNA 5178A/C polymorphism with maternal inheritance and onset of type 2 diabetes in Japanese patients*. Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes. 109(7): 361-364.
64. Wang, S., et al. (2013). *Mitochondrial DNA mutations in diabetes mellitus patients in Chinese Han population*. Gene 513: 472-475.
65. Xu, Z., et al. (2014). *Genetic Mutation Analysis of Human Gastric Adenocarcinomas Using Ion Torrent Sequencing Platform*. National Cancer Center Japon- 9 (7): 1-11.
66. Youle, R. y Van der Bliek, A. (2012). *Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress*. Science 337: 1062-1065.
67. Zeviani, M. y Antozzi, C. (1997). *Mitochondrial disorders*. Molecular Human Reproduction. 3(2): 133-148.

10 ANEXOS

ANEXO A: Materiales, equipos y reactivos.

Material

- Tubos Eppendorf de 0.5 mL, 1.6mL y 2 mL
- Tubos LoBind de 1.5 mL
- Tubos PCR
- Placa de 96 pozos para reacción PCR
- Gradillas
- Parafilm
- Películas adheribles MicroAmp
- Puntas para micropipeta de 10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L

Equipos

- Termocicladores 9700 (Applied Biosystems)
- Unidad E-Gel® iBase™ y transiluminador E-Gel® Safe Imager™
- Agilent 2100 Bioanalyzer
- Cámaras de electroforesis horizontales Cleaver Scientific
- Fuente de Poder BioRad PowerPac Basic™
- Transiluminador UVP Multi-Doc-It
- NanoDrop ND-1000
- PCR Tiempo Real 7900 HT Fast System ViiA™ 7
- Ion OneTouch™ 2
- Ion OneTouch™ ES (Enrichment System)
- Ion Torrent Sequencer PGM
- Secuenciador ABI 3130X
- Microcentrífuga Sprout™ para tubos eppendorf y PCR
- Microcentrífuga
- Centrífuga de placas

- Micropipetas Rainin de 2 μ L, 10 μ L, 100 μ L y 100 μ L
- Vortex mixer Maxi Mix™ II

Reactivos

- Kit SequalPrep™ Long PCR with dNTPs, que contiene: SequalPrep™ Long Polymerase, 5 U/ μ L; SequalPrep™ 10X Reaction Buffer; SequalPrep™ Enhancer B; DMSO.
- Primers MitoA y MitoB a una concentración de 100 ng/ μ L.
- Kit Agencourt® AMPure® XP.
- Geles de Agarosa E-Gel® SizeSelect™ al 0.8 y 2%.
- Kit Agilent High Sensitivity DNA que contiene: High Sensitivity DNA Ladder, High Sensitivity DNA Markers 35/10380 bp, High –Sensitivity DNA Dye Concentrate, High Sensitivity DNA Gel Matrix.
- Kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library que contiene: 10X Ligase Buffer, DNA Ligase, Nick Repair Polymerase, dNTP Mix y Low TE.
- Kit Ion Xpress™ Barcode Adapters que contiene: Ion Xpress™ P1 Adapter y Ion Xpress™ Barcode X (1-96).
- Kit de PCR ROCHE™: Buffer 10X, MgCl₂, Taq Polimerasa 1000 U/ μ L.
- Kit Ion Library Quantitation que contiene: Taqman® Assay, Ion Library Amplification Mix, E. coli Library control.
- Kit Ion AmpliSeq™ Library que contiene: Platinum® PCR Super Mix y Library Amplification Primer Mix.
- Kit Ion PGM™ Template OT2 200 que contiene los reactivos: Ion PGM™ Enzyme Mix TL, Ion PGM™ Ion Sphere™ Particles, Ion PGM™ PCR Reagent X, Ion PGM™ Reagent Mix TL; y las soluciones Ion PGM™ OT2 Oil, Ion PGM™ OT2 Reaction Oil, Ion PGM™ PCR Reagent B, Nuclease-Free Water, Ion PGM™ OT2 Recovery Solution, Ion One Touch™ Wash Solution, Ion PGM™ MyOne™ Beads Capture Solution, Ion PGM™ ISP Resuspension Solution.
- Kit Ion PGM™ Sequencing 200 v2 que contiene: Ion PGM™ Sequencing 200 v2 dGTP, Ion PGM™ Sequencing 200 v2 dCTP, Ion PGM™ Sequencing 200 v2 dATP, Ion PGM™ Sequencing 200 v2 TTP, Ion PGM™ Sequencing 200 v2 Polymerase, Ion PGM™

Sequencing 200 v2 Sequencing Primers, Control Ion Sphere™ Particles, Ion PGM™ Sequencing 200 v2 W2 Solution, Ion PGM™ Cleaning Tablet, Annealing Buffer, Ion PGM™ Sequencing 200 v2 1X W3 Solution.

- Kit BigDye Terminator v3.1
- Primers DNAm1, DNAm2, DNAm4, DNAm9, DNAm11, DNAm21, DNAm23 DNAm24, DNAm28, DNAm41 a una concentración 100 ng/μL.
- Agarosa grado analítico Promega™
- Intercalante SYBR® Gold
- Marcador de Peso 1kb Fermentas™ y 50 pb BioLab™
- Solución TBE 5X y 1X.
- Agua Grado Molecular
- Low TE Solución 1X pH 8.0
- Etanol al 70% V/V
- Kit de soluciones QIAGEN: QIAquick PCR Purification, el cual contiene Buffer PBI, Buffer PB y Buffer PE.

ANEXO B: Lista de las 198 variantes encontradas en la secuenciación por Ion Torreny. Las variantes en negritas representan aquellas que no se encuentran registradas en las bases de datos de MITOWEB.

Position	Ref	Variante	Función	Gen	Frequency	Quality
55	TA	CC	Control	d-loop	100	952.33
64	C	T	Control	d-loop	97	728.99
66	G	T	Control	d-loop	15.6	14.83
73	A	G	Control	d-loop	96.9	927.19
103	G	A	Control	d-loop	98.2	826.48
113	C	T	Control	d-loop	100	772.43
143	G	A	Control	d-loop	100	956.86
146	T	C	Control	d-loop	100	813.36
150	C	A	Control	d-loop	100	700.61
152	T	C	Control	d-loop	100	1886.53
153	A	G	Control	d-loop	100	811.05
185	G	A	Control	d-loop	98.7	608.62
188	A	G	Control	d-loop	97.5	596.21

194	C	T	Control	d-loop	100	1529.07
195	T	C	Control	d-loop	100	491.18
199	T	C	Control	d-loop	100	1425.91
215	A	G	Control	d-loop	95.8	843.81
234	AA	GG	Control	d-loop	21.3	16.75
235	A	G	Control	d-loop	97.4	568.19
248	A	-	Control	d-loop	100	811.51
263	A	G	Control	d-loop	100	832.48
309	C	T	Control	d-loop	33.3	46.55
310	T	C	Control	d-loop	65.9	128.13
311	-	C	Control	d-loop	40	144.41
417	G	A	Control	d-loop	100	372.75
489	T	C	Control	d-loop	100	506.72
499	G	A	Control	d-loop	100	347.57
514	CA	-	Control	d-loop	100	368.31
663	A	G	rRNA	RNA1	100	3087.34
709	G	A	rRNA	RNA1	100	3101.93
750	A	G	rRNA	RNA1	100	3075.67
827	A	G	rRNA	RNA1	100	3026.04
961	T	C	rRNA	RNA1	100	907.86
1007	G	A	rRNA	RNA11	100	1070.47
1438	A	G	rRNA	RNA1	100	3150.51
1525	C	T	rRNA	RNA1	100	1643.25
1736	A	G	rRNA	RNA2	97.5	598.89
1888	G	A	rRNA	RNA2	100	3104.7
2061	C	T	rRNA	RNA2	100	1017.19
2092	C	T	rRNA	RNA2	100	1904.23
2218	C	T	rRNA	RNA2	96.9	943.72
2483	T	C	rRNA	RNA2	83.3	1586.59
2706	A	G	rRNA	RNA2	100	3123.47
3010	G	A	rRNA	RNA2	100	1932.27
3547	A	G	non-syn: I-V	ND1	100	1248.98
3552	T	A	syn : A-A	ND1	100	633.12
4247	T	-		ND1	37.4	1315.59
4248	T	C	syn:I-I	ND1	100	2142.93
4679	T	C	syn: L-L	ND2	100	2037.43
4715	A	G	syn: G-G	ND2	100	3139.61
4769	A	G	syn: M-M	ND2	100	3122.3
4820	G	A	syn:E-E	ND2	100	2642.26
4823	T	C	syn V-V	ND2	100	1573.65
4824	A	G	non-syn: T-A	ND2	100	2641.37
4883	C	T	syn: P-P	ND2	94.7	1547.88

4977	T	C	syn: L-L	ND2	97.1	2802.06
5178	C	A	non syn: L-M	ND2	100	1269.57
5462	C	T	syn: A-A	ND2	100	1436.71
5493	T	C	non syn: F-L	ND2	94.5	616.66
5773	G	A	tRNA	tRNA TC	95.7	2418.11
5836	A	G	tRNA	tRNA TY	91.6	1909
5951	A	G	syn:G-G	CO1	100	2401.61
6308	C	T	syn: N-N	CO1	100	1824.49
6413	T	C	syn: N-N	CO1	100	2498.68
6473	C	T	syn: I-I	CO1	100	2645.04
6491	C	A	syn: L-L	CO1	100	1289.45
6755	G	A	syn: G-G	CO1	97.6	2501.56
6935	C	T	syn: F-F	CO1	100	2957.37
7028	C	T	syn: A-A	CO1	100	3116.7
7196	C	A	syn: L-L	CO1	100	2871.19
7241	A	G	syn: A-A	CO1	100	2121.29
7403	A	G	syn: P-P	CO1	100	810.22
7521	G	A	tRNA	tRNA TD	87.3	1306.54
7697	G	A	nos syn: V-I	CO2	100	1643.76
7724	A	T	non syn: T-S	CO2	100	483.23
8027	G	A	non syn: A-T	CO2	100	2160.82
8152	G	A	syn: P-P	CO2	95.6	1729.58
8164	C	T	syn: Y-Y	CO2	100	1303.23
8194	C	T	syn: N-N	CO2	98.1	1927.02
8269	G	A	syn: Term-Term	CO2	100	1125.14
8271	ACCCCTCT	-	non coding	non codinf	80.8	960.99
8272	CCCCCTCTAC	-	non coding	non codinf	0	863.12
8388	T	C	non syn: V-A	ATP8	57.7	219.6
8414	C	T	non syn: L-F	ATP6	100	848.72
8548	T	C	ATP8/6: L-L /S-P	ATP8/6	100	849.4
8584	G	A	non syn: A-T	ATP6	100	1582.27
8635	C	T	non syn: L-F	ATP6	100	772.4
8680	C	T	syn: L-L	ATP6	98.3	867.02
8701	A	G	nion syn: T-A	ATP6	100	1821.93
8794	C	T	non syn: H-Y	ATP6	97	2860.39
8860	-	G	frameshift	ATP6	100	1050.76
8860	A	G	non syn: T-A	ATP6	95.7	2762.95
8946	AC	GT		ATP6	32	1769.99
8947	C	T	syn: L-L	ATP6	68	1769.99
9025	G	A	non syn: G-S	ATP6	100	462.35
9039	G	A	syn: M-M	ATP6	100	1283.48

9098	T	C	non syn: I-T	ATP6	74.7	672.25
9166	T	C		ATP6	95.6	957.04
9518	C	T	syn: S-S	CO3	98.4	460.88
9540	T	C	syn: L-L	CO3	97.8	662.29
9545	A	-	frameshift	CO3	22.4	523.74
9545	A	G	syn: G-G	CO3	100	694.17
9804	G	A	non syn: A-T	CO3	90.9	672.03
9950	T	C	syn: V-V	CO3	100	2200.92
9966	G	A	non syn: V-I	CO3	73.9	852.02
10045	T	C	tRNA	tRNA G	100	1139.8
10097	A	G	syn: L-L	ND3	100	1159.04
10199	C	T	syn: A-A	ND3	97.9	1069.47
10310	G	A	syn: L-L	ND3	100	1362.99
10398	A	G	non syn: T-A	ND3	100	994.82
10400	C	T	syn: T-T	ND3	97.2	1251.32
10598	A	G	syn: M-M	ND4L	38.1	22.91
10792	A	G	syn: L-L	ND4	98.6	679.78
10814	A	-	frameshift	ND4	46.9	64.96
10873	T	C	syn: P-P	ND4	98.9	672.34
11176	G	A	syn: Q-Q	ND4	100	1144.83
11177	C	T	non syn: P-S	ND4	98.7	600.75
11314	A	G	syn: E-E	ND4	97.6	622.27
11617	T	C	syn: I-I	ND4	100	1291.06
11719	G	A	syn: G-G	ND4	100	1314.22
11914	G	A	syn: T-T	ND4	100	1476.96
12007	G	A	syn: W-W	ND4	96.1	905.77
12280	A	G	tRNA	tRNAL2	100	699.88
12397	A	G	non syn: T-A	ND5	100	415.85
12468	T	C	syn: F-F	ND5	100	761.91
12519	T	C	syn: V-V	ND5	100	787.57
12684	G	A	syn: Q-Q	ND5	100	1141.56
12705	C	T	syn: I-I	ND5	100	1211.97
12978	A	G	syn: L-L	ND5	95.1	541.7
13104	A	G	syn: G-G	ND5	97.6	736.35
13182	T	C	syn: A-A	ND5	100	1321.55
13263	A	G	syn: Q-Q	ND5	100	1231.18
13290	C	T	syn: G-G	ND5	100	561.52
13434	A	G	syn: M-M	ND5	97.2	1275.67
13590	G	A	syn: L-L	ND5	100	794.86
14002	A	G	non syn: T-A	ND5	40.6	35.08
14016	G	A	syn: K-K	ND5	100	350

14025	T	C	syn: P-P	ND5	97.4	547.28
14163	C	T	non syn: A-T	ND6	100	1216.83
14318	T	C	non syn: N-S	ND6	95	418.27
14364	G	A	syn: L-L	ND6	100	398.59
14383	C	T	syn: A-A	ND6	100	377.6
14668	C	T	syn: M-M	ND6	100	917.33
14684	C	T	tRNA	tRNAE	100	361.57
14766	C	T	non syn: T-I	CYB	100	455.46
14783	T	C	syn: L-L	CYB	97.1	303.72
15043	G	A	syn: G-G	CYB	100	1185.77
15172	G	A	syn: G-G	CYB	100	1242.16
15227	G	A	non syn: V-I	CYB	100	1009.85
15244	A	G	syn: G-G	CYB	89.3	490.1
15301	G	A	syn: L-L	CYB	100	858.68
15326	A	G	non syn: T-A	CYB	98.6	664.6
15346	G	A	syn: L-L	CYB	97.6	927.72
15461	T	C	syn: L-L	CYB	96.5	613.73
15487	A	T	syn: P-P	CYB	100	712.14
15535	C	T	syn N-N	CYB	96.1	434.93
15877	C	A	syn: L-L	CYB	100	807.42
15930	G	A	tRNA	tRNA TT	100	1417.94
16051	A	G	Control	d-loop	100	2491.96
16093	T	C	control	d-loop	94.2	1953
16111	C	T	control	d-loop	94.4	960.06
16129	G	A	control	d-loop	100	1677.98
16131	T	C	control	d-loop	100	1658.92
16136	T	C	control	d-loop	100	1998.94
16140	T	C	control	d-loop	100	1279.95
16145	G	A	Control	d-loop	100	669.08
16153	G	A	control	d-loop	100	1628.8
16174	C	T	control	d-loop	92.1	871.5
16183	A	C	control	d-loop	71.1	141.59
16189	T	C	control	d-loop	100	372.52
16207	A	G	Control	d-loop	96.8	446.87
16209	T	C	Control	d-loop	100	291.09
16215	A	G	control	d-loop	97.3	798.84
16217	T	C	control	d-loop	100	343.39
16223	C	T	control	d-loop	98.1	483.79
16239	C	T	control	d-loop	100	401.86
16240	A	G	control	d-loop	96.6	841.39
16241	A	G	control	d-loop	98.5	516.69

16259	C	T	control	d-loop	100	371.96
16261	C	T	control	d-loop	97.8	698.87
16274	G	A	Control	d-loop	96	351.56
16290	C	T	control	d-loop	100	73.84
16298	T	C	control	d-loop	97.8	688.47
16301	C	T	Control	d-loop	97.5	599.59
16311	T	C	control	d-loop	100	568.83
16316	A	G	control	d-loop	98.4	970.96
16319	G	A	control	d-loop	100	671.1
16323	T	C	Control	d-loop	98.4	476.97
16325	T	C	control	d-loop	100	784.73
16327	C	T	control	d-loop	98.8	741.55
16356	T	C	control	d-loop	100	263.73
16357	T	C	control	d-loop	90.8	463.36
16362	T	C	control	d-loop	100	654.61
16368	T	C	Control	d-loop	100	596.9
16391	G	A	control	d-loop	92.1	245.94
16467	C	T	control	d-loop	91.5	586.48
16519	T	C	control	d-loop	100	835.23
16526	G	A	control	d-loop	98.3	903.52

ANEXO C: Marcadores descritos por MITOWEB para la asignación de los haplogrupos. Solo se muestran los haplogrupos predominantes en México.

Haplogrupo	SNP diagnóstico	HVS1
A	A 663 G	16223 16290 16319 16362
B	CCCCCTCTA-del	16183C 16189 16217
C	A 13263 G	16223 16327 16298
D	C 5178 A	16223 16362

ANEXO D: Se enlistan las variantes exclusivas por grupo étnico.

ETNIA	VARIANTES
Huastecos	AA234GG, C6308T, A7241G, T9098C, G9966A, A16207G, T16217C, G16274A
Maya	TA55CC, G66T, G143A, G5773A, A5951G, 10814A-del, A12397G, A13434G, G15227A, T16140C, A16241G
Mazateco	G499A, C1525T, T4823C, G7521A, G9804A, A10792G, T12519C, T13182C, C14163T, A16183G, A16215G, C16259T, A16316G, C16467T
Mixe	C2061T, T5493C, C8635T, T10045C, C10199T, C14684T, T16209C, C16278T
Nahuatl	T152C, C309T, C6491A, A7403G, G8269A, G10310A, A13104G, T14025C, T15461C, T16093C, T16136C, C16239T, C16261T
Otomí	G103A, T961C, T6413C, C6935T, AC8946GT, T9166C, C9518T, G11176A, T12468C, G12684A, G14364A, G15346A, T16131C, C16174T
Tarahumara	C113T, C2218T, T2483C, T3552A, C8164T, A10598G, T11617C, A12978G, G16526A
Seri	C194T, T199C, G7697A, G1007A, T8388C, C8680T, C13290T, A14002G, A16051G, C16301T
Zapoteco	C150A, G185A, A188G, T195C, G417A, G709A, T4679C, C5462T, G6755A, G8152A, C8194T, G9025A, A12280G, C14383T, C15877A, G16145A, T16323C, T16368C

ANEXO E: Variantes identificadas y que han sido reportadas como asociadas a enfermedades mitocondriales.

Variante	Gen	Función	Patología
T195C	D-loop	Control	Desorden bipolar
A663G	RNA1	rRNA	Arteriosclerosis coronaria
A827G	RNA1	rRNA	Sordera de herencia materna
T961C	RNA1	rRNA	Sordera de herencia materna
A1438G	RNA1	rRNA	Diabetes Mellitus
C5178A	ND2	NS: L-M	Diabetes Mellitus
T9098C	ATP6	NS: I-T	Enfermedades mitocondriales por antirretrovirales
G9804A	CO3	NS: A-T	LHON (Neuropatía óptica hereditaria de Leber)
A10398G	ND3	NS:T-A	Cáncer de mama / Síndrome metabólico / Diabetes Mellitus
A12397G	ND5	NS: T-A	Parkinson juvenil
C14163T	ND6	NSn: A-T	Sordera
C14668T	ND6	S: M-M	Desorden depresivo
G15043A	CYB	S: G-G	Trastorno depresivo mayo
T16189C	D-loop	Control	Diabetes Mellitus / Cardiomiopatía / Cáncer endometrial / Síndrome metabólico