



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE  
POLIMORFISMOS EN LA REGION  
HIPERVARIABLE 2 DE ADN MITOCONDRIAL  
CON EL FENOTIPO DE RETINOPATÍA  
DIABÉTICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

A N D R E A B A Ñ O S L Ó P E Z

ASESORA:

CAP. 1/o. Q. B. Y DRA. EN C. VIRGINIA  
SÁNCHEZ MONROY

COASESORA:

M. EN C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

Estudio de asociación de polimorfismos en la región hipervariable 2 de ADN mitocondrial con el fenotipo de retinopatía diabética.

Que presenta la pasante: Andrea Baños López

Con número de cuenta: 310114640 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Junio de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Ma. Llasbeth Hernández Calderón	
<b>1er. SUPLENTE</b>	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, bajo la dirección de CAP. 1/o. Q. B. Y Dra. En C. Virginia Sánchez Monroy.

# A G R A D E C I M I E N T O S

*Cada una de las personas mencionas han sido de suma importación para con muy desarrollo personal y profesional; este espacio está destinado a recordarles lo mucho que los aprecio y cuando los admiro.*

*A mi madre, Cristina López Rufino, por ser la persona más honorable y hermosa que he conocido en mi vida. Mamá...mami, todo el amor que me has brindado a ayudado superar cada obstáculo que Dios ha puesto en mi camino. Sé que algunas veces no he logrado llenar tus expectativas pero aun así cada día me esforzaré, nunca te defraudare y lucharé infinitamente para compensar un poco toda la confianza, comprensión y amor que me has brindado. Mil gracias por ser mi mejor amiga pero sobre todo...mi mami, te amo con todo mi corazón.*

*A mi padre, Andrea Baños Millán, por siempre encontrar las palabras adecuadas que llegan a reconfortar mi corazón cuando creo que no lograré mis metas. Te amo mucho, sé que no lo demuestro en algunas ocasiones pero quiero que sepas que siempre te he escuchado y admirado. Gracias por ser mi papi.*

*A mi hermano, Pablo Rodrigo, por llenarme de sonrisas en los momentos más agotadores de mi carrera. Te amo hermano.*

*A toda mi familia, que cada fin de semana se preocupaban por mi desempeño en la escuela, gracias por siempre mostrar interés en lo que hago no pude haber tenido una familia más unida, los amo.*

*A mis compañeras de aventuras Monse, Aline, Andrea y Chio, por ser las personas más extraordinarias de este planeta. Sin ustedes mi vida universitaria no hubiera sido la misma. Hemos pasado por muchas cosas, obtuvimos logros y fracasos, pero sobretodo hemos forjado una amistad invaluable. Monse, eres una loca y la más ñoña de todas pero aún así te amo (es broma). Aline, nunca dejes de ser tan detallista y tampoco dejes de ser tan inocente (sino a quien le jugaremos bromas). Andrea, por favor sigue siendo tan loca como siempre (me estoy riendo mientras lo escribí). Chio, mi Juana Tercera del Carmen Jr te quiero mucho. Mil gracias por estar cuando más las necesito, las quiero.*

*A mis amigos "de la cuarta", Ricardo, Eliseo y Nacho, por adoptarme desde primer semestre y compartir conmigo varias de sus aventuras. Ricardo, aprecio todos los momentos que pasamos juntos y las risas que compartimos, sé que estarás conmigo cuando lo necesite por eso te ofrezco lo mismo. Eliseo, gracias por permitirme conocer el gran ser humano que eres, aprecio muchísimo tu amistad por lo que quiero recordarte que siempre estaré a tu lado. Su amistad es uno de mis tesoros más grande que tengo.*

*A la UNAM, por haber confiado en mí y brindarme la mejor educación que este país puede darle a los jóvenes mexicanos. Estaré en deuda contigo y con su comunidad siempre.*

*A la profesora, Maritere Domínguez Rojas, por brindarme su confianza y apoyo durante toda mi formación académica. Gracias por ser de las pocas profesoras que ama y le apasiona lo que hace, es por usted que muchos más alumnos amaran tanto como yo la genética. Y a la Dra. Virginia Monroy por permitirme colaborar en este estudio.*

*Y por último un agradecimiento especial a Chabela Vargas, por haber interpretado tan magnificas canciones que me acompañaron por muchas horas a lo largo de mi proceso de titulación, descanse en paz.*

# D E D I C A T O R I A S

A ti mamá, por todo el apoyo.

Por todo el esfuerzo que has hecho para verme conseguir mis sueños.

A mi hermano, que este trabajo sirva de ejemplo y que nunca te rindas cuando sobre tus sueños se trata.



*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hada.”*

*Marie Curie*



# Í N D I C E

Índice .....	1
Abreviaturas.....	3
Índice de figuras.....	4
Índice de tablas .....	7
Resumen.....	8
<b>I. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	9
A. MARCO TEÓRICO.....	9
a. <i>Diabetes Mellitus</i> .....	9
b. <i>Complicaciones de la Diabetes Mellitus: Microangiopatías en Retinopatía Diabética</i> .....	10
c. <i>Retinopatía Diabética y su mecanismo molecular</i> .....	12
d. <i>La mitocondria</i> .....	17
e. <i>La genética del ADN Mitocondrial</i> .....	21
f. <i>Tipos de mutaciones genéticas</i> .....	23
g. <i>Polimorfismos</i> .....	25
h. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	26
i. <i>Secuenciación de fragmentos de ADN</i> .....	28
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
III. HIPÓTESIS.....	31
IV. OBJETIVOS.....	31
a) General.....	31
b) Particular.....	31
<b>V. <u>PLAN DE LA INVESTIGACIÓN</u></b> .....	32
A. TIPO DE ESTUDIO .....	32
B. POBLACIÓN, TAMAÑO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	32
C. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL.....	33
D. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
i. <i>Evaluación de la integridad de las muestra de ADN genómico</i> .....	37
ii. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR punto final) para amplificación de la región hipervariables 2 del ADN mitocondrial</i> .....	37
iii. <i>Comprobación del producto de PCR</i> .....	39
iv. <i>Limpieza de productos de PCR</i> .....	39
v. <i>Reacción de secuencia</i> .....	41
vi. <i>Limpieza de los productos de reacción de secuencia</i> .....	42

	<i>vii. Secuenciación automatizada.....</i>	<i>43</i>
VI.	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	44
	<i>a) Pruebas clínicas.....</i>	<i>44</i>
	<i>b) Integridad del ADN genómico .....</i>	<i>45</i>
	<i>c) Productos de amplificación de la región HV2.....</i>	<i>46</i>
	<i>d) Secuenciación de la región HV2.....</i>	<i>47</i>
	<i>e) Alineamientos Secuencia de ANDERSON (rCRS)- población estudio.....</i>	<i>47</i>
	<i>f) Estadísticos de asociación de las variantes genéticas estudiadas.....</i>	<i>51</i>
VII.	<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	53
VIII.	<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	58
IX.	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	59
X.	<b><u>ANEXOS</u></b> .....	63
	a) Consentimiento Informado.....	63

# A B R E V I A T U R A S

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN DE LA ABREVIATURA
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGE</b>	Producto final de la glicosilación avanzada
<b>AIF</b>	Factor inhibidor de la apoptosis
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ddNTPs</b>	Dideoxynucleótidos
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes Mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>dNTPs</b>	Desoxynucleótidos
<b>ENT</b>	Enfermedades no transmisibles
<b>EO</b>	Estrés oxidativo
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleótido de flavina-adenina (del inglés flavinadenine dinucleotide) (forma reducida)
<b>HV1</b>	Región hipervariable 1
<b>HV2</b>	Región hipervariable 2
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (del inglés Nicotinamide adenine dinucleotide) (forma reducida)
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés polymerase chain reaction)
<b>PKC</b>	Proteína Quinasa C
<b>RAGE</b>	Receptor de AGE
<b>rCSR</b>	Secuencia de referencia de Anderson revisada, del inglés revised Cambridge Reference Sequence
<b>RD</b>	Retinopatía Diabética
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SNP</b>	polimorfismos de nucleótido sencillo (del inglés single nucleotide polymorphism)

# Í N D I C E D E F I G U R A S

- FIGURA 1 | Características generales del daño tisular inducido por hiperglicemia (Saldaña, 2014)..... 11
- FIGURA 2 | Ejemplo sobre Reacción de Schiff y la formación del compuesto de Amadori en el grupo amino ácido de la proteína hemoglobina. Figura de autoría propia..... 13
- FIGURA 3 | Cascada de las PKC..... 14
- FIGURA 4 | Producción de superóxido inducida por hiperglicemia en la cadena transportadora de electrones (Kowluru, et al., 2015). ..... 15
- FIGURA 5 | Afecciones producidas por acumulación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres..... 16
- FIGURA 6 | Descripción esquemática del mecanismo molecular de la retinopatía diabética..... 17
- FIGURA 7 | Esquema amplificado de los componentes mitocondriales. Figura de autoría propia..... 19
- FIGURA 8 | Conformación del complejo enzimático llamado ATPasa ..... 20
- FIGURA 9 | Organización interna del ADN mitocondrial humano. Secuencia de Anderson (rCRS)..... 22
- FIGURA 10 | Detalle de la Región Control o D-Loop ..... 22
- FIGURA 11 | Organización de los distintos tipos de mutaciones..... 24
- FIGURA 12 | Mutaciones génicas del tipo transición-transversión..... 25
- FIGURA 13 | Modelo de la reacción en cadena de la polimerasa..... 27
- FIGURA 14 | Método de secuenciación por técnica enzimática..... 28
- FIGURA 15 | Modelo experimental de secuenciación automatizada..... 29
- FIGURA 16 | Metodología general del proyecto de investigación..... 33
- FIGURA 17 | Diagrama de flujo de la metodología a seguir para la verificación de la integridad de muestra..... 34

- FIGURA 18 | Diagrama de flujo para la Reacción en cadena de la Polimerasa de la región HV2 ..... 34
- FIGURA 19 | Diagrama de flujo para la limpieza del producto obtenido de PCR HV2 por el método de ExoSAP-IT ..... 35
- FIGURA 20 | Diagrama de flujo para PCR de secuencias de la HV2..... 35
- FIGURA 21 | Diagrama de flujo para la etapa de purificación del producto de PCR de secuenciación en columna ..... 36
- FIGURA 22 | Materiales utilizado durante la evaluación de la integridad del ADN mitocondrial..... 37
- FIGURA 23 | Secuencias utilizadas para la amplificación de HV2..... 38
- FIGURA 24 | Material utilizado en la amplificación de HV2 ..... 38
- FIGURA 25 | Condiciones del programa para PCR ..... 39
- FIGURA 26 | Condiciones del programa para reacción ExoSAP-IT..... 40
- FIGURA 27 | Material utilizada para la reacción de Secuencia..... 41
- FIGURA 28 | Condiciones del programa para reacción de secuencia ..... 42
- FIGURA 29 | Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio del ADN genómico de individuos control. .... 45
- FIGURA 30 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio del producto de PCR punto final para la región hipervariable 2 del grupo de individuos control ..... 46
- FIGURA 31 | Electroferograma de un fragmento de 80pb de la región hipervariable 2, muestra C26..... 47
- FIGURA 32 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) -Muestras control de HV2. Posición de la base 87 sombreada..... 47
- FIGURA 33 | Electroferograma de la muestra C122 (grupo control)..... 48
- FIGURA 34 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) -Grupo Diabético sin RD. Señalado se encuentra la posición 87 ..... 48
- FIGURA 35 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) -Grupo Diabético con RD. Señalado se encuentra la posición 87 ..... 48

- FIGURA 36 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) – Grupos de estudio.  
..... 49
- FIGURA 37 | Alineamientos de secuencia ANDERSON (rCSR) vs Grupos de estudio dirigido a la posición de C309. .... 50

# I N D I C E D E T A B L A S

- TABLA 1 | Condiciones de reacción para la amplificación de HV2 ..... 38
- TABLA 2 | Condiciones utilizadas para la reacción de Exo-SAP-IT ..... 40
- TABLA 3 | Condiciones empleadas para la reacción de secuencia de HV2..... 41
- TABLA 4 | Características clínicas de la población control en comparación con la población diabética..... 44
- TABLA 5 | Promedios obtenidos de los resultados estadísticos de los alineamientos con BLAST. .... 51
- TABLA 6 | Frecuencias de las variantes genéticas estudiadas en los grupos de estudio. .... 51
- TABLA 7 | Asociación de las variantes genéticas estudiadas con el fenotipo de retinopatía diabética. .... 52
- TABLA 8 | Asociación de las variantes genéticas estudiadas con el fenotipo de diabetes. .... 52

# R E S U M E N

La *diabetes mellitus* (DM) se puede considerar como uno de los principales problemas de salud mundial, entre otras razones por su elevada prevalencia, su elevado costo económico y el número de muertes prematuras que provoca (Ruiz, et al., 2006). Esta condición provoca varios trastornos en el organismo humano alterando el metabolismo del mismo, entre algunos de estos cambios se encuentran las interacciones de la glucosa con moléculas como los aminoácidos de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de manera anormal provocando cambios drástico que terminan afectando a la persona que la padece, además de aumentar las posibilidades de desarrollar complicaciones de la misma.

Una de las complicaciones más frecuentes de la DM es la Retinopatía diabética (RD), esta es una complicación microvascular provocada por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de las vasculatura del ojo, los niveles elevados de glucosa en sangre provocan un cambio en las vías moleculares propiciando la formación de dichas moléculas. Estudios realizados por diversos tipos de instituciones han documentado la existencia de una posible relación entre mutaciones en el ADN mitocondrial con el desarrollo de retinopatía diabética (Tang, et al., 2014). La RD es la causa más importante de ceguera adquirida en la población diabética, actualmente se han registrado aproximadamente más de 93 millones de casos es ahí donde radica la importancia de estudiar la posible asociación de dicha enfermedad con algunos factores genéticos, tales como el ADN mitocondrial (OMS, 2016).

En este estudio se exploró la posible asociación del fenotipo de RD y los polimorfismos presentes en la región hipervariable 2 (HV2) del ADN mitocondrial. Para lo cual se estudio un grupo control de pacientes sanos y dos grupos con diabetes con y sin el fenotipo de RD. Se observó que los 3 polimorfismos estudiados (A77d A87d y C309CC) fueron diferentes entre los grupos de estudio. De forma interesante se encontró que dos de los polimorfismos (A77d y A87d) se asociaron a diabetes y además de relacionarse a un efector protector para el fenotipo de RD. Como consecuencia de ello se afirma que es posible establecer la asociación de polimorfismos presentes en la HV2 del ADN mitocondrial y el fenotipo de un grupo control de pacientes sanos como pacientes diabéticos con y sin RD mediante la comparación de las frecuencias que presenten dichos grupos de estudio.

## I. INTRODUCCIÓN

### a) MARCO TEORICO

#### **a. *Diabetes Mellitus***

La *diabetes mellitus* (DM) se puede considerar como uno de los principales problemas de salud mundial, entre otras razones por su elevada prevalencia, su elevado costo económico y el número de muertes prematuras que provoca (Ruiz, et al., 2006). Además de ser una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) a la cual se ha pactado intervenir con carácter prioritario por la Organización mundial de la Salud. En las últimas décadas han aumentado sin pausa el número de casos y la prevalencia de la enfermedad poniendo en un estado de alerta a la mayoría de las naciones del mundo (OMS, 2016).

La DM es una enfermedad crónica que tiene causas diversas; se caracteriza por hiperglucemia crónica y trastornos del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas como consecuencia de anomalías de la secreción o del efecto de la insulina. Se ha estudiado que los dos principales tipos de DM se deben a que el páncreas no produce suficiente insulina (una hormona que regula el nivel de azúcar, o glucosa, en la sangre) tipo 1, o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce, tipo 2 (OMS, 2015). Es importante destacar que en su etapa inicial la DM no produce síntomas pero cuando se detecta de forma tardía y no es tratada adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (Hernández, et al., 2013).

Existen otros tipos específicos de DM ocasionados por defectos genéticos que repercuten a nivel de la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, otros síndromes genéticos asociados en ocasiones con diabetes, Diabetes mellitus gestacional e incluso se ha reportado evidencia de defectos genéticos que censuran la función de las células beta, tanto en el ADN nuclear como en el ADN mitocondrial (Saldaña, 2014).

En México la DM tipo 2 es una de las principales causas de morbilidad asociada con el actual modelo económico y social, con serias repercusiones en el estilo de vida, cuyos indicadores se observan en la alimentación, el manejo del estrés y el sedentarismo, entre otros (de los Rios, et al., 2004).

La DM2 es consecuencia de la interacción de factores genéticos y ambientales con tendencia a presentarse en familias, además de estar asociada con la obesidad, la poca actividad física y la alimentación; se caracteriza por hiperglucemia causada por un defecto en la secreción de insulina, es bastante común que se encuentre relacionada al desarrollo de resistencia a esta hormona debido a las causas por las que se llega a padecer DM2, se le conocía anteriormente como diabetes sacarina no dependiente de la insulina (Hernández, et al., 2013).

Por lo general, aparece en la edad adulta, aunque está aumentando en niños y adolescentes afectando con mayor frecuencia a las personas que padecen hipertensión arterial y dislipidemia (colesterol sanguíneo anormal). Este tipo de pacientes tienden a tener un riesgo mayor de padecer complicaciones micro y macro vasculares, debido a los niveles altos de glucosa circulante en su sistema provocando daños considerables en el sistema vascular (Kowluru, et al., 2015).

Los pacientes a veces no presentan manifestaciones clínicas o éstas son mínimas durante varios años antes del diagnóstico. De acuerdo con su cuadro clínico los pacientes presentan poliuria, polidipsia, polifagia y baja de peso inexplicable. Por otro lado durante el desarrollo de la DM2 también pueden presentarse casos de entumecimiento de las extremidades, dolores (disestesias) de los pies y visión borrosa (National Institutes of Health, 2016).

El objetivo global del tratamiento es disminuir las concentraciones sanguíneas de glucosa anormales que presentan los afectados para aliviar los signos y síntomas y prevenir o posponer la aparición de complicaciones. Se recomienda a los pacientes mantener un control en la dieta y la práctica de algún ejercicio físico; por otro lado también la combinación con medicamentos orales o insulina suplementaria. La detección temprana de las complicaciones de DM2 puede realizarse mediante estudios para evaluar el funcionamiento adecuado de los ojos, una prueba de orina, cuidado de los pies y remisión con el especialista cuando sea necesario, es de esta manera donde el tratamiento oportuno llega a evitar la muerte prematura (OMS, 2016).

Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que a nivel mundial, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con diabetes, con cifra actual estimada en más de 347 millones de personas con diabetes. En 2014, el 9% de los adultos (18 años o mayores) tenía diabetes. En 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes. Más del 80% de las muertes por diabetes se registra en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2015). Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son –en ese orden– los países con mayor número de diabéticos (Hernández, et al., 2013).

#### ***b) Complicaciones de la Diabetes Mellitus: Microangiopatías en Retinopatía Diabética***

Las complicaciones que se presentan en DM se clasifican en macroangiopatías y microangiopatías, estas complicaciones tiene un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes con DM tipo 2. El tener complicaciones macrovasculares incrementa la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares y cerebrovascular mientras la presencia de una complicación microvascular se relaciona con nefropatías y a retinopatías diabéticas (Kowluru, et al., 2015). Así, por ejemplo, no debemos olvidar que la retinopatía diabética está presente en el 21% de los diabéticos en el momento del diagnóstico y que

es la principal causa de ceguera en el mundo occidental entre la población adulta de 20 a 74 años (Botet, et al., 2012).

La hiperglicemia es la causa inicial del daño tisular en los diabéticos así como el desarrollo de retinopatía diabética, este proceso perjudicial es modificado por determinantes genéticos que confieren una susceptibilidad individual y por factores de riesgo independientes como la hipertensión y la hiperlipidemia (Kowluru & Mishra, 2015; Chew, et al., 2014) (FIGURA 1).

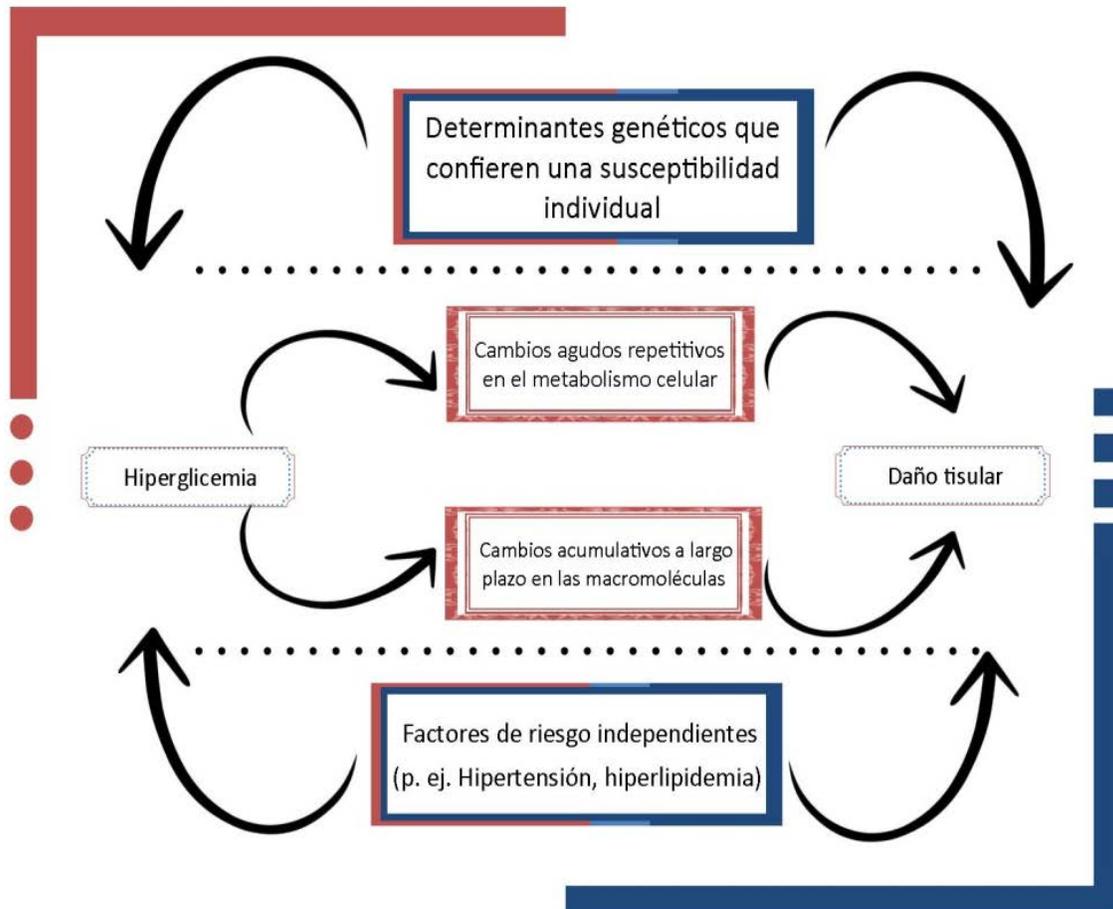


FIGURA 1 | Características generales del daño tisular inducido por hiperglicemia (Saldaña, 2014).

La microvasculatura de la retina es el principal sitio al que se asocia la retinopatía diabética ya que éste es el tejido con mayor actividad metabólica en el cuerpo (Frank 2004). La susceptibilidad de las células al daño inducido por hiperglicemia es la consecuencia de la insuficiencia de estas para limitar el transporte de glucosa a su interior cuando éstas se encuentran bajo la condición hiperglicémica que se presenta en DM (Saldaña, 2014).

Los tipos celulares que presentan daño por hiperglicemia son las células endoteliales de los capilares retinianos, las células mesangiales en el glomérulo renal y las células de

Schwann en los nervios periféricos. Se sabe que estos tipos celulares presentan una característica común, un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en particular una sobreproducción de superóxido a través de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Kowluru, et al., 2015).

La incidencia de las complicaciones incrementa notablemente después de 5 a 10 años de evolución de la DM tipo 2; sin embargo, existe una variabilidad muy grande de un individuo a otro respecto al inicio y progresión de las mismas, es decir, algunos individuos desarrollan tempranamente complicaciones severas, mientras otros no llegan a desarrollar complicaciones significativas incluso después de muchos años de evolución de la diabetes mal controlada. Tanto las complicaciones micro y macrovasculares presentan disfunción en la fosforilación oxidativa mitocondrial; es por esto que las variaciones en el ADN mitocondrial pueden ser candidatas a alterar el riesgo genético para las principales complicaciones de la diabetes, la nefropatía, la retinopatía y la enfermedad cardiovascular (Saldaña, 2014).

### ***c) Retinopatía Diabética y su mecanismo molecular***

La retinopatía diabética es la causa más importante de ceguera adquirida en la población diabética, actualmente se han registrado aproximadamente más de 93 millones de casos. En años recientes se ha visto un aumento en el diagnóstico de diabetes tipo 2 en edades cada vez más jóvenes lo cual aumenta de forma considerable el riesgo de presentar retinopatía diabética y su progresión (Malik, et al., 2015). Se considera que el número de personas que presenten esta complicación crezca de 126.6 millones en el año 2010 a 191.0 millones para el año 2030 (Kowluru, et al., 2015).

Las condiciones impuestas al cuerpo por la diabetes facilitan las interacciones de la glucosa con los aminoácidos de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos además de que se puede ver involucrada en reacciones no enzimáticas, formando bases de Schiff y productos de Amadori (Stitt, 2010) (FIGURA 2). Una cascada compleja de reacciones, en última instancia, resulta en la conversión de los productos de Amadori en la formación del producto final de la glicosilación avanzada (AGEs). El aumento de AGEs y sus receptores (RAGEs) han sido observados dentro de capilares de la retina, esos se encuentran asociados con un aumento de la pérdida de células y la inflamación capilar en la retinopatía diabética (Kowluru, et al., 2015; Stitt, 2003)

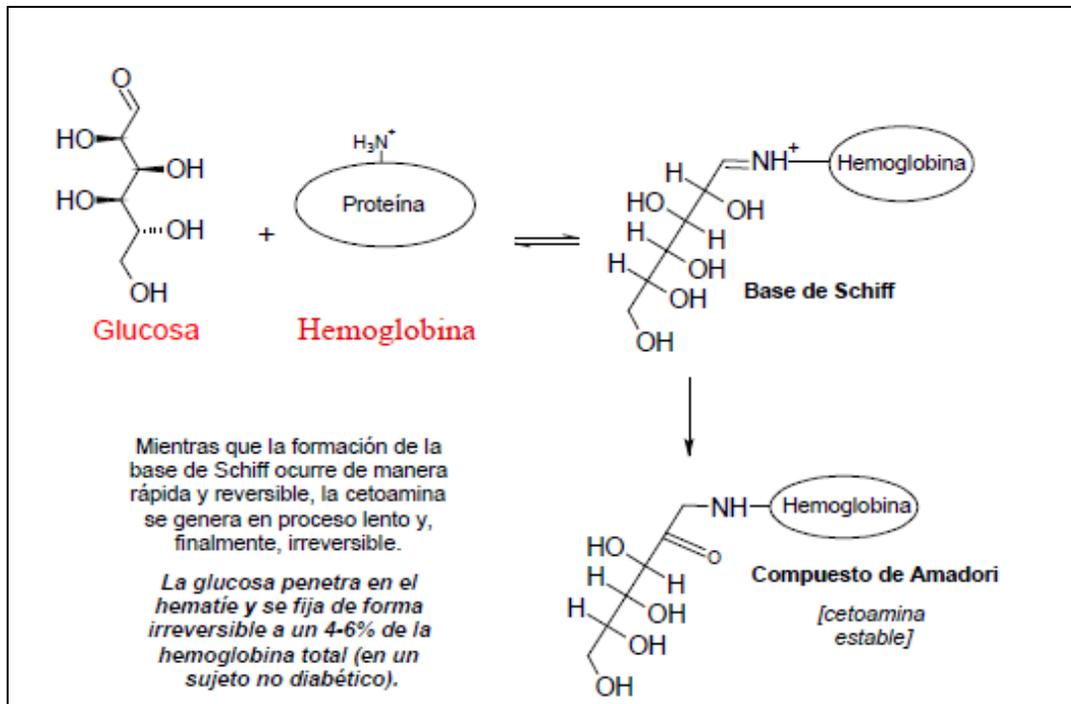


FIGURA 2 | Ejemplo sobre Reacción de Schiff y la formación del compuesto de Amadori en el grupo amino ácido de la proteína hemoglobina. Figura de autoría propia.

La importancia de comprender el cómo es que la hiperglucemia altera múltiples vías celulares mediante cambios a unos pocos elementos esenciales ha sido uno de los puntos críticos para los investigadores. La intervención del aumento en los niveles de glucosa circulante se ha descrito en la activación de diacilglicerol proteinquinasa C dentro de la casada de las PKCs (FIGURA 3) y la activación de PKC en la vasculatura de la retina, ambas situaciones desencadenan un aumento de la permeabilidad vascular, alteraciones en el flujo sanguíneo y estimulación de la neovascularización vista en la RD ya que PKC está involucrada con una aceleración de la apoptosis de las células capilares, lo que resulta en una degeneración de éstos dando como resultado una aceleración en la progresión de la RD (Geraldés, et al., 2009).

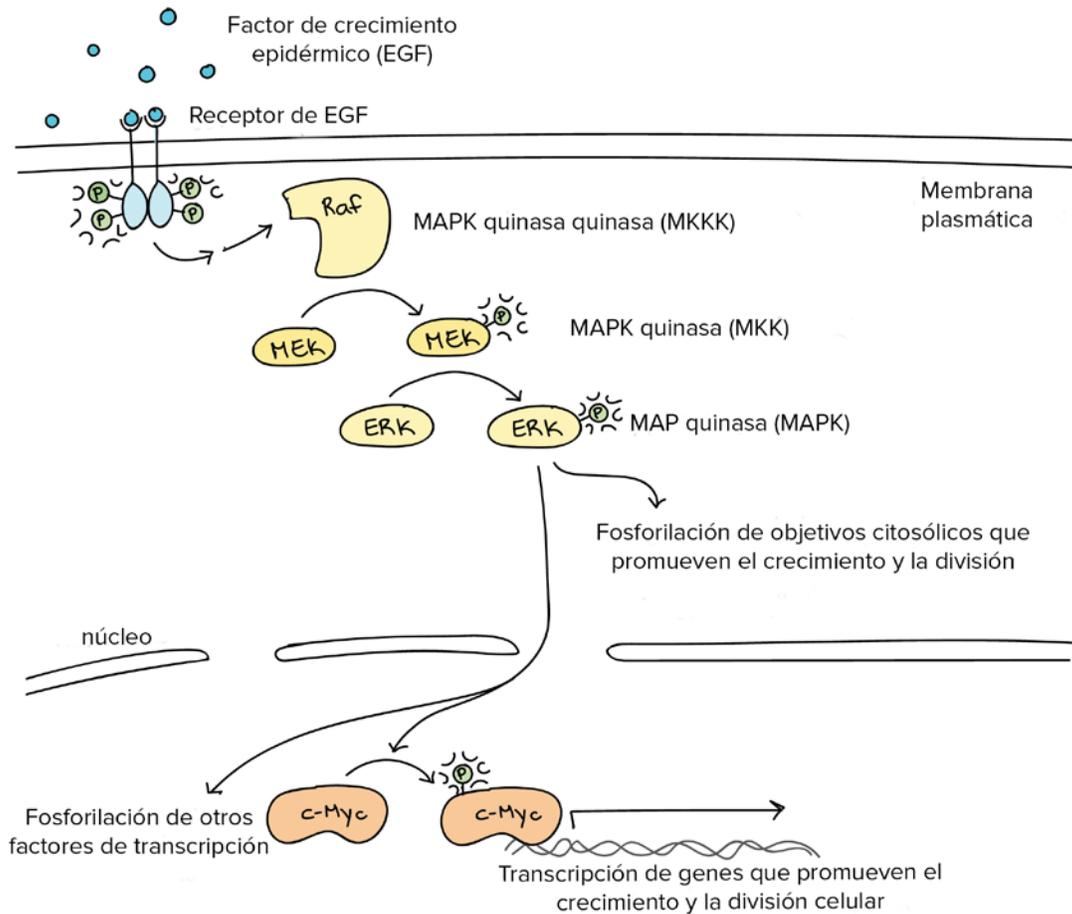


FIGURA 3 | Cascada de las PKC. Mecanismo general de activación de tirosina quinasas que actúan como receptores (PQTr). La asociación de ligandos a una PQTr, produce su dimerización y autofosforilación en tirosina. El factor de nucleósido guanidina (Sos) activa a la proteína G, Ras que a su vez activa al producto del oncogén Raf-1. Esto permite la activación de una cascada de MAPKK quinasa quinasa y MAPK, la cual finalmente se trasloca al núcleo para fosforilar factores de transcripción (FT) e inducir expresión génica. Obtenida de KhanaAcademy el Agosto 15 del 2017.

El aumento del estrés oxidativo se postula como una de las causas primordiales en el desarrollo de las principales complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes. La hiperglicemia está estrechamente relacionada con aumento del estrés oxidativo, la retina al ser un tejido rico en ácidos grasos poliinsaturados con alta oxidación de la glucosa y la absorción de oxígeno (Andersin, et al., 1984), se considera como un buen objetivo durante el aumento del estrés oxidativo en la diabetes (Kowluru, et al., 2015).

El principal reservorio de radicales libres se concentra en la mitocondria, en condiciones fisiológicas normales se ha estimado que es en este lugar donde existe aproximadamente el 2% del consumo total de oxígeno (Kowluru, et al., 2015). Las células de los tejidos de diabéticos que presentan una elevación de la concentración de glucosa en su interior presentan mayor oxidación de estas moléculas de glucosa a través del ciclo de Krebs, incrementando, a su vez, la generación de moléculas que transfieren electrones (NADH y

FADH<sub>2</sub>), mismos que son donados dentro de la cadena respiratoria (Saldaña, 2014).

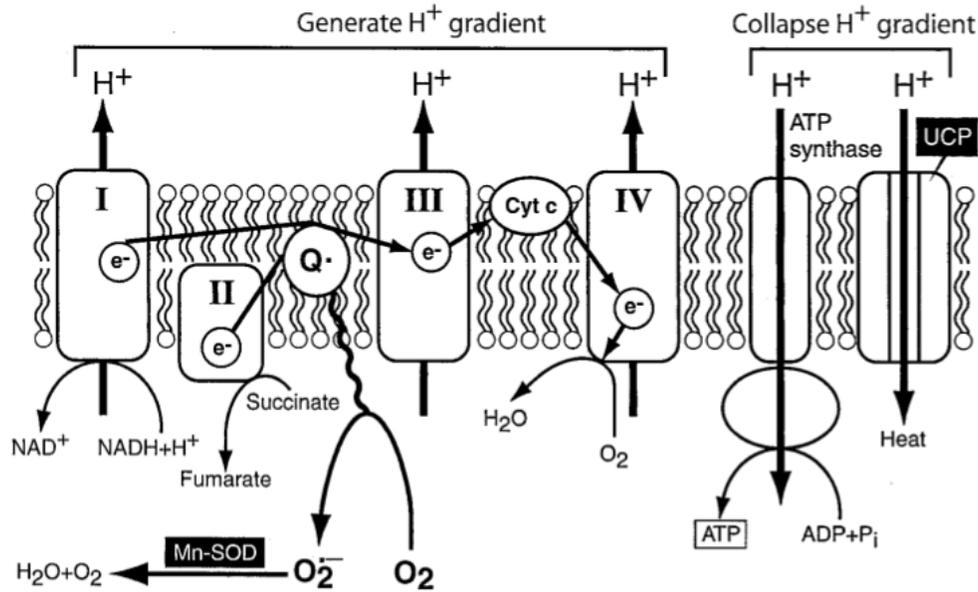


FIGURA 4 | Producción de superóxido inducida por hiperglicemia en la cadena transportadora de electrones (Kowluru, et al., 2015).

La transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV de la cadena transportadora de electrones bombea protones del interior del espacio intermembranal de la mitocondria, generando un gradiente al cual conduce a la síntesis de ATP, pero algunos electrones se escapan del complejo I o II ocasionando que los electrones regresen a la coenzima Q. Dichos electrones interactúan con el oxígeno molecular para formar el anión superóxido (Murphy, 2009; Trumpower, 1990) (FIGURA 4). Se ha descrito que en la retinopatía diabética la inactivación del complejo III se ve implicada en el aumento de la acumulación de superóxido en las mitocondrias de la retina (Kanwar, et al., 2007) (FIGURA 5).

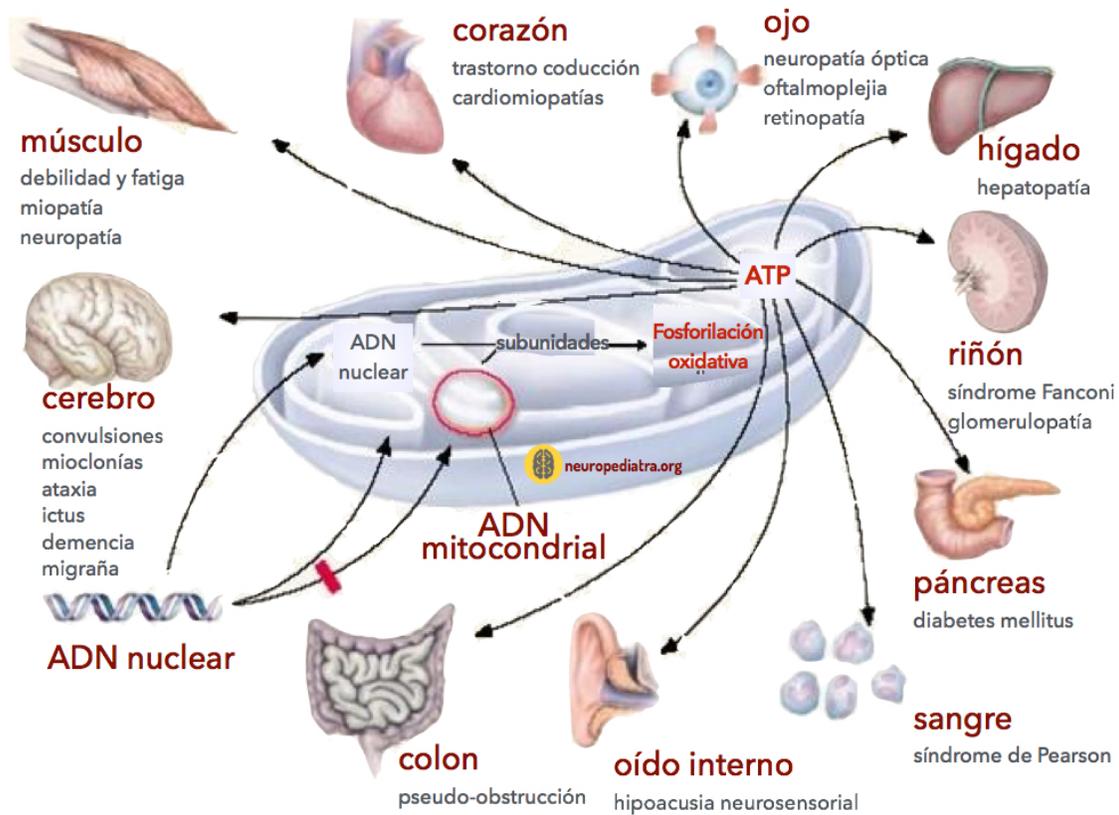


FIGURA 5 | Afecciones producidas por acumulación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Obtenido de KhanaAcademy el 25 de Septiembre del 2016.

Como se ha estado señalando en esta sección los niveles altos de glucosa circulante y las ROS son las causantes de varias anomalías metabólicas en la DM incluyendo la activación de PKC y AGEs (Brownlee, 2005); en otra instancia también el aumento de hidroperóxidos de lípidos en suero se asocia con aumento de la prevalencia de la retinopatía en pacientes diabéticos (Brownlee, 2005; Kowluru, 2001)

Bajo condiciones patológicas la producción y la desintoxicación de los radicales libres se ve deteriorada ya que corresponde ya sea al aumento de la producción de ROS, la disminución de los mecanismos para su eliminación o ambos, lo que resulta en desequilibrio donde se tiene una biodisponibilidad excesiva de ROS (Kowluru, et al., 2015); en la retinopatía diabética, la retina experimenta tanto, el aumento de la producción y la disminución de la eliminación de los radicales libres. Si los radicales libres no son neutralizados pueden ocasionar fácilmente daños en macromoléculas como proteínas, lípidos e incluso el ADN alterando la expresión de genes, tanto en el ADN genómico como en el ADN mitocondrial (Kowluru, et al., 2013) (FIGURA 6).

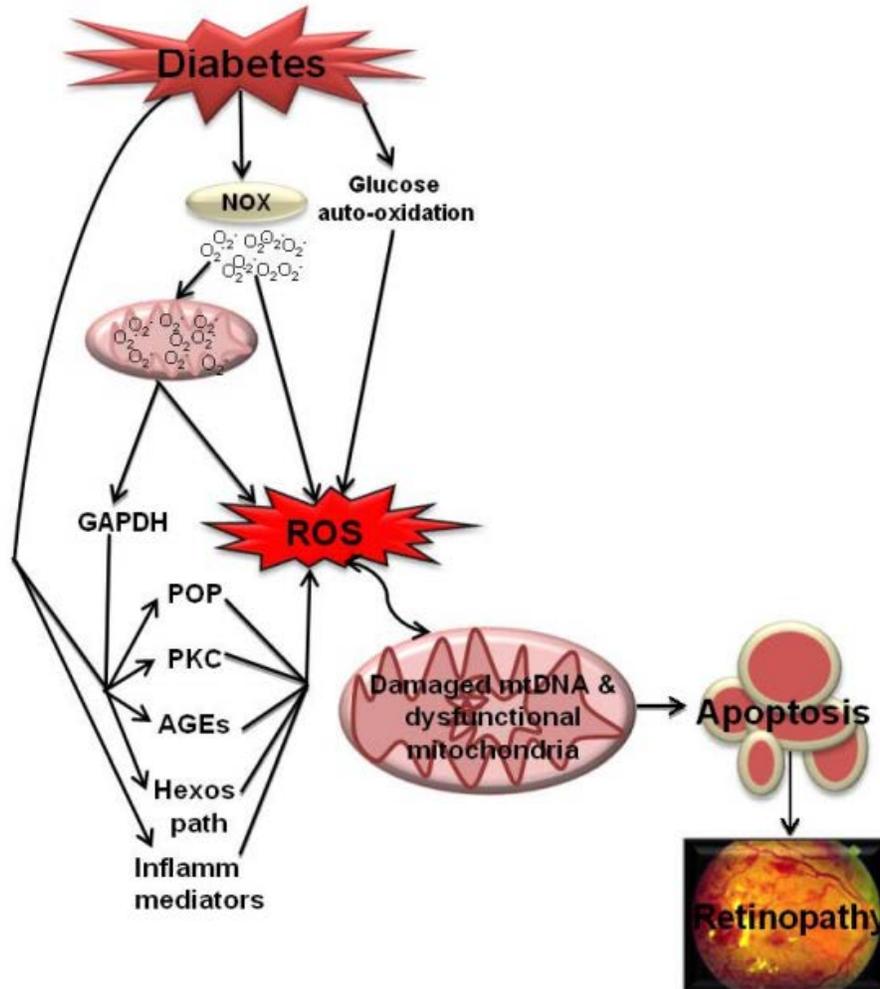


FIGURA 6 | Descripción esquemática del mecanismo molecular de la retinopatía diabética (Kowluru, et al., 2015).

Estudios realizados por diversos tipos de instituciones han documentado la existencia de una posible relación entre mutaciones en el ADN mitocondrial con el desarrollo de retinopatía diabética (Tang, et al., 2014; Bishop, 2004) como ejemplo de uno de ellos es el trabajo realizado por la Saldaña Rivera en el que se evidenciaron polimorfismos con una posible asociación con el fenotipo de RD, por los cuales se decidió realizar el seguimiento de estos a través de la presente tesis. La consecuencia que se ve implicada en una mutación en el ADN mitocondrial puede ser en el cambio de secuencia codificante para una proteína, donde puede llegar a afectar el metabolismo de órganos cambiando de forma severa el fenotipo de algunas enfermedades (Magner, et al., 2015).

#### **d) La mitocondria**

La mitocondria es un organelo que controla los destinos de las células más allá de la síntesis del ATP. Distribuye la energía sintetizando ATP a expensas de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos por medio de la fosforilación oxidativa y el poder reductor (Alberts,

et al., 2002) e integra los caminos metabólicos. Regula la maquinaria epigenética, la expresión génica, los factores de transcripción y las vías de señalización. La mitocondria es una planta de energía auto regulable, actúa como un centro de recepción de señales finas del universo celular y responde a las necesidades metabólicas de todos los componentes de la célula de una manera integrada y eficiente (de Gómez, et al., 2012) además de estar presentes en prácticamente todas las células eucariotas.

La mitocondria tiene un tamaño variable entre 0.1 $\mu$ m y 0.5 $\mu$ m de diámetro y pueden alcanzar una longitud máxima de 7 $\mu$ m, sin embargo éste depende de la actividad de la célula; en promedio una sola célula puede albergar cerca 2000 mitocondrias (Lodish, 2006). La población mitocondrial es dinámica y muestra variaciones en el tamaño, el número y la masa durante las diversas etapas del desarrollo, la diferenciación celular y en respuesta a diversas situaciones fisiológicas y patológicas (Goffart, et al., 2003).

En el fenómeno de biogénesis mitocondrial confluyen dos procesos íntimamente ligados: la proliferación que consiste en el aumento del número de mitocondrias por célula, y la diferenciación, mediante la cual el orgánulo adquiere las características estructurales y funcionales adecuadas para el desarrollo de las funciones específicas de las distintas células del organismo (Nisoli, et al., 2004). En el control de la biogénesis mitocondrial participan numerosos factores, como la regulación de la expresión y la replicación del genoma mitocondrial, la expresión y el transporte a la mitocondria de diversas proteínas codificadas por genes nucleares, y la coordinación de todos estos procesos (López, 2005).

Estructuralmente las mitocondrias están formadas por dos envolturas membranales, al igual que las membranas plasmáticas, las mitocondriales poseen una simetría en la distribución de los lípidos no sólo entre las membranas interna y externa, sino también entre las capas interna y externa de la bicapa lipídica (Sánchez, et al., 2008). De modo que una alteración en esta distribución tiene consecuencias para la función y supervivencia de las mitocondrias y aún de la célula misma en el proceso de la apoptosis (Grim, et al., 2007). Las dos membranas limitan tres espacios acuosos: el intermembranal, el intracrestal y la matriz mitocondrial (FIGURA 7).

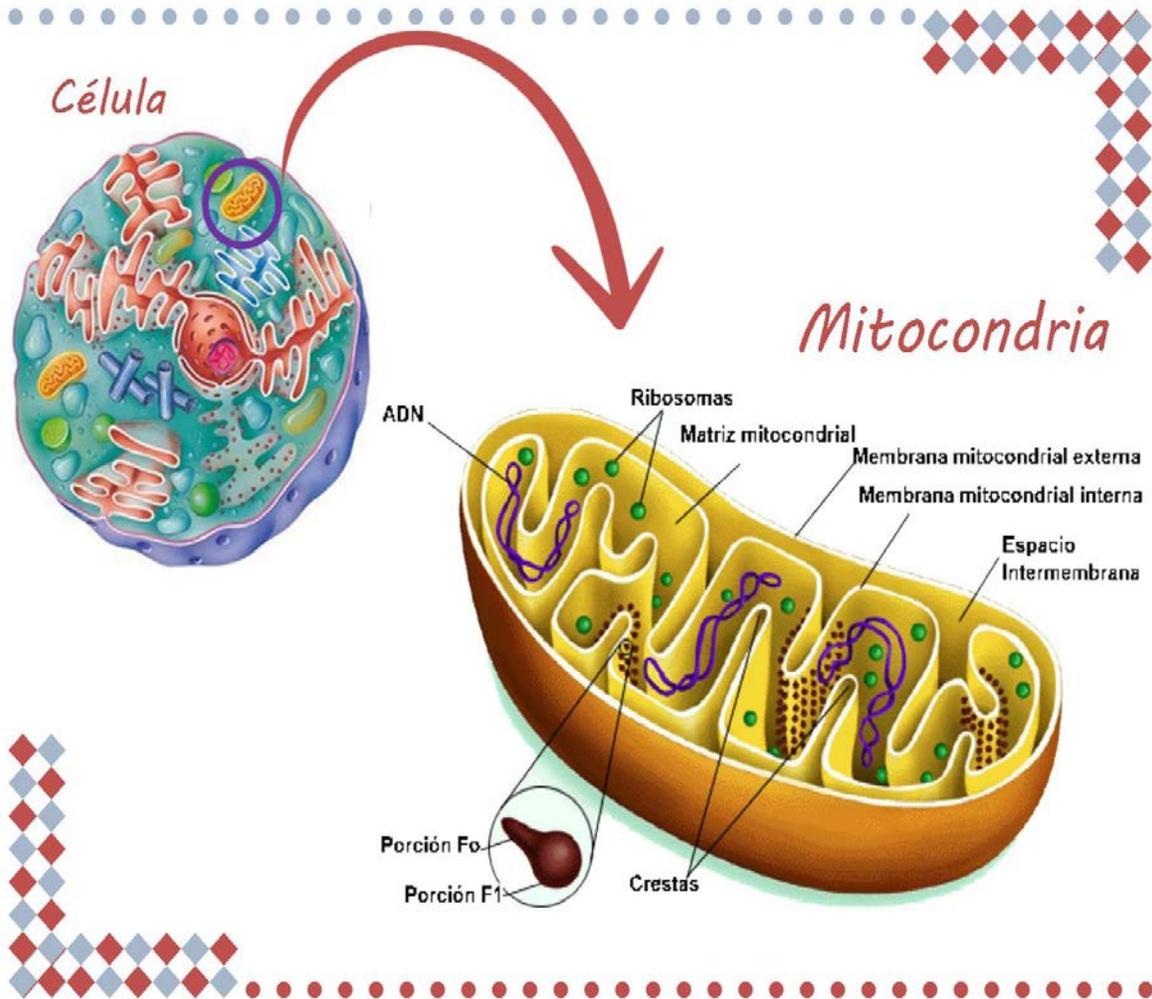


FIGURA 7 | Esquema amplificado de los componentes mitocondriales. Figura de autoría propia.

La membrana externa contiene, entre otras proteínas, una permeasa característica, la porina ó canal aniónico dependiente de voltaje que permite la entrada y salida de proteínas y solutos. Durante la muerte celular por apoptosis y en condiciones de estrés oxidativo se asocia a la translocasa de ADP-ATP y a un acarreador de calcio formando el poro de transición de permeabilidad produciéndose una salida masiva de proteínas, despolarización de la membrana y la muerte celular (de Gómez, et al., 2012).

La membrana interna difiere en su organización molecular de la membrana externa. Posee 80% de proteínas y 20% de lípidos. Se caracteriza por formar cierto número de repliegues que se denominan crestas y que incrementan el área total de la superficie interna (Lodish 2006). Estas crestas aparecen como estructuras lamelares o tubulares, cuyo número está relacionado con las demandas energéticas de la célula. Esta membrana es impermeable a muchos solutos; contiene tres tipos de proteínas: 1. Las que llevan a cabo las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria, 2. Un complejo enzimático llamado ATPasa, que sintetiza el ATP en la matriz y 3. Proteínas

transportadoras específicas que regulan el paso de metabolitos dentro y fuera de la matriz (Lehninger, et al., 2002) (FIGURA 8).

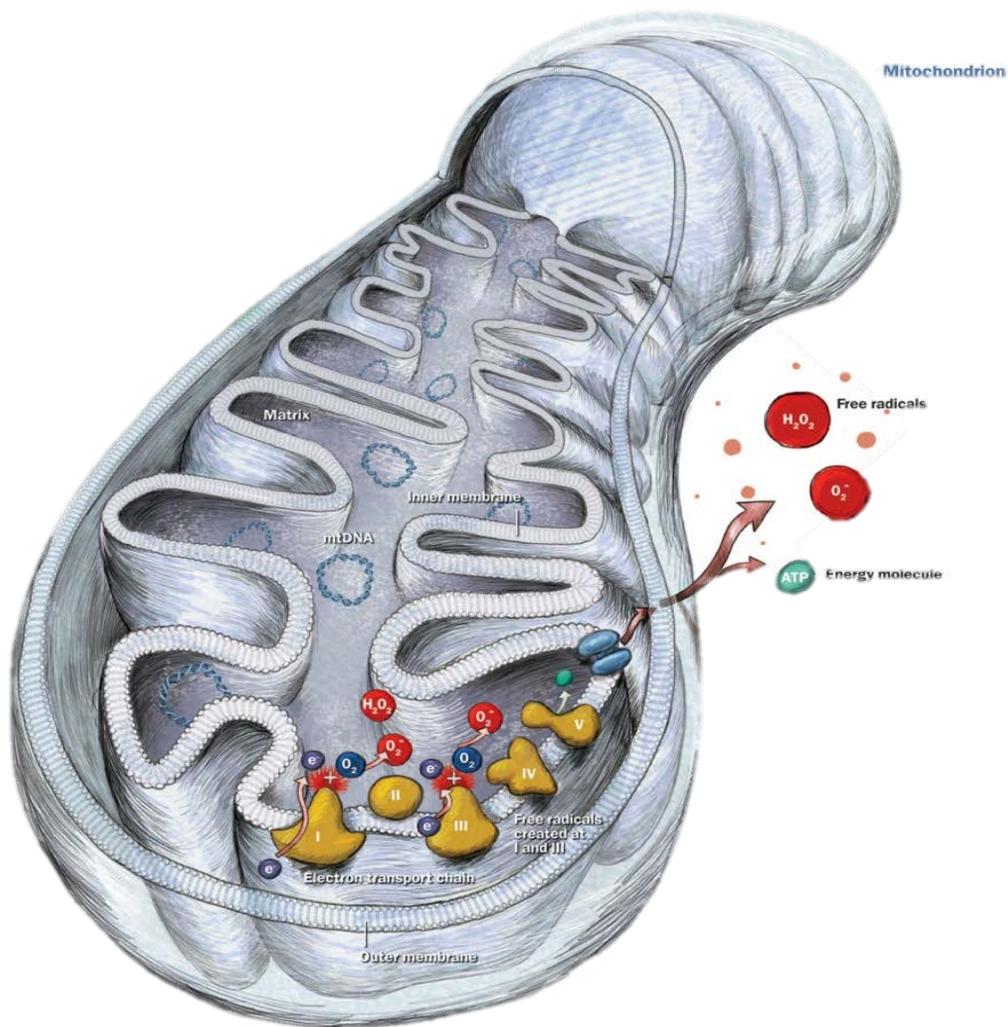


FIGURA 8 | Conformación del complejo enzimático llamado ATPasa (Lehninger, et al., 2002)

Entre las dos membranas queda delimitado un espacio intermembranal, este contiene todas las moléculas que las porinas de la membrana externa dejan pasar. Esta es la razón de que sea rico en protones, los cuales proceden del funcionamiento de los complejos de la cadena respiratoria y desempeñan un papel esencial en la fosforilación de ADP (Lehninger, et al., 2002). Por otro lado el espacio intermembranal contiene también componentes claves implicados en la muerte celular de tipo apoptótico, como algunas caspasas, el factor inhibidor de la apoptosis (AIF) y el citocromo c, que se localiza sobre la cara interna de la membrana interna (López R, 2005).

En cuanto la matriz mitocondrial es de una consistencia ligeramente densa y finamente granulosa, debido a los gránulos densos e irregulares de iones de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>, moléculas

de ADN y ARN mitocondrial, metabolitos a oxidar y ribosomas tipo 70S similares a los de las bacterias, llamados mitorribosomas, que realizan la síntesis de algunas proteínas mitocondriales. En la matriz mitocondrial tienen lugar diversas rutas metabólicas, por ejemplo el ciclo de Krebs y en la beta-oxidación de los ácidos grasos (Sánchez, et al., 2008).

### **e) La genética del ADN Mitocondrial**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una de las moléculas más importantes para la vida. Consiste de una doble hélice donde cada una de las cadenas es un polímero integrado por nucleótidos; cada nucleótido, está formado por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada que puede ser adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G) y un grupo fosfato (Stansfield, 1992). El genoma de los seres humanos consta de 23 pares de cromosomas contenidos dentro del núcleo y un genoma haploide circular localizado en las mitocondrias dentro del cual están 37 genes necesarios para la cadena respiratoria de la célula (Guardado, et al., 2008).

El ADN mitocondrial humano consta de una doble cadena, circular, cerrada de 16568 pares de bases; esta doble hebras se encuentra conformada por la cadena pesada o H (Heavy) y la cadena ligera o L (Light), la cadena pesada contiene una mayor proporción de bases purícas mientras que la ligera está compuesta mayormente por bases pirimidícas (Terreros Ibáñez, 2010). Esta secuencia ha llegado a recibir el nombre de secuencia clásica de Anderson (o secuencia referencial de Cambridge), todo ADN mitocondrial humano es comparado con esta primera secuenciación realizada hace unos años. El ADN mitocondrial se encuentra dividido en dos regiones desde un punto de vista funcional: región codificante y región control. En la región codificante, se encuentran 37 genes altamente empaquetados, 22 codifican para ARNs de transferencia, 2 para ARN ribosomales, uno de 12S y otro de 16S respectivamente, y 13 codifican para enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP (Holland, 1999; Terrero, 2010) (FIGURA 9).

A diferencia del ADN nuclear el ADN mitocondrial se duplica de manera independiente del nuclear; carece de histonas y forma complejos llamados nucleoides con proteínas específicas relacionadas con la duplicación del ADN, su transcripción a ARN mensajero y su traducción a proteínas. Cada nucleoide se adosa a la membrana interna mitocondrial y contiene 6 copias, son unidades dinámicas que responden a las condiciones metabólicas de la célula. Presentan una frecuencia de mutaciones de 7 a 10 veces mayor que el ADN nuclear y un sistema de reparación deficiente. La traducción de ambas cadenas pesada y ligera es bidireccional y asincrónica, además los codones para los aminoácidos difieren del código universal ( de Gómez Poyou, et al., 2012).



A lo largo de la evolución, se han dado mutaciones en el ADN mitocondrial, la mayoría de las cuales se ubican en la región control, en segmentos conocidos como regiones hipervariables 1 y 2 (HV1 y HV2) (Saldaña, 2014). Los polimorfismos presentes en las regiones hipervariables del genoma mitocondrial se dan por transiciones o transversiones que se presentan a lo largo de la secuencia. (Kline, 2005) Si bien, se pueden presentar en cualquier posición, se han detectado posiciones que mutan más frecuentemente que otras, estas son consideradas puntos calientes de mutación o *hot spots* (Terreros, 2010).

La región hipervariable del ADN mitocondrial, dado su carácter “neutral” ante la Selección Natural, ha venido siendo considerada muy informativa para valorar la diversidad intraespecífica y también para estimar las relaciones filogenéticas, basadas en linajes maternos, entre especies próximas (Varela, et al., 2009). La tasa de mutación del ADN mitocondrial es más alta comparada con el genoma nuclear y se debe en parte a la exposición del ADN mitocondrial a radicales de oxígeno que se producen en la fosforilación oxidativa (Salas, 2007).

#### **f) Tipos de mutaciones genéticas**

La definición de mutación a partir del conocimiento de que el material hereditario es el ADN y de la propuesta de la doble hélice para explicar la estructura del material hereditario, sería que una mutación es cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN. La mutación es la fuente primaria de variabilidad genética en las poblaciones, éstas pueden ocurrir tanto en las células somáticas como en las células germinales (Tamarin, 1996).

# TIPOS DE MUTACIONES

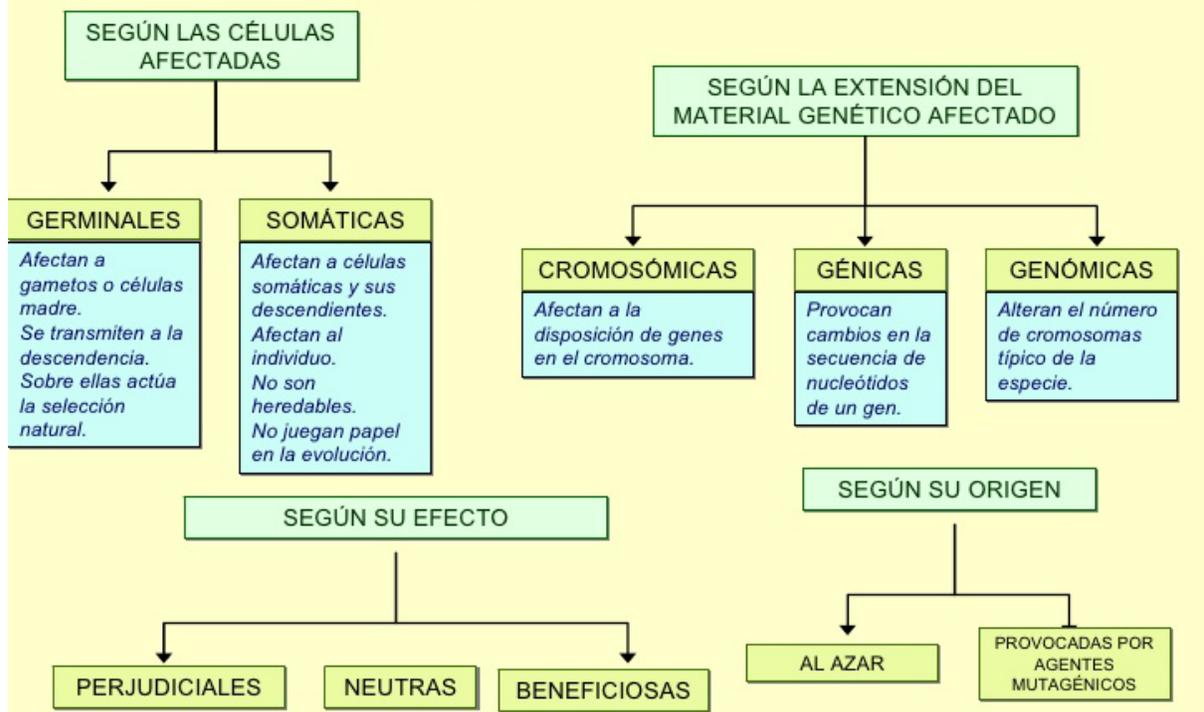


FIGURA 11 | Organización de los distintos tipos de mutaciones. Obtenida en SlideShare el 1 de Septiembre del 2016.

Las mutaciones que afectan solamente a las células de la línea somática no se transmiten a la siguiente generación ya que estas mutaciones producen alteraciones exclusivas en el organismo que la presentó; pero desaparece en el momento en que muere el individuo en que se originó. Sin embargo, las mutaciones en las células germinales, óvulos y espermatozoides, pueden transmitirse como rasgos hereditarios diferenciadores a los descendientes del organismo en los que tuvo lugar la mutación y tienen una mayor importancia desde el punto de vista evolutivo (Pierce, 2005).

Existen varias formas en las que se puede agrupar a las mutaciones (FIGURA 11), uno de ellos es con base a los niveles mutacionales, es decir, se clasifican de acuerdo a la cantidad de material hereditario afectado por la mutación. Dentro de ésta se haya la mutación génica: afecta a un sólo gen, mutación cromosómica: afecta a un segmento cromosómico que incluye varios genes y la mutación genómica que afecta a cromosomas completos (por exceso o por defecto) o a juegos cromosómicos completos (Pierce, 2005).

En cuanto a las mutaciones génicas podemos decir que éstas se dividen en distintos tipos dependiendo del cambio que se produce en la base afectada; las transiciones o transversiones, entendiéndose por transición al cambio en un nucleótido de una base púrica

por otra púrica o de una pirimidica por otra pirimidica; mientras que una transversion es el cambio de una base púrica por una pirimidica o viceversa (FIGURA 12). Éstas producen mutaciones conocidas como: silenciosas o de sinonimia, en donde el cambio de la base afectada produce un codón que determina el mismo aminoácido; de cambio de sentido conservada, donde el codón alterado determina un aminoácido químicamente similar al codón sin alteración; de cambio de sentido no conservada, donde se obtiene un codón químicamente distinto, y la mutación sin sentido, la cual determina un codón alterado indicativo de la terminación de la cadena.

Dentro de las mutaciones génicas también se pueden encontrar los siguientes dos tipos de mutaciones: inserción o adición y deleciones de nucleótidos; hablan acerca de ganancias de uno o más nucleótidos (inserciones o adiciones) y de pérdidas de uno o más nucleótidos. Ambos tipos tienen como consecuencia cambios en el cuadro o marco de lectura produciendo cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificante alterando su función.

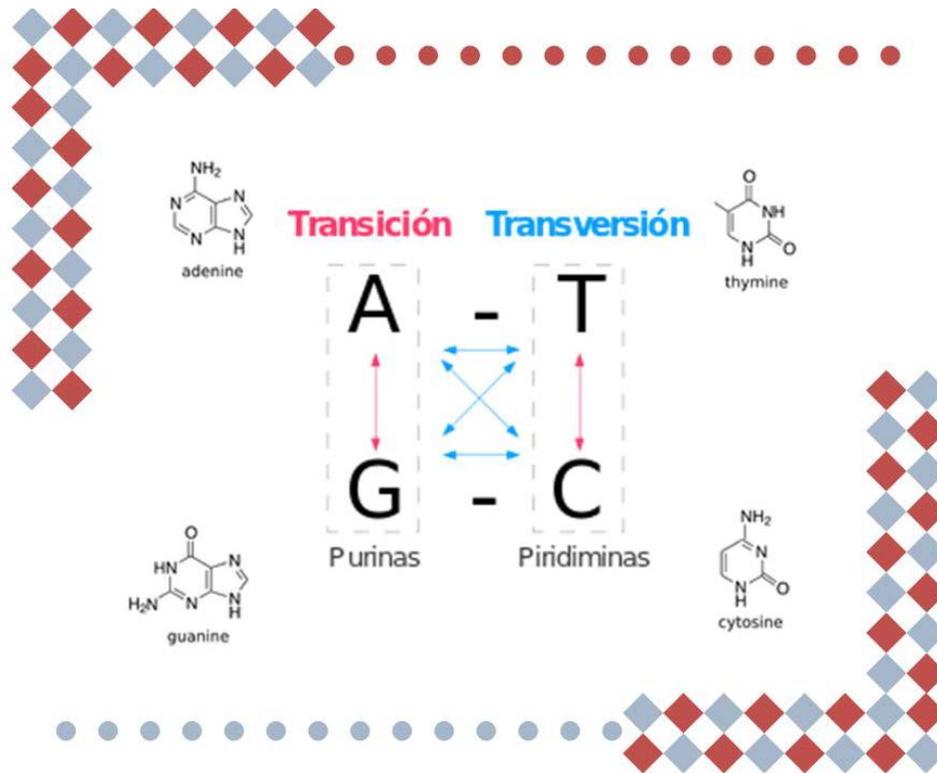


FIGURA 12 | Mutaciones génicas del tipo transición-transversión. Figura de autoría propia.

### g) Polimorfismos

Los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia, un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones,

cambios en el número de secuencias repetidas) cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP, del inglés Single Nucleotide Polymorphism) (Checha-Caratechea, 2007).

Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido; a este tipo de SNP's se les conoce como "no sinónimos". Puesto que este tipo de SNP's afecta directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones (Botstein, et al., 2003). Asimismo, existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de "*splicing*" (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas (Checha-Caratechea, 2007).

Los polimorfismos genéticos pueden ser usados como marcadores para ayudar a esclarecer ciertos patrones y/o procesos biológicos. Los estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades; a partir de esto han surgido pruebas directas e indirectas para el estudio de genes candidatos. En un estudio de prueba directa, el supuesto SNP responsable de una enfermedad es genotipificado directamente. El reto de este tipo de estudios es predecir o determinar *a priori* cuáles SNP's son los responsables del fenotipo de interés (Checha-Caratechea, 2007). Los estudios indirectos de asociación genética difieren de las pruebas directas porque el estudio de los SNP's no son probados directamente, pues este tipo de estudios se basa en un análisis de ligamiento genético el cual utiliza "marcadores neutrales", y no hace predicciones sobre la localización del gen responsable de la enfermedad en estudio (Crawford, et al., 2005).

#### ***h) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula (Serrato, et al., 2014). Esta invención hizo acreedor a Kary B. Mullis en 1993 del Premio Nobel en Química, debido al gran impacto su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico.

La técnica de PCR se basa en la replicación enzimática del ADN, en donde la enzima más importante en la replicación es la polimerasa del ADN dependiente de ADN, comúnmente conocida como ADN polimerasa, es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN, pero en este caso durante un ciclo térmico. Este consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos de la reacción de fusión del ADN (Flores, et al., 2015). Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o

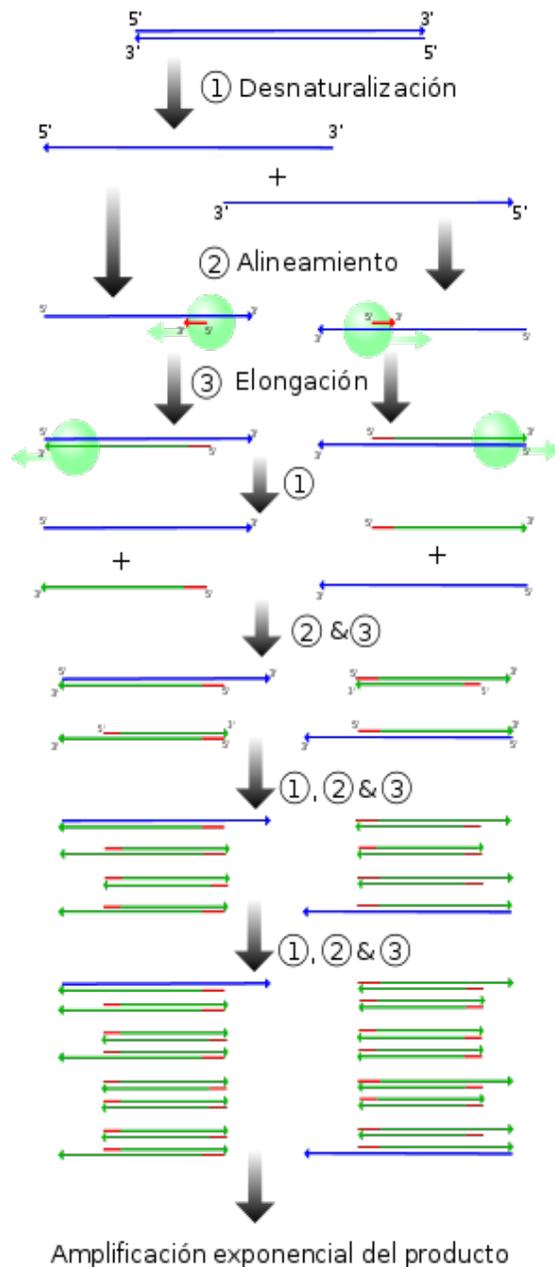


FIGURA 13 | Modelo de la reacción en cadena de la polimerasa (Serrato, et al., 2014).

et al., 2014) (FIGURA 13).

Los componentes de una reacción PCR son: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio ( $MgCl^2$ ) u otro cofactor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis (Bohinski, 1991).

separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN (Serrato, et al., 2014).

Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se requiere amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores.

Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se debe incrementar la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, que se repiten sucesivamente. En cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias (Flores, et al., 2015).

Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Flores, et al., 2015; Serrato,

En cualquier PCR es muy importante utilizar siempre un control negativo, para poder monitorear posibles contaminaciones. También es recomendable usar un control positivo, que consiste en una muestra que sabemos amplifica sin problemas bajo las condiciones establecidas. Este control es muy útil para asegurarnos que los reactivos ocupados se encuentran en condiciones apropiadas (Serrato, et al., 2014; Pierce, 2005).

**i) Secuenciación de fragmentos de ADN**

El orden que tienen los nucleótidos en el ADN es lo que se denomina secuencia y las técnicas y métodos que se utilizan para conocer esa secuencia son llamados de secuenciación (De Necochea, et al., 2004)

Conocer el orden de los nucleótidos es una herramienta con infinidad de aplicaciones porque la diferencia fundamental entre todas las moléculas de ADN que forman el material genético de los seres vivos es la secuencia de estas cuatro bases nitrogenadas (Márquez-Valdelamar, et al., 2014). En 1977 surgen dos técnicas modernas de secuenciación de ADN: la secuenciación química de Maxam y Gilbert (1977) y el método que revolucionó a la biología molecular, la secuenciación enzimática de Sanger (Sanger, et al., 1977).

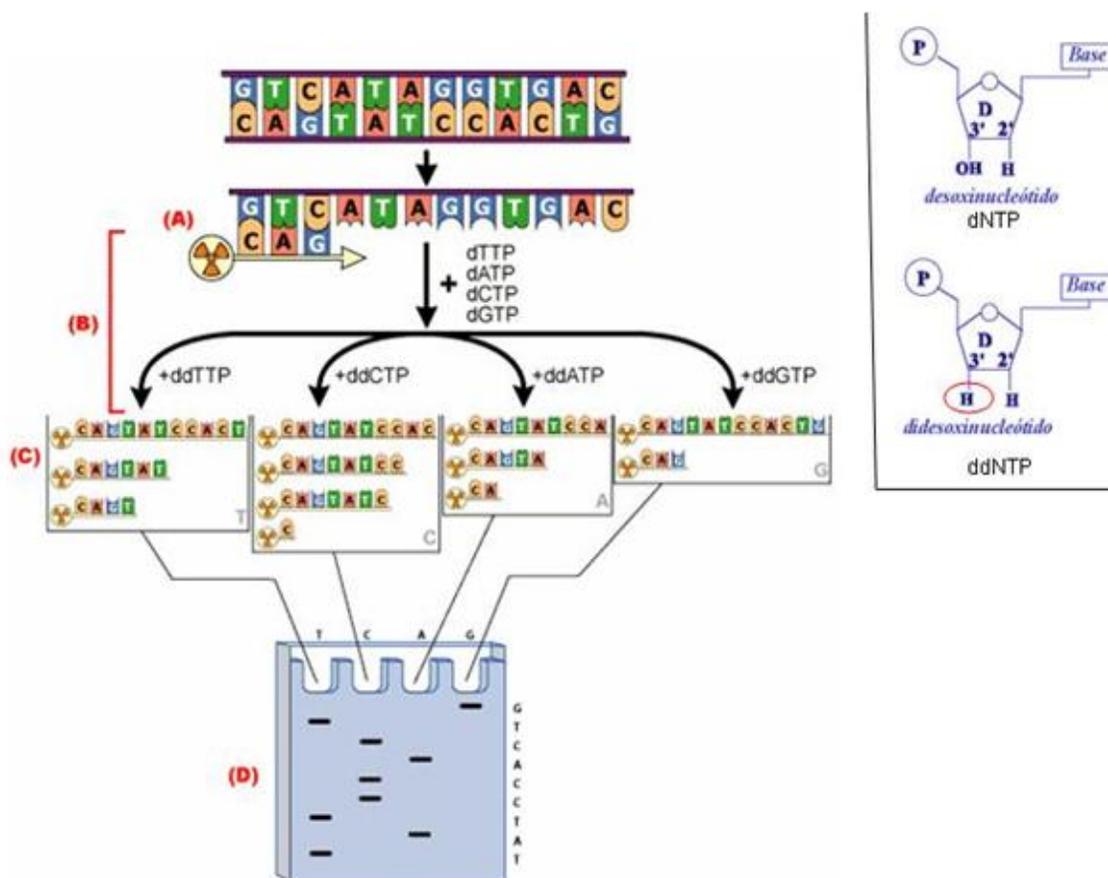


FIGURA 14 | Método de secuenciación por técnica enzimática (Márquez-Valdelamar, et al., 2014).

La técnica enzimática se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN in vitro. Se realiza una PCR del fragmento que se va a secuenciar pero, a diferencia de una PCR convencional se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxinucléotidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3' y están marcados con radiactividad o con fluoróforos (Márquez-Valdelamar, et al., 2014) (FIGURA 14). Cuando se incorpora un dideoxinucléotido a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente longitud, cada uno terminando en un ddNTPs. Posteriormente, los fragmentos obtenidos, se separan y analizan electroforéticamente de manera manual o automática (Sanger, et al., 1977; Bohinski, 1991; Márquez -Valdelamar, et al., 2014) (FIGURA 15).

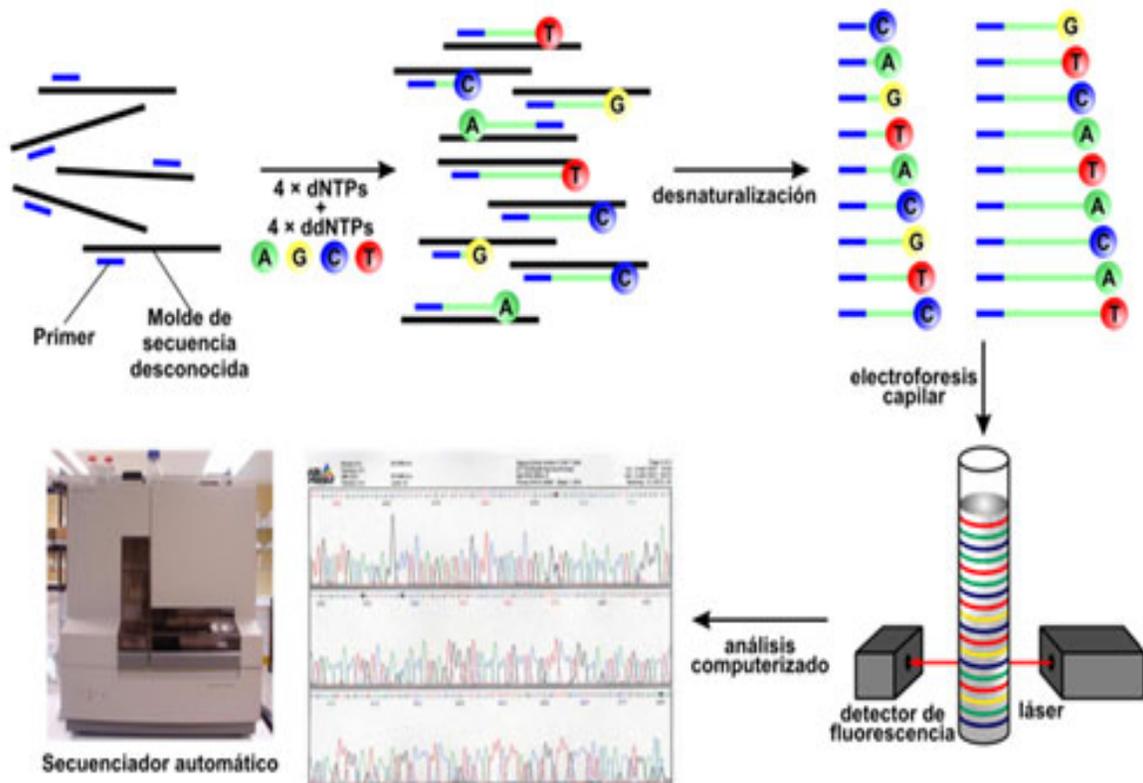


FIGURA 15 | Modelo experimental de secuenciación automatizada (Márquez-Valdelamar, et al., 2014).

Desde entonces, este método ha sido utilizado ampliamente en muchas líneas de investigación, generando tal cantidad de secuencias que a principios de los ochenta fue necesario crear bases de datos universales para resguardar la información y hacerla accesible a los usuarios (Márquez-Valdelamar, et al., 2014). En 1982, año en que se crea el Gen Bank a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI), existían

más de 2 000 secuencias y para finales del mes de agosto del 2016 esta base de datos estaba integrada por más de 196120831 secuencias.

El análisis de resultados de este tipo de técnica se hace actualmente mediante la interpretación de los electroferogramas que son gráficos que arroja el secuenciador después de analizar la electroforesis. Éste muestra el orden de las bases a partir de curvas de fluorescencia, una por cada base, y se puede visualizar en programas como Chromas y BioEdit que se obtienen de manera gratuita en internet (Márquez-Valdelamar, et al., 2014). Es importante revisar los electroferogramas antes de continuar con los análisis de la muestra debido a que nos dan mucha información, incluyendo la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos. Dependiendo del propósito del estudio, lo siguiente es generar hipótesis de homología de las bases al comparar y alinear las secuencias entre los organismos secuenciados (De Necochea, et al., 2004). En un proceso de alineación de secuencias, el mecanismo básico es simplemente colocar en la misma posición a todas las bases. Para esto se utilizan programas de cómputo como CLUSTAL X que es el más usado. Esta herramienta se incluye en los diversos programas de edición de secuencias como BioEdit.

Una de las grandes ventajas al trabajar con secuencias es que el ADN se encuentra en todas las células de los organismos y se puede recuperar de tejido vivo o muerto. La principal desventaja de esta técnica es el costo; sin embargo, los avances tecnológicos la hacen cada vez más barata, por ejemplo los secuenciadores son cada vez más precisos y solo requieren de cantidades mínimas de reactivos para obtener un buen resultado (De Necochea, et al., 2004; Márquez-Valdelamar, et al., 2014).

## j) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al gran impacto que ha adquirido la RD en los últimos años alrededor de todo el mundo se han realizado estudios que permitan comprender la relación que tiene esta complicación con la población diabética. Estudios realizados como el de la M.C Saldaña Rivera se puede evidenciar la presencia de polimorfismos con una posible asociación con el fenotipo de RD, por los cuales se decidió realizar el seguimiento de estos a través de la presente tesis.

De esta manera el trabajo pretende analizar los resultados obtenidos en conjunto con dicho trabajo para evaluar la asociación potencial de polimorfismos en la región hipervariable 2 (HV2) de ADN mitocondrial con el fenotipo de un grupo control de pacientes sanos (n=59) el cual puede ser comparado con un grupo de diabéticos que presentan retinopatía diabética (n=51) y otro grupo que no la presente (n=59).

## k) HIPOTESIS

Sí en estudio de los polimorfismos presentes en la región HV2 del ADN mitocondrial con el fenotipo de un grupo control y con un grupo de diabéticos con y sin retinopatía diabética se observará una posible asociación, entonces esta puede ser establecida mediante la comparación de las frecuencias que presenten dichos grupos de estudio.

## l) OBJETIVOS

### *Objetivo general*

- Estudiar la asociación potencial de polimorfismos en la región HV2 de ADN mitocondrial con el fenotipo de un grupo control y de pacientes diabéticos con y sin RD mediante la secuenciación de la región HV2 así como la implementación de análisis bioinformático y estadístico para determinar dicha asociación mediante las frecuencias obtenidas.

### *Objetivo particular*

- Realizar una comparación de los resultados clínicos obtenidos durante el trabajo de (Saldaña, 2014) de ambos grupos de estudio.

## **II. PLAN DE INVESTIGACIÓN**

### **A. TIPO DE ESTUDIO**

El estudio presente se considera un estudio genético de asociación, debido a que el enfoque utilizado para este tipo de análisis se basa en la comparación de la frecuencia del alelo estudiado en pacientes no relacionados con controles emparejados.

### **B. POBLACIÓN DE ESTUDIOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

En el presente estudio se realizó sobre un grupo de 59 individuos los cuales cumplían con las características de un grupo control, mientras que el grupo diabético con el que se trabajó consta en total de 110 pacientes de los cuales 51 de ellos presentaban RD mientras que los 59 restantes no tenían RD. Los individuos que participaron fueron militares y derechohabientes que acudieron a la consulta externa de Oftalmología en la Unidad de Especialidades Médicas y a consulta externa en el gabinete de Retina del Hospital Central Militar en el periodo comprendido de mayo a septiembre de 2013 (Saldaña Rivera 2014).

Conforme a las muestras utilizadas en el estudio estas fueron otorgadas por el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad las cuales de acuerdo a los criterios que establece el consentimiento informado cada uno de los individuos participantes fueron informados sobre las complicaciones o riesgos que pudieran presentarse durante o después en el estudio; además se les informó sobre la privacidad de los datos personales. Su participación voluntaria se acentuó con su firma en la hoja de consentimiento informado expedirá en el año 2013. Ver anexo 1

### C. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL

A continuación se muestran los pasos secuenciales de los procedimientos realizados en la realización del proyecto (FIGURAS 16-21).

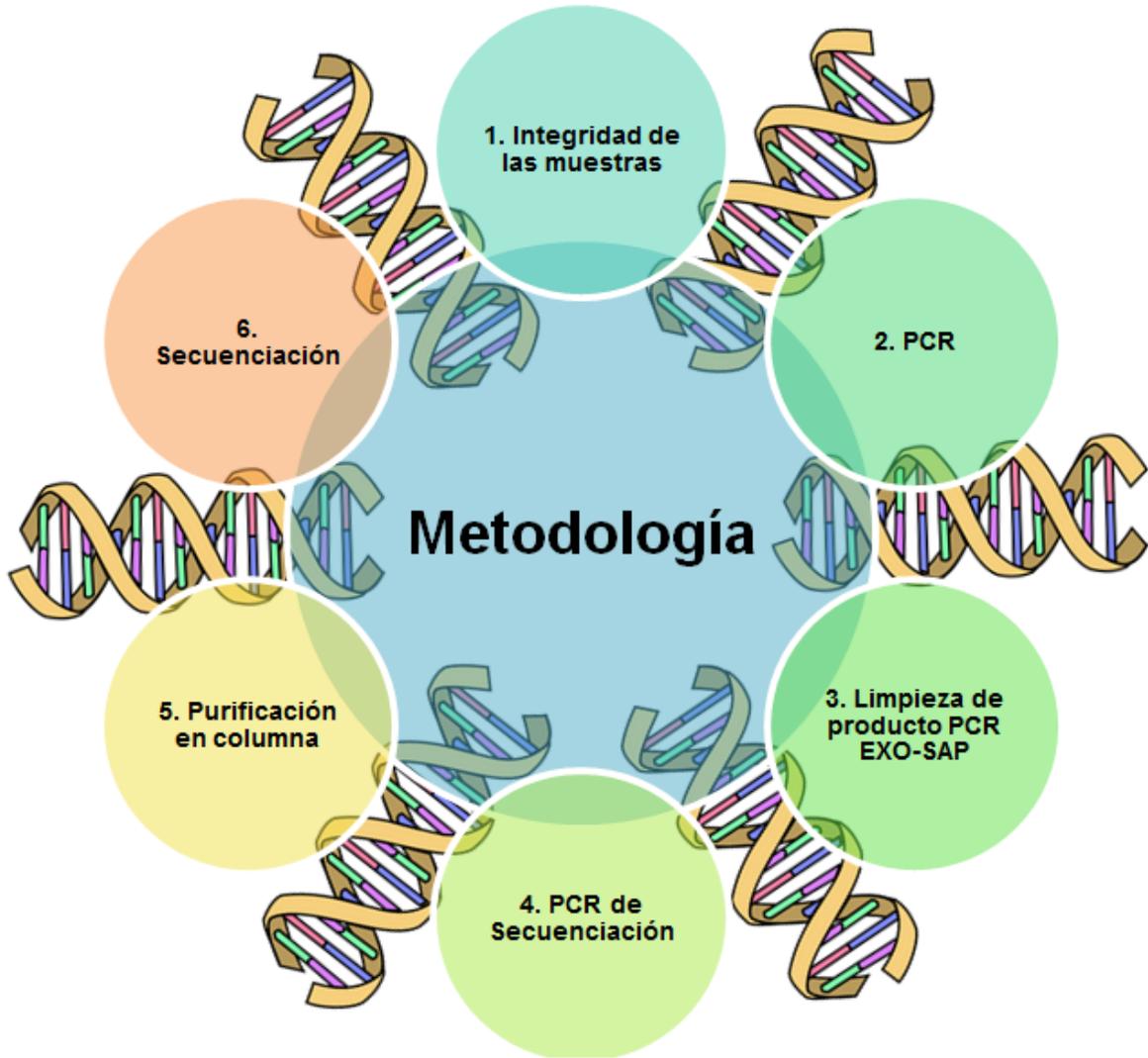


FIGURA 16 | Metodología general del proyecto de investigación.

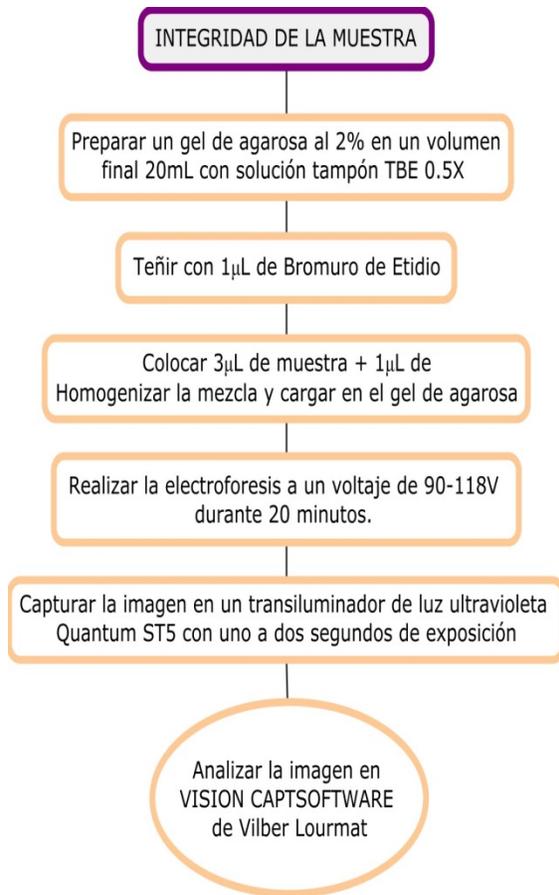
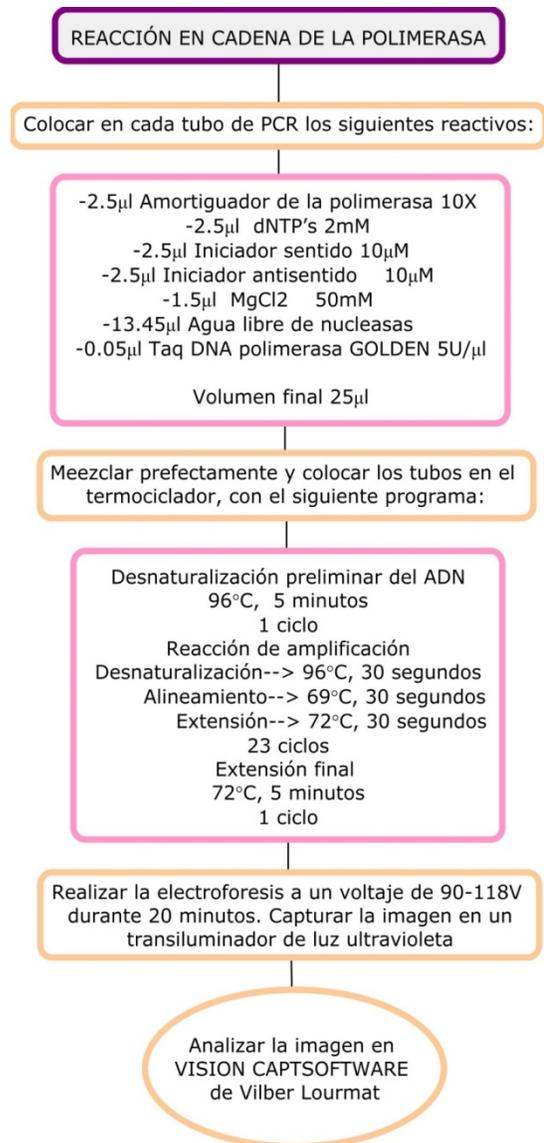


FIGURA 18 | Diagrama de flujo para la Reacción en cadena de la Polimerasa de la región HV2

FIGURA 17 | Diagrama de flujo de la metodología a seguir para la verificación de la integridad de muestra.



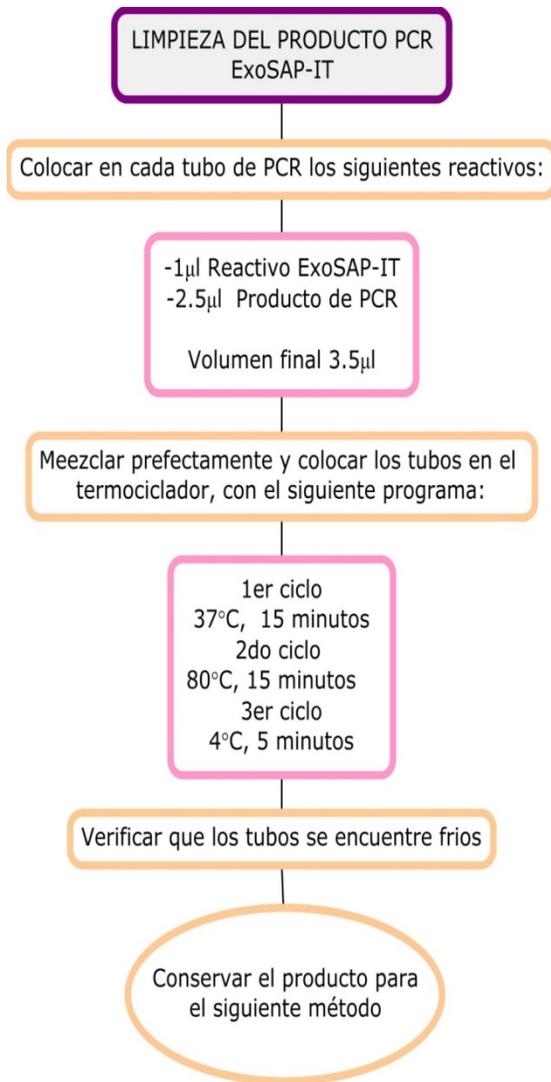


FIGURA 19 | Diagrama de flujo para la limpieza del producto obtenido de PCR HV2 por el método de ExoSAP-IT

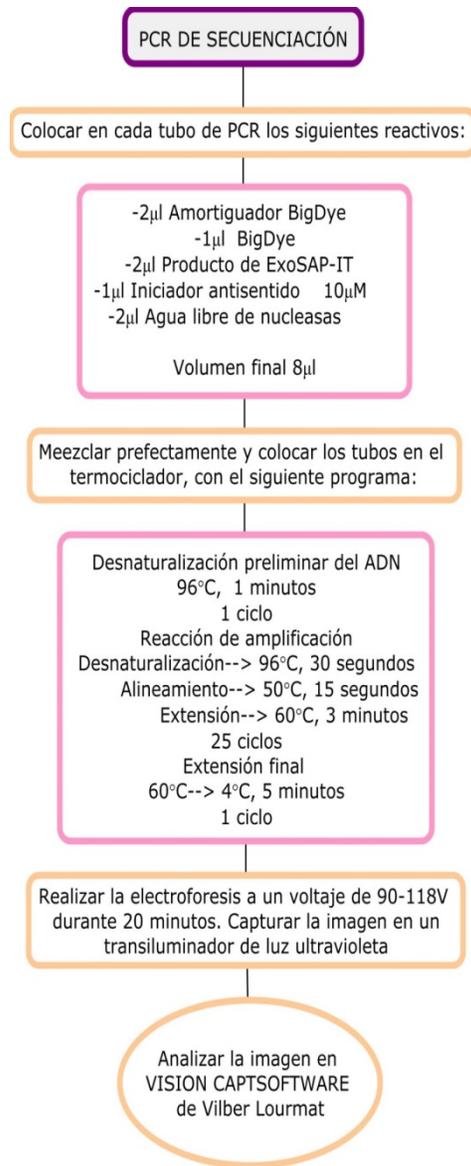


FIGURA 20 | Diagrama de flujo para PCR de secuencias de la HV2

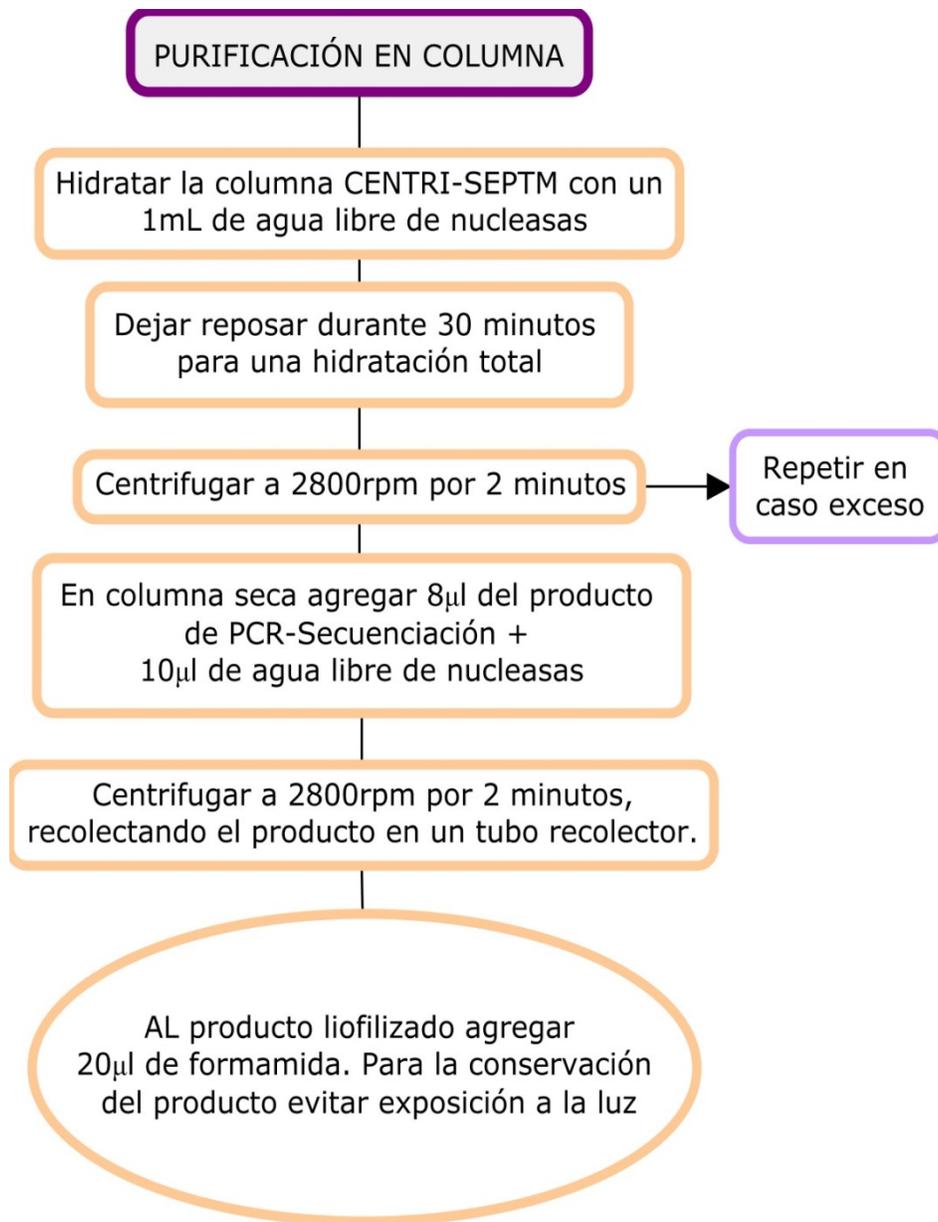


FIGURA 21 | Diagrama de flujo para la etapa de purificación del producto de PCR de secuenciación en columna

## D. MATERIALES Y MÉTODOS

### *i. Evaluación de la integridad de las muestra de ADN genómico.*

Para evaluar la integridad de las muestras utilizadas, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio usando como solución tampón TBE 0.5X (Tris 54g, ácido bórico 27.5g y 20ml de EDTA a 0.5M (pH 8.0)) sometido a un voltaje de 90-118V durante 20 minutos (FIGURA 22).

La fotografía del gel se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta Quantum ST5 con uno a dos segundos de exposición, los geles se leyeron con ayuda del programa VISION CAPT SOFTWARE de Vilber Lourmat.



FIGURA 22 | Materiales utilizado durante la evaluación de la integridad del ADN mitocondrial. a) Cámara de electroforesis, fuente de poder con voltaje constante, claves corriente. b) Software Vision-Capt. c) Transiluminador de luz ultravioleta Quantum ST5

### *ii. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR punto final) para amplificación de las regiones hipervariables 2 del ADN mitocondrial*

La amplificación de HV2 se realizó a través de PCR punto final. Donde se utilizaron los primers que sugiere la publicación de Butler (2005) para la amplificación de HV2. Se puede apreciar las secuencias utilizadas en los primers en la FIGURA 23.

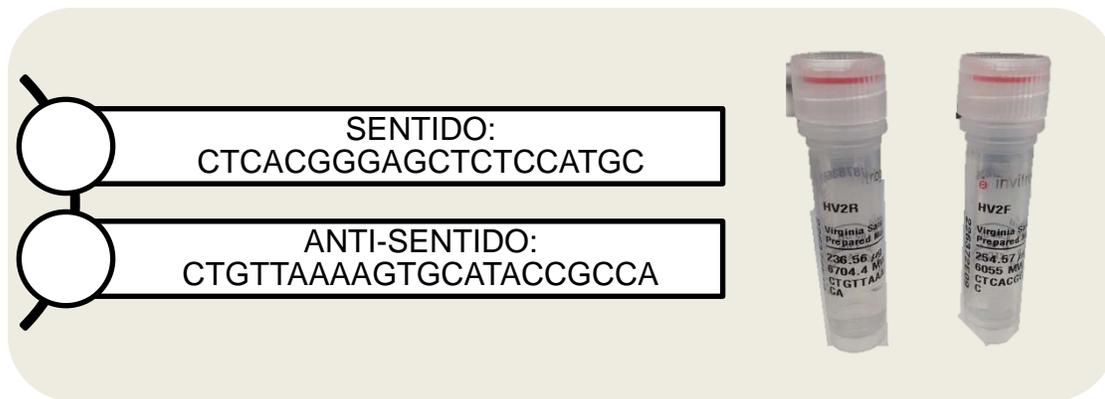


FIGURA 23 | Secuencias utilizadas para la amplificación de HV2

Las condiciones a las cuales se efectuó la PCR para la amplificación de HV2 se presenta a continuación (TABLA 1), además de que en la FIGURA 24 se pueden observar los materiales utilizados:

TABLA 1 Condiciones de reacción para la amplificación de HV2

Reactivo	Concentración del stock	Volumen requerido para 25µl	Concentración final
Amortiguador de la polimerasa	10X	2.5µl	1X
dNTP's	2mM	2.5µl	0.2mM
Iniciador sentido	10µM	2.5µl	1µM
Iniciador antisentido	10µM	2.5µl	1µM
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5µl	3mM
Agua bidestilada	----	13.45µl	----
Taq DNA polimerasa GOLDEN	5U/µl	0.05µl	0.01U/µl

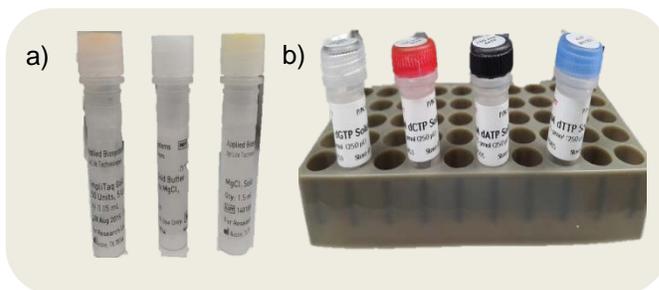


FIGURA 24 | Material utilizado en la amplificación de HV2. a) Kit de amplificación GOLDEN: AmpliTaq Golden, MgCl<sub>2</sub> Buffer y MgCl<sub>2</sub> 50mM b) Kit de dNTP's .

Las temperaturas y el número de ciclos que se usaron para la reacción de PCR se muestran en la FIGURA 25.

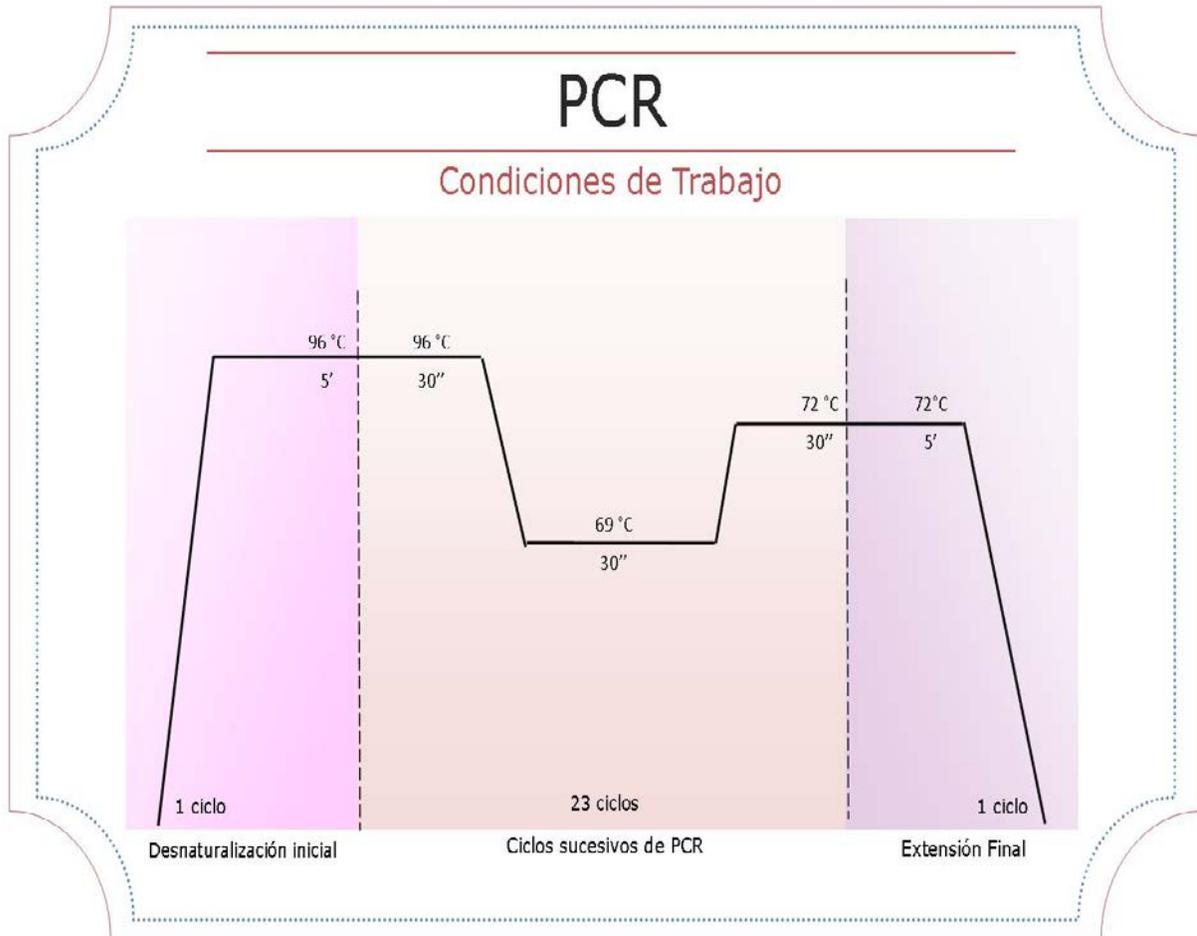


FIGURA 25 | Condiciones del programa para PCR

### iii. Comprobación del producto de PCR

Para corroborar el éxito de la amplificación de HV2 se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio, usando como solución tampón TBE al 0.5X (Tris 54g, ácido bórico 27.5g y 20ml de EDTA a 0.5M (pH 8.0)) sometido a un voltaje de 90-100V durante 20 minutos. La fotografía del gel se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta Quantum con la ayuda del programa VISION CAPT SOFTWARE de Vilber Lourmat.

### iv. Limpieza de productos de PCR

Con la finalidad de evitar que los remanentes de los primers y de los desoxirribonucleótidostrifosfato en el producto de PCR interfirieran con la reacción de secuenciación, se los eliminó usando el reactivo ExoSAP-IT (Affymetrix®), que se basa en

el uso de dos enzimas hidrolíticas, una exonucleasa I que degrada los iniciadores residuales y una fosfatasa alcalina de camarón que hidroliza los dNTP's excedentes. Las condiciones a las cuales se efectuaron la reacción de ExoSAP-IT (TABLA 2), así como las temperaturas y el número de ciclos (FIGURA 26) que se usaron se presenta a continuación:

TABLA 2 Condiciones utilizadas para la reacción de Exo-SAP-IT

Reactivo	Cantidad
<b>ExoSAP-IT (Affymetrix®)</b>	1 µl
<b>Producto de PCR</b>	2.5 µl
<b>Temperaturas</b>	
1 ciclo → 37° → 15 minutos	
1 ciclo → 80° → 15 minutos	
1 ciclo → 4° → 5 minutos	

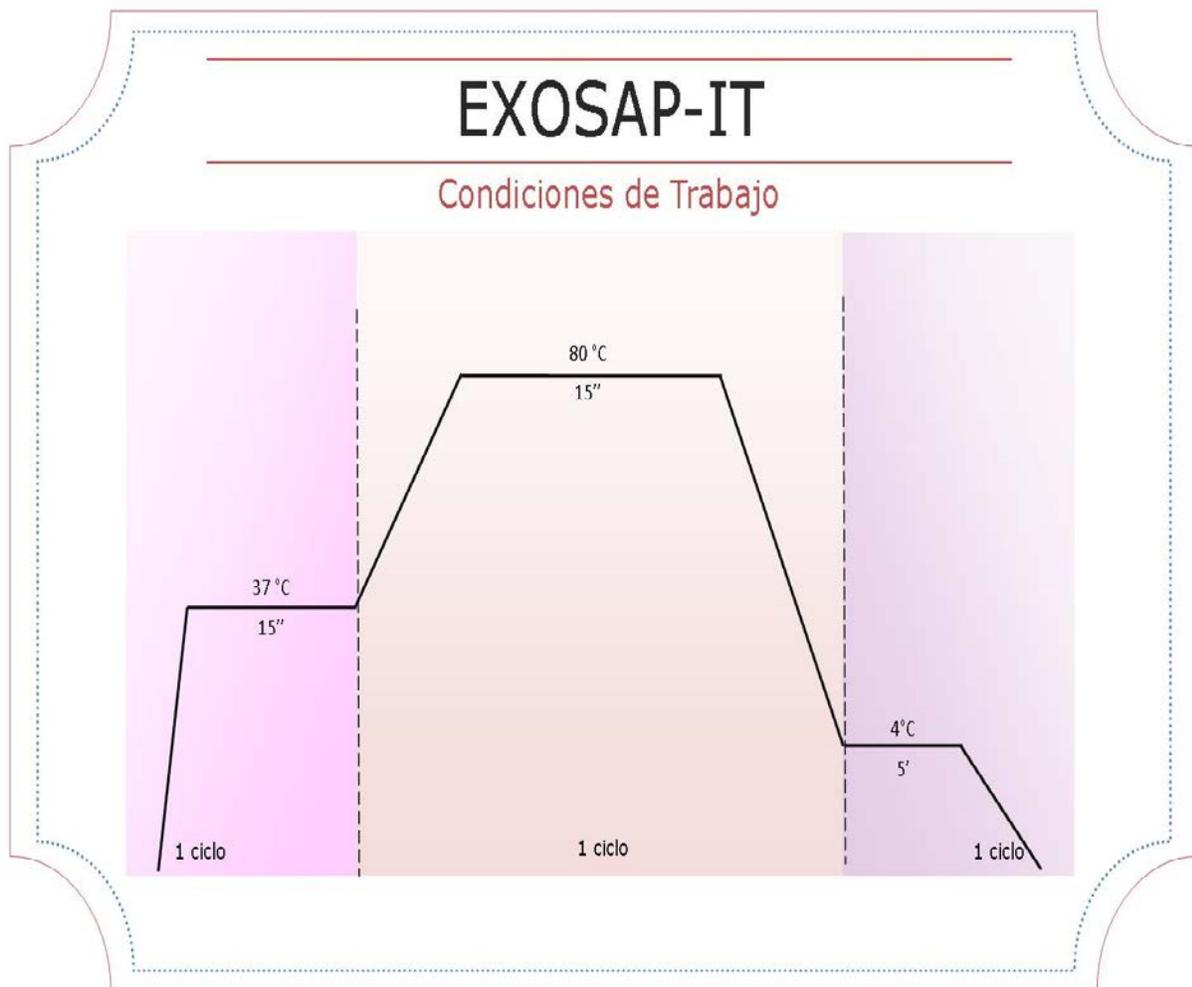


FIGURA 26 | Condiciones del programa para reacción ExoSAP-IT

### v.Reacción de secuencia

La reacción de secuencia se fundamentó en el método enzimático de Sanger. Se utilizó BigDye® terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) (FIGURA 27), que contiene análogos dideoxirribonucleótidos marcados con fluoróforos con espectros de emisión diferentes de la familia dicloro rodamina (dRodamina) que se incorporan a la hebra creciente de ADN, actuando como terminadores, generando fragmentos de ADN de diferentes longitudes marcados con diferente color en el extremo 3'. Este sistema incluye, además, una mezcla del resto de los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR (amortiguador de la polimerasa, los cuatro dNTP's, y la AmpliTaq® DNA polimerasa). Las condiciones para llevar a cabo la reacción de secuencia se muestran en la TABLA 3.

TABLA 3 Condiciones empleadas para la reacción de secuencia de HV2

Reactivo	Cantidad
BigDye® Terminator (mezcla de reacción) (AppliedBiosystems)	1µl
Amortiguador BigDye®	2µl
Iniciador antisentido (10µM)	1µl
Agua bidestilada	2µl
Producto de PCR sometido a limpieza con ExoSAP-IT	2µl



FIGURA 27 | Material utilizada para la reacción de Secuencia. a) Termociclador, b) Reactivo BigDye® y c) Tubos de PCR rotulados para la reacción de secuencia. y c) Tubos de PCR rotulados para la reacción de secuencia.

La mezcla de reacción se sometió a diferentes temperaturas y ciclos los cuales se encuentran representados en el FIGURA 28.

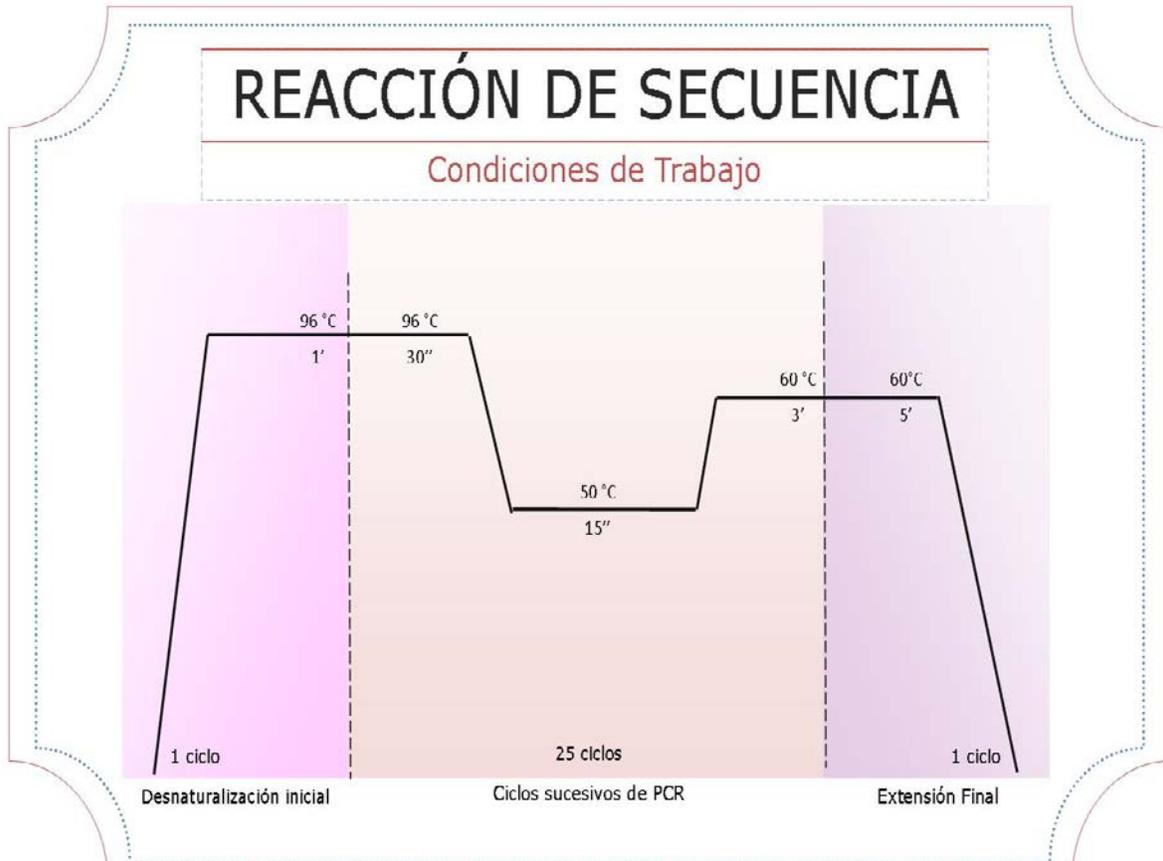


FIGURA 28 | Condiciones del programa para reacción de secuenciación

vi. *Limpieza de los productos de reacción de secuenciación*

La limpieza se realizó con las columnas CENTRI-SEP™ (Life Technologies™), cuyo diseño está basado en el procedimiento de filtración por gel para la purificación del ADN, dichas columnas fueron hidratadas con 1 mL de agua bidestilada, dejando reposar la columna por 30 minutos. Para eliminar el exceso de agua se centrifugó a 2800 rpm por 2 minutos en EPPENDERT-CENTRIFUGE 5418. Antes de someter el fragmento de ADN marcado que obtuvimos de la reacción de secuenciación por la columna se procedió a diluir la muestra con agua bidestilada (10µl). El paso de la muestra diluida a través de la columna elimina los terminadores marcadores que no se incorporaron a las hebras de ADN sintetizadas, el exceso de moléculas de bajo peso molecular y el exceso de sales ya que pueden interferir durante la secuenciación automatizada que es leída por un fluorómetro.

Posteriormente se procedió a evaporar el agua de la muestra mediante un concentrador centrífugo de vacío (LABCONCO) durante 20 minutos. Después se suspendió con 20µl de formamida (HCONH<sub>2</sub>). Se resguardaron los productos finales en tubos rotulados, en un cuarto oscuro para evitar el contacto de la luz con la muestra a una temperatura de 3.5°C.

*vii. Secuenciación automatizada*

Las muestras obtenidas al final del procedimiento fueron transferidas al Laboratorio de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo el cargo de la Dra. Alejandra Serrato Díaz, las muestras fueron sometidas a la secuenciación automatizada en un secuenciador automático de DNA, ABI PRISM 3100 Avant. Los resultados obtenidos fueron entregados vía electrónica con la aprobación de la Dra. Serratos.

### III. RESULTADOS

#### a) Pruebas clínicas

Uno de los objetivos del trabajo está enfocado en la comparación de los resultados clínicos de ambos grupos, tal como se puede apreciar en la TABLA 4 el grupo control no presenta niveles elevados de glucosa, colesterol y triglicéridos caso contrario al grupo de diabéticos.

TABLA 4 Características clínicas de la población control en comparación con la población diabética

Variable	Controles (n=59)	Diabéticos (n=110)	Valores de referencia*
Edad (años)	63.57 ± 9.24	61.08 ± 8.86	55 - 84
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	28.53 ± 5.16	27.99 ± 4.4	18.5 – 24
Glucosa (mg/dl)	93 ± 10.79	144 ± 61.1	70 -99
Hemoglobina glucosilada (HbA1c) (%)	6.05 ± 0.70	7.59 ± 1.82	4 – 5.6
Triglicéridos (mg/dl)	144 ± 74.51	215 ± 103.45	<250
Colesterol (mg/dl)	184 ± 43.16	195 ± 40.34	<200

\*Los valores de referencia utilizados provienen de los establecidos en el Hospital Central Militar, Unidad de Especialidades Médicas-Oftalmología.

## b) Integridad del ADN genómico

A continuación se presenta la FIGURA 29 la cual representa los resultados obtenidos durante la inspección de la integridad del material genético de las muestras del grupo control.

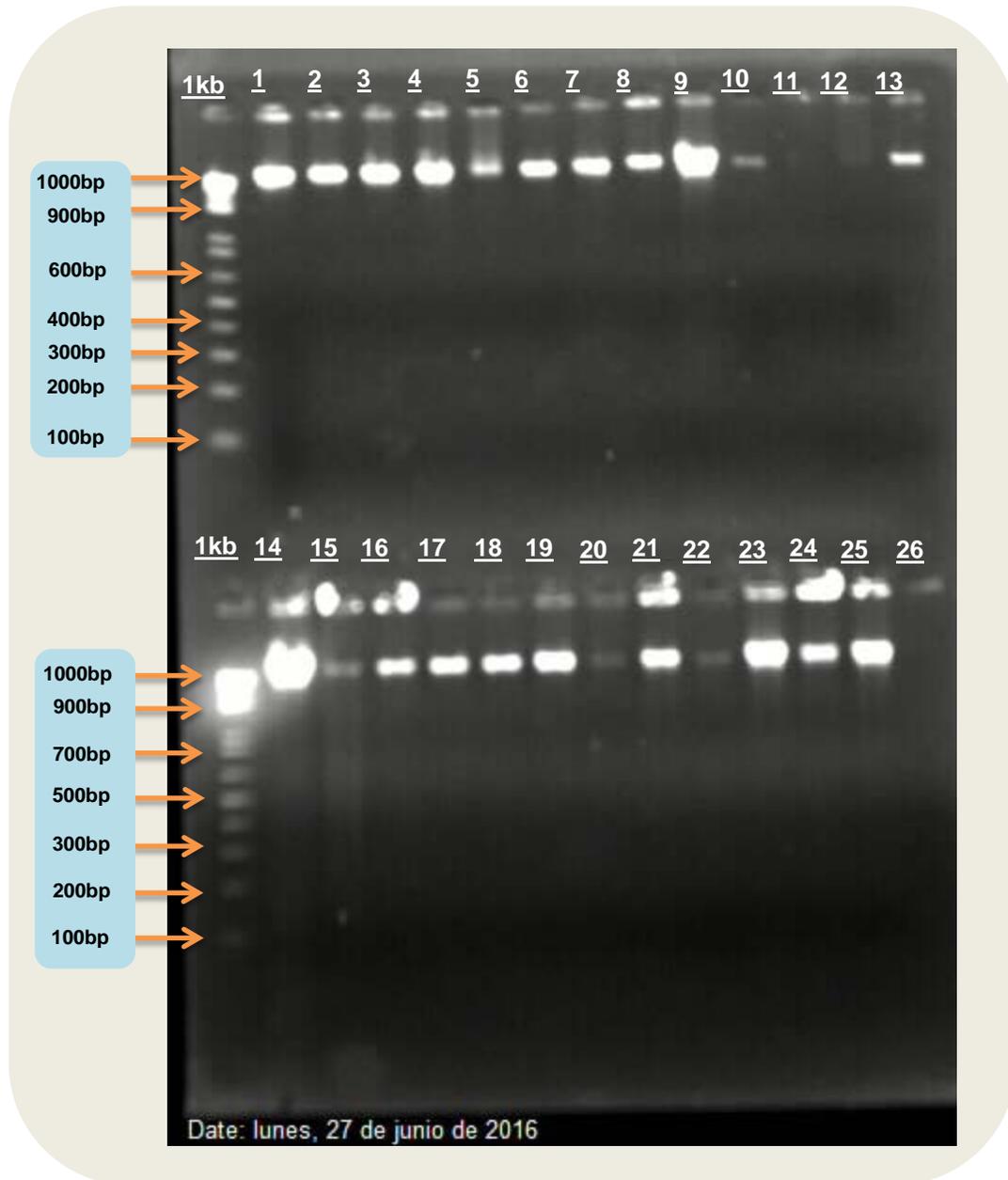


FIGURA 29 | Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio del ADN genómico de individuos control. En el primer carril izquierdo que ambas partes se encuentra el marcador de peso molecular de 1Kb, posteriormente tenemos las muestras de ADN genómico desde el carril 1 al 26 con muestras representativas del grupo control analizadas en el presente trabajo-

### c) Productos de amplificación de la región HV2

Uno de los pasos importantes es la obtención del producto de amplificación de la región HV2, como se puede observar en la FIGURA 30 el fragmento obtenido es de 529pb, un producto de amplificación adecuado para el estudio de la región HV2.

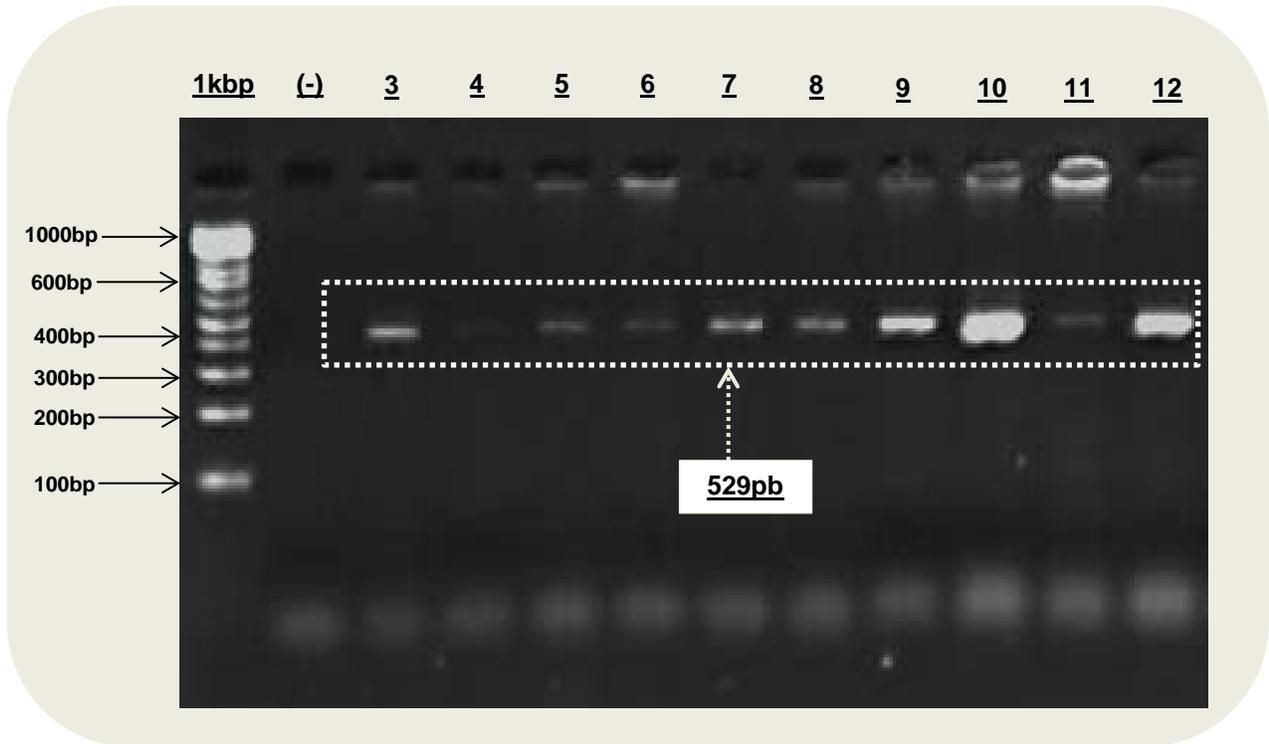


FIGURA 30 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio del producto de PCR punto final para la región hipervariable 2 del grupo de individuos control. En el primer carril, de izquierda a derecha, se encuentra el marcador de tamaño molecular de 1kbp. Control negativo en el carril 2. En los carriles del 3 al 12 se encuentran los amplicones de HV2 (370 pb) con muestras representativas del grupo control.

#### d) Secuenciación de HV2

Los resultados obtenidos a partir de la reacción de secuenciación de Sanger son representados en electroferogramas como el exhibido en la FIGURA 31.

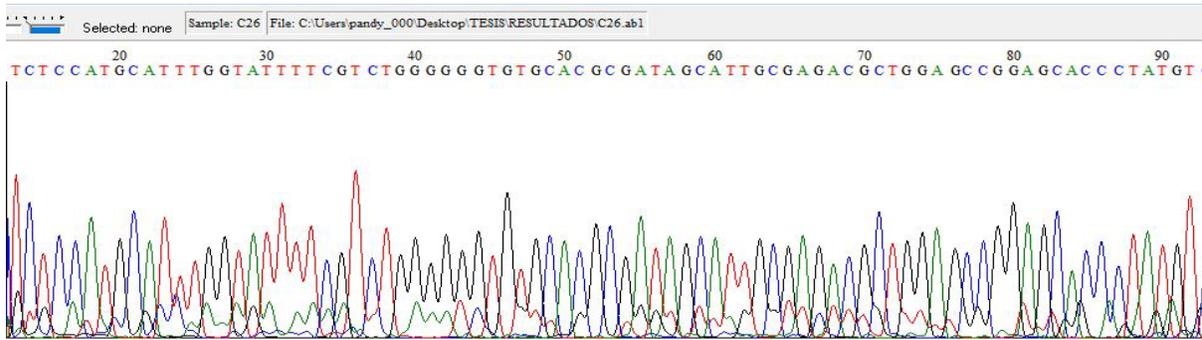


FIGURA 31 | Electroferograma de un fragmento de 80pb de la región hipervariable 2, muestra C26.

#### e) Alineamientos Secuencia de ANDERSON (rCSR)- población estudio.

A continuación se presenta una serie de figuras que dan ejemplo de los principales y nuevos SNP encontrados en ambas poblaciones, comparando las secuencias obtenidas de los grupos de estudiados con la Secuencia de referencia de ANDERSON revisada (rCSR). (FIGURA 32- 37).

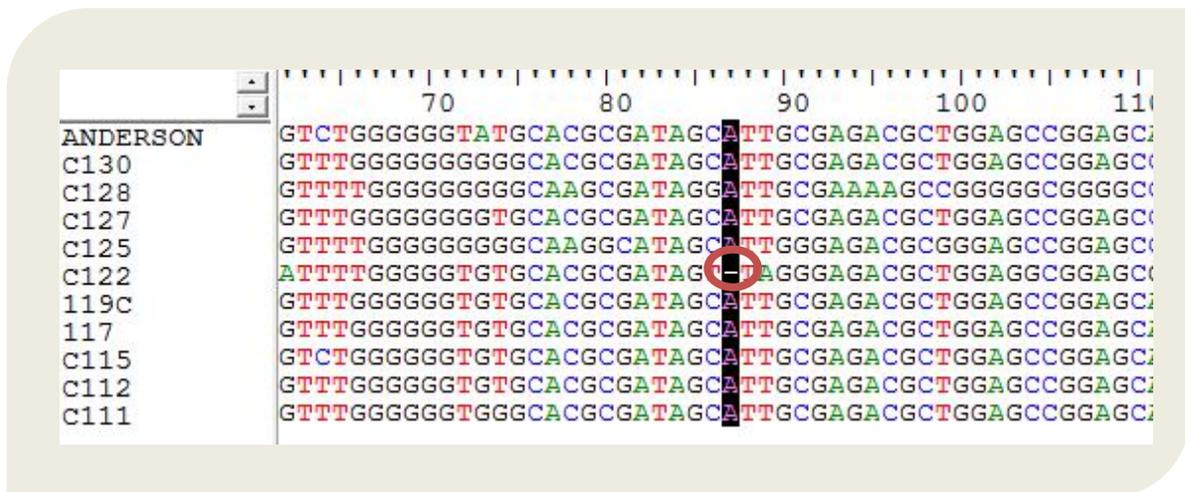


FIGURA 32 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) -Muestras control de HV2. Posición de la base 87 sombreada, en donde podemos observar A87d en la muestra C122. Tipo de alineamiento: ClustalW Multiple Alignment. Programa: BioEdit Sequence Alignment Editor.

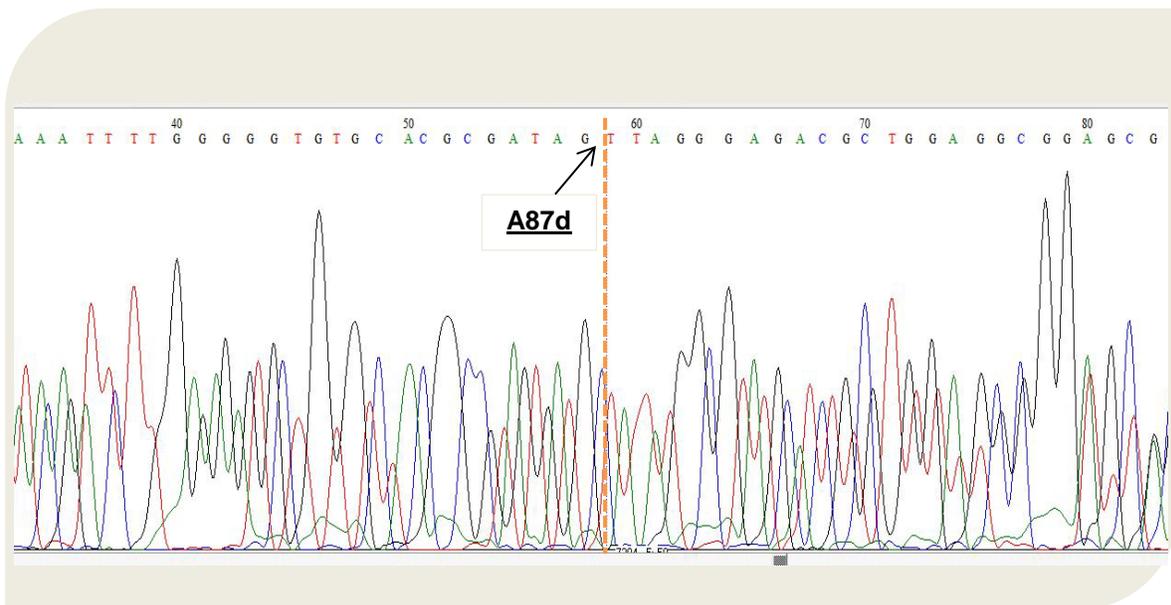


FIGURA 33 | Electroferograma de la muestra C122 (grupo control) donde se aprecia la delección de Adenina en la posición 87 (A87d).

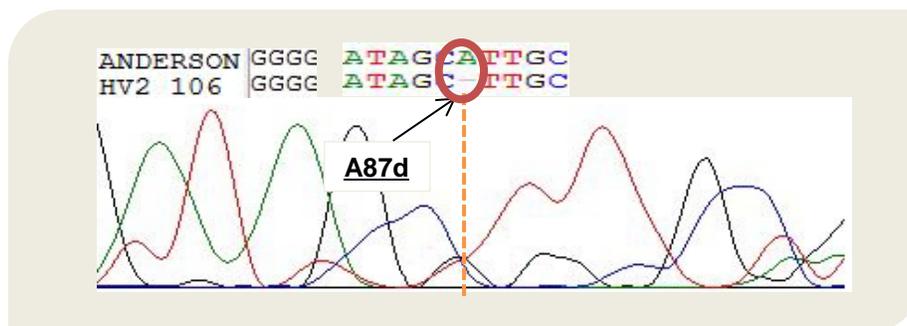


FIGURA 34 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) -Grupo Diabético sin RD. Señalado se encuentra la posición 87 en la cual se observa la presencia de A87d en la muestra HV2\_106; en la parte inferior se observa el electroferograma que corrobora la ausencia de Adenina.

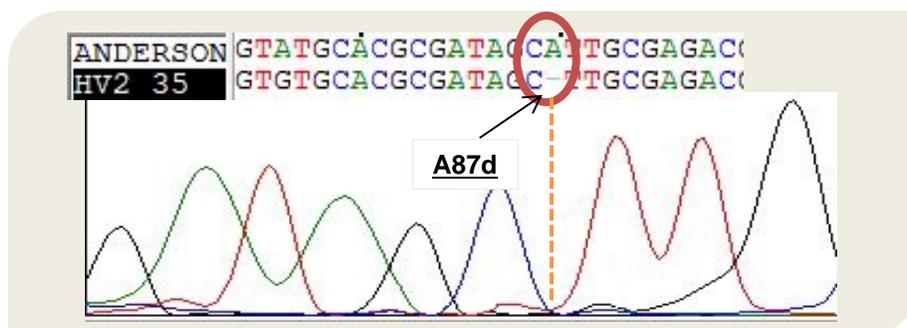


FIGURA 35 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) -Grupo Diabético con RD. Señalado se encuentra la posición 87 en la cual se observa la presencia de A87d en la muestra HV2\_35; en la parte inferior se observa el electroferograma que corrobora la ausencia de Adenina.

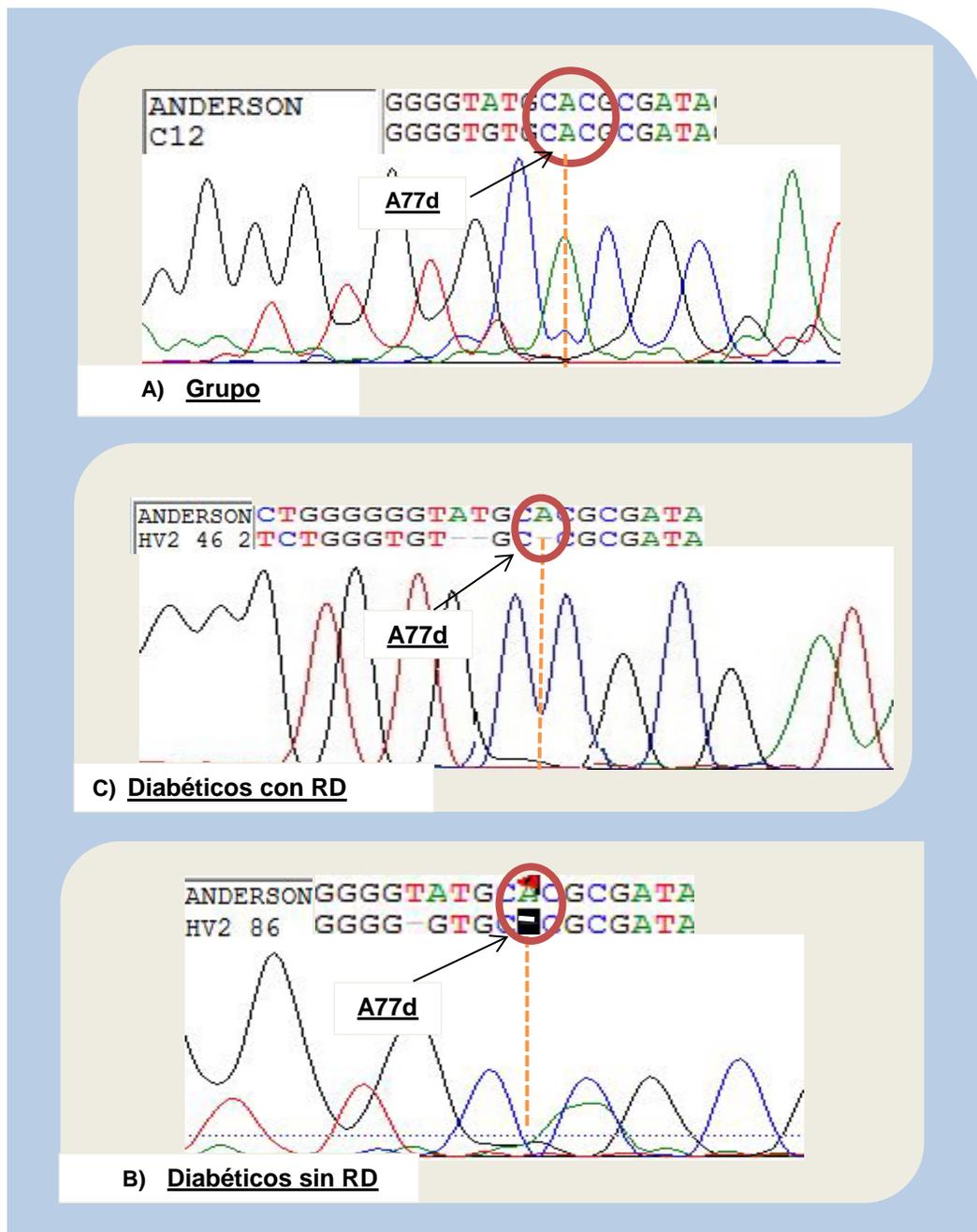
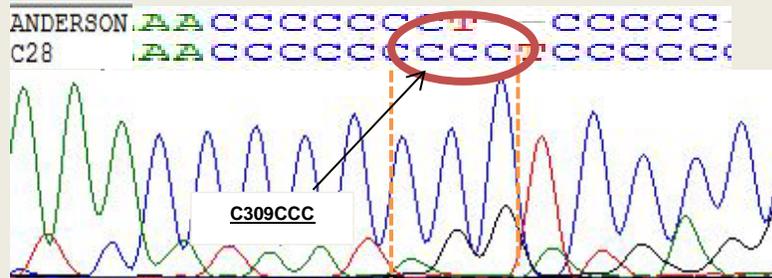
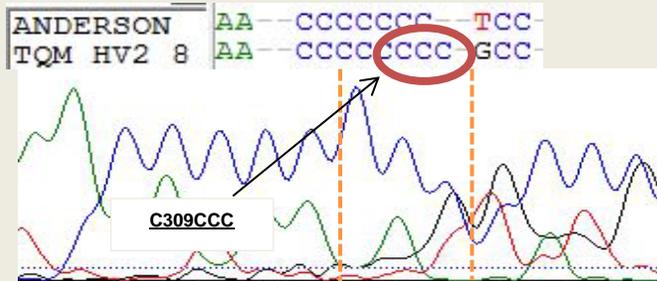


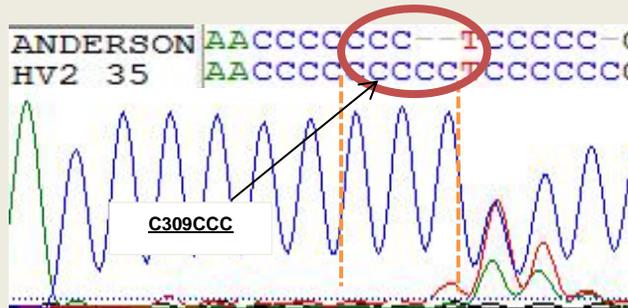
FIGURA 36 | Alineamiento de secuencia ANDERSON (rCSR) – Grupos de estudio. A) Grupo control: Señalado se encuentra la posición 77; Parte inferior se observa el electroferograma que corrobora la ausencia del polimorfismo. B) Grupo Diabético con RD. Señalado se encuentra la posición 77 en la cual se observa la presencia de A77d en la muestra HV2\_46; en la parte inferior se observa el electroferograma que corrobora la ausencia de Adenina en esa posición. C) Grupo Diabético sin RD muestra HV2\_86; posición de 77b sombreada se observa la ausencia de adenina en esa posición. Electroferograma: línea punteada señala la posición en la cual existe la ausencia de adenina.



A) Grupo Control



B) Diabéticos sin RD



C) Diabéticos con RD

FIGURA 37 | Alineamientos de secuencia ANDERSON (rCSR) vs Grupos de estudio dirigido a la posición de C309. Electroferograma: líneas punteadas señalan la posición en la cual existe C309CCC. A) grupo control: muestra C28, B) Diabéticos sin RD: muestra TQM HV2\_8, C) Diabéticos con RD: muestra HV2\_35.

Existen una serie de datos que nos ayudan a determinar si los alineamientos realizados son fidedignos, en la TABLA 5 se tienen dichos datos obtenidos de la herramienta bioinformática BLAST.

TABLA 5 Promedios obtenidos de los resultados estadísticos de los alineamientos con BLAST.

GRUPOS DE ESTUDIO	Max score	Total score	Query cover	E-VALUE	% Identidad
CONTROLES (n=59)	529	529	87%	3E-28	94%
DIABÉTICOS (n=110)	370	370	91%	-	96%

#### f) Estadísticos de asociación de las variantes genéticas estudiadas

Por último tenemos los resultados estadísticos de las frecuencias de las variantes genéticas estudiadas así como su relación con el fenotipo de RD; la TABLA 6 muestra las frecuencias de las variantes en los grupos de estudio, en donde se puede observar un incremento de las variantes A77d y A87d en el grupo de los pacientes diabéticos y en particular de aquellos son RD. Mientras que la variante C309CCC es más frecuente en el grupo control.

En la TABLA 7 se confirma la asociación de las variantes A77d y A87d como protectoras al fenotipo de RD y finalmente la TABLA 8 demuestra la asociación de las variantes A77d y A87d al fenotipo de DM.

TABLA 6 Frecuencias de las variantes genéticas estudiadas en los grupos de estudio.

GRUPO DE ESTUDIO	A77d	A87d	C309CCC
CON RETINOPATIA DIABETICA (N=51)	10/51 (19.6%)	4/51(7.8%)	7/51(13.7%)
SIN RETINOPATIA DIABETICA (N= 59)	32/59 (54.2%)	17/59 (28.8%)	10/59 (16.9%)
CONTROL (N=59)	0/59 (0%)	1/59 (1.7%)	27/29 (45.8%)

TABLA 7 Asociación de las variantes genéticas estudiadas con el fenotipo de retinopatía diabética.

GRUPO DE ESTUDIO	Frecuencia	OR (IC 95%)	p
<b>Variante A77D</b>			
<b>CON RETINOPATIA DIABETICA (N=51)</b>	10/51 (19.6%)	<b>0.2058 (0.0871 - 0.4865)</b>	<b>P=0.0003*</b>
<b>SIN RETINOPATIA DIABETICA (N= 59)</b>	32/59 (54.2%)		
<b>Variante A87D</b>			
<b>CON RETINOPATIA DIABETICA(N=51)</b>	4/51(7.8%)	<b>0.2103 (0.0655 - 0.6748)</b>	<b>P=0.0088*</b>
<b>SIN RETINOPATIA DIABETICA (N= 59)</b>	17/59 (28.8%)		
<b>Variante C309CCC</b>			
<b>CON RETINOPATIA DIABETICA (N=51)</b>	7/51(13.7%)	0.7795 (0.2733 - 2.2236)	P=0.6414
<b>SIN RETINOPATIA DIABETICA (N= 59)</b>	10/59 (16.9%)		

\*Diferencia estadísticamente significativa

TABLA 8 Asociación de las variantes genéticas estudiadas con el fenotipo de diabetes.

GRUPO DE ESTUDIO	Frecuencia	OR (IC 95%)	p
<b>Variante A77D</b>			
<b>CON DIABETES (N=110)</b>	42/110 (38.2%)	<b>97.8571 (5.8934 - 1624.86)</b>	<b>P=0.0014*</b>
<b>SIN DIABETES (N= 59)</b>	0/59 (0%)		
<b>Variante A87D</b>			
<b>CON DIABETES (N=110)</b>	21/110 (19.1%)	<b>24.6207 (3.2127 - 188.68)</b>	<b>P=0.0020*</b>
<b>SIN DIABETES (N= 59)</b>	1/59 (1.7%)		
<b>Variante C309CCC</b>			
<b>CON DIABETES (N=110)</b>	17/110 (15.5%)	1.3380 (0.6396 - 2.7990)	P=0.4394
<b>SIN DIABETES (N= 59)</b>	27/59 (45.8 %)		

\*Diferencia estadísticamente significativa

#### IV. DISCUSIÓN

Para poder realizar la valoración de cualquier fenómeno o evento es necesario incluir un grupo control, el cual tiene como objetivo proporcionar un panorama donde se pueda obtener una comparación entre los resultados de los grupos de estudio. Los grupos control científicos ayudan al investigador a mostrar que el diseño experimental es capaz de generar resultados que son estadísticamente válidos además de eliminar las variables de confusión (Álvarez, 2005). Para determinar el efecto que tiene algún evento clínico o en este caso el evento genético, el cual está representado con los SNP presentes en la región HV2 del ADN mitocondrial, es necesario que se le presenten las mismas atenciones a ambos grupos.

Las pruebas de laboratorio son un elemento indispensable para prevenir, detectar y controlar al paciente diabético entre ellas se encuentra la prueba de glucosa, HbA1c, colesterol y triglicéridos así como el índice de masa corporal, en un paciente sano estos parámetros deban encontrarse dentro de los valores de referencia (Álvarez, 2005). Uno de los objetivos del estudio es comparar los resultados de cada prueba clínica realizada de un grupo control contra un grupo de diabéticos previamente estudiados dentro del mismo rango de edad. Como se puede observar en la TABLA 4 el promedio de edad de los individuos se encuentra entre los 63.57 años de vida un valor aceptable para poder ser comparado con el grupo de diabéticos ( $61.08 \pm 8.86$ ). Por otro lado se les realizó una batería de pruebas clínicas para corroborar que dichos individuos se encontraran dentro de los parámetros de referencia.

Los valores obtenidos de las pruebas de glucosa, triglicéridos y colesterol del grupo control se encuentran dentro de los valores de referencia, mientras que el grupo diabético muestra valores incrementados en estas pruebas. En el caso de la evaluación de los niveles de azúcar en sangre se obtuvo que en promedio el grupo control presenta  $93(\pm 10.79)$  mg/dl de glucosa y a su vez un  $6.5(\pm 0.70)\%$  de Hemoglobina glucosilada. Ambas pruebas son de suma importancia ya que el aumento de los niveles de glucosa circulante incrementan la activación de la cascada de la Proteína Quinasa C (PKCs) en la vasculatura de la retina desencadenando un aumento de la permeabilidad vascular y alteraciones en el flujo sanguíneo lo que propicia el desarrollo de la RD (Geraldes, et al., 2009).

Uno de los multifactores que aumenta la probabilidad de que una persona sana desarrolle DM es la obesidad, para esto se dispone del cálculo del Índice de masa corporal el cual nos ayuda a clasificar el grado de obesidad si es que existe. El valor promedio del IMC del grupo control es de  $28.53 (\pm 5.16)$  kg/m<sup>2</sup> es cual habla sobre el sobrepeso presente en el grupo control. Es importante ya que como se ha mencionado con antelación el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de DM. Para finalizar con las pruebas clínicas se midió el colesterol y triglicéridos (obteniendo resultados de  $144(\pm 74.51)$  mg/dl y  $184(\pm 43.16)$  mg/dl respectivamente) ya que valores por arriba del límite superior de los valores de referencia se relacionan con problemas coronarios.

Estos metabolitos lipídicos son degradados mediante  $\beta$ -oxidación sinónimo de fuente de energía. Diversos trabajos relacionan el estrés oxidativo (EO) a la DM puesto que llega a provocar un desbalance entre los procesos pro-oxidativos y los mecanismos antioxidantes, favoreciendo a los primeros (Ford, et al., 2003; Hansel, et al., 2004). A dicho fenómeno se le responsabiliza de importantes daños que ocurren en las membranas celulares, un daño del ADN, trastorno en la expresión de genes y disfunción endotelial (Govindarajan, et al., 2006). Se ha postulado que el EO produce insulinoresistencia a través de la afectación de la fosforilación inducida por insulina y de la redistribución celular del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) y el fosfatidilinositol-3-kinasa, reduciendo la expresión del GLUT-4 y su actividad (Rudich, et al., 1998; González, et al., 2009).

Un vez que se ha verificado que el grupo control no presentaban DM el siguiente punto a tratar es el estudio de la región HV2 de ADN mitocondrial de cada uno de los individuos que conforman este grupo ya que la asociación de los SNP encontrados en esta región con los de un grupo de diabéticos nos podría indicar un posible efecto protector en el fenotipo de RD. Primeramente se determinó la integridad de las muestras de ADN genómico (FIGURA 29), este tipo de valoración es de suma importancia debido a que nos revela datos como el estado de degradación que presenta la muestra y la cantidad de material genético, este último aspecto es estimable a partir del grosor de la banda. De acuerdo a los resultados obtenidos las muestras se encuentran en buen estado y son aptas para el procedimiento de amplificación de HV2.

La mayoría de las bandas presentes en la FIGURA 29 muestran un grosor considerable exceptuando los carriles 11, 12 y 26 en los cuales la presencia de la banda es nula, esto puede ser consecuencia de varios factores desde un mal manejo en la muestra durante la preparación de la mezcla de reacción, malas condiciones de conservación de la muestra e incluso la temperatura en la que se trabajó. Por otro lado al comparar todas las bandas con el marcador de peso molecular se reafirma la integridad de ADN dado que las muestras presentan fragmentos de ADN mayores a 1kb; sí el material genético se encontrara en malas condiciones esto se podría estudiar en la imagen obtenida de la electroforesis siendo muy probable que se observen varias bandas de diferentes tamaños en un solo carril dando una imagen de escalera. Es vital tener muestras de ADN en buen estado en vista que el objetivo es lograr la amplificación de HV2 para analizarlo y encontrar SNP relacionados con RD.

En relación con la amplificación de la región HV2 esta se logró mediante PCR de punto final, La región HV2 se encuentra ubicada desde la base 73-340 del ADN mitocondrial representando un fragmento de aproximadamente 267-268 bases (Terreros, 2010). Es por esto que la selección de los *primers* es un punto clave para lograr una buena amplificación. Los *primers* sugeridos en el trabajo de Butler han sido utilizados ampliamente para la amplificación de la región HV2. EL fragmento esperado de la PCR consta de 529pb tal y como se puede ver en los resultados obtenidos (FIGURA 30). Se logró amplificar exitosamente al total de la población del grupo control, no obstante

existieron muestras en las cuales de acuerdo al gel de electroforesis no presentaban una cantidad considerable de material genético como consecuencia fueron eliminadas para el proceso de secuenciación.

Conocer el orden de los nucleótidos en la secuencia del materia genético nos ayuda a valorar los posibles efectos que tengan los cambios en esta (Márquez-Valdelamar, et al., 2014). La técnica de secuenciación es un método altamente preciso y sensible derivado de esto es crítico que los productos de amplificación tengan un alto grado de pureza para evitar interferencias de productos no deseados durante el desarrollo y el análisis de la reacción de secuenciación (Márquez-Valdelamar, et al., 2014).

Una vez finalizado el proceso de purificación de las muestras del grupo control estas fueron sometidas a la reacción de secuenciación por el método enzimático de Sanger en la cual se utilizó el primer reverse, ya que los SNP de interés, A77d y A87d, se encuentran muy cerca del inicio del extremo 5' de la región HV2 provocando dificultades para obtener resultados fidedignos. El análisis de resultados se hace mediante la interpretación de los electroferogramas obtenidos (FIGURA 31); es importante revisar los electroferogramas antes de continuar con los análisis de la muestra debido a que nos dan mucha información, incluyendo la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos. (Sanger, et al., 1977)

Los resultados obtenidos demuestran que las muestras fueron manejadas correctamente ya que no presenta interferencias en las señales emitidas lo que facilita la lectura de los electroferogramas un ejemplo de ello es la FIGURA 31 en donde se tiene una panorámica de aproximadamente 80pb. Continuando con el propósito del estudio, lo siguiente es generar hipótesis de homología de las bases al comparar y alinear las secuencias entre el grupo control y la cadena de Anderson para poder de este modo identificar los principales SNP de interés ya antes mencionadas adicionando a C309CCC.

Retomando el objetivo principal del trabajo fue explorar las frecuencias de los polimorfismos A77d, A87d y C309CCC en los grupos de estudio. Esto como consecuencia de que en trabajos anteriores se han visto presentes con una frecuencia significativa en pacientes diabéticos con y sin complicaciones como la RD (Saldaña, 2014) e inclusive se puede llegar a pensar en un efecto protector otorgado por estos polimorfismos en relación con la prevención o el lento progreso de la RD. Para alcanzar los objetivos la aplicación de herramientas bioinformáticas tales como BLAST y BioEdit ayudan obtener resultados fidedignos (Márquez-Valdelamar, et al., 2014) se empleó la primera herramienta para realizar los alineamientos y obtener datos importantes como los que se muestran en la TABLA 5.

En general los resultados de los dos grupos apoyan la fidelidad de los resultados debido a que ambos grupos presentan promedios por encima del 90% cuando se habla de similitud al genoma mitocondrial humano de acuerdo a la secuencia de referencia de Anderson (rCSR) además de abarcar un porción considerable de la secuencia, de este modo

aseguramos que los alineamientos cubrían la región HV2, que van de las posiciones 59 a la 429 aproximadamente, de acuerdo a la secuencia de referencia de Anderson. El valor promedio obtenido de E-value fue de  $3E-28$  el cual señala la homología de los genes estudiados. En la FIGURA 32 se tiene un ejemplo de alineamiento tipo ClustalW el cual una herramienta utilizada para alineamientos sencilla, en esta se encuentra sombreada a adenina en la posición 87, la muestra control de la región HV2 C122 presenta la delección de esta base lo cual representa a una de las variantes estudiadas: A87d.

Retomando el objetivo, al valorar las frecuencias de las variantes genéticas estudiadas en los grupos (TABLA 6) es posible discernir que las bajas frecuencias expresadas en el grupo de pacientes diabéticos con el fenotipo de RD sugieren que no existe alguna asociación entre las tres variantes con dicho fenotipo. En contraste a esto se distinguió que las frecuencias expresadas de manera elevada en los pacientes diabéticos sin RD sugieren la posible relación de factores protectores para el desarrollo o progresión de dicho fenotipo. Esto se relaciona directamente con la vulnerabilidad que presenta el ADN mitocondrial (de Gómez Poyou, et al., 2012) a las condiciones metabólicas de la célula pues al carecer de histonas y estar compactado en forma de nucleoides en la membrana interna de la mitocondria ocasiona que este tenga una frecuencia de mutaciones de 7 a 10 veces mayor al DNA nuclear. Es por esta razón que la condición metabólica en la que se encuentran los pacientes diabéticos con RD y sin RD proporciona altas probabilidades de presentar mutaciones en cualquier región de ADN mitocondrial, en este caso es específicamente en la región HV2.

El hallazgo de un posible efecto protector generó el estudio de asociación entre las variantes genéticas (A77d, A87d y C309CCC) con el fenotipo de RD. Conforme a los resultados obtenidos (TABLA 7) es preciso resaltar que existen diferencias significativas entre las frecuencias los grupos de estudio en lo que respecta a las variantes A77d y A87d, esto nos indica que ambas variantes son factores protectores para el fenotipo de RD en pacientes diabéticos. Es importante destacar que la región HV2 es un región control dentro de ADN mitocondrial por lo cual se debe considerar que en ella se encuentran los promotores de transcripción, secuencias de conservación y el origen de replicación, además de ser la sección más polimórfica de todo el ADN mitocondrial por lo cual podría ser poco frecuente que se presenten mutaciones de carácter relevante (Magner, et al., 2015; Kowluru, et al., 2013). Aun así no se puede descartar la posibilidad de que dichos polimorfismos se asocien a factores de protección para el fenotipo de RD en pacientes diabéticos lo cual representa que la delección de adenina en estos *hot spots* (Terreros, 2010) pueden llegar a implicar en el ADN mitocondrial el cambio de secuencia codificante para una proteína, donde puede llegar a afectar de manera positiva el metabolismo de órganos cambiando de forma severa el fenotipo de la enfermedades.

Se debe agregar que las variantes A77d y A87d se expresan con mayor frecuencia en diabéticos nos da un indicativo de que pudieran estar asociadas a la diabetes, transitoriamente la variante C309CC se ve expresada con mayor frecuencia en el grupo control (TABLA 6), lo cual plantea la posibilidad de encontrarnos con una variante

protectora a la diabetes. Teniendo en cuenta esto se decidió analizar la asociación de las variantes con el fenotipo de diabetes, como se puede evaluar en la TABLA 8 las frecuencias de A77d y A87d son estadísticamente significativas por lo cual se corrobora que están asociadas con la diabetes; entretanto la variante C309CCC no aportó pruebas significativas de nos indicaran su asociación a la enfermedad.

Comprender los cambio en el organismo cuando las condiciones impuestas la diabetes alteran múltiples vías celulares mediante cambios a unos pocos elementos esenciales como el ADN mitocondrial en el desarrollo de la RD, en donde la retina experimenta tanto el aumento de la producción y la disminución de la eliminación de los radicales libres. Como consecuencia de la no neutralización de éstos el ADN mitocondrial fácilmente llega a ser dañado (Kowluru, et al., 2015). Estudios realizados con objetivos similares al presente han logrado establecer tanto en animales como en sistemas celulares que la mitocondria de la retina puede ser severamente dañada en la DM, propiciando la muerte de la mitocondrial. Específicamente, se han visto en cultivos celulares de retina humana que la hiperglicemia es capaz de dañar el ADN mitocondrial a raíz de esto se ha propuesto a este evento como un evento contribuidor para la degeneración de las células capilares de la retina (Xie, et al., 2008).

Algunos estudios han proporcionado evidencia convincente de que el daño en el ADN mitocondrial es un paso clave que conduce a la disfuncion mitocondrial. proponiendo que la retinopatía se asocia con el contenido circulante de ADN mitocondrial, expresándose un aumento de este circulante en etapas tempranas de la RD, mientras que en la etapa tardía el ADN mitocondrial circulante disminuye (Malik, et al., 2015). En células sanas el ADN mitocondrial se encuentra fuera del núcleo, en las mitocondrias ubicadas cerca de la cadena transportadora de electrones donde se usa como plantilla para transcribir numerosos RNA mensajeros, requeridos para el funcionamiento mitocondrial idóneo (Malik, et al., 2012). Debido a su ubicación el ADN mitocondrial es particularmente susceptible a sufrir daños por EO, resultando en deleciones, mutaciones en sus componentes. Las consecuencias del daño en el ADN mitocondrial pueden llevar a afectar a las células en diferentes formas; una de ellas se presenta si la carga de mutación excede ciertos límites establecidos por la estructura mitocondrial, entonces la célula no será capaz de mantener el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones resultando en una deficiencia de energía para los procesos celulares básicos y de reparación de la misma (Malik, et al., 2012; Kowluru, et al., 2015; Xie, et al., 2008) La retina es el tejido con más demanda energética en todo el organismo por lo cual es sumamente susceptible a las deficiencias bioenergéticas (Malik, et al., 2015).

Para concluir los polimorfismos tales como las variantes estudiadas se ubican en su mayoría en la región control del ADN mitocondrial, los polimorfismos presentes en las regiones hipervariables se dan principalmente por transiciones o transversiones y deleciones de bases (Kline, 2005). Es por esto que el estudio de asociación de las variantes seleccionadas en este trabajo nos brinda información relevante en la cual se puede destacar que efectivamente existe una relación entre dos de las variantes a la

diabetes y que ambas llegan a cumplir la función de efecto protector en la RD abriendo el panorama a futuras investigaciones relacionadas con el papel que pueden llegar a ejercer estas variantes en el fenotipo de la RD.

## V. CONCLUSIÓN

A lo largo de la presente investigación se abordó la importancia que tiene la RD como una complicación microvascular de la DM. Su desarrollo se le atribuye al EO al que se encuentra expuesto el organismo debido a la hiperglicemia. Al ser la retina el tejido con requerimientos elevados de energía la mitocondria asume un papel importante, pues el EO puede llegar a dañar su tejido e incluso su material genético. Se observó que en los últimos años han surgido estudios que abordan a los polimorfismos en el ADN mitocondrial como un factor relevante en la RD, justificando la realización del presente trabajo.

Como resultado del estudio de asociación presentado se observó que los 3 polimorfismos estudiados (A77d A87d y C309CC) fueron diferentes entre los grupos de estudio. De forma interesante se encontró que dos de los polimorfismos (A77d y A87d) se asociaron a diabetes y además de relacionarse a un efector protector para el fenotipo de RD. Como consecuencia de ello se afirma que es posible establecer la asociación de polimorfismos presentes en la región HV2 del ADN mitocondrial y el fenotipo de un grupo control de pacientes sanos como pacientes diabéticos con y sin RD mediante la comparación de las frecuencias que presenten dichos grupos de estudio. Además se analizaron las diferencias entre ambos grupos de estudios mediante los resultados de pruebas clínicas (Saldaña, 2014) donde se confirmó la condición diabéticas de los pacientes así como la condición del grupo control.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Alberts , B, et al., 2002. *Molecular biology of the cell*. España,: Omega Eds.
- Álvarez, R, 2005. *Ensayos clínicos: diseño, análisis e interpretación. En: Ensayos clínicos: diseño, análisis e interpretación*. España,: Ediciones Díaz de Santos.
- Andersin, R., Rapp, L. & Wiegand, R., 1984. *Lipid peroxidation and retinal degeneration*. Curr.Eye.Res.
- Bishop, D., 2004. *DNA. Changing Science and Society*. España,: Akal.
- Bohinski, R., 1991. *Bioquímica*. México: Pearson Education.
- Botstein, D. & Risch, N., 2003. *Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease*. Nat Genet.
- Brownlee, M., 2005. *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes.
- Checha-Caratechea, M., 2007. *Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones*. Rev Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria.,México.
- Chew, E., 2014. *The effect of medical management on the progression of diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Eye Study*. Ophthalmology.
- Crawford, D., Akey, D. & Nickerson, D., 2005. *The patterns of natural variation in human genes*. Annu Rev Genomics Genet.
- de Gómez Poyou, M. & Nuñez, J., 2012. *La mitocondria en el centro del universo celular*. Mensaje Bioquímico.
- De Necochea, R. & Canul, J., 2004. *Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Flores, G., 2015. *Manual de prácticas. Genética Molecular*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ford, E., Mokdad, A. & Gales, W., 2003. *The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Diabetes.
- Frank, R., 2004. *Diabetic retinopathy*. N. Engl.J.Med.
- Geraldés, P., 2009. *Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy*. Nat.Med.
- Goffart , S. & Wiesner, R., 2003. *Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis*. Exp Physiol.
- González, O., Arpa, Á., González, M. & Pérez, J., 2009. *Oxidative stress assessment in patients presenting with metabolic syndrome*. Hospital Militar Central: Dr. Luis Díaz Soto. Perú.

- Govindarajan, G., Hayden, M. & Cooper, S., 2006. *Metabolic desarrengments in the insulin resistant heart*. J Cardiometab Synd.
- Grimm , S. & Brdiczka, D., 2007. *The permeability transition pore in cell death*. Apoptosis.
- Guardado, M., Queipo, G., Meraz-Ríos, M. & Berumen, J., 2008. *Diversidad genética en la población mexicana: Utilización de marcadores de ADN*. Rev Médica Hospital General de México.
- Hansel, B., Giral, P. & Nobecourt, E., 2004. *Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity*. J Clin Endocrinol Metab.
- Hernández, M., Gutiérrez, J. & Reynoso, N., 2013. *Diabetes mellitus en México.El estado de la epidemia*. Salud pública de México.
- Holland, M. & Parsons, T., 1999. *Mitochondrial DNA Sequense analysis: Validation and use for forensic casework*. Forensic Science Review.
- Holland, M. & Parsons. T., 1999. *Mitochondrial DNA Sequense analysis – Validation and use for forensic casework*. Forensic Science Review.
- Kanwar, M., Chan, P., Kern, T. & Kowluru, R., 2007. *Oxidative dameage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase*. Invest. Pohtalmol. Vls. Sci.
- KhanaAcademy. Consultada el 15 de Agosto del 2017: <https://es.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling/mechanisms-of-cell-signaling/a/intracellular-signaltransduction>
- KhanaAcademy. Consultada el 25 de Septiembre del 2016: <https://es.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/tour-of-organelles/v/mitochondria>
- Kline, M., 2005. *Mitochondrial DNA Typing Screens with control region and coding region SNPs*. J Forensic Sci.
- Kowluru, M., 2001. *Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are inter-related*. Acta Diabetol.
- Kowluru, R. & Mishra, M., 2015. *Oxidative stress, mitochondrial dameage and diabetic retinopathy*. Biochimica et Biophysica Acta.
- Kowluru, R., Santos, J. & Mishra, M., 2013. *Epigenetic modifications and diabetic retinopathy*. Biomed.Res.Int.
- de los Rios Castillo, J., Sánchez, J., Barrios, P. & Guerrero, V., 2004. *Calidad de vida en pacientes con diabetes mellitus tipo 2*. Revista Médica del IMSS.
- Lehninger, D., Michael, N. & Cox, M., 2002. *Principles of Biochemistry*. Fourth Edition.USA.
- Lodish, H., 2006. *Biología celular y molecular*. España: Médica Panamericana.
- López, R., 2005. *Función y biogénesis mitocondrial*. Universitat de les Illes Balears.
- Magner, M., 2015. *Clinical manifestation of mitochondrial diseases*. Developmental Period Medicine.

- Malik, A., 2015. *Altered circulating mitochondrial DNA and increased inflammation in patients with diabetic retinopathy*. Biabetes Research and Clinical Practice.
- Márquez-Valdelamar, L., Serrato, A. & Cerritos, R., 2014. *Secuenciación de fragmentos de ADN. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- MtDNA Test Blog el 3 de septiembre del 2016, en línea: <http://mtdnatest.com/reagents-kits/mtdnatest-human/>
- Murphy, M., 2009. *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem. J.
- National Institutes of Health, 2016. *Medline Plus*. [En línea]: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001214.htm>
- Nisoli, E., Clementi, E., Moncada, S. & Carruba, M. O., 2004. *Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework*. Biochem Pharmacol.
- OMS, 2015. *Organización Mundial de la Salud*. [En línea]: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- OMS, 2016. *Informe mundial sobre la Diabetes. Resumen de orientación*. World Health Organization.
- Botet, J., Benaiges, D. & Pedragosa, À., 2012. *Dislipidemia diabética, macro y microangiopatía*. Clin Invest Arterioscl.
- Pierce, B., 2005. *Genética: Un enfoque conceptual*. Médica Panamericana.
- Rudich, A., Tirosh, A. & Potashnik, R., 1998. *Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*. Diabetes.
- Ruiz, M., 2006. *La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades*. Gac Sanit.
- Salas, A, et al., 2007. *Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics*. Forensic Science International.
- Saldaña, E., 2014. *Estudio de asociación de los haplotipos de ADN mitocondrial con el fenotipo de retinopatía diabética en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en la población mexicana (Tesis de maestría)*, Secretaría de la Defensa Nacional. Escuela de Militar Graduados de Sanidad. México.
- Sánchez, R. & Arboleda, G., 2008. *Mitocondria y muerte celular*. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R., 1977. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J. & Sierra, E., 2014. *PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales., México.
- SlideShare. Consultada el 1 de Septiembre del 2016: [https://es.slideshare.net/ggeorge\\_/mutaciones-9275708](https://es.slideshare.net/ggeorge_/mutaciones-9275708)
- Stansfield, W., 1992. *Genética*. México: Mc Graw Hill.

- Stitt, A., 2003. *The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy*. Exp.Mol.Pathol.
- Stitt, A., 2010. *AGEs and diabetic retinopathy*. Invest.Ophthalmol.
- Tamarin, R., 1996. *Principios de Genética*. Reverté.
- Tang, Z., Wang, L., Zeng, F. & Zhang, K., 2014. *Human genetics of diabetic retinopathy*. J Endocrinol Invest.
- Terreros, G., 2010. *Determinación de la variación de las secuencias de las regiones HVI y HVII de la región control del DNA mitocondrial en una muestra de la población caribe Colombiana*, Pontificia Universidad Javeriana. Columbia.
- Trumpower, B., 1990. *The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex*. J. Biol.Chem.
- Varela, T., Aínsua, R. & Fariña, J., 2009. *El ADN mitocondrial y las relaciones filogenéticas de los últimos estadios del género Homo*. Real Academia Galega de Ciencias.

VII. ANEXOS

**ANEXO 1**  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO UTILIZADO POR LA MAYOR M.C. ELSA**  
**SALDAÑA RIVERA**

SECRETARÍA DE LA DEFENSA NACIONAL  
UNIVERSIDAD DEL EJÉRCITO Y FUERZA AÉREA

ESCUELA MILITAR DE GRADUADOS DE SANIDAD  
UNIDAD DE ESPECIALIDADES MÉDICAS-HOSPITAL CENTRAL MILITAR

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN: "ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOGRUPOS DE ADN  
MITOCONDRIAL CON EL RIESGO DE DESARROLLAR RETINOPATÍA DIABÉTICA EN  
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN LA POBLACIÓN MEXICANA"

**CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN**

**DATOS PERSONALES**

Nombre: \_\_\_\_\_

Matrícula: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Teléfono: \_\_\_\_\_

Nombre de la persona que recibió la información y da el consentimiento: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre del procedimiento: Cepillado de mucosa oral.

Datos de quien realizó el procedimiento:

Mx. M. C. Elsa Saldaña Rivera (C.P. 5805385).

Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Laboratorio Multidisciplinario de Investigación,  
Calle Cerrada de Palomas, S/N, Col. Lomas de San Isidro, D.F.

Teléfono: 55400759, extensiones 2 y 7.

Propósito del estudio: Evaluar la potencial asociación entre los haplogrupos de ADN mitocondrial y el riesgo de desarrollar Retinopatía Diabética en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 en la población mexicana.

Riesgos y Complicaciones: Laceración de la mucosa, hemorragia leve, infección.

Acepto que se me realice el procedimiento: Sí ( ) No ( )

**POR LO TANTO, CON ANOTACIÓN VERBAL Y ESCRITA:**

1. Declaro de forma libre y voluntaria sin existir ninguna presión física o moral sobre mi persona, que he comprendido las explicaciones que se me han proporcionado, el propósito y los riesgos del procedimiento, aclarando las dudas que he planteado. A sí mismo declaro que he leído y comprendido totalmente el consentimiento y los espacios en blanco que han sido llenados antes de firmar.

A la vuelta...

