



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Determinación molecular de la mutación
A3243G en el mtDNA de un paciente mexicano
con MELAS y su familia por medio de PCR-
RFLP”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

MIRIAM ALEJANDRA BRAVO MARTINEZ

ASESOR INTERNO:

MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

ASESOR EXTERNO:

JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

ANGELICA SALDAÑA MARTINEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi Mamá, a mi Papá y a mi Hermano, por estar conmigo siempre y por brindarme su confianza y amor incondicional.

A mis compañeras de dormitorio, por consentirme y apapacharme todos los días.

Y a todos mis amigos y profesores, por recorrer este camino a mi lado.

Contenido general

Contenido general	2
Índice general	2
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Resumen	6
Abreviaturas	7

Índice general

Introducción	9
Capítulo 1. Mitocondrias	9
Capítulo 2. Función mitocondrial: Sistema OXPHOS	10
Capítulo 2.1 Complejos del sistema OXPHOS	11
Capítulo 3. Fusión y fisión mitocondrial	12
Capítulo 4. DNA mitocondrial	13
Capítulo 4.1. Transcripción, replicación y traducción	14
Capítulo 4.2. Herencia del DNA mitocondrial	19
Capítulo 4.3 Homoplasmia y heteroplasmia	20
Capítulo 5. Enfermedades mitocondriales	21
Capítulo 5.1 Clasificación	22
Capítulo 5.2 Enfermedades mitocondriales en México	24
Capítulo 6. MELAS	25
Capítulo 6.1 Diagnóstico	26
Capítulo 6.2 Tratamiento	29
Capítulo 6.3 Otras enfermedades relacionadas a la mutación A3243G	30
Objetivos	32
2.1 Objetivo general	32
2.1.1 Objetivos particulares	32
Metodología de investigación	33
3.1 Sujetos de estudio	33
3.2 Métodos	34

3.2.1 Extracción del DNA de sangre periférica	34
3.2.3 Cuantificación y pureza del DNA	34
3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
3.2.5 Electroforesis horizontal en gel de agarosa	35
a) Preparación del gel de agarosa al 1%	35
b) Carga y corrida del gel	35
3.2.6 RFLP	36
3.2.7 DENSITOMETRIA	36
Resultados	37
Discusión	39
Conclusiones	41
Perspectivas	42
Anexos	43
Referencias	45

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de una mitocondria y sus componentes	9
Figura 2. Representación esquemática de los complejos OXPHOS	10
Figura 3. Mapa del genoma mitocondrial humano	13
Figura 4. Diagrama esquemático del genoma mitocondrial humano y modelo de replicación RITOLS	15
Figura 5. Modelo para el inicio de la transcripción mitocondrial	16
Figura 6. Procesamiento postranscripcional y traducción de transcritos mitocondriales humanos	18
Figura 7. Modelo para la transmisión de mtDNA en la línea germinal femenina	20
Figura 8. Mecanismos de herencia de mutaciones del mtDNA	21
Figura 9. Relación del genoma mitocondrial y enfermedades	23
Figura 10. Imágenes cerebrales en enfermedad mitocondrial (EM)	27
Figura 11. Detalles sobre la PCR-RFLP	36
Figura 12. Árbol genealógico del paciente ME16	37
Figura 13. RFLP's realizados con la enzima <i>ApaI</i>	38
Figura 14. RFLP's realizados con la enzima <i>ApaI</i>	38

Índice de tablas

Tabla 1. Mutaciones en el DNA mitocondrial en los genes <i>MT-TL1</i> (<i>tRNA^{Leu(URR)}</i>) y <i>MT-ND5</i> asociados a MELAS	25
Tabla 2. Situación clínica de los pacientes con probable enfermedad mitocondrial	33
Tabla 3. Preparación de una PCR para un volumen de 12.5 µl	35
Tabla 4. Concentración de DNA obtenida a partir de la cuantificación por espectrofotometría	37
Tabla 5. Porcentajes de heteroplasmia de las muestras positivas para la mutación A3243G	37
Tabla 6. Resumen de las historias clínicas de los pacientes con probable enfermedad mitocondrial	43

Resumen

Las enfermedades mitocondriales presentan una amplia heterogeneidad clínica y fenotípica, por este motivo, para su diagnóstico se requiere de una caracterización clínica, bioquímica y molecular meticulosa. A pesar de que las mutaciones en el mtDNA son comunes, en México no se cuenta con información suficiente para generar un dato epidemiológico a diferencia de Inglaterra y Finlandia cuyos estudios poblacionales han demostrado que las frecuencia de portadores de la mutación A3243G se estiman en 1.4 y 16.3 por 100,000 personas respectivamente, esto se debe principalmente a que la información sobre mitocondriopatías en nuestro país proviene de proyectos de tesis en donde se efectúan pruebas moleculares que permiten llevar a cabo la identificación precisa de las mutaciones patógenas, permitiendo confirmar el diagnóstico que previamente es establecido por un médico a partir de las características clínicas que presenta el paciente. Debido a esto, el presente trabajo tiene como objetivo llevar a cabo el análisis genético de muestras obtenidas a partir de la extracción del DNA total de una muestra de sangre de una familia mexicana con un integrante que padece el síndrome MELAS y 4 pacientes aislados que fueron obtenidos en el transcurso de la investigación y la posterior amplificación de un fragmento de 676 pb del mtDNA que comprende los nucleótidos 2777 y 3452 y que engloba al gen *MT-TL1* que codifica el *tRNA^{Leu(UUR)}* mediante el uso de los primers 5'-GTCCTAAACTACCAAACCTGC-3'(forward) y 5'-AAGGGTTGTAGTAGCCCGTAG-3'(reverse) y la posterior digestión (RFLP) con la enzima de restricción *ApaI* lo que permitió evidenciar la presencia de la mutación A3243G en dos de los 5 pacientes mexicanos estudiados (BBZ y ME16) con fenotipo asociado a MELAS, así como en la madre y hermano del paciente ME16, el posterior análisis por densitometría reveló la presencia de la mutación con un 65%, 40%, 5% y 1% de heteroplasmia respectivamente. Esta evidente variación entre los niveles de heteroplasmia dada por diversos mecanismos involucrados con la herencia del mtDNA (segregación replicativa, segregación mitótica y "cuello de botella genético mitocondrial"), agrega un grado de complejidad a nuestra comprensión de la enfermedad relacionada con la mutación A3243G debido a la existencia de moléculas mutantes y de tipo salvaje en diferentes proporciones dentro de la misma célula. Además, parece probable que el nivel de heteroplasmia que posee un individuo se correlaciona con la carga de enfermedad (hipótesis del umbral). Este trabajo dará a conocer un síndrome poco diagnosticado molecularmente en nuestro país, destacando la importancia de llevar a cabo la identificación de mutaciones presentes en el mtDNA, así como la necesidad de continuar realizando este tipo de investigaciones en diferentes muestras y en un mayor número de familiares para poder contribuir al mayor entendimiento de las enfermedades mitocondriales.

Abreviaturas

ATP	Trifosfato de adenosina.
ADP	Adenosín difosfato.
ADC	Coefficiente de difusión aparente.
BrEt	Bromuro de etidio.
CK	Creatinina quinasa.
CoA	Acetilcoenzima A.
CoQ 10	Coenzima Q 10.
CSBs	Bloques de secuencia conservada.
CPEO	Oftalmoplegía externa progresiva crónica esporádica.
CTD	Dominio C-terminal.
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1.
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DWI	Secuencia ponderada por difusión.
ECM	Enfermedad por cambios mínimos.
ECV	Enfermedades cardiovasculares.
ETC	Cadena de transporte de electrones.
EF	Factor de elongación.
EM	Enfermedad mitocondrial.
FADH	Flavín adenín dinucleótido.
FBSN	Necrosis estriatal bilateral infantil familiar.
FRR	Fibras rojas irregulares.
GTP	Guanosín trifosfato.
HSP	Promotor de cadena pesada.
HVS	Región hipervariable.
IF	Factor de iniciación.
Kb	Kilobase.
KD	Dieta cetogénica.
kDa	Kilodalton.
KSS	Síndrome de Kearn Sayre.
LCR	Líquido cefalorraquídeo.
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber.
LS	Síndrome de Leigh.
Leigh	Encefalomiopatía necrotizante subaguda.
LSP	Promotor de cadena ligera.
MAO	Monoaminoxidasa.
MELAS	Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares.
MERF	Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas.
MIDD	Diabetes y sordera de herencia materna.
MILS	Síndrome materno hereditario de Leigh.
MIMyCa	Miocardiopatía y miopatía.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
mTERF	Factor de terminación.

mtSSB	Proteína de unión a DNA monocatenaria específica de mitocondrias.
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.
NARP	Neuropatía, ataxia, síndrome de retinitis pigmentosa.
NCR	NCR: Región no codificante.
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear.
ND4	ADH deshidrogenasa 4.
ND5	NADH deshidrogenasa 5.
ND6	NADH deshidrogenasa 6.
NO	Óxido nítrico.
O_H	Origen de replicación de la cadena H.
O_L	Origen de replicación de la cadena L.
OXPHOS	Fosforilación oxidativa.
PAGE	Gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEO	Oftalmoplegía externa progresiva.
POLG	DNA polimerasa gamma.
POLRMT	RNA polimerasa mitocondrial.
pre-IC	Complejo de pre-iniciación.
RFLP	Polimorfismo de los fragmentos largos de restricción.
RITOLS	Incorporación de ribonucleótidos a lo largo de la cadena retrasada.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal.
SEPR	Síndrome de encefalopatía posterior reversible.
SIDS	Síndrome de muerte súbita del lactante.
SNC	Sistema nervioso central.
SDM	Mecanismo de desplazamiento de filamento.
TC	Tomografía computarizada.
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico.
TFAM	Factor de iniciación de la transcripción.
TFB2M	Factor de transcripción B2 mitocondrial.
TEFM	Factor de alargamiento de la transcripción mitocondrial.
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia.
tRNA^{Leu}	RNA de transferencia de la leucina.
tRNA^{Lys}	RNA de transferencia de la lisina.
tRNA^{Phe}	RNA de transferencia de la fenilalanina.

Introducción

Capítulo 1. Mitocondrias

Las mitocondrias (del griego *mitos*; hilo y *chondros*; gránulo) (Kuhnel, 2003) son organelos que varían mucho de un tipo celular a otro en cuanto a número, forma y número de crestas. Existen alrededor de 2,000 por cada célula y en total llegan a ocupar hasta el 25% del volumen celular. Los tejidos con un metabolismo oxidativo muy intenso, como el músculo cardíaco, tienen mitocondrias con muchas crestas. Su forma dentro de un tejido varía de acuerdo con su estado funcional, es decir, si son organelos plásticos o móviles (Kolman & Rohm, 2004).

Como se muestra en la figura 1, están rodeadas por dos membranas, una externa lisa y una interna fuertemente plegada cuyas invaginaciones se llaman crestas y las evaginaciones se conocen como túbulos, tiene una gran superficie y encierra a la matriz mitocondrial. El espacio que queda entre ambas membranas se conoce como espacio intermembranal. Las dos membranas son muy ricas en proteínas. Las porinas (canales aniónicos dependientes de voltaje) presentes en la membrana externa posibilitan el intercambio de pequeñas moléculas (<10 KDa), esta membrana posee receptores para proteínas y polipéptidos que se translocan hacia el espacio intermembrana. También contiene varias enzimas como la fosfolipasa A₂, monoaminoxidasa (MAO) y acetilcoenzima A (CoA) sintetasa. Por el contrario, la membrana interna es impermeable a todas las moléculas con excepción del O₂, el CO₂ y el H₂O, debido a que tiene una cantidad abundante del fosfolípido cardiolipina, que la torna impermeable a los iones. Esta membrana contiene proteínas con tres funciones principales: 1) producir las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria de transporte de electrones (ETC), 2) sintetizar ATP y 3) regular el transporte de metabolitos hacia dentro y fuera de la matriz. Las enzimas ATP sintetasa están unidas a la membrana interna y proyectan sus cabezas (partícula F₁) hacia la matriz en la cual hay gránulos, que miden unos 30 nm de diámetro y tienen Ca²⁺ y otros cationes divalentes y trivalentes, contiene las enzimas solubles del ciclo del ácido cítrico (ciclo de krebs) y las enzimas que participan en la β-oxidación de los ácidos grasos. Los productos principales de la matriz son CO₂ y NADH reducido, que es la fuente de los electrones para la cadena de transporte electrónico de la membrana mitocondrial interna (Ross & Pawlina, 2007; Kolman & Rohm, 2004).

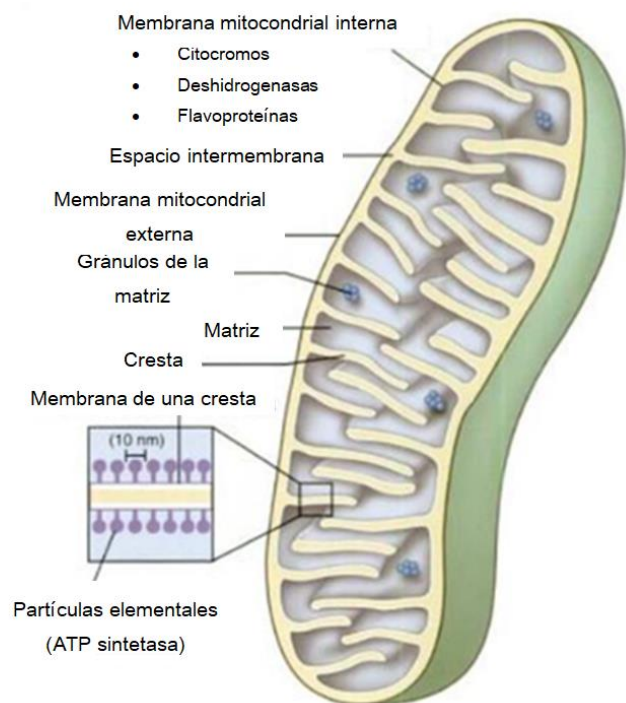


Figura 1. Representación esquemática de una mitocondria y sus componentes (Modificada de Ross & Pawlina, 2007)

Se cree que estos organelos evolucionaron desde un procarionte (eubacteria) aerobio que vivía en simbiosis dentro de células eucariontes primitivas. Esta teoría fue avalada por la demostración de que las mitocondrias poseen su propio genoma, aumentan su cantidad por división y sintetizan algunas de sus proteínas (constituyentes) estructurales (Ross & Pawlina, 2007).

Capítulo 2. Función mitocondrial: Sistema OXPHOS

El mantenimiento de la homeostasis bioenergética es una función principal del metabolismo celular, ya que se deben mantener niveles de energía suficientes para que las células prosperen (Castellanos & Lanning, 2019).

Las mitocondrias generan aproximadamente el 90% de la energía celular en forma de trifosfato de adenosina (ATP) a partir del proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) en células de mamíferos, también juegan un papel crucial en otras vías de señalización, que incluyen el ciclo del ácido tricarbónico (TCA), la β -oxidación de los ácidos grasos, el manejo del calcio, la regulación de la apoptosis intrínseca y participan en el ciclo celular (Yan et al., 2019).

Los complejos de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintetasa comprenden el sistema OXPHOS, a través del cual se genera la mayoría del ATP celular (Castellanos & Lanning, 2019).

El sistema OXPHOS (figura 2) combina dos conjuntos de reacciones: respiración y síntesis de ATP. La respiración consiste en transferir de manera secuencial electrones extraídos de compuestos nutritivos a través de una cadena de reacciones de la oxidoreductasa (llevadas a cabo mediante los complejos de la cadena respiratoria I, II, III, y IV), lo que conduce a la reducción del oxígeno molecular en agua. Desde un punto de vista estructural, toda la cadena respiratoria está contenida en la membrana interna de las mitocondrias y desde un punto de vista genético, el sistema OXPHOS es único, ya que toma contribuciones de dos genomas separados física y funcionalmente, el genoma nuclear y el genoma mitocondrial.

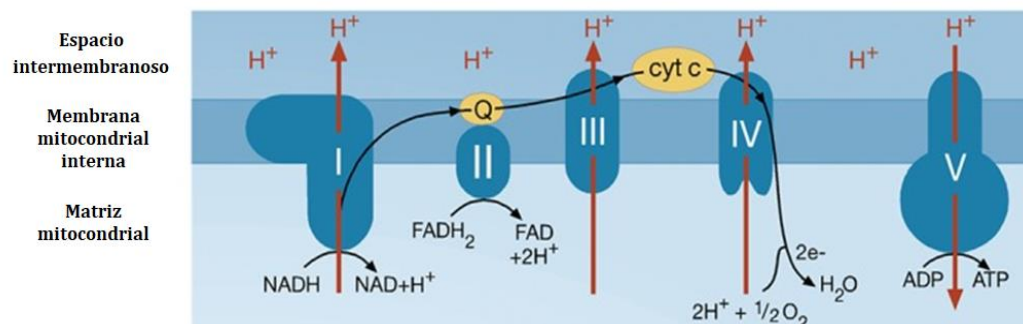


Figura 2. Representación esquemática de los complejos OXPHOS. Los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico a través de la membrana interna que se utiliza para impulsar la producción de ATP por el Complejo V (ATP sintetasa) que cataliza la condensación de ADP y fosfato inorgánico en ATP, la principal moneda energética de la célula. La translocasa ATP-ADP exporta el ATP al espacio intermembrana, donde se difunde libremente desde la membrana externa hacia el citosol (Modificada de Alston et al., 2017; Mishara & Chan, 2014).

Capítulo 2.1 Complejos del sistema OXPHOS

Complejo I (CI, NADH: ubiquinona oxidoreductasa EC 1.6.5.3), es el principal punto de entrada de electrones a la cadena respiratoria, ya que cataliza la transferencia de electrones desde NADH a ubiquinona. Es el complejo más grande en el sistema OXPHOS, con un peso molecular de ≈ 980 kDa; está compuesto por 45 subunidades, 7 de las cuales están codificadas por genes del DNA mitocondrial (mtDNA) y las 388 restantes por genes del DNA nuclear (nDNA) (*Fernández et al., 2009*). La deficiencia aislada del complejo I representa el fenotipo bioquímico para $\approx 30\%$ de los pacientes pediátricos, de los cuales 70-80% tienen un defecto genético nuclear. Los síntomas clínicos asociados con la deficiencia de complejo I son heterogéneos, aunque el pronóstico es típicamente pobre, con progresión rápida. La acidosis láctica es una característica común, aunque a menudo se presenta con otros síntomas, como miocardiopatía o leucodistrofia. Se han identificado mutaciones en 19 de las 37 subunidades estructurales y en 10 de 14 factores de ensamblaje identificados (*Alston et al., 2017*).

Complejo II (CII, succinato deshidrogenasa: ubiquinona oxidoreductasa, EC 1.3.5.1), a diferencia de cualquiera de los otros complejos del sistema mitocondrial OXPHOS, está completamente codificado por DNA nuclear y participa tanto en el ciclo del ácido tricarbóxico (donde metaboliza el succinato en fumarato) como en la cadena respiratoria (que transfiere electrones de FADH para reducir la ubiquinona en ubiquinol). La deficiencia del complejo II es rara (2–8% de los casos de enfermedad mitocondrial). Las mutaciones bialélicas se han asociado con presentaciones metabólicas congénitas, que afectan principalmente al sistema nervioso central (SNC) o al corazón (miocardiopatía hipertrófica, leucodistrofia, síndrome de Leigh y encefalopatía), mientras que las mutaciones heterocigotas están relacionadas con la susceptibilidad al cáncer, particularmente el feocromocitoma y el paraganglioma (*Alston et al., 2017*).

Complejo III (CIII, ubiquinol: ferricitocromo c oxidoreductasa, EC 1.10.2.2), los electrones se canalizan al complejo III desde complejos de transferencia de electrones aguas arriba mediante la reducción de ubiquinona a semiubiquinona y eventualmente ubiquinol. CIII funciona como un dímero estrechamente asociado, incrustado en la membrana mitocondrial interna. En los mamíferos, cada monómero está compuesto por 11 subunidades estructurales diferentes. Tres subunidades contienen los centros metálicos responsables de la transferencia de electrones: citocromo *b* (*MTCYB*), citocromo *c1* (*CYCI*) y la proteína Rieske Fe – S (*UQCRFS1* o *RISP*). La función de las otras ocho subunidades queda por dilucidar. *MTCYB* está codificado por mtDNA, mientras que las subunidades restantes están codificadas por genes nucleares (*Fernández et al., 2009*). La intolerancia al ejercicio es el fenotipo clínico reportado para $> 50\%$ de los pacientes con mutaciones en el gen *MTCYB*, también se ha observado cardiomiopatía y encefalomiopatía. Se han reportado mutaciones patogénicas en cuatro de las subunidades estructurales codificadas nuclearmente más cinco factores de ensamblaje / auxiliares, con presentaciones que incluyen retraso del desarrollo, encefalopatía, acidosis láctica, disfunción hepática, tubulopatía renal y debilidad muscular (*Alston et al., 2017*).

Complejo IV (CIV, citocromo c oxidoreductasa, COX, EC 1.9.3.1), la enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, cataliza la transferencia de electrones del citocromo *c* reducido al oxígeno molecular. Según la estructura de la enzima bovina, el CIV de mamíferos es un complejo heteromérico compuesto de 13 subunidades diferentes. El núcleo catalítico de la enzima está compuesto por subunidades codificadas por mtDNA (*MTCO1* y *MTCO2*), que contienen los dos restos hemo A (a y a₃) y los dos centros de cobre (Cu A y Cu B) responsables de la transferencia de electrones. Una tercera subunidad codificada por mtDNA (*MTCO3*) es parte del núcleo estructural y puede desempeñar un papel en el bombeo de protones. Las 10 subunidades restantes (*COX4*, *COX5A*, *COX5B*, *COX6A*,

COX6B, *COX6C*, *COX7A*, *COX7B*, *COX7C* y *COX8*) están codificadas en el DNA nuclear y deben importarse, procesarse y ensamblarse junto con las subunidades codificadas con mtDNA. En la actualidad se desconoce la función de las subunidades codificadas nucleares, pero es probable que tengan funciones reguladoras y de estabilización. En humanos, para *COX6A* y *COX7A* hay diferentes isoformas específicas de tejido: la expresada en el corazón (isoforma H), que está presente en el músculo esquelético y cardíaco, y la expresada en el hígado (isoforma L), que está presente en los tejidos extramusculares. También se han identificado una isoforma *COX6B2* específica de testículo y una *COX4* específica de pulmón, lo que revela la notable plasticidad funcional de la enzima (Fernández *et al.*, 2009). Las presentaciones clínicas relacionadas con su deficiencia a menudo son de inicio temprano y devastadoras, afectan principalmente al corazón y al SNC (p. Ej., se ha informado que *SURF1* presenta >80 mutaciones diferentes causantes del síndrome de Leigh), sin embargo, un fenotipo de Charcot-Marie-Tooth más leve se ha asociado con mutaciones bialélicas en *COX6A1* (Alston *et al.*, 2017).

Complejo V (CV, ATPasa mitocondrial, EC 3.6.3.14) explota la energía obtenida por los protones acumulados en el espacio intermembrana que fluye de regreso a la matriz mitocondrial para promover la condensación de ADP y fosfato inorgánico en ATP. Es un complejo de múltiples subunidades que consta de dos módulos funcionales, las partículas hidrofílicas, F1, orientadas a la matriz y las hidrófobas, F0, incrustadas en la membrana. F1 y F0 están físicamente conectados entre sí por dos tallos de proteínas. La F1 contiene cinco subunidades diferentes (3α , 3β , γ , δ , y ϵ), y actúa como el dominio catalítico de la ATP sintasa. La F0 consta de ocho subunidades (a, b, c, d, e, f, g y A6L) y el tallo central contiene un subconjunto de F1 (subunidades γ , δ , y ϵ), y el tallo periférico o estator se compone de las subunidades OSCP, F6, B y D. Las subunidades A y A6L de la F0 están codificadas por los genes *MTATP6* y *MTATP8* de mtDNA, respectivamente (Fernández *et al.*, 2009). Únicamente se han notificado defectos en solo cuatro genes del complejo nuclear V, con fenotipos clínicos diversos. Los defectos más comunes involucran una mutación en *TMEM70* que da lugar a acidosis láctica y miocardiopatía, aunque se han reportado casos de encefalopatía y cataratas en otras poblaciones (Alston *et al.*, 2017).

Capítulo 3. Fusión y fisión mitocondrial

Las mitocondrias sufren de remodelación en su membrana a través de ciclos de fusión (dos mitocondrias que se unen para formar una sola mitocondria) y división o fisión (una mitocondria única se divide en dos). El equilibrio entre ambos controla la estructura mitocondrial y, según el tipo de célula, las numerosas mitocondrias individuales pueden cambiar para formar una estructura membranosa única e interconectada que da como resultado una mezcla de la población mitocondrial en la célula. Dos grandes GTPasas conservadas evolutivamente constituyen la maquinaria central de fusión: las mitofusinas que se encuentran en la membrana externa, el *Mgm1* y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) que se encuentran en la membrana interna de la levadura y de los mamíferos, respectivamente (Westermann, 2010).

La fisión mitocondrial requiere el reclutamiento de la proteína Drp1 (relacionada con la dinamina del citosol) a la membrana mitocondrial externa. El ensamblaje de Drp1 en la superficie mitocondrial provoca la constricción de las mitocondrias y la eventual división del orgánulo en dos entidades separadas. Existen cuatro receptores Drp1 en mamíferos y estos se encuentran en la membrana mitocondrial externa: Fis1, Mff, Mid49 y Mid51. Los tres últimos juegan el papel predominante en la fisión. A pesar de su importancia en la levadura, Fis1 parece desempeñar un papel menor en la fisión mitocondrial en mamíferos (Mishra & Chan, 2014).

Presenta la mayoría del DNA no codificante dentro de una región de ≈ 1 kb denominada región no codificante (NCR) también conocida como región control (figura 3). La NCR es el sitio más polimórfico dentro del mtDNA con varios polimorfismos conocidos dentro de dos regiones hipervariables (HVR). La secuenciación de los HVR puede usarse para atribuir haplogrupos mitocondriales y es útil para rastrear linajes genéticos de poblaciones humanas. La NCR desempeña una función reguladora dentro del mtDNA, ejerciendo control sobre la transcripción y la traducción ya que contiene el origen de replicación para una cadena y el origen de transcripción para ambas cadenas. Muchas moléculas de mtDNA contienen una región de triple cadena, que forma un desplazamiento (D-loop) o un bucle D, este contiene ambas cadenas y una cadena pesada parcialmente replicada, unida por hidrógeno a la cadena ligera. Regularmente el término se usa indistintamente, sin embargo, el bucle D solo forma parte de la región de control y no es análogo al NCR. El resto de la molécula de mtDNA consta de genes sin estructuras intrónicas interpuestas y, a menudo, con marcos de lectura superpuestos entre genes adyacentes (*Sharma & Sampath, 2019; Holt & Reyes, 2012*).

Cada mitocondria contiene múltiples copias de mtDNA, con células que portan numerosas mitocondrias funcionales, esto junto con su organización compacta, puede ayudar a explicar su densidad genética relativamente alta. A pesar del tamaño minúsculo de la molécula de mtDNA en relación con el genoma nuclear, el mRNA de origen mitocondrial puede representar una gran proporción del mRNA celular total, desde el 5% en el pulmón hasta el 30% en el corazón humano (*Sharma & Sampath, 2019*).

Debido a la evolución, el mtDNA ha perdido parte de su autonomía y actualmente depende del nDNA, ya que este codifica numerosos factores necesarios para su transcripción, traducción y replicación (*Salvatore, 2004*).

Capítulo 4.1. Transcripción, replicación y traducción

- Replicación: teorías en competencia

A diferencia del nDNA, la replicación del mtDNA es un evento continuo e indispensable durante toda la vida de un organismo, ya que se lleva a cabo en células diferenciadas, como las células neuronales y cardíacas, así como en las células en proliferación (*Yasukawa & Kang, 2018*).

- Modelo clásico, también se conoce como modelo de replicación asíncrona, asimétrica y de desplazamiento de cadena o SDM (mecanismo de desplazamiento de filamento): Es el modelo más aceptado y establece que la replicación se inicia con la síntesis de la cadena H desde una posición específica en el NCR llamada O_H . La síntesis de la cadena H continúa de forma continua y unidireccional (en sentido horario) sin síntesis sincrónica de la cadena opuesta. La cadena L, comienza a replicarse desde una posición física y temporalmente distinta llamada O_L , que se encuentra aproximadamente a 11 kb de distancia de O_H y la replicación de esta cadena se inicia sólo después de que la síntesis de la cadena H pasa sobre este punto. La síntesis de la cadena L también es continua y unidireccional (en sentido antihorario). La característica de este modelo es que la síntesis de la cadena principal no acompaña a la síntesis de la cadena secundaria; por lo tanto, no hay fragmentos de Okazaki involucrados, a diferencia de la replicación del DNA nuclear (*Sharma & Sampath, 2019; Holt & Reyes, 2012; Yasukawa & Kang, 2018*).
- RITOLS: Como se muestra en la figura 4, la replicación comienza en uno de los dos sitios de origen (O_H u Ori-b), seguido por la síntesis de la cadena principal con la incorporación simultánea de RNA en la cadena rezagada. Se sospecha que la síntesis de cadena rezagada

comienza en O_L , posteriormente el RNA de la cadena rezagada se convierte o se reemplaza por DNA. Dicho de otra manera, SDM + RNA de cadena rezagada = replicación RITOLS. Este modelo tiene mucho en común con el SDM ya que ambos modelos predicen que las dos cadenas de DNA no se sintetizan simultáneamente y ambas marcan " O_L " como un sitio de inicio principal de la síntesis de DNA de segunda cadena en mamíferos. Una ventaja potencial de RITOLS sobre SDM es que evita exponer repeticiones directas como DNA monocatenario, que en los plásmidos bacterianos aumenta la frecuencia de formación de deleciones (Holt & Reyes, 2012).

→ Acoplamiento de cadena o síncrono de replicación: El proceso de replicación se inicia dentro del bucle D, y ambas cadenas se sintetizan bidireccionalmente y simultáneamente (Sharma & Sampath, 2019).

El equipo de replicación del mtDNA está conformado por una DNA polimerasa (POLG), una DNA helicasa (Twinkle) y una proteína de unión a DNA monocatenaria específica de mitocondrias (mtSSB). Otros factores críticos son la RNAsa H1 y la DNA ligasa III, que se comparten con el núcleo, sin embargo, a pesar de este conocimiento, estamos lejos de tener un inventario completo de las proteínas necesarias para la replicación y el mantenimiento del mtDNA (Pearse et al., 2013).

Algunos de los factores codificados en el núcleo que son importantes para el mantenimiento del mtDNA tienen una interacción prolongada con él, por ejemplo, la principal proteína de empaquetamiento del mtDNA, *TFAM*, mientras que otros no interactúan directamente ni con el mtDNA ni con sus proteínas de unión (Pearse et al., 2013).

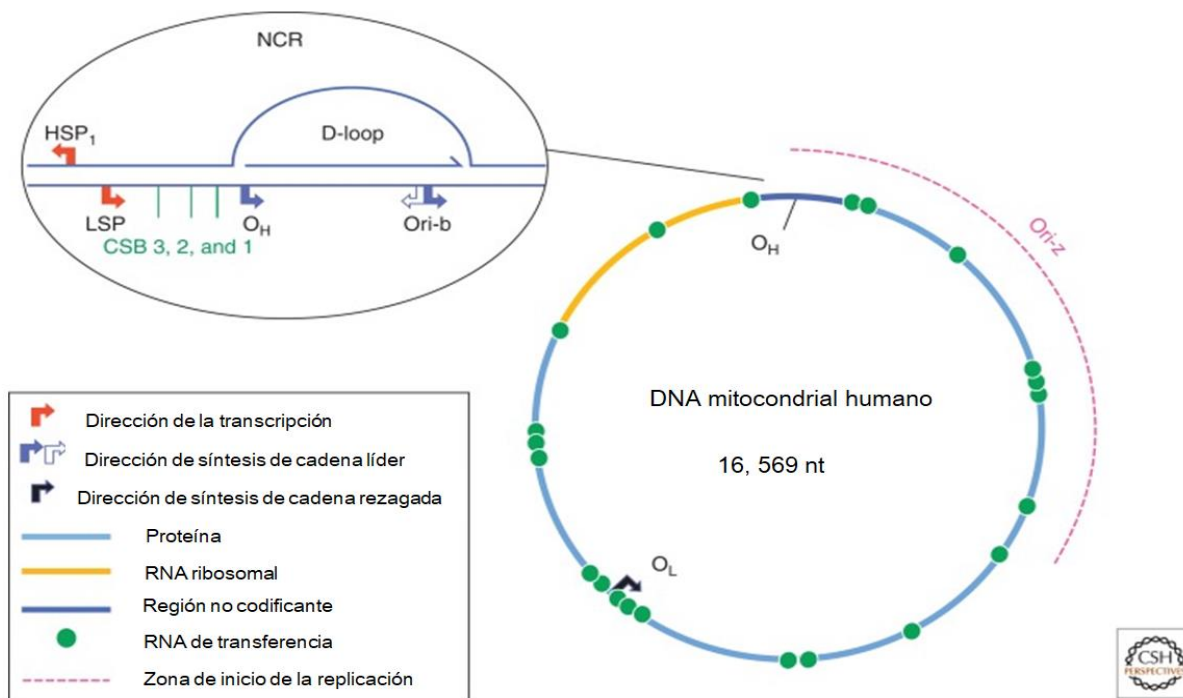


Figura 4. Diagrama esquemático del genoma mitocondrial humano y modelo de replicación RITOLS. LSP, promotor de cadena ligera; HSP, promotor de cadena pesada; CSBs, bloques de secuencia conservada (Modificado de Holt & Reyes, 2012).

- Transcripción del DNA mitocondrial

Para llevar a cabo la transcripción mitocondrial se requiere de tres etapas: iniciación, alargamiento y terminación. Estas no se comprenden por completo, siendo el inicio de la transcripción el más controvertido debido al papel debatido de *TFAM* (Shokolenko & Alexeyev, 2017).

Se cree que se inicia a partir de tres promotores, un promotor de cadena L (LSP) y dos promotores de cadena H (HSP1 y HSP2) (Holt & Reyes, 2012). El sitio HSP1 se ubica 16 pb aguas arriba del gen *tRNA^{Phe}* y produce una transcripción que finaliza en el extremo 3' del gen *rRNA 16S*. El sitio HSP2 está cerca del extremo 5' del gen *rRNA 12S* y genera una molécula policistrónica, que corresponde a casi toda la hebra H (Falkenberg et al., 2007).

Los tres producen transcripciones policistrónicas y los productos de HSP1 y HSP2 se superponen parcialmente. El objetivo principal de HSP1 es dar lugar a rRNA para los ribosomas mitocondriales (mitoribosomas). Mientras que HSP2 adicionalmente produce 10 mRNA y 14 tRNA a partir de una transcripción primaria de longitud cercana al genoma. El único promotor de la hebra L genera una transcripción primaria de dos tercios del genoma de longitud, que codifica una sola proteína (ND6) y los 8 tRNA restantes (Pearse et al., 2013).

De acuerdo al modelo prevaleciente, el inicio de la transcripción en las mitocondrias se realiza a través de tres pasos (figura 5):

1. En primer lugar *TFAM* se une a un sitio de unión de alta afinidad corriente arriba de los promotores HSP1 y LSP, generando una curva aguda en el mtDNA. Estos sitios se han mapeado en la posición -12-35 en relación con los sitios de inicio de transcripción LSP y HSP1 por medio de la huella de DNAsa I. Una curva de 180° en la región promotora de LSP puede ser importante para el posicionamiento adecuado de la maquinaria de transcripción mitocondrial en relación con el sitio de inicio de la transcripción.
2. El complejo *TFAM*-mtDNA recluta *POLRMT* por medio de interacciones ubicadas en el dominio C-terminal (CTD) de *TFAM*, originando así un complejo de preiniciación (pre-IC).
3. El reclutamiento de *TFB2M* al pre-IC facilita la fusión del promotor y el reclutamiento del sustrato de cebado al sitio catalítico de *POLRMT* (Shokolenko & Alexeyev, 2017).

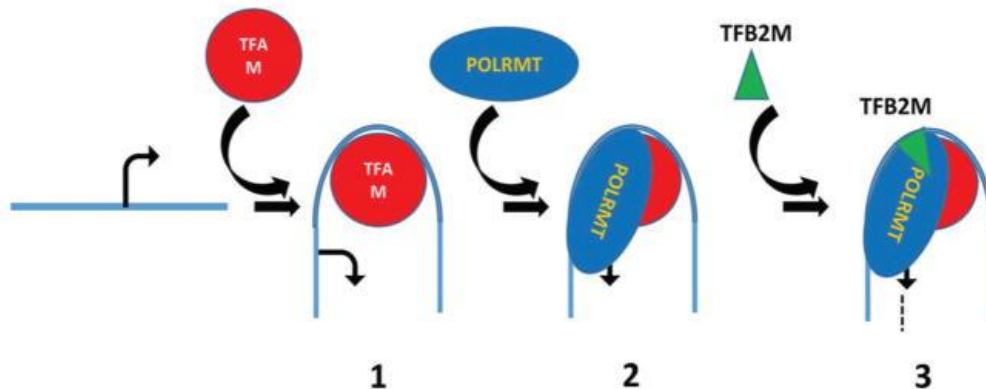


Figura 5. Modelo para el inicio de la transcripción mitocondrial (Shokolenko & Alexeyev, 2017).

Ya que comenzó la transcripción, se cree que *TFB2M* se disgrega de *POLRMT*, iniciando el paso de alargamiento. Este paso lo lleva a cabo el complejo de alargamiento, que posiblemente incluye, junto con *POLRMT*, un factor de alargamiento de la transcripción mitocondrial (*TEFM*) y una helicasa. *TEFM* incrementa la procesividad de *POLRMT* y, en el caso de la transcripción mediada por LSP, *TEFM* favorece la derivación por *POLRMT* de una estructura G-quadruplex en el bloque de secuencia II conservado humano (*CSBII*). Se ha propuesto que esta derivación regula el paso entre la replicación y la transcripción de mtDNA. Cuando no se encuentra *TEFM*, la terminación de la transcripción alrededor de *CSBII* crea un cebador para la replicación del mtDNA, por el contrario cuando *TEFM* está presente, *POLRMT* evita *CSBII* y continúa la síntesis de una transcripción policistrónica de longitud casi genómica (*Shokolenko & Alexeyev, 2017*).

Solo se ha establecido con claridad el sitio de terminación de la transcripción mitocondrial que comienza en HSP1, este se ubica al final del gen codificante del *rRNA 16S*. La terminación de la transcripción en este sitio depende de la proteína del factor de terminación de la transcripción mitocondrial (mTERF), una proteína de 39 kDa que une la secuencia concretamente a una región de 28 pb en el extremo 3' del gen *MT-TL1* (*tRNA^{Leu} (UUR)*). La proteína mTERF puede terminar la transcripción in vitro, sin embargo, aún no se aclara el papel funcional de la proteína in vivo. Se ha identificado un sitio de terminación para la transcripción de HSP2 un poco más allá de la región de control, inmediatamente aguas arriba del gen *tRNA^{Phe}*. La terminación de la unidad de transcripción LSP no ha sido estudiada en detalle (*Falkenberg et al., 2007*).

- Traducción mitocondrial

La síntesis de proteínas mitocondriales se puede dividir en cuatro pasos principales (figura 6B):

- **Iniciación:** Empieza con *IF3_{mt}* al dividir las dos subunidades del mitorribosoma 55S y formar un complejo con la subunidad 28S más pequeña. El ingreso del mRNA en el complejo de la subunidad *IF3_{mt}*: 28S va seguido de una pausa para confirmar la presencia de un codón de inicio apropiado antes de que formilmetionil-tRNA (fMet-tRNA), el primer residuo en todas las cadenas polipeptídicas mitocondriales, pueda unirse al primer codón. Si este paso falla, el complejo se disocia. Para continuar, *IF2_{mt}* debe acoplarse al complejo y esto facilita la unión a la gran subunidad 39S, después de lo cual el GTP unido a *IF2_{mt}* se hidroliza. Posteriormente, los factores de iniciación se apartan del ribosoma 55S recién restaurado, lo que permite iniciar el alargamiento de la cadena polipeptídica.
- **Alargamiento:** Un aminoacil-tRNA cargado entra en el sitio A del mitorribosoma (en un complejo ternario con *EF-TU_{mt}* unido a GTP), para coordinar el acoplamiento específico de codón: anticodón del tRNA y mRNA. El emparejamiento correcto de codón: anticodón conduce a la liberación de *EF-TU_{mt}*-GDP recién formado mediado por la hidrólisis de GTP. La actividad enzimática intrínseca del ribosoma cataliza la transferencia de la cadena de peptidilo en el tRNA en el sitio P al nuevo aminoacil-tRNA en el sitio A, mediante la actividad de la peptidiltransferasa intrínseca de la subunidad 39S, extendiendo así la cadena polipeptídica en crecimiento. Mientras que *EFG1* facilita la translocación del ribosoma a lo largo del mRNA en una dirección de 5' a 3' de forma dependiente de GTP, *EF-TU_{mt}*-GTP es regenerado por *EF-Ts_{mt}* y forma complejos con un nuevo aminoacil-tRNA. El ciclo de elongación se repite hasta que se encuentra un codón de parada.
- **Terminación:** El ribosoma de translocación localiza un codón de parada mitocondrial de UAA o UAG. Recientemente se ha informado que al encontrar un codón AGA o AGG, el mitorribosoma

realiza un desplazamiento de marco de lectura - 1 para llevar un codón de parada UAG clásico al sitio A, lo que origina la terminación estándar. Ya que el codón de parada ha entrado en el sitio A, *mtRF1a* reconoce el codón y se une al ribosoma en su forma unida a GTP. Este evento de unión induce la hidrólisis del enlace peptidil-tRNA en el sitio A, a través de la actividad de la peptidiltransferasa intrínseca de la subunidad 39S, liberando así el polipéptido maduro del ribosoma. para finalizar se requiere admitir los factores de reciclaje *mtRRF1* y *mtRRF2* en el sitio A del ribosoma para generar la liberación del mRNA.

→ Reciclaje de ribosomas: La unión de *mtRRF1* y *mtRRF2* (también conocido como *EFG2*) al sitio A genera la disgregación del monosoma 55S, liberando el mRNA y el tRNA. De esta manera el ribosoma puede comenzar un nuevo ciclo de síntesis de proteínas (*Pearce et al., 2013*).

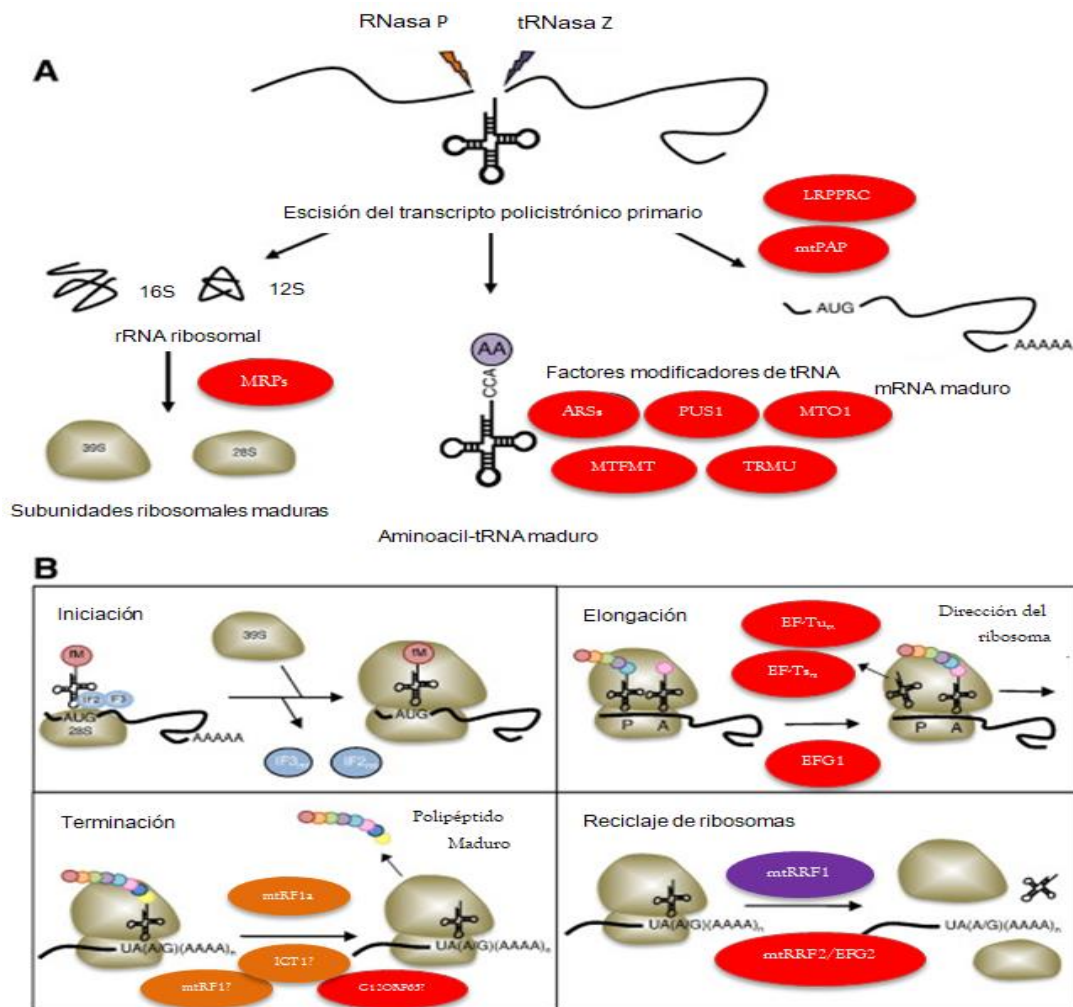


Figura 6. Procesamiento postranscripcional y traducción de transcritos mitocondriales humanos. A) Procesos postranscripcionales que conducen a la maduración de especies de RNA mitocondrial. B) Las cuatro etapas de la traducción mitocondrial. Se sabe que los factores que se muestran en negro / rojo causan trastornos de la traducción mitocondrial (*Modificado de Pearce et al., 2013*).

Capítulo 4.2. Herencia del DNA mitocondrial

En las células en proliferación, la división de las mitocondrias en células hijas debe dar como resultado un reparto idóneo del mtDNA. En los mamíferos las mitocondrias se heredan exclusivamente a través del linaje materno con un patrón vertical no mendeliano (*Mishra & Chan, 2014; Solano et al., 2001*) este tipo de herencia se lleva a cabo en humanos y animales gracias a la dilución de los mtDNA de espermatozoides por mtDNA de ovario en la fertilización, el ovocito tiene más de 200,000 mtsDNA mientras que el espermatozoide tiene cientos, además la proteína de la membrana externa mitocondrial de los espermatozoides, prohibitina, está ubiquitinada, lo que posiblemente permite que las mitocondrias de los espermatozoides sean reconocidas como extrañas por el ovocito y degradadas dentro de las 24 h posteriores a la fertilización (*Wallace, 2007*).

El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular ya que las mitocondrias se reparten al azar entre las células hijas (segregación mitótica), lo que provoca que si en una célula coexisten las dos poblaciones de mtDNA (normal y mutado) en el transcurso de las divisiones se podrán originar tres genotipos diferentes: homoplásmico para el mtDNA normal, homoplásmico para el mtDNA mutado y heteroplásmico. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje de DNA mutado que contenga, es decir, si el número de moléculas de mtDNA dañado es relativamente bajo se genera una complementación con las moléculas de DNA normal y no se expresa el defecto genético, sin embargo, si sobrepasa un umbral determinado se manifestará un fenotipo patológico (efecto umbral) (*Solano et al., 2001*).

Gracias a este patrón de herencia uniparental, el mtDNA carece de los beneficios de la recombinación que surge de la reproducción sexual. Sin embargo, los mecanismos han evolucionado para disminuir la posibilidad de transmitir mutaciones patogénicas de mtDNA a la descendencia. En algunos casos, estos mecanismos fracasan, y los trastornos hereditarios maternos denominados encefalomiopatías mitocondriales surgen cuando se transmite una carga significativa de mutaciones del mtDNA a la descendencia (*Mishra & Chan, 2014*).

La herencia de los genomas citoplasmáticos por parte de ambos padres posibilita mutaciones perjudiciales con una ventaja replicativa para desarrollarse por toda la población y erosionar la aptitud de las especies. Las mutaciones nucleares que limitan la transmisión de genomas de orgánulos a un solo padre reducen esta posibilidad, sin embargo, el número de linajes de mtDNA transmitidos de madres a hijos también debe limitarse, ya que en una población mixta de moléculas de mtDNA (heteroplasmia), puede llegar a prevalecer una mutación que posee una ventaja replicativa pero que también es perjudicial para el huésped. Cada mutación desfavorable posterior con una ventaja replicativa suplantarán a la anterior hasta que el linaje muera, un proceso conocido como "trinquete de Muller". La introducción de un cuello de botella en la línea germinal (figura 7) que limita el número de mtDNA transmitidos entre generaciones mejora este problema al aumentar la tasa de purificación de las moléculas mutantes en la línea germinal materna. Así mismo, las nuevas mutaciones de mtDNA se segregan rápidamente a la homoplasmia para que puedan analizarse mediante selección natural, y las mutaciones perjudiciales se eliminan de la población antes de que puedan extenderse ampliamente (*Wallace, 2007*).

En un principio, parece que el cuello de botella mitocondrial causa enfermedad en los niños de madres sanas. Sin embargo, desde una perspectiva evolutiva, es todo lo contrario. Este fenómeno reduce la carga mutacional durante la transmisión y protege a la especie humana del colapso mutacional predicho por Ratchet de Muller en poblaciones asexuales. A corto plazo (durante unas pocas generaciones), esto puede causar enfermedades mitocondriales dentro de las familias, pero a largo plazo (después de muchas

generaciones), suprime las mutaciones adversas de la línea germinal materna, y así "limpia" la población (Carling *et al.*, 2011).

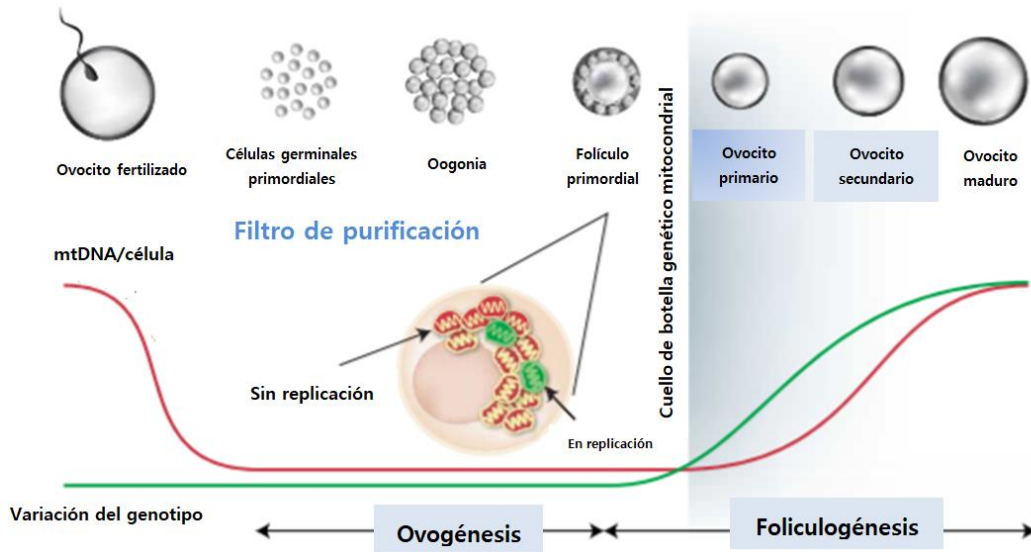


Figura 7. Modelo para la transmisión de mtDNA en la línea germinal femenina. El cuello de botella genético mitocondrial postnatal durante la foliculogénesis segrega con rapidez las variantes de mtDNA que pasaron a través del filtro para su purificación (Modificada de Wai *et al.*, 2008)

Capítulo 4.3 Homoplasma y heteroplasma

La homoplasma se refiere a la presencia de una mutación patógena en todas las copias del mtDNA (Falkenberg, *et al.*, 2007). Por otro lado, la existencia de mtDNA sano y mutado dentro de una mitocondria determinada se conoce como heteroplasma. Cabe resaltar que se necesita de una cantidad mínima de genomas mitocondriales mutantes para la expresión de una disfunción o enfermedad mitocondrial, fenómeno conocido como “efecto umbral”. Este efecto es relativo, debido a que el porcentaje de genomas afectados necesarios para alterar la función mitocondrial varía según los requisitos metabólicos de la célula o tejido en un momento dado, el par de bases / gen particular involucrado y el trasfondo genético nuclear. Generalmente, cuanto mayor es el nivel de mtDNA mutante, más grave es la enfermedad, aunque existen algunas excepciones. Por este motivo, la tolerancia celular de la heteroplasma es un tema que no se comprende completamente, ya que probablemente (a) difiera de acuerdo a la mutación y el tipo de célula, (b) se vea significativamente influenciada por procesos competitivos como la biogénesis y degradación mitocondrial, y (c) da lugar a una variedad de fenotipos, muchos de los cuales pueden estar por debajo de los niveles de detección clínica (Pereira & Moraes, 2017; Sharma & Shampath, 2019).

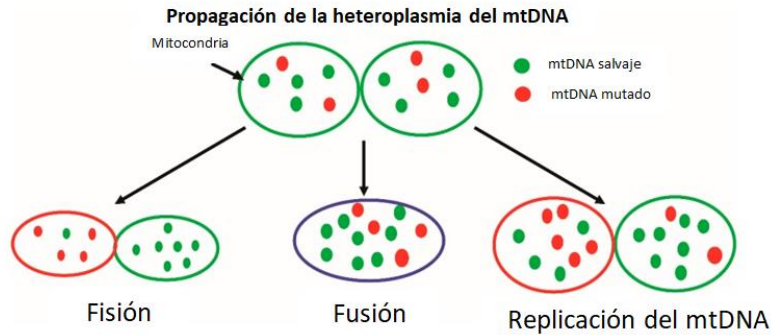


Figura 8. Mecanismos de herencia de mutaciones del mtDNA. (Óvalos verdes = mitocondrias funcionales; rojo = disfuncional; azul = función subóptima) (Modificado de Sharma & Shampath, 2019).

Como se muestra en la figura 8, en cada mitocondria existen múltiples copias de mtDNA, algunas de las cuales pueden presentar mutaciones dañinas. Tras la fisión, fusión o replicación del DNA mitocondrial, estas moléculas pueden segregarse aleatoriamente a las mitocondrias hijas, lo que da como resultado niveles reducidos o aumentados de heteroplasmia. Por este motivo es complicado estudiar la contribución de la heteroplasmia al desarrollo de la enfermedad, ya que el umbral de la enfermedad para cada mutación puede ser diferente y puede dar lugar a un espectro de fenotipos clínicos y subclínicos (Sharma & Shampath, 2019). De igual forma, se sabe que las mutaciones en el mtDNA pueden contribuir a fenotipos de enfermedades relacionadas con la edad, como ceguera, sordera, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, disfunción renal y endocrina (Pereira *et al.*, 2017).

Capítulo 5. Enfermedades mitocondriales

Que las mutaciones del mtDNA podrían causar enfermedad se informó por primera vez a nivel molecular en 1988 con la demostración de que pacientes aislados con miopatía mitocondrial podían alojar deleciones heteroplasmáticas del mtDNA, que la enfermedad de ceguera de aparición repentina heredada de la madre, neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), fue generada por una mutación homoplásmica en el gen *ND4* en el nt G11778A (codón de arginina 340 a histidina, p.R340H) y que la epilepsia mioclónica y la enfermedad de las fibras rojas irregulares (MERRF) fueron causadas por una mutación heteroplasmática en el gen *tRNA^{Lys}* en nt A8344G. Estos descubrimientos dieron lugar a las bases para investigar y comprender una gama de enigmáticas enfermedades familiares y relacionadas con la edad (Wallace & Chalkia, 2013).

Debido a la falta de protección de las histonas, el mtDNA tiende a desarrollar mutaciones somáticas, las cuales pueden surgir después de la exposición a mutágenos ambientales, por errores de la DNA polimerasa durante la replicación, por fallas en la maquinaria de reparación y por defectos en los mecanismos de degradación del mtDNA dañado. Sin embargo, la fuente más reconocida de mutagénesis son las especies reactivas de oxígeno (ROS), que son producidas por la cadena de transporte de electrones mitocondriales, esto se debe a que el mtDNA se ubica muy cerca de las cadenas respiratorias (Shokolenko *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2019). Según diversas estimaciones, el mtDNA sufre una alta tasa de mutagénesis, potencialmente de 10 a 20 veces mayor que la del genoma nuclear (Sharma & Shampath, 2019).

Las mutaciones en el mtDNA son sorprendentemente comunes y surgen constantemente. Los estudios epidemiológicos genéticos que únicamente cuantifican las mutaciones patógenas del mtDNA más

comunes han estimado que la incidencia de enfermedades mitocondriales clínicas es aproximadamente 1 en 5000. Aún más impactante, una encuesta de sangre de cordón de recién nacidos reveló que 1 de cada 200 bebés albergaba una de las 10 mutaciones patógenas más comunes (Wallace & Chalkia, 2013).

Estos síndromes a menudo son difíciles de diagnosticar debido a su heterogeneidad fenotípica, que con frecuencia afecta a múltiples sistemas (Boggan, et al., 2019), por este motivo la caracterización clínica y bioquímica meticulosa de los pacientes sigue siendo fundamental para el diagnóstico (Gorman et al., 2015), sin embargo, el diagnóstico definitivo de enfermedades mitocondriales puede requerir evaluaciones tanto del mtDNA como del nDNA para detectar mutaciones, ya sea a través de paneles de diagnóstico específicos o mediante secuenciación (Dimmock & Lawlor, 2017).

Capítulo 5.1 Clasificación

La manera más adecuada para que el médico realice un diagnóstico relacionado con enfermedades mitocondriales es utilizar una clasificación que combine criterios genéticos y bioquímicos. Debido a que la cadena respiratoria es la única vía metabólica en la célula que está bajo el control de ambos genomas, la clasificación genética de las enfermedades mitocondriales distingue los trastornos debidos a defectos en el mtDNA (figura 9), que se gobiernan por las reglas más laxas de la genética mitocondrial y defectos en el nDNA que se gobiernan por las reglas más estrictas de la genética mendeliana (Salvatore, 2004).

Así mismo, una clasificación actualizada de enfermedades relacionadas con el mtDNA, distingue a los defectos genéticos mitocondriales como esporádicos y hereditarios. Los principales fenotipos mejor definidos se mencionan a continuación:

Síndromes debidos a reordenamientos del mtDNA

- Esporádico
 - Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)
 - Síndrome de Pearson
 - Oftalmoplejía externa progresiva crónica esporádica (cPEO)
 - Diabetes y sordera
- Heredado de la madre
 - cPEO
 - Síndromes multisistémicos

Síndromes debidos a mutaciones puntuales en el mtDNA

- Esporádico
 - cPEO
 - Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares (MELAS)
 - Intolerancia al ejercicio
 - Miopatía aislada
- Heredado de la madre
 - ❖ Mutación puntual en genes que codifican polipéptidos
 - Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)
 - Neuropatía, ataxia, síndrome de retinitis pigmentosa (NARP)
 - Síndrome de Leigh
 - ❖ Mutación puntual en genes que codifican tRNA

- MELAS
- Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF)
- Miocardiopatía y miopatía (MIMyCa)
- cPEO
- Miopatía aislada
- Diabetes y sordera
- Sordera neurosensorial
- Miocardiopatía hipertrófica
- Tubulopatía
- ❖ Mutaciones puntuales en genes que codifican rRNA
 - Sordera no sindrómica inducida por aminoglucósidos
 - Miocardiopatía hipertrófica

(Mancuso et al., 2007).

Bioquímicamente, las mutaciones en el mtDNA se pueden dividir en aquellas que alteran la síntesis de proteínas mitocondriales en su totalidad (p. Ej., Mutaciones y reordenamientos de genes de tRNA o rRNA) y aquellas que afectan a una de las 13 subunidades de la cadena respiratoria codificada por mtDNA (Salvatore, 2004).

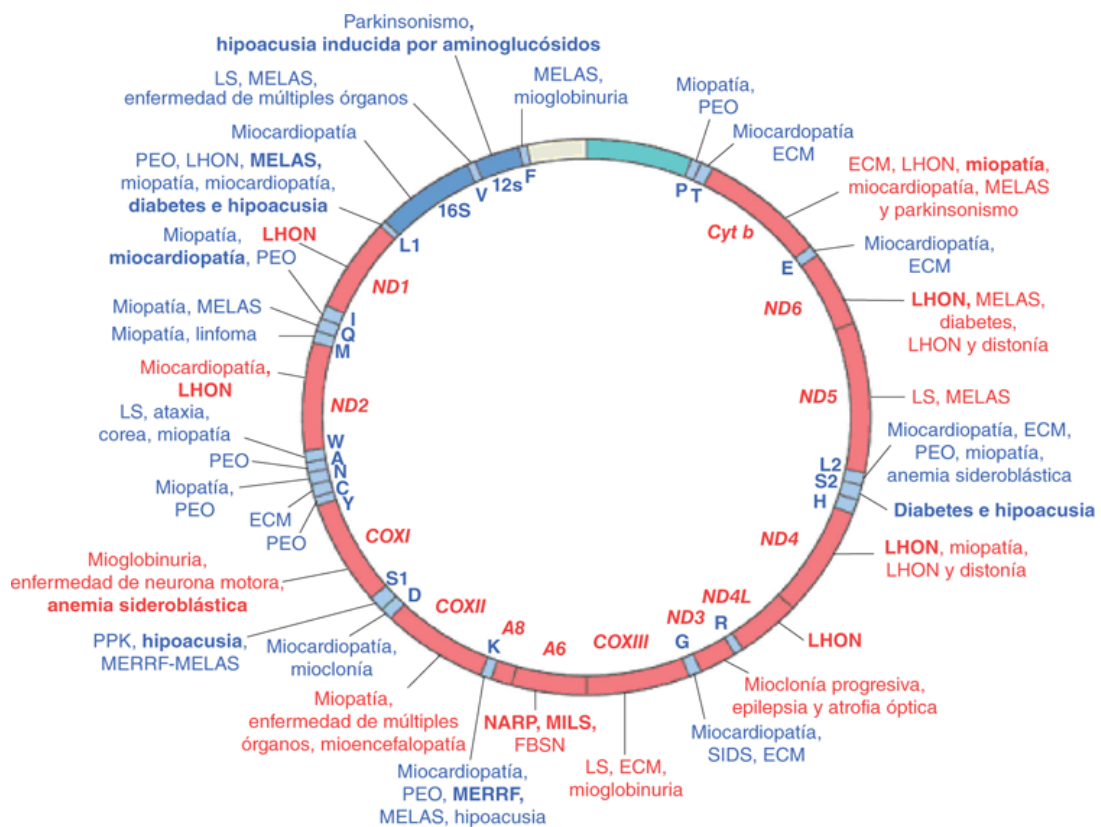


Figura 9. Relación del genoma mitocondrial y enfermedades (Harrison, 2016).

Capítulo 5.2 Enfermedades mitocondriales en México

Los síndromes mitocondriales son difíciles de diagnosticar debido a su heterogeneidad fenotípica ya que con frecuencia afecta a múltiples sistemas (*Boggan, et al. 2019*), por este motivo la caracterización clínica y bioquímica meticulosa de los pacientes sigue siendo fundamental para el diagnóstico (*Gorman et al., 2015*), sin embargo, su diagnóstico definitivo puede requerir evaluaciones moleculares para detectar mutaciones, ya sea a través de paneles de diagnóstico específicos o mediante secuenciación (*Dimmock & Lawlor, 2017*). En el sector salud de México no se llevan a cabo estas pruebas de diagnóstico, por este motivo la información sobre enfermedades mitocondriales en el país es escasa, sin embargo, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, un equipo encabezado por el Dr. José Francisco Montiel Sosa ha realizado diversos estudios enfocados en el diagnóstico de enfermedades mitocondriales.

En el 2007 tras la secuenciación completa del DNA de una paciente mexicana se reveló la presencia de la mutación A3243G en el gen *MT-TL1* (*tRNA^{Leu(UUR)}*) del mtDNA en un 31% de heteroplasmia y una serie de polimorfismos, algunos no descritos anteriormente que permitieron establecer que pertenecía a la variante mitocondrial correspondiente al haplogrupo B2. Así mismo, se determinó que la secuencia del mtDNA de la paciente contiene dos mutaciones privadas A7746G y A13661G (*Delgado et al., 2007*).

En 2009 un estudio genético molecular evidenció la presencia de la mutación G14459A en una proporción del 95% de heteroplasmia en el paciente y en un 5% en su madre, esta mutación se ha relacionado con anterioridad al síndrome de Leigh, un dato importante es que se determinó que la paciente mexicana pertenece al haplogrupo de origen europeo H a diferencia de trabajos previos en donde se reporta la mutación en pacientes mexicanos pertenecientes a haplogrupos nativoamericanos (*Gutiérrez, 2009*). En el mismo año, al estudiar genéticamente a dos familias y un paciente aislado, se logró determinar la presencia de la mutación A3243G, así como su porcentaje de heteroplasmia en 5 tejidos diferentes (sangre, orina, saliva, ceja y músculo). La importancia de este trabajo radica en que al llevar a cabo la investigación en varios familiares, se consiguió prevenirlos sobre un integrante que en el futuro presentará la enfermedad ya que su nivel de heteroplasmia es muy alto incluso a su corta edad. De igual forma logró relacionarse al haplogrupo B con la prevalencia de la mutación en México (*Saldaña et al., 2009*).

En 2016 al llevar a cabo la secuenciación de todo el genoma mitocondrial por PCR de largo alcance, se diagnosticó a un paciente con KSS al determinar la presencia de una delección de aproximadamente 7629 pb presente con un 84,65% de heteroplasmia y la identificación del haplogrupo C. Este hallazgo es relevante ya que la distribución de este haplogrupo en América se encuentra pobremente caracterizada (*Montiel et al., 2013*). Dos años después se publicó un estudio en donde se reporta nuevamente al paciente anterior con la delección a gran escala de 7629 pb en el mtDNA, sin embargo, en este trabajo también se llevó a cabo la secuenciación del mtDNA de la madre, en donde no se encontró la delección a gran escala pero sí una delección de 4977 pb, el tercer y último paciente indicó una delección de 5387 pb. El haplogrupo de pacientes con enfermedades mitocondriales rara vez se ha reportado en poblaciones mexicanas, sin embargo, en este estudio se logró identificar los haplogrupos C1b14, C1d y B2 para los pacientes 1,2 y 3 respectivamente (*Saldaña et al., 2018*).

Así mismo, se realizó un análisis bioinformático para crear una guía de diagnóstico basado en la detección de las mutaciones en el mtDNA más comunes asociadas a los síndromes MELAS, KSS y Leigh (Villamil, 2014).

Capítulo 6. MELAS

La encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares (MELAS) es un trastorno multisistémico que se hereda por vía materna y es causado por mutaciones del DNA mitocondrial que dan lugar a una deficiencia de la cadena respiratoria (Abdullah et al., 2020). Presenta un amplio espectro de manifestaciones, que incluyen episodios similares a accidentes cerebrovasculares, demencia, epilepsia, acidosis láctica, intolerancia al ejercicio, debilidad muscular, migrañas, hipoacusia neurosensorial, neuropatía periférica, vómitos recurrentes y baja estatura. Otras menos comunes incluyen mioclonías, ataxia, atrofia óptica, retinopatía, miocardiopatía, diabetes, nefropatía, depresión, ansiedad y trastornos psicóticos. La edad típica de aparición es la niñez, con aproximadamente el 70% de las personas afectadas antes de los 20 años. Rara vez se expresa antes de los 2 años o después de los 40 años (El-Hattab et al., 2017).

Molecularmente, está causado por diferentes mutaciones en el DNA mitocondrial, las más comunes se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1. Mutaciones en el DNA mitocondrial en los genes *MT-TL1* (*tRNA^{Leu(URR)}*) y *MT-ND5* asociados a MELAS (Lorenzoni et al., 2015).

Gen	Mutación	Proporción de personas afectadas
<i>MT-TL1</i> (<i>tRNA^{Leu(URR)}</i>)	3243 A>G	~ 80%
	3271 T>C	~7.5%
	3252 A>G	<5%
	3256 C>T 3260 A>G 3291 T>C 3302 A>G	<10%
<i>MT-ND5</i>	13513 G>A	<10%
	12770 A>G 13042 A>T 13045 A>C 13046 T>C	<5%
	13048 A>T 13514 G>A 13528 A>G	

La mutación A3243AG provoca una alteración en la traducción mitocondrial que conduce a una disminución en la síntesis de proteínas mitocondriales, incluidas las subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC), dando como resultado el deterioro de la ETC y en la producción de energía. La incapacidad de las mitocondrias afectadas para generar suficiente energía para satisfacer las necesidades de varios órganos origina la disfunción multiorgánica, también puede estimular la proliferación mitocondrial en el músculo liso y las células endoteliales de los vasos sanguíneos pequeños, lo que conduce a una angiopatía que altera la perfusión sanguínea en la microvasculatura de varios órganos que puede contribuir a las complicaciones observadas en el síndrome, en particular los episodios similares a un accidente cerebrovascular. Además existe una creciente evidencia de que se presenta deficiencia de óxido nítrico (NO) que puede contribuir significativamente a sus complicaciones (El-Hattab et al., 2017).

Capítulo 6.1 Diagnóstico

- Clínico y bioquímico

La evaluación de biomarcadores mitocondriales en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR), son recomendados por la mayoría de los algoritmos de diagnóstico. El análisis en sangre para detectar enfermedad mitocondrial debe incluir hemograma completo, creatina fosfoquinasa, transaminasas, albúmina, lactato y piruvato, aminoácidos y acilcarnitinas, además de ácidos orgánicos urinarios cuantitativos o cualitativos. Las muestras deben recolectarse adecuadamente, especialmente para las mediciones de lactato y piruvato (*Parikh et al., 2015*).

En la mayoría de los pacientes con síndrome MELAS, el nivel de ácido láctico en sangre y LCR se eleva durante, o poco después de los episodios similares a ictus, mientras que a nivel ventricular medido por espectroscopía, suele estar elevado y este aumento se asocia con la gravedad de los síntomas neurológicos. También se pueden medir los niveles séricos de creatina quinasa (CK), la cual puede estar aumentada, generalmente durante o después de episodios similares a ictus, lo que ayuda a demostrar la afectación muscular en estos pacientes, sin embargo, a pesar de que es inespecífica para demostrar la miopatía mitocondrial sus hallazgos apoyan en el diagnóstico diferencial con otras enfermedades. Los estudios bioquímicos han demostrado que varios complejos de la cadena respiratoria mitocondrial pueden ser deficientes, aislados o en combinación, pero el complejo I parece estar más involucrado, mientras que el complejo II parece menos afectado (*Lorenzoni et al., 2015*).

Clínicamente, su diagnóstico se basa en 3 criterios 1) episodios similares a un accidente cerebrovascular antes de los 40 años, 2) encefalopatía caracterizada por convulsiones o demencia y 3) miopatía mitocondrial evidente por acidosis láctica o fibras rojas irregulares (FRR). Este diagnóstico se puede considerar confirmado si también se presenta al menos dos de los tres criterios de apoyo, incluido el desarrollo psicomotor temprano normal, dolores de cabeza recurrentes y episodios de vómitos recurrentes (*El-Hattab et al., 2017*).

- Pruebas cardíacas

- Electrocardiograma: La miocardiopatía, la preexcitación o el bloqueo cardíaco incompleto se describen bien en MELAS. Los defectos de la conducción auriculoventricular son una preocupación específica en los casos de síndrome de Kearns-Sayre.
- Ecocardiograma: La miocardiopatía se presenta con mayor regularidad en los trastornos que también causan miopatía del músculo esquelético. La disfunción sistólica es un hallazgo frecuente, pero el fenotipo estructural puede variar. En MELAS, es típica la hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo y la miocardiopatía dilatada es común del síndrome de Barth (*Dimmock & Lawlor, 2017*).

- Imagenología

Los estudios de imagen pueden ser útiles en el diagnóstico ya que permiten demostrar la presencia de anomalías variables y algunos patrones típicos de las enfermedades mitocondriales. Con frecuencia, la atrofia cerebral y cerebelosa se observa en una amplia gama de estos trastornos. Asimismo, el deterioro metabólico puede dar lugar a lesiones de isquemia o infarto "similares a un accidente cerebrovascular" que pueden no pertenecer a territorios vasculares específicos. En MELAS, se puede presentar un incremento de la señal T₂, con mayor frecuencia en las áreas occipitales, también puede observarse una propagación lenta de estas lesiones en las semanas posteriores al evento inicial. Por otro lado, las

lesiones similares a ictus de MELAS muestran un mayor coeficiente de difusión aparente (ADC), al contrario de la reducción observada en los ictus isquémicos. Estas lesiones similares a apoplejías pueden confundirse con el síndrome de encefalopatía posterior reversible (SEPR) y es probable que ambos estados patológicos tengan una etiología similar relacionada con la disfunción endotelial, la isquemia y el edema vasogénico subsiguiente. En la figura 10 se muestran los resultados hallados en imágenes cerebrales de pacientes con MELAS. Por otro lado, las anomalías de imagen observadas en el síndrome de Leigh son típicamente diferentes a las de MELAS, incluidas anomalías de señales hiperintensas simétricas bilaterales en el tronco encefálico y / o ganglios basales en la resonancia magnética ponderada en T₂ (*Dimmock & Lawlor, 2017*).

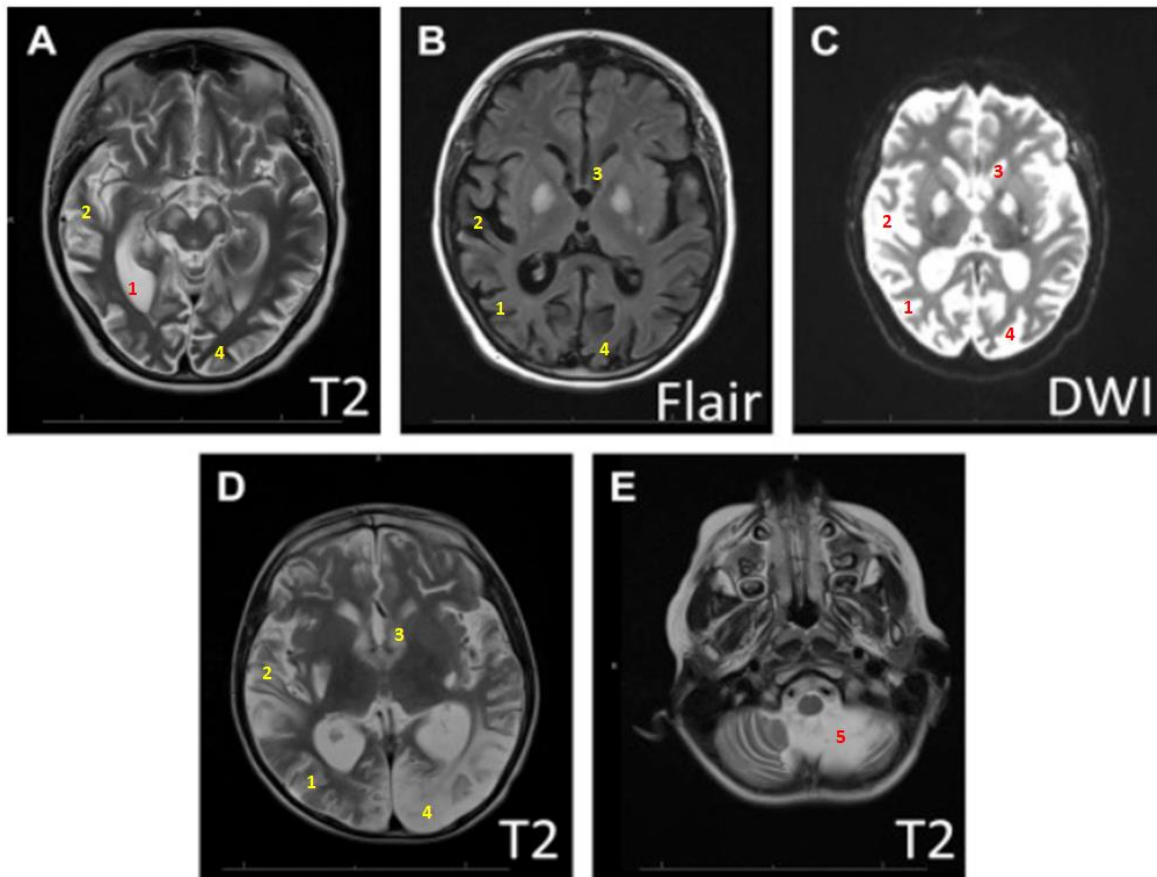


Figura 10. Imágenes cerebrales en enfermedad mitocondrial (EM). Se muestra la resonancia magnética de dos pacientes con MELAS para ilustrar los hallazgos de imagen en la EM grave. El primer paciente (A – C) presentó áreas irregulares de difusión restringida e hiperintensidad (áreas brillantes) de la señal TR larga que afectan los lóbulos parietales (1), los lóbulos temporales (2) y los ganglios basales (3) de forma bilateral. El segundo paciente (D, E), mostró anomalías similares en los lóbulos occipitales (D4) y una marcada atrofia cerebelosa (E5: área brillante). DWI, secuencia ponderada por difusión; Flair, secuencia de recuperación de inversión atenuada por fluidos; T₂, secuencia de imágenes ponderadas en T₂ (*Modificada de Dimmock & Lawlor, 2017*).

- Diagnóstico genético

Para el diagnóstico definitivo de las enfermedades mitocondriales se debe recurrir a la búsqueda de mutaciones tanto del mtDNA como del nDNA (*Dimmock & Lawlor, 2017*).

Actualmente para llevar a cabo su diagnóstico se puede recurrir a la secuenciación del genoma del mtDNA y el análisis de heteroplasmia, esto se puede realizar de manera eficaz en sangre, sin embargo, puede ser necesario analizar otros tejidos en los órganos afectados (*Parikh et al., 2015*).

Una muestra de gran utilidad para el diagnóstico, debido a su alto contenido de mtDNA en las células epiteliales renales, es la orina. Este se aplica particularmente en el síndrome MELAS y su mutación más común A3243G en *MT-TL1* (*tRNA^{Leu(URR)}*). Por otro lado, el hígado o el músculo esquelético se consideran fuentes de tejido preferidas cuando están disponibles, debido a su alto contenido de mtDNA, su dependencia de la respiración mitocondrial y la posibilidad de que puedan albergar una mutación específica de tejido que simplemente no está presente en la sangre (*Parikh et al., 2015*).

➤ RFLP

La Técnica de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se utilizó por primera vez en 1975 y en la actualidad es el método más comúnmente empleado para detectar mutaciones puntuales "comunes" en el mtDNA. Permite explotar variaciones en secuencias de DNA homólogas y requiere una cantidad mínima de DNA de peso molecular relativamente alto, con una cantidad promedio de fragmentos de aproximadamente 20, 000 a 25, 000 pb (20 a 25 Kb). En este análisis las muestras de DNA se cortan en pedazos por medio de enzimas de restricción, las cuales reconocen secuencias específicas y catalizan escisiones de endonucleótidos sólo en estos sitios de reconocimiento, debido a esto los fragmentos producidos son de longitudes definidas y se separan según su longitud mediante electroforesis en gel de agarosa. Por este motivo, cualquier cambio genómico dentro de los sitios de reconocimiento (como algunas mutaciones puntuales) provocan la pérdida o aparición de un sitio de restricción, alterando el número o la distribución de los fragmentos de restricción creando variaciones en el patrón de bandas. De esta manera, al llevar a cabo una digestión de endonucleasa de un amplificado por PCR de la zona que rodea a una mutación, se puede evidenciar la presencia de una población de mtDNA mutado. Por ejemplo, la mayor parte de pacientes MELAS presenta un cambio en el nucleótido 3243 del mtDNA de A a G, generando un cambio de la secuencia GAGCCC, la cual no puede ser reconocida por ninguna enzima de restricción conocida a GGGCCC, secuencia que puede ser reconocida por la enzima Apa I o Hae III. Al amplificar una región de 238 pb que rodea al nucleótido 3243 y luego digerir con Hae III y separar los fragmentos en un PAGE al 12%, el mtDNA mutado migraría como cuatro fragmentos (97 pb, 72 pb, 37 pb y 32 pb), mientras que el mtDNA salvaje migraría solo en tres fragmentos (169 pb, 37 pb y 32 pb). Existen otras mutaciones que generan la adición o pérdida de sitios de restricción. Esta técnica es la herramienta de diagnóstico más utilizada para detectar mutaciones puntuales del mtDNA, sin embargo, los datos derivados de este método deben interpretarse con precaución ya que pueden existir problemas asociados con la amplificación por PCR de una población heteroplasmática de mtDNA (*Rudin et al., 2001; Jarcho, 2001; Batt, 2014; Moraes et al., 2003; McFarland & Turnbull, 2009*).

Capítulo 6.2 Tratamiento

Durante los últimos 10 años, se han logrado avances importantes en la comprensión de la patogenia de los trastornos mitocondriales, sin embargo, aún no existe un tratamiento eficaz. De esta manera el manejo óptimo de las enfermedades mitocondriales se puede dividir en tres grandes grupos: asesoramiento, terapia de apoyo y terapia farmacológica.

En el síndrome de MELAS aún no existe una terapia de consenso, su tratamiento es en gran medida sintomático. Inicialmente, se necesita una evaluación completa para determinar el daño en múltiples órganos, incluida la evaluación neurológica y cognitiva, neuroimagen, exámenes audiológicos y oftalmológicos, evaluación del crecimiento, ecocardiograma y electrocardiograma y detección de diabetes. Las complicaciones pueden tratarse mediante tratamientos médicos o quirúrgicos estándar, por ejemplo, implantes cocleares para la pérdida auditiva y medicamentos anticonvulsivos para la epilepsia. Se necesita apoyo nutricional para los niños que no logran prosperar y se necesita rehabilitación con fisioterapia y terapia ocupacional después de episodios similares a un accidente cerebrovascular (*El-Hattab et al., 2017*).

La progresión significativa de la miocardiopatía puede tardar muchos años, pero en algunos genotipos, p. Ej., A3243AG, puede progresar más rápidamente a un fallo en la etapa terminal a pesar del tratamiento con bloqueadores beta y / o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. La enfermedad mitocondrial ciertamente debe considerarse en el diagnóstico diferencial de los pacientes que presentan hipertrofia biventricular y se deben realizar las investigaciones apropiadas para excluir este diagnóstico (*McFarland & Turnbull, 2009*).

- Terapia de apoyo

Diversos estudios han demostrado que abandonar un estilo de vida sedentario a partir de la terapia con ejercicio provee beneficios ante la enfermedad mitocondrial, ya que al aumentar la actividad física, cambia la calidad de vida de los pacientes al mejorar la función mitocondrial (mejorando la actividad de OXPHOS) y disminuir la carga de mitocondrias afectadas. Por otro lado, se ha demostrado que al mejorar la cantidad y la calidad de calorías consumidas en la dieta se mejora la salud mitocondrial. La dieta cetogénica (KD) es una dieta alta en grasas y baja en glucosa, que estimula la utilización de lípidos mediante la beta oxidación mitocondrial y la producción de cuerpos cetónicos en el hígado, por este motivo, se ha utilizado durante mucho tiempo en niños que sufren convulsiones, que en su mayoría son resistentes a los fármacos antiepilépticos convencionales (FAE). Los estudios han mostrado una disminución de las convulsiones epilépticas en niños con epilepsia y deficiencia del complejo RC; sin embargo, la dieta no pudo controlar la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que el uso de KD mejora el metabolismo energético del cerebro regulando al alza la biogénesis mitocondrial, inhibiendo la producción de ROS, aumentando la interacción neurona-glía y la concentración de ATP, así mismo, cambia el nivel de heteroplasmia en las células que albergan una delección en el mtDNA . Estos estudios sugieren la posible utilidad de la KD en el tratamiento de enfermedades mitocondriales. Sin embargo, aún se requieren más ensayos controlados en pacientes y una mejor comprensión de su mecanismo (*Khan et al., 2015*).

- Tratamiento farmacológico

Se están utilizando varios suplementos en el síndrome de MELAS, sin embargo, aún no hay evidencia clara que respalde su uso en los trastornos mitocondriales. La creatina, que se metaboliza a fosfocreatina, es un donante de fosfato esencial para la regeneración de trifosfato de adenosina (ATP) en el músculo y el cerebro, mejora la fuerza muscular y las actividades de ejercicio. Por otro lado la Coenzima Q 10 (CoQ 10), facilita la transferencia de electrones y estabiliza los complejos ETC al proporcionar efectos antioxidantes protectores, puede tener efectos benéficos sobre la debilidad muscular, la fatigabilidad y los niveles de lactato. CoQ 10 no atraviesa la barrera hematoencefálica; por lo tanto, puede tener un efecto limitado sobre el sistema nervioso central. La idebenona es un análogo de CoQ 10 que puede cruzar la barrera hematoencefálica y se ha demostrado que mejora las complicaciones neurológicas en algunos informes de casos. La L-carnitina es necesaria para la entrada de ácidos grasos de cadena larga a la matriz mitocondrial donde se someten a la β -oxidación. Por lo tanto, la suplementación con esta puede mejorar la β -oxidación y reponer las reservas intracelulares de coenzima A (*El-Hattab et al., 2017*).

En MELAS, también se puede recurrir al uso de L-arginina, un sustrato para la óxido nítrico sintetasa, que da lugar a una mayor disponibilidad de NO, lo que mejora la vasodilatación cerebral y el flujo sanguíneo, disminuyendo la frecuencia y la gravedad de los episodios similares a un accidente cerebrovascular. Además, puede reducir la hiperexcitabilidad neuronal observada en MELAS, ya que es un precursor de la agmatina (*Lekoubou et al., 2011; El-Hattab et al., 2017*) por otro lado, algunos estudios han demostrado que la suplementación con citrulina tiene un efecto similar al de la L-arginina, sin embargo, la citrulina tiene una mejor absorción y biodisponibilidad sistémica, ya que sufre de una mayor absorción intestinal y presenta capacidad para eludir el hígado, mientras que la arginina se convierte en ornitina en el hígado a través de la acción de arginasa I (*El-Hattab et al., 2017*).

Capítulo 6.3 Otras enfermedades relacionadas a la mutación A3243G

La mutación mitocondrial en *MT-TL1* (*tRNA^{Leu(UUR)}*) A3243G es la causa más común de diabetes y sordera de herencia materna (MIDD), una forma rara de diabetes que se presenta con pérdida de audición neurosensorial y distrofia del patrón macular (*Zhu et al., 2017*). Los pacientes con esta mutación demuestran una fosforilación oxidativa alterada y generalmente se caracterizan por un diagnóstico en una edad temprana, una función baja de las células beta, falta de obesidad, resistencia a la insulina y autoanticuerpos asociados con la diabetes mellitus tipo 1, sin embargo, no todos los pacientes presentan el fenotipo típico (especialmente en una etapa temprana), por este motivo a veces se diagnostican erróneamente como DMT1 o DMT2 y reciben un tratamiento incorrecto ya que generalmente necesitan terapia con insulina, pero no metformina debido a una mala respuesta a los agentes hipoglucemiantes orales y al incremento en los niveles de lactato. Actualmente, el diagnóstico correcto exige la secuenciación del DNA, sin embargo, debido a su baja prevalencia (representa del 0,5% al 3% de todos los casos de diabetes en algunas poblaciones) y la complejidad de las pruebas genéticas, no es práctico secuenciar a todos los pacientes con diabetes (*Tian et al., 2018; Zhu et al., 2017*).

Por otro lado, se ha reportado que del 30 al 75% de los pacientes con la mutación A3243G presenta hipoacusias neurosensoriales bilaterales y simétricas, estas involucran en mayor medida daño en la estructura coclear en lugar de estructuras retrococleares y dado que existe una estrecha relación entre la cóclea y los órganos terminales vestibulares periféricos, estos también pueden verse afectados (*Inoue, 2019*).

La Oftalmoplejía Externa Progresiva Crónica (CPEO) es una subclase de enfermedad mitocondrial caracterizada por ptosis y debilidad progresiva del movimiento del músculo extraocular. Puede ser causada por múltiples defectos tanto en el mtDNA como en el nDNA, sin embargo, los pacientes con deleciones tienden a tener retinopatía pigmentaria, mientras que aquellos con mutaciones puntuales en el gen de tRNA además de CPEO presentan diabetes mellitus y pérdida de audición (*Hansrote et al., 2002; Narumi et al., 2018*).

En general la mutación puntual del mtDNA A3243G en *MT-TL1* (*tRNA^{Leu}^(UR)*) se manifiesta como una enfermedad multiorgánica grave que puede incluir cataratas, miopatía, convulsiones, endocrinopatía múltiple, CPEO, anomalías cardíacas e hipoacusia. En los análisis histológicos y bioquímicos de biopsia muscular pueden observarse fibras rojas rasgadas y pérdida de la capacidad oxidativa (*Hansrote et al., 2002*).

Objetivos

2.1 Objetivo general

Llevar a cabo el análisis genético de muestras obtenidas de una familia mexicana con un integrante que padece el síndrome MELAS mediante la amplificación del gen *MT-TL1* (*tRNA^{Leu(UUR)}*) para evidenciar la presencia o ausencia de la mutación A3243G por medio de PCR-RFLP, con el fin de apoyar en el diagnóstico y determinar su relación con la presencia y severidad de los síntomas.

2.1.1 Objetivos particulares

1. Extraer el DNA total de una muestra de sangre de pacientes con probable patología mitocondrial por medio de protocolos establecidos; además de verificar que se encuentren en condiciones óptimas mediante la cuantificación de su concentración y pureza con espectrofotometría para su posterior análisis molecular.
2. Realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador programado previamente a fin de obtener un número adecuado de copias del fragmento de mtDNA a analizar. Verificar la correcta amplificación y concentración del fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa y cuantificación por espectrofotometría.
3. Demostrar la presencia o ausencia de mutaciones específicas en los amplificados mediante la técnica de RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) realizando digestiones de los amplificados con la enzima *ApaI*.
4. Calcular el porcentaje de heteroplasmia de la mutación mediante un programa de análisis en un software especializado, para determinar la relación de ésta con la severidad de los síntomas.

Metodología de investigación

Las muestras de los pacientes estudiados fueron proporcionadas por la unidad médica de alta especialidad del hospital general “Dr. Gaudencio González Garza” Centro Médico Nacional La Raza y por el departamento de neurología del Centro Médico Nacional siglo XXI, con la previa autorización de los pacientes estipulada en el consentimiento informado.

3.1 Sujetos de estudio

En la siguiente tabla (tabla 2) se muestra la situación clínica de los pacientes, motivo por el cual fueron elegidos para el presente estudio.

Tabla 2. Situación clínica de los pacientes con probable enfermedad mitocondrial.

MUESTRA	SITUACIÓN CLÍNICA
Paciente 1 (ME16)	Paciente diagnosticado clínicamente con síndrome MELAS. Se busca confirmar si la presencia de la mutación A3243G es la responsable del síndrome.
Las muestras de los siguientes pacientes fueron proporcionadas en el transcurso de la investigación y debido a la escases y urgencia de estos diagnósticos en el país, se decidió incluirlas en el presente trabajo.	
Paciente 2 (BBZ)	Paciente diagnosticado clínicamente con síndrome MELAS. Se busca confirmar si la presencia de la mutación A3243G es la responsable del síndrome.
Paciente 3 (DAN)	Paciente sin diagnóstico clínico pero que de acuerdo al fenotipo presentado se requiere de estudios que permitan descartar o confirmar enfermedad metabólica o mitocondrial. Se busca confirmar si la presencia de la mutación A3243G es la responsable del síndrome.
Paciente 4 (YGM)	Paciente sin diagnóstico clínico pero que de acuerdo al fenotipo presentado se requiere de estudios que permitan descartar o confirmar enfermedad mitocondrial. Se busca confirmar si la presencia de la mutación A3243G es la responsable del síndrome.
Paciente 5 (DEM)	Paciente diagnosticado clínicamente con síndrome MELAS. Se busca confirmar si la presencia de la mutación A3243G es la responsable del síndrome.
Consultar “Resumen de la historia clínica de los pacientes” en el apartado de anexos (tabla 6).	

3.2 Métodos

Para llevar a cabo el análisis del mtDNA del paciente, en primer lugar se requiere obtener una muestra que puede proceder de distintos tejidos, en este caso se utilizó sangre para llevar a cabo la extracción del DNA total con un equipo y protocolos comerciales, posteriormente este DNA se amplifica mediante PCR y los fragmentos obtenidos se digieren (RFLP) con la enzima de restricción *Apal* con el fin de identificar si existe la mutación A3243G.

3.2.1 Extracción del DNA de sangre periférica

En un tubo eppendorf colocar 200 µl de la muestra de sangre y 20 µl de QIAGEN proteasa (o proteína K), agitar con vortex y adicionar 200 µl del buffer AL, mezclar perfectamente en vortex por 15'' e incubar a 56°C por 10'. Colocar en microcentrífuga para retirar las gotas que hayan quedado en la tapa y adicionar 200 µl de etanol absoluto y mezclar en vortex por 15'' y centrifugar nuevamente (un pulso). Retirar la muestra del tubo y transferir a una columna QIAamp Spin en un tubo de 2 ml (sin mojar el borde) y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm. Extraer la columna del tubo y colocarla en un tubo colector de 2 ml nuevo. Desechar el tubo que contiene el filtrado. Posteriormente abrir cuidadosamente la columna y adicionar 500 µl de buffer AW1 sin mojar el borde y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y desechar el tubo con el filtrado. Abrir con cuidado la columna y agregar 500 µl del buffer AW2, centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos. Colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado. Finalmente abrir la columna y adicionar 200 µl de buffer AE o agua libre de nucleasas, incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto

3.2.3 Cuantificación y pureza del DNA

Conectar el espectrofotómetro (Nanodrop) e iniciar el programa en la computadora (Nanodrop2000) para cuantificación de ácidos nucleicos, posteriormente levantar el brazo del espectrofotómetro y colocar 2µl de H₂O libre de nucleasas y RNAsas, bajar el brazo y presionar "enter" para iniciar el equipo. Levantar el brazo nuevamente, limpiar con papel absorbente la gota de agua y colocar 2 µl de la solución blanco (H₂O nuevamente), bajar el brazo y presionar "leer blanco". Por último levantar el brazo y limpiar con papel absorbente la gota del blanco y colocar 2 µl de la muestra problema y presionar "F1" o "read" (leer).

Nota: En cada lectura se debe observar que se forma una burbuja debido a la tensión superficial entre el espectro y la base donde se coloca la solución a leer.

3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Preparar tubos conforme a la tabla número 3.

Tabla 3. Preparación de una PCR para un volumen de 12.5 µl

REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN
PCR Master mix (kit)	6.25 µl
Primer Hmt2797L: 5'- GTCCTAAACTACCAAACCTGC-3'	0.5 µl
Primer LeuH: 5'- AAGGGTTGTAGTAGCCCGTAG-3'	0.5 µl
DNA	5 µl
Agua libre de nucleasas	0-25 µl

También se prepara un tubo blanco con agua en lugar de DNA, un tubo control (+) que en este caso contiene muestra de DNA positivo para síndrome MELAS y dos tubos control (-) que contiene muestras de DNA positivo para el síndrome Leigh. Los tubos preparados se agitan perfectamente para homogeneizar la solución y se colocan dentro del termociclador previamente programado a: 95°C (precalentamiento); 95°C 30'' (desnaturalización); 60°C 45'' (alineamiento); 72°C 1' (elongación) [35 ciclos]; 72°C 5' ∞ (incubación). Los primers utilizados generan un amplificado de 676 pb que comprende del nucleótido 2777 hasta el 3452 del mtDNA, fragmento entre el cual se ubica el gen MT-TL1 que comprende entre los nucleótidos 3230 y 3304 y que puede poseer la mutación A3243G, estos primers fueron sintetizados por la marca Sigma.

3.2.5 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

a) Preparación del gel de agarosa al 3% y 2.5%

Pesar 0.60 y 0.5 g de agarosa respectivamente en un matraz Erlenmeyer, adicionar 20 ml de TAE 1X y calentar en horno de microondas, hasta que se disuelva. Posteriormente, agregar una gota de bromuro de etidio (BrEt 0.5 µg/µl) y mezclar bien, cerrar los extremos del soporte del gel, colocar peines adecuados y posicionar en una superficie nivelada y libre de corrientes de aire. Después verter la mezcla en el soporte evitando que se formen burbujas (si se forman es preciso removerlas), cuando haya solidificado, se retira el peine y se coloca el gel en la dirección correcta en la cámara de electroforesis (los pocillos quedan cercanos al cátodo de la cámara). Por último, se adiciona TAE 1X a la cámara hasta el nivel indicado, se debe verificar que el gel se encuentra totalmente sumergido.

b) Carga y corrida del gel

Colocar 8 gotas de 2 µl de colorante (buffer de carga azul/naranja 6X) en un trozo de papel parafilm correspondiente al número de muestras, blanco, control positivo (C+), control negativo (C-) y marcador de peso molecular. Posteriormente se colocan gotas de 2 µl de cada muestra, blanco y controles y se mezclan con el otro elemento, se toma la mezcla utilizando la micropipeta y se deposita cuidadosamente en el pocillo correspondiente. En el último carril de colocan 3µl del marcador de peso molecular (este no

requiere buffer de carga), enseguida se cierra la cámara y se conecta a la fuente de poder (≈ 90 V). El cátodo se conecta en el extremo cercano a los pocillos, de modo que la molécula de DNA migre hacia el ánodo, se deja migrar las muestras, hasta que el frente de la corrida (colorante amarillo) se visualice cerca del extremo contrario del gel o hasta que se requiera. Finalmente, se emplea el sistema de fotodocumentación SmartView Pro 100 Imager System para fotografiar y visualizar el gel.

3.2.6 RFLP

La digestión con las enzimas *ApaI* se realiza de la siguiente manera:

Adicionar 5 μ l del amplificado, 2 μ l de la enzima *ApaI*, 1 μ l de buffer y 2 μ l de H₂O a 30°C a un tubo de 200 μ l, posteriormente colocar el tubo el termomixer a 30°C y dejar incubar durante 4 hrs. Al término de este tiempo de digestión se prepara un gel de agarosa al 2.5% para correr las muestras de la misma manera que en los procedimientos anteriores. Finalmente se recurre al sistema de fotodocumentación SmartView Pro 100 Imager System para fotografiar el gel y visualizar si existe el corte por parte de la enzima y por consiguiente la mutación A3243G.

	2761	cctaaca	aac	ccacag	gtcc	taaact	acca	aacctgc	att	aaaaatt	tcg	g	gttgggg	cg
	2821	cctcgg	gagca	gaaccca	aacc	tccgag	cag	acatg	ctaag	acttcacc	ag	tcaa	agcg	aa
ApaI	2881	ctactata	ct	caattg	atcc	aataact	tga	ccaacg	gaac	aagttacc	ct	agg	gata	aaca
	2941	gcgcaat	cct	attctag	agt	ccatat	caac	aatagg	g	tt	acgac	ctcga	tgtt	gatca
5'...GGGCC*C... 3'	3001	ggacat	ccccg	atgg	tcagc	cgctatt	aaa	ggttc	g	ttc	aacg	att	aaag	tcctac
	3061	gtgat	ctgag	ttcag	accg	agtaat	ccag	gtcgg	tttct	atcta	cnttc	aaatt	cctcc	
3'...C*CCGGG... 5'	3121	ctgtac	gaaa	ggaca	agaga	aataagg	cct	acttc	acaaa	g	gcctt	ccc	ccg	taaatga
	3181	tatcat	ctca	acttag	tatt	atacc	cacac	ccacca	aaga	acagg	g	ttg	taa	gatggc
	3241	aggcc	*c	gg	aatcgc	ataa	aactt	aaaac	tttac	ag	tca	gag	gtt	caat
	3301	aaca	acatac	ccatg	gcaa	cctc	ctactc	ctcatt	gtac	ccatt	t	caat	cg	caatggca
	3361	ttccta	aatgc	ttacc	gaacg	aaaa	attcta	ggct	atatac	aactac	g	caa	agg	ccccaac
	3421	gttg	taggcc	ctac	gggct	actaca	a	cccc	tt	cgct	gacg	ccata	aaa	aact

Figura 11. Detalles sobre la PCR-RFLP. Se muestra la secuencia que es reconocida por los primers de 21 pb que comprende de los nucleótidos 2777 a 2797 para el primer reward y de 3432 a 3452 para el primer reverse (amarillo) y que en conjunto amplifican un fragmento de 676 pb, el gen *MT-TL1* (*tRNA^{Leu(URR)}*) que comprende del nucleótido 3230 al 3304 (gris), la secuencia reconocida por la enzima *ApaI* (azul), el nucleótido 3243 que sufre el cambio de A por G (en negrita) y el sitio de corte de la enzima (asterisco) que genera dos fragmentos (486 pb y 234 pb).

3.2.7 DENSITOMETRIA

Cuantificar el porcentaje de heteroplasmia por densitometría usando el fotodocumentador SmartView Pro 100 Imager System y el analizador GeneTools (Syngene, Beacon House, Nuffield Road, Cambridge Inglaterra). Importar las imágenes que se desean analizar y detectar de manera automática o manual los carriles y las bandas en el gel de electroforesis, posteriormente calcular los valores de peso molecular y de par de bases utilizando estándares de una o más bandas.

Resultados

Además del paciente ME16, se estudiaron muestras de sangre pertenecientes a dos miembros de su familia (madre y hermano). En la figura 12 se muestra el árbol genealógico del paciente en estudio.

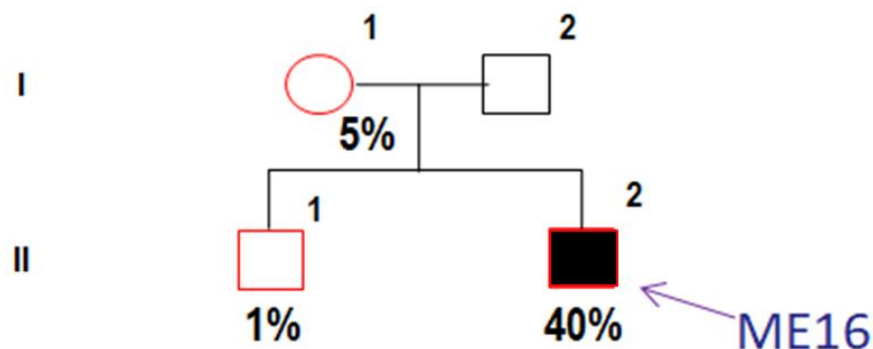


Figura 12. Árbol genealógico del paciente ME16 señalado con una flecha. Los miembros de la familia que proporcionaron muestras se representan de color rojo I-1 madre; II-1 hermano; II-2 probando.

Tabla 4. Concentración de DNA obtenida a partir de la cuantificación por espectrofotometría de la muestra control (C+) y los pacientes.

Muestras	Concentración de DNA en ng/μl	Pureza de DNA (Relación 260nm/280nm)
C+	38	1.99
DEM	53	1.77
BBZ	37	1.79
DAN	22	1.98
YGM	24.8	1.77
ME16	16.17	1.77

Tabla 5. Porcentajes de heteroplasma de las muestras positivas para la mutación A3243G obtenidos por densitometría.

Muestras		% de heteroplasma
Paciente	ME16	40%
Familiares	MA16	5%
	HE16	1%
Paciente	BBZ	65%

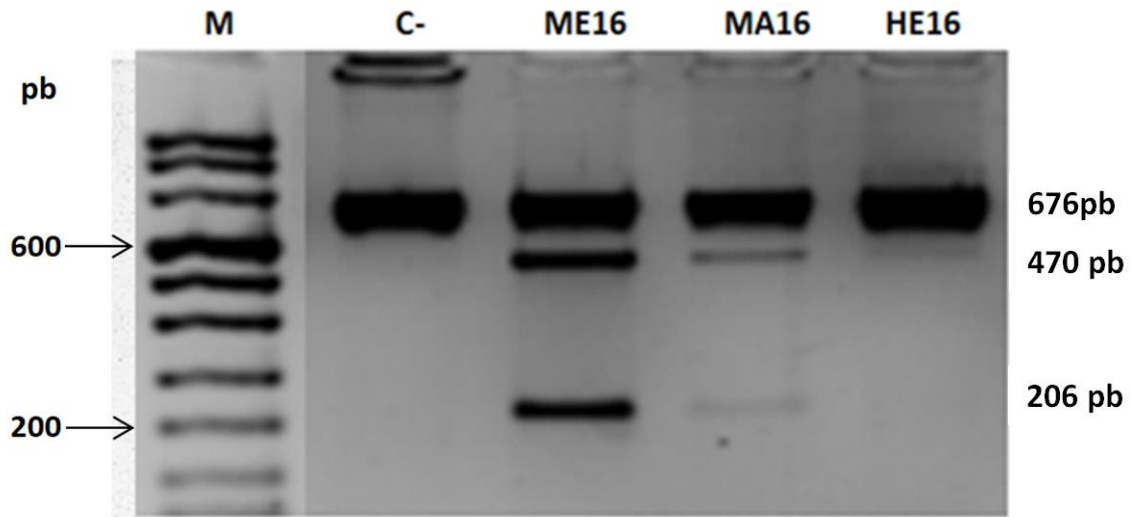


Figura 13. RFLP's realizados con la enzima *Apal* en los amplificados de 676 pb del paciente ME16 y sus familiares. Gel de agarosa al 3%; M: marcador; C-: control negativo; ME16: probando; MA16: madre; HE16: hermano.

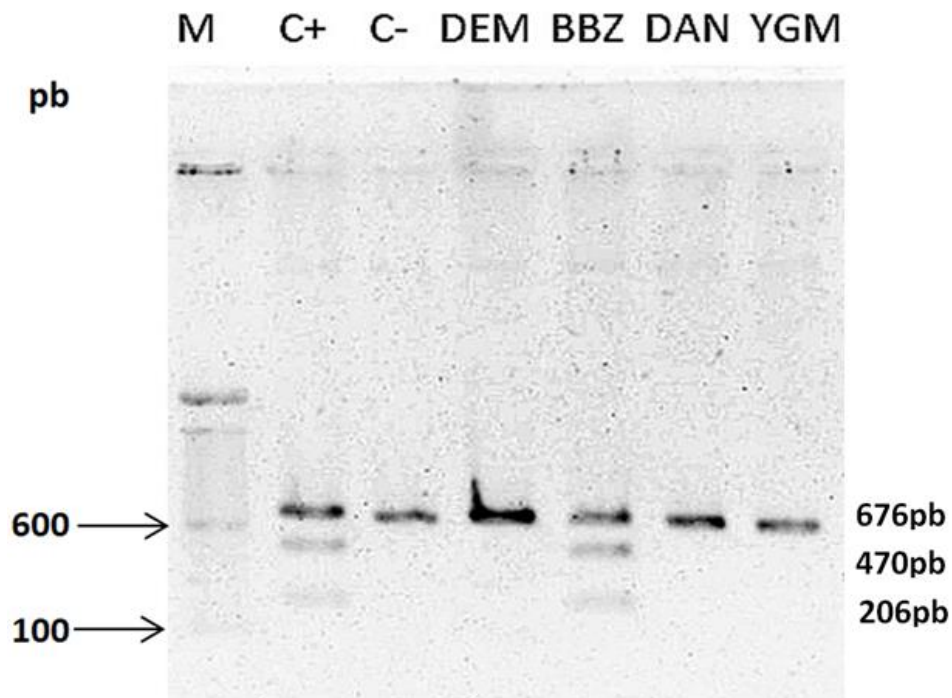


Figura 14. RFLP's realizados con la enzima *Apal* en los amplificados de 676 pb de los pacientes aislados. Gel de agarosa al 2.5%; M: marcador; C+: control positivo; C-: control negativo; DEM, DAN, YGM, F: pacientes en los que no se encontró la mutación; BBZ: paciente positivo para la mutación A3243G.

Discusión

Las disfunciones mitocondriales se asocian con una gran proporción de enfermedades humanas debido a que la falta de producción de una cantidad adecuada de ATP o energía resulta en un grupo clínicamente heterogéneo de trastornos cuyas presentaciones clínicas son extremadamente graves en tejidos que demandan mucha energía, como el músculo esquelético, el sistema nervioso central y los músculos del corazón; sin embargo, la disfunción mitocondrial puede afectar a cualquier órgano del cuerpo (*Alston et al., 2017; Khan et al., 2015*), estas características hacen que su diagnóstico sea un desafío (*Steton & Prokisch, 2020*) por este motivo a pesar de que la variante patógena A3243G en el gen *MT - TLI* (que codifica el *tRNA^{Leu} (UUR)*) es el genotipo de enfermedad heteroplasmática del mtDNA asociada al síndrome MELAS más común (*Grady et al., 2018*) en México no se cuenta con información suficiente para generar un dato epidemiológico a diferencia de Inglaterra y Finlandia cuyos estudios poblacionales han demostrado que las frecuencias de portadores de la mutación A3243G se estiman en 1.4 y 16.3 por 100,000 personas, respectivamente (*Vivero et al., 2013*), esto se debe principalmente a que la información sobre enfermedades mitocondriales en nuestro país proviene de proyectos de tesis en donde se efectúan pruebas moleculares que permiten llevar a cabo la identificación precisa de las mutaciones patógenas, permitiendo confirmar el diagnóstico que previamente es establecido por un médico a partir de las características clínicas que presenta el paciente, entre las que se pueden mencionar las miopatías mitocondriales, la encefalopatía con episodios similares a los de un accidente cerebrovascular, convulsiones y acidosis láctica (*Abdullah et al., 2020*). Como se puede observar en las figuras 13 y 14, en este trabajo se consiguió demostrar la presencia de la mutación A3243G a partir de un estudio genético molecular en dos pacientes mexicanos, BBZ (con un 65% de heteroplasmia) y ME16 (con un 40% de heteroplasmia), ambos con fenotipo asociado a MELAS, descrito en su historia clínica en el cuadro presente en el apartado de materiales y equipos.

De igual forma se llevó a cabo el análisis de muestras de sangre de dos familiares (madre y hermano) del paciente ME16, en los que también se encontró la mutación. Esto se debe a que en el caso de los mamíferos, las enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en este tipo de material genético se transmiten a la descendencia exclusivamente a través del linaje materno, lo cual se ve facilitado por el gran tamaño del óvulo en comparación con el esperma (*Carelli & Chan, 2014*) y por la posible degradación de las mitocondrias del espermatozoide por parte del ovocito (*Wallace, 2007*).

Como se observa en la tabla 5, se encontró una variación en los niveles de heteroplasmia de la mutación entre los 3 integrantes de la familia, el paciente ME16 presenta la mutación en un 40% de heteroplasmia, mientras que su madre y hermano la presentan en un 5% y 1% respectivamente, esto agrega un grado de complejidad a nuestra comprensión de la enfermedad relacionada con la mutación A3243AG debido a la existencia en diferentes proporciones de moléculas mutantes y de tipo salvaje dentro de la misma célula (*Boggan et al., 2018*). Esta transmisión de la mutación del mtDNA de la madre heteroplasmática a la descendencia muestra una elevada variabilidad genética entre los hermanos, ya que a diferencia del paciente, el hermano presenta un porcentaje mínimo de heteroplasmia (1%), esto puede estar determinado por dos procesos principales, en primer lugar se debe a que posterior a la fertilización, la mutación heteroplasmática del mtDNA presente en el ovocito se segrega a cualquiera de las dos células hijas de forma aleatoria, dando lugar a una variabilidad en la carga de mutación transmitida a la descendencia y en segundo lugar, existe un proceso conocido como “cuello de botella genético mitocondrial” que ocurre en las primeras etapas de la ovogénesis (*Khan et al., 2015*) y el cual funciona como un filtro ya que permite que sólo una pequeña proporción de genomas mitocondriales disponibles repoblen la descendencia de la próxima generación dando como resultado la pérdida directa de la

mutación por deriva genética. Sin embargo, a corto plazo, el cuello de botella también puede generar problemas importantes al individuo, ya que existen algunas mutaciones que "escapan" de este filtro y tienden a volverse homoplásmicas mucho más rápido (*Chinnery et al., 2000*).

La mayoría de las mutaciones patogénicas que generan la expresión del fenotipo de la enfermedad están presentes en la condición heteroplasmática, sin embargo, existen algunas excepciones como la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), donde las mutaciones se presentan principalmente en condiciones homoplásmicas tanto en individuos sintomáticos como asintomáticos (*Khan et al., 2015*), sin embargo, en las condiciones de heteroplasma existe una hipótesis clásica que establece que la deficiencia bioquímica sólo se manifiesta si se supera un umbral de heteroplasma específico de tejido y mutación. La razón es que existe una variación considerable en la cantidad de mtDNA de tipo salvaje que se requiere para la síntesis de componentes mitocondriales necesarios para OXPHOS. Si se considera la hipótesis del umbral, parece probable que el nivel de heteroplasma que posee un individuo se correlacione con la carga de enfermedad (*Boggan et al., 2019*) esta hipótesis permite explicar porque la paciente BBZ con un 65% de heteroplasma y el paciente ME16 con un 40% de heteroplasma presentan el fenotipo asociado a MELAS y su hermano con un 1% de heteroplasma no presenta ningún síntoma y signo clínico relacionado con la mutación, mientras que la madre con un 5% de heteroplasma presenta hipoacusia crónica progresiva, la cual podría estar relacionada a la mutación ya que esta provoca una disfunción en la fosforilación oxidativa de la célula por lo que los tejidos metabólicamente activos, son especialmente sensibles a la mutación y disfunción mitocondrial, en este caso, la estría vascular (fundamental para el mantenimiento del potencial iónico) presente en el oído, es muy activa metabólicamente. En consecuencia, se cree que la fosforilación oxidativa alterada da como resultado la producción de oxígeno libre con la consiguiente pérdida de función y pérdida de audición (*Vivero et al., 2013*), sin embargo, a pesar de que los pacientes con enfermedad muy grave tienden a tener una elevada proporción de mtDNA mutante, la relación entre el nivel de heteroplasma y el fenotipo clínico no es sencilla y dicha variación intraindividual entre los tejidos aumenta la incertidumbre (*Grady et al., 2018*). De esta manera el uso de la heteroplasma para determinar la gravedad de la enfermedad no se ha aclarado por completo y la gravedad de los síntomas no siempre demuestra una correlación lineal. Es importante considerar que en estudios previos se ha demostrado que el uso de sangre periférica tiene una relación inversa con la aparición de hipoacusia y diabetes; por ejemplo, el aumento de la heteroplasma da como resultado una edad más temprana de inicio de los síntomas. Por el contrario, en algunos estudios no se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre el grado de heteroplasma y la gravedad de la pérdida auditiva (*Vivero et al., 2013*).

En cuanto a las muestras en las que no se encontró la mutación A3243G se recomienda continuar con pruebas moleculares para conseguir el diagnóstico del paciente ya que como se muestra en la tabla 1 y en la figura 9, existen otras mutaciones asociadas al síndrome MELAS. También es muy importante considerar la posibilidad de buscar la mutación en otros tejidos ya que el nivel de la mutación patógena A3243G en sangre disminuye con el tiempo (selección negativa). Debido a que para algunas mutaciones del mtDNA, en especial aquellas con efectos fenotípicos severos, la selección puede operar durante toda la vida del individuo. En algunos tejidos y órganos, esta puede conducir a una disminución en la cantidad de mtDNA mutado, mientras que en otros puede aumentar. En poblaciones de células madre que se dividen rápidamente, el mtDNA mutado puede eliminarse por medio de la selección que opera a nivel de la célula, sin embargo, la segregación mitótica podría conducir a niveles altos de mtDNA mutante en algunas células madre y niveles bajos en otras. Así mismo, las células que contienen una carga elevada de mutaciones pueden no dividirse, pero aquellas con un nivel bajo se dividirán normalmente (*Chinnery et al., 2000*).

Conclusiones

- ❑ Se comprobó la presencia de la mutación A3243G en los amplificadores de 676 pb mediante la técnica de RFLP con la enzima de restricción *ApaI* en dos de los 5 pacientes que presentan el fenotipo asociado a MELAS (BBZ y ME16) y en dos familiares del paciente ME16, lo que confirmó molecularmente el diagnóstico previo del médico, hecho que permitirá brindar mejor terapia a los pacientes y un mejor asesoramiento genético a los familiares.
- ❑ Se consiguió la extracción del DNA total y la verificación de sus condiciones óptimas por espectrofotometría obteniendo una concentración que va desde 22 hasta 53 ng/ul y una relación 260nm/280nm de 1.77 hasta 1.98.
- ❑ Se realizó exitosamente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniendo un fragmento de 676 pb del mtDNA en un paciente que padece el síndrome MELAS y dos de sus familiares (madre y hermano), así como en 4 pacientes aislados.
- ❑ Finalmente se calculó el porcentaje de heteroplasmia por densitometría, lo que posibilitó el análisis de su relación con la presentación de la enfermedad.

Perspectivas

Con este trabajo se espera motivar a la comunidad científica y médica a llevar a cabo diagnósticos definitivos en enfermedades causadas por mutaciones genéticas. Por este motivo, se dio a conocer un síndrome poco diagnosticado molecularmente en nuestro país, destacando la importancia de llevar a cabo la identificación de mutaciones presentes en el mtDNA, lo que permitirá brindar un tratamiento adecuado a los pacientes y un asesoramiento genético a los familiares, así como (a largo plazo) obtener datos epidemiológicos sobre la incidencia de la mutación en la población.

Igualmente, se resalta la necesidad de continuar realizando este tipo de investigaciones en más pacientes que presenten el fenotipo asociado a alguna enfermedad mitocondrial, así como en diferentes tejidos y en un mayor número de familiares para poder contribuir al mejor entendimiento de los fenómenos genéticos presentes en las enfermedades mitocondriales.

Anexos

Tabla 6. Resumen de las historias clínicas de los pacientes con probable enfermedad mitocondrial.

MUESTRA	HISTORIA CLÍNICA
Paciente 1 (ME16)	Paciente masculino de 18 años de edad de estatura corta con padecimiento subagudo progresivo recurrente, sin embargo, reversible en gran parte de los síntomas, con episodios similares a accidentes cerebrovasculares acompañados en su debut de un evento aparente de crisis convulsiva tónica, con semiología del lóbulo temporal, además de episodios de migraña con aura visual, así como tendencia al sueño y con cuadros encefalopáticos durante los episodios similares a accidentes cerebrovasculares. Fue diagnosticado con hipotiroidismo en Noviembre del 2014. Su madre reporta diabetes gestacional a los 36 años de edad, estatura corta e hipoacusia crónica progresiva de aproximadamente 5 años de evolución, Padre con reciente diagnóstico de enfermedad de parkinson, tío materno con crisis convulsivas durante la juventud y tías maternas todas de estatura corta.
Las muestras de los siguientes pacientes fueron proporcionadas en el transcurso de la investigación y debido a la escases y urgencia de estos diagnósticos en el país, se decidió incluirlas en el presente trabajo.	
Paciente 2 (BBZ)	Paciente femenino de 9 años y 8 meses de edad con antecedente de madre con baja talla e hipoacusia bilateral progresiva. Cursa con cuadro de evolución aguda de síndrome convulsivo, piramidal y encefalopático, asociado a alteración metabólica (acidosis metabólica descompensada), con evidencia de lesión cerebral tipo isquémica que abarca más de un territorio vascular, cursando con herniación subfalcial de 5mm secundario a edema y ECV parietotemporoccipital, cumple con 3 criterios clínicos: hemiparesia, evento cerebrovascular tipo apoplejía, encefalopatía, además de lactato elevado en plasma por lo que hay datos fuertemente sugestivos para síndrome de MELAS.
Paciente 3 (DAN)	Paciente masculino de 9 meses de edad. Sus padres niegan antecedentes de epilepsia o enfermedades neurológicas. Presentan carga positiva para cáncer cervicouterino y de testículo, además de carga genética para diabetes e hipertensión. A las 24 horas de nacido presenta crisis epiléptica con cianosis peribucal, fijación de la mirada y empuñamiento de ambas manos con duración de 1 a 2 minutos aproximadamente. Se realiza electroencefalograma en el que se reportan paroxismos multifocales por focos independientes en región temporal bilateral y central derecha y TC de cráneo reportada sin alteraciones estructurales. Con un mes y medio de edad presenta estado epiléptico. Se aborda por crisis convulsivas de difícil control, con tamiz metabólico ampliado sin alteraciones, se realiza resonancia magnética de encéfalo (15.10.18) encontrando pérdida del volumen cerebral por atrofia corticosubcortical del lóbulo temporal medial, signos de atrofia parietal bilateral y lesiones lacunares en tálamo y

	<p>pedúnculo cerebral derecho en el tracto espinotalámico ipsilateral, alteración en la señal con restricción a la difusión en ambos globos pálidos, tálamos, sustancia negra, núcleos rojos y tegmento pontino. Dada la refractariedad de las crisis epilépticas, asociado a regresión en el neurodesarrollo y datos en resonancia magnética se requiere de estudios que permitan descartar o confirmar enfermedad metabólica o mitocondrial.</p>
<p>Paciente 4 (YGM)</p>	<p>Lactante femenino de 9 meses de edad, datos de hipotonía central y retraso psicomotor desde el nacimiento, presenta diagnóstico de epilepsia idiopática parcial focalizada y síndromes epilépticos con principios de ataque localizados y trastornos de desarrollo específicos de funciones motoras. En la exploración neurológica, no logra sostén cefálico, seguimiento visual inconstante y meníngeos ausentes. En la exploración general presenta hemangioma occipital. De acuerdo a los criterios de enfermedades mitocondriales propuestos por Morava, el paciente cuenta con facies miopática, retraso en el desarrollo, mioclonos, signos piramidales y lactato elevado sumando un total de 5 puntos lo que genera un diagnóstico probable de enfermedad mitocondrial, por lo que se requiere la realización de más estudios para su confirmación.</p>
<p>Paciente 5 (DEM)</p>	<p>Preescolar masculino de 2 años y 8 meses de edad, presenta los siguientes diagnósticos: Estado epiléptico focal remitido, evento vascular cerebral isquémico crónico en territorio de arteria cerebral media izquierda asociado a necrosis cortical laminar (en TC de cráneo simple y contrastada se observa hipodensidad en la región frontotemporo occipital izquierdo), hemiplejía corporal derecha, afasia motora y epilepsia focal motora sin pérdida del estado de alerta en hemicuerpo derecho, en estudio de eco doppler carotídeo se reportan datos en relación a insuficiencia de circulación vertebro basilar. Debido a todo lo anterior se solicitan estudios para descartar síndrome de MELAS.</p>

Referencias

- [1] Abdullah, H., Shah, S., Husain, H., Hassan, F., & Maqsood, H. (2020). Late-onset Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes (MELAS) Syndrome in a 63-year-old Patient. *Cureus*, 12(4), e7862. <https://doi.org/10.7759/cureus.7862>
- [2] Alston, C., Rocha, M., Lax, N., Turnbull, D., & Taylor, R. (2017). The genetics and pathology of mitochondrial disease. *The Journal of pathology*, 241(2), 236–250. <https://doi.org/10.1002/path.4809>
- [3] Batt, C. (2014) Encyclopedia of Food Microbiology.1(2). AP, ELSEVIER. p. 274. <https://books.google.com.mx/books?id=1b1CAGAAQBAJ&pg=RA1-PA274&dq=RFLP&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiSu6DQsabsAhUHSa0KHdN1CPEQ6AEwCHoECAkQAg#v=onepage&q=RFLP&f=false>
- [4] Boggan, R., Lim, A., Taylor, R., McFarland, R. & Pickett, S. (2019) Resolving complexity in mitochondrial disease: Towards precision medicine. *Molecular Genetics and Metabolism*, 28(1-2), 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.09.003>
- [5] Carelli, V., & Chan, D. (2014). Mitochondrial DNA: impacting central and peripheral nervous systems. *Neuron*, 84(6), 1126–1142. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.022>
- [6] Carling, P., Cree, L., & Chinnery, P. (2011). The implications of mitochondrial DNA copy number regulation during embryogenesis. *Mitochondrion*, 11(5), 686–692. [doi:10.1016/j.mito.2011.05.004](https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.05.004)
- [7] Castellanos, E. & Lanning, NJ (2019). Phosphorylation of OXPHOS Machinery Subunits: Functional Implications in Cell Biology and Disease. *The Yale journal of biology and medicine*, 92 (3), 523–531. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6747953/>
- [8] Chinnery, P., Thorburn, D., Samuels, D., White, S., Dahl, H., Turnbull, D. & Howell, N (2000). The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?. *Trends in Genetics*, 16(11), 500–505. [10.1097/00125817-200203000-00005](https://doi.org/10.1097/00125817-200203000-00005)
- [9] Delgado, R., Zárate, A., Monsalvo, A., Herrero, M., Ruiz, E., López, M., Montoya, J., & Montiel, J. (2007). Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS) con la mutación A3243G en el gen ARN^tLeu(UUR) del ADN^{mt} en el haplogrupo B2 nativo americano [Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) with the A3243G mutation of the tRNA^{Leu}(UUR) gene of mtDNA in native American haplogroup B2]. *Revista de neurología*, 44(1), 18–22.
- [10] Dimmock, D. y Lawlor, M. (2017). Presentation and Diagnostic Evaluation of Mitochondrial Disease. *Pediatric Clinics of North America*, 64 (1), 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.08.011>
- [11] El-Hattab, A., Almannai, M. & Scaglia, F. (2017). Arginine and citrulline for the treatment of MELAS syndrome. *Journal of inborn errors of metabolism and screening*, 5. <https://doi.org/10.1177/2326409817697399>
- [12] Falkenberg, M., Larsson, N., & Gustafsson, C. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 76, 679–699. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028>

- [13] Fernández, E., Tiranti, V. & Zeviani, M. (2009) Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, 1793 (1), 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.028>
- [14] Gorman, G., Schaefer, A., Ng, Y., Gómez, N., Blakely, E., Alston, C., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P., Taylor, R., Turnbull, D., & McFarland, R. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of neurology*, 77(5), 753–759. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>
- [15] Grady, J., Pickett, S., Ng, Y., Alston, C., Blakely, E., Hardy, S., Feeney, C., Bright, A., Schaefer, A., Gorman, G., McNally, R., Taylor, R., Turnbull, D., & McFarland, R. (2018) mtDNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease. *EMBO molecular medicine*, 10(6), e8262. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708262>
- [16] Gutiérrez A., Saldaña, A., García, R., Rayo, D., Carreras, M., López, M., Ruiz, E., Montoya, J. & Montiel, J. (2009) Síndrome de Leigh causado por la mutación G14459A del ADN mitocondrial en una familia mexicana. *Rev Neurol*; 49 (05):248-250. [10.33588/rn.4905.2009282](https://doi.org/10.33588/rn.4905.2009282)
- [17] Hansrote, S., Croul, S., Selak, M., Kalman, B., & Schwartzman, R. J. (2002). External ophthalmoplegia with severe progressive multiorgan involvement associated with the mtDNA A3243G mutation. *Journal of the neurological sciences*, 197(1-2), 63–67. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(02\)00048-5](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(02)00048-5)
- [18] Harrison (2016) Principios de Medicina Interna, 19e. McGraw-Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1717>
- [19] Holt, I., & Reyes, A. (2012). Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a012971. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012971> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504440/>
- [20] Inoue, A., Iwasaki, S., Fujimoto, C., Kinoshita, M., & Yamasoba, T. (2019). Progression of Peripheral Vestibular Dysfunctions in Patients With a Mitochondrial A3243G Mutation. *American Neurotology Society & European Academy of Otology and Neurotology*, 40(3), 359–364. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002091>
- [21] Jarcho, J. (2001). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Current Protocols in Human Genetics*. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0207s01>
- [22] Khan, N., Govindaraj, P., Meena, A., & Thangaraj, K. (2015). Mitochondrial disorders: challenges in diagnosis & treatment. *The Indian journal of medical research*, 141(1), 13–26. [10.4103/0971-5916.154489](https://doi.org/10.4103/0971-5916.154489)
- [23] Kolman, J & Rohm, K (2004) Bioquímica: Texto y Atlas (3). Madrid: Médica Panamericana. <https://books.google.com.mx/books?id=f61Mvd-vl60C&pg=PA210&dq=mitocondria&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjwkaiizqPpAhWYGs0KHTnqA5kQ6AEIRzAE#v=onepage&q=mitocondria&f=false>

- [24] Kondadi, A., Anand, R. & Reichert, A. (2019). Functional Interplay between Cristae Biogenesis, Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial DNA Integrity. *International journal of molecular sciences*, 20 (17), 4311. <https://doi.org/10.3390/ijms20174311>
- [25] Kuhnel, W. (2003) Atlas color de Citología e Histología (11) Madrid: *Médica Panamericana*. <https://books.google.com.mx/books?id=0VvNlniGA4gC&pg=PA30&Harrisondq=mitocondrias&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjlpOzN16PpAhWaZ80KHWsTDNcQ6AEIXjAG#v=onepage&q=mitocondrias&f=false>
- [26] Lekoubou, A., Kouamé-Assouan, A., Cho, T., Luauté, J., Nighoghossian, N., & Derex, L. (2011) Effect of long-term oral treatment with L-arginine and idebenone on the prevention of stroke-like episodes in an adult MELAS patient. *Revue neurologique*, 167(11), 852–855. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2011.02.038>
- [27] Lorenzoni, P., Werneck, L., Kay, C., Silvado, C., & Scola, R. (2015). When should MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) be the diagnosis?. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20150154>
- [28] Mancuso, M., Filosto, M., Choub, A., Tentorio, M., Broglio, L., Padovani, A., & Siciliano, G. (2007). Mitochondrial DNA-related Disorders. *Bioscience Reports*, 27(1-3), 31–37. [10.1007/s10540-007-9035-2](https://doi.org/10.1007/s10540-007-9035-2)
- [29] McFarland, R. & Turnbull, D. (2009) Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *Journal of Internal Medicine*, 265(2), 210-228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.02066.x>
- [30] Mishra, P. & Chan, D. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15 (10), 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>
- [31] Montiel, J., Herrero, M., Munoz, M., Aguirre, L., Pérez, G., García, R. & Montoya, J. (2013). Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in a patient with Kearns–Sayre syndrome containing a novel 7629-bp deletion. *Mitochondrial DNA*, 24(4), 420–431. [10.3109/19401736.2012.760550](https://doi.org/10.3109/19401736.2012.760550)
- [32] Moraes, C., Atencio, D., Oca-Cossio, J. & Diaz, F. (2003). Techniques and pitfalls in the detection of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 5(4), 197–208. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60474-6](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60474-6)
- [33] Narumi, K., Mishima, E., Akiyama, Y., Matsushashi, T., Nakamichi, T., Kisu, K., Nishiyama, S., Ikenouchi, H., Kikuchi, A., Izumi, R., Miyazaki, M., Abe, T., Sato, H., & Ito, S. (2018). Focal Segmental Glomerulosclerosis Associated with Chronic Progressive External Ophthalmoplegia and Mitochondrial DNA A3243G Mutation. *Nephron*, 138(3), 243–248. <https://doi.org/10.1159/000485109>
- [34] Parikh, S., Goldstein, A., Koenig, M., Scaglia, F., Enns, G., Saneto, R., Anselm, I., Cohen, B., Falk, M., Greene, C., Gropman, A., Haas, R., Hirano, M., Morgan, P., Sims, K., Tarnopolsky, M., Van Hove, J., Wolfe, L. & DiMauro, S. (2015). Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in Medicine*, 17 (9), 689–701. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.177>

- [35] Pearce, S., Nezhich, C. & Spinazzola, A. (2013) Mitochondrial diseases: Translation matters. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 55, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.08.013>
- [36] Pereira, C., & Moraes, C. (2017). Current strategies towards therapeutic manipulation of mtDNA heteroplasmy. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 22(6), 991–1010. <https://doi.org/10.2741/4529>
- [37] Ross, M. & Pawlina, W. (2007) Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular (5) EE.UU: *Médica Panamericana*. https://books.google.com.mx/books?id=NxYmIRZQi2oC&pg=PA58&dq=membranas+mitocondriales&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwin662X6qTpAhVCC6wKHfgqA_kQ6AEINTAC#v=onepage&q=membranas%20mitocondriales&f=false
- [38] Rudin, N. & Inman, K. (2001) An Introduction to Forensic DNA Analysis, Second edition. *CRC PRESS*. p.17. <https://books.google.com.mx/books?id=LnKN73kqZuoC&pg=PA17&dq=RFLP&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjwrrj16HsAhVGeKwKHaL7ClcQ6AEwAXoECAUQAg#v=onepage&q=RFLP&f=false>
- [39] Saldaña, A., de Lourdes, M., Pérez, G., Montiel, J., Montoya, J., Emperador, S. & Ramírez, R. (2018). Whole sequence of the mitochondrial DNA genome of Kearns Sayre Syndrome patients: Identification of deletions and variants. *Gene*, 668, 171-181. [10.1016/j.gene.2018.11.085](https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.085)
- [40] Saldaña, A., Montiel, J. & Ávila, I (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. *FESC*, México. <http://132.248.9.195/ptb2010/mayo/0657496/Index.html>
- [41] Salvatore, D. (2004) Mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergética*, 1658 (1,2), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.03.014>
- [42] Sharma, P., & Sampath, H. (2019). Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells*, 8 (2), 100. <https://doi.org/10.3390/cells8020100>
- [43] Shokolenko, I., & Alexeyev, M. (2017). Mitochondrial transcription in mammalian cells. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 22, 835–853. <https://doi.org/10.2741/4520>
- [44] Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G., & Alexeyev, M. (2009). Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic acids research*, 37(8), 2539–2548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp100>
- [45] Solano, A., Playán, A., López, M., & Montoya, J. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano [Genetic diseases of the mitochondrial DNA in humans]. *Salud pública de México*, 43(2), 151–161. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11381844/>
- [46] Stenton, S. & Prokisch, H. (2020) Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*, 102784(56). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102784>

- [47] Gao D., Zhu B., Sun H. & Wang X. (2017) Mitochondrial DNA Methylation and Related Disease. In: Sun H., Wang X. (eds), *Mitochondrial DNA and Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1038 (117-127). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6674-0_9
- [48] Tian, L., Han, X., Huang, X., Zhang, S., Gong, S., Ma, Y., Cai, X., Zhou, L., Luo, Y., Li, M., Liu, W., Zhang, X., Ren, Q., Zhu, Y., Zhou, X. H., Zhang, R., Chen, L., Gao, X., Liu, Y., Zhang, F. & Ji, L. (2018). A Screening Approach for Mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) A3243G Mutation in a Hospital-Based Population with Diabetes. *Chinese medical journal*, 131(9), 1117–1119. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.230729>
- [49] Villamil, A. (2014). "Diagnóstico molecular de enfermedades mitocondriales en población mexicana". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/347058>
- [50] Vivero, R., Ouyang, X., Kim, Y., Liu, W., Du, L., Yan, D., & Liu, X. (2013). Audiologic and genetic features of the A3243G mtDNA mutation. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 17(5), 383–389. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0403>
- [51] Wai, T., Teoli, D., & Shoubridge, E. A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*, 40(12). [10.1038/ng.258](https://doi.org/10.1038/ng.258)
- [52] Wallace, D. (2007) Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annual Review of Biochemistry*. 76 (1), 781-821. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.76.081205.150955>
- [53] Wallace, D. & Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220>
- [54] Westermann, B. (2010) Fusión mitocondrial y fisión en la vida y muerte celular. *Nat Rev Mol Cell Biol* (11) 872–884 . <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- [55] Yan, C., Duanmu, X., Zeng, L., Liu, B., & Song, Z. (2019). Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*, 8 (4), 379. <https://doi.org/10.3390/cells8040379>
- [56] Yasukawa, T. & Kang, D. (2018). An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms. *The Journal of Biochemistry*, 164 (3), 183-193. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy058>
- [57] Zhu, J., Yang, P., Liu, X., Yan, L., Rampersad, S., Li, F., Li, H., Sheng, C., Cheng, X., Zhang, M., & Qu, S. (2017). The clinical characteristics of patients with mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} m.3243A>G mutation: Compared with type 1 diabetes and early onset type 2 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*, 31(8), 1354–1359. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.04.001>