



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

“Asociación de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en
pacientes pediátricos con Hipoacusia Neurosensorial No
Sindrómica”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

RIVERA MIJANGOS LAURA REBECA

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa
Coasesores: Dr. Luis Carlos Gómez Rojas
Dra. Laura Gutiérrez Valdez



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
SECRETARÍA GENERAL
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.**

Asociación de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes pediátricos con Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica.

Que presenta la pasante: **Laura Rebeca Rivera Mijangos**
Con número de cuenta: **413078108** 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 10 de septiembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. María Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	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).

Agradecimientos

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por decirme las palabras adecuadas para levantarme y no darme por vencida. "Pidan, y se les dará; busquen, y encontrarán; llamen, y se les abrirá. Porque todo el que pide, recibe; el que busca, encuentra; y al que llama, se le abre". Mateo 7:7-8.

Todos merecemos una ovación de pie, al menos una vez en la vida.

Mi mamá lo merece porque ella me ha dado el amor más puro y sincero que puedo recibir sin aún merecerlo, porque nunca abandona nada y mucho menos a mí.

Mi papá lo merece por trabajar duro día y noche con tal de brindarnos un futuro mejor a mi hermano y a mí. Por tu inmenso cariño y amor.

A mis padres en conjunto por representar la unión familiar y porque nunca ha sido tarea fácil ser una hija ordinaria de padres extraordinarios.

Mi hermano Oscar lo merece, porque siempre serás mi ejemplo a seguir, gracias por todos tus consejos y por estar conmigo en los momentos más difíciles y nunca abandonarme. Te amo.

Dany lo merece, mi novio, compañero en el amor, lo profesional y la vida. Gracias por ser ese pedacito de isla en medio de la nada, por ser esa mano que me agarra cuando estoy a un milímetro de la caída. Por adivinar qué me pasa antes que yo, por ser motivo y nunca obligación. Gracias por reaparecer en mi vida. Gracias por ser tú.

Al Dr. Francisco Montiel, por siempre abrirme las puertas a su laboratorio y dejarme formar parte de su grupo de trabajo. Por la confianza que depositó en mí y su constante apoyo. Gracias por ser mi asesor y un gran amigo.

A la Dra. Angélica Saldaña por su valiosa ayuda. Porque me brindó todas las herramientas necesarias en el laboratorio para completar este trabajo satisfactoriamente.

A la maestra Josefina y a la maestra Anita, muchas gracias porque fueron pieza fundamental en la parte experimental de mi proyecto al compartirme sus conocimientos y experiencia. Les tengo una gran admiración.

Al Dr. Luis Carlos Gómez y a la Dra. Laura Gutiérrez, por su asesoría en la parte clínica, al otorgarme las muestras empleadas para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Oscar Rolón, Jefe de investigación del Teletón, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto en una Institución tan importante como lo es el CRIT Estado de México, por cada una de sus correcciones y retroalimentación hacia este trabajo. Agradezco infinitamente su tiempo invertido y su paciencia.

A Vero, Eva, Angie, Susy (VELAS), Greg y Dany, como olvidar todos los buenos y malos momentos que compartimos a lo largo de la carrera y los que seguimos compartiendo. Porque han sido un apoyo para mí no solo en lo profesional sino en lo personal.

A Percy, Ornella (los Peruanos) y Aarón, mis compañeros en el laboratorio, a su lado los momentos en el laboratorio fue más ameno y sencillo y porque compartieron un poco de su cultura conmigo.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi papá y a mi mamá como un sentimiento de gratitud y eterno reconocimiento, quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, a quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en una persona de provecho. Gracias a su amor, guía y apoyo he logrado culminar mi carrera profesional, siendo para mí la mejor de las herencias.

ÍNDICE

<i>Índice de figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>iv</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>v</i>
<i>Resumen</i>	<i>vi</i>
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Generalidades	1
1.2.1 Concepto y origen de las mitocondrias	1
1.2.2 Morfología y funciones de la mitocondria	2
1.2.3 Sistema OXPHOS	4
1.2.4 Genoma mitocondrial	5
1.2.5 Segregación mitótica y efecto umbral	7
1.3 Enfermedades mitocondriales	7
1.3.1 Clasificación	8
1.3.2 Clínica de las enfermedades mitocondriales	10
1.3.3 Diagnóstico	12
1.4 Haplogrupos	14
1.5 Hipoacusia	15
1.5.1 Fisiología de la audición	15
1.5.2 Definición de Hipoacusia	18
1.5.3 Prevalencia en México	18
1.5.4 Clasificación	19
1.5.5 Causas de hipoacusia neurosensorial	21
1.5.6 Diagnóstico etiológico de las hipoacusias neurosensoriales	23
1.5.6.1 Antecedentes familiares	23
1.5.6.2 Antecedentes personales	23
1.5.6.3 Exploración física	23
1.5.6.4 Estudios complementarios	24
1.5.6.5 Estudios genéticos	24
1.5.7 Genes más frecuentemente implicados en Hipoacusias neurosensoriales no sindrómicas	24
1.6 Mutación A1555G	26
1.6.1 Mutación A1555G relacionada a la ototoxicidad de los aminoglucósidos	26
1.6.2 Diagnóstico genético molecular	28
1.6.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	28
1.6.2.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	29
2. Planteamiento del problema	30

3. Justificación	30
4. Objetivo General	31
4.1 Objetivos específicos	31
5. Hipótesis	32
5.1 Criterios de selección	32
6. Variables	33
7. Metodología	33
7.1 Tipo de muestreo	33
7.1.1 Diseño estadístico	33
7.2 Material y equipo	34
7.2.1 Obtención de células de la mucosa bucal	34
7.2.2 Extracción de DNA a partir de células de la mucosa bucal	34
7.2.3 Cuantificación de concentración y pureza del DNA	34
7.2.4 Amplificación de la región específica por PCR	34
7.2.5 Electroforesis en gel de agarosa	34
7.2.6 R.F.L.P	35
7.3 Métodos	35
7.3.1 Obtención de células de la mucosa bucal	35
7.3.2 Extracción de DNA a partir de raspado bucal: Fenol- Cloroformo	35
7.3.3 Cuantificación de concentración y pureza de DNA	36
7.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
7.3.5 Electroforesis	36
7.3.6 R.F.L.P	37
7.3.7 Haplogrupos	38
8. Aspectos éticos	39
9. Resultados	40
10. Discusión	49
11. Conclusiones	52
12. Referencias	53
13. Conflicto de intereses	56
14. Anexo 1. Hoja de recolección de datos	57
15. Anexo 2. Carta de confidencialidad	58
16. Anexo 3. Carta de consentimiento informado	59
17. Anexo 4. Ejemplo de Resultado de paciente	61
18. Anexo 5. Ley General de Salud	63

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la morfología mitocondrial	3
Figura 2. Esquema general del funcionamiento de la mitocondria	3
Figura 3. Cadena respiratoria mitocondrial.	5
Figura 4. Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA).	6
Figura 5. Árbol de decisiones. Actitud ante una sospecha de enfermedad mitocondrial.	13
Figura 6. Esquema del oído.	16
Figura 8. Ciclo de amplificación de la PCR. (Garibyan y Avashia, 2014)	29
Figura 9. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 1-5.	41
Figura 10. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 6-10.	41
Figura 11. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 11 y 12.	42
Figura 12. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado del paciente 13.	42
Figura 13. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 14 y 15.	43
Figura 14. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI de los pacientes 1 al 5. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.	43
Figura 15. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI de los pacientes 6-10. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.	44
Figura 16. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI de los pacientes 11 y 12. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.	44
Figura 17. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI del paciente 13. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.	45
Figura 18. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI de los pacientes 14 y 15. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.	45
Figura 19. Gel de Agarosa (3%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima Hae III para Haplogrupo A. Pacientes 4, 7, 8 y 10.	46
Figura 20. Gel de Agarosa (3%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima Hae III para Haplogrupo A. Pacientes 11,12,13,14 y 15.	46
Figura 21. Gel de agarosa (3%), tinción BrEt , que muestra el amplificado para detección de Haplogrupo B. Pacientes 3,5,9,14 y 15.	47
Figura 22. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima Alu I para Haplogrupo C. Pacientes 1,2,3,5,6,7,8 y 10.	47
Figura 23. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima Alu I para Haplogrupo C. Pacientes 9, 14 y 15.	48

Índice de tablas

Tabla 1. Principales enfermedades mitocondriales	9
Tabla 2. Enfermedades mitocondriales: principales alteraciones bioquímicas y genéticas.	10
Tabla 3. Principales signos y síntomas en relación con la edad que sugieren una enfermedad mitocondrial	11
Tabla 4 Frecuencias estimadas de haplotipos en todo el mundo (%)	15
Tabla 5. Genes implicados en hipoacusias genéticas no sindrómicas de herencia autosómica recesiva.	25
Tabla 6. Genes implicados en hipoacusias genéticas no sindrómicas de herencia autosómica dominante.	25
Tabla 7. Genes implicados en hipoacusias genéticas no sindrómicas de herencia ligada al cromosoma X o mitocondrial.	26
Tabla 8. Preparación de una reacción de PCR para un volumen de 25 μ l	36
Tabla 9. Preparación de R.F.L.P	37
Tabla 10. Primers utilizados en la PCR para la determinación de los diferentes haplogrupos.	38
Tabla 11. Datos clínicos y audiométricos de los 15 pacientes que se sometieron al análisis para la detección de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial.	40
Tabla 12. Concentración de DNA total (ng/ μ l) y relación de pureza de las muestras de los pacientes.	40
Tabla 13. Haplogrupos determinados mediante RFLP de los pacientes estudiados.	48
Tabla 14. Haplogrupos determinados mediante RFLP de los controles negativos para la mutación A1555G	48

Abreviaturas

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CPEO	Oftalmoplejía crónica progresiva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HAD	Herencia Autosómica Dominante
HAR	Herencia Autosómica Recesiva
HXR	Herencia ligada al X recesivo
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
MELAS	Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro vasculares
MERRF	Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas
MILS	Síndrome materno hereditario de Leigh
MNGIE	Encefalopatía mitocondrial neurogastrointestinal
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NAD	Dinucleótido de nicotinamina y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NARP	Neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismo en los fragmentos largos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SNC	Sistema Nervioso Central
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia

Resumen

Las enfermedades de herencia mitocondrial comprenden un grupo heterogéneo de padecimientos, cuyas manifestaciones clínicas son muy variadas. Éstas pueden aparecer al nacimiento o en la edad adulta y la disfunción mitocondrial primaria se comprueba mediante exámenes morfológicos, bioquímicos y genéticos. Las manifestaciones de dichos padecimientos son muy variados, ya que pueden o no afectar varios órganos y tejidos.

Diferentes mutaciones del DNA mitocondrial están implicadas en el desarrollo de hipoacusia neurosensorial sindrómica o no sindrómica : la primera descrita, y la más frecuente es la mutación A1555G del RNA ribosómico 12S, después las mutaciones C1494T del RNA ribosómico 12S y las T7511C y T7510C del RNA de transferencia de la serina. La mutación A1555G en el gen del rRNA 12S del genoma mitocondrial es responsable de Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica, puede ser de cualquier intensidad y aparecer a cualquier edad, de forma espontánea, así como provocar un incremento en la susceptibilidad a la acción ototóxica de los aminoglucósidos. La mutación se ha encontrado en países de Asia como China y Japón, países Europeos como España, donde se estima que el 17-33% de los pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos son portadores de la mutación A1555G, sin embargo, en México no existe un estudio que reporte la presencia de esta mutación con el desarrollo de hipoacusia. En este trabajo se buscó la presencia de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial mediante un estudio genético en pacientes pediátricos mexicanos procedentes del Centro de Rehabilitación e Inclusión Infantil Teletón, Estado de México y de consulta privada con diagnóstico de Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica asociado al consumo de aminoglucósidos ó de causa desconocida. Se seleccionaron los pacientes con el apoyo de dos especialistas en audiología y foniatría, se les tomó una muestra de raspado bucal, donde se realizó la extracción de DNA y posteriormente se realizó PCR y RFLP para determinar la presencia de la mutación. No se encontró la mutación en los 15 casos estudiados, descartando que la mutación haya sido la causa del desarrollo de Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica.

Así también se determinó el haplogrupo de cada paciente, para determinar si puede ser un factor de riesgo o protección para el desarrollo de la enfermedad, encontrando una mayor prevalencia de Haplogrupo C. Se propone realizar un estudio más extenso, para establecer si el haplogrupo C representa un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Desde que en 1988 se describieron las primeras enfermedades causadas por daños en el mtDNA, se han encontrado más de 150 mutaciones (más 100 deleciones y unas 50 mutaciones puntuales) asociadas a enfermedades humanas. El interés por su estudio ha crecido enormemente debido al gran aumento de pacientes diagnosticados con estos trastornos y a que se presentan tanto en recién nacidos como en adultos de todas las edades (Solano, Playán, López-Pérez y Montoya, 2001). Muchas de estas mutaciones se transmiten por línea materna, dado al elevado número de moléculas de mtDNA que existe en los óvulos (entre 100,000 y 200,000 copias) en comparación con unos pocos cientos que hay en los espermatozoides, además que estos pierden sus mitocondrias durante la fertilización (Abelardo, Playán, López y Montoya, 2001), lo que hace que el diagnóstico en un individuo pueda tener implicaciones en muchas generaciones de una familia.

Diferentes mutaciones del DNA mitocondrial están implicadas en el desarrollo de hipoacusia neurosensorial. La hipoacusia hereditaria puede ser clasificada en: conductiva, neurosensorial o mixta; sindrómica (cuando forma parte de un conjunto de signos y síntomas) o no sindrómica (en donde la única manifestación de la enfermedad es la hipoacusia); prelingual (antes del desarrollo del lenguaje) o poslingual (luego del mismo), entre otras. Aproximadamente el 30% de las hipoacusias genéticas prelinguales son sindrómicas (la hipoacusia es un síntoma identificable en más de 400 síndromes diferentes). En el 70% de los casos restantes, la hipoacusia no se asocia a ninguna otra manifestación clínica (hipoacusias no sindrómicas). Dentro de las hipoacusias prelinguales no sindrómicas el 80% se hereda según un patrón autosómico recesivo, el 18% siguen un patrón autosómico dominante, y el 2% restante corresponde a las hipoacusias de herencia ligada al cromosoma X y al genoma mitocondrial. Habitualmente, las mutaciones en genes mitocondriales ocasionan síndromes complejos. Sin embargo, determinadas mutaciones en genes como *MTRNR1*, *MTTS1* o *MTTL1* pueden presentar como único síntoma una hipoacusia. Además del patrón de herencia característico, en estos trastornos destaca su elevada variabilidad en términos de penetrancia y severidad. El ejemplo más característico es la mutación 1555G>A en el gen *MTRNR1* (*12srRNA*). En algunos individuos, la pérdida de audición se desencadena como consecuencia de la administración de antibióticos aminoglucósidos, mientras que en otros la hipoacusia aparece espontáneamente (Cabanillas y Cadiñanos, 2011).

1.2 Generalidades

1.2.1 Concepto y origen de las mitocondrias

Se trata de un organelo citoplasmático de características muy especiales. Su nombre proviene del griego mito (hilo) y chondros (cartílago) (Arredondo, Venet, Román y Ramírez, 2012). Por su origen endosimbiótico se convierte en un componente de gran importancia en la vida de la célula.

Todas sus características estructurales y funcionales evidencian que en el nacimiento de la célula eucariota, una bacteria fue fagocitada por un microorganismo de mayor tamaño con el fin de aprovecharse de la energía en forma de ATP que esta fabricaba, mientras la célula anfitriona dotaba a su huésped de materias primas y protección. La simbiosis perfecta entre estos 2 organismos primitivos supone en uno de los pasos más importantes de la evolución. A lo largo del tiempo, estas bacterias fagocitadas fueron asumiendo tareas cada vez más relevantes dentro del funcionamiento interno de esa célula primitiva hasta convertirse en lo que hoy se conoce como mitocondria; esta hipótesis tiene entre sus fundamentos la evidencia de que las mitocondrias poseen su propio DNA (Arredondo, Venet, Román y Ramírez, 2012).

1.2.2 Morfología y funciones de la mitocondria

Las mitocondrias son cilíndricas, aunque experimentan cambios de forma sutiles, derivados de su actividad. Normalmente se les representa en forma alargada. Su tamaño oscila entre 0.5 y 1 μm de diámetro y hasta 5 μm de longitud. Su número depende del tipo celular en el que se localizan y de las necesidades energéticas de la célula. Una célula puede tener desde unas pocas mitocondrias hasta miles de ellas. El mayor número se encuentra en las células nerviosas, musculares y del hígado. Se encuentran ubicadas en las regiones de las células donde la demanda de energía es mayor, por lo que se desplazan de un lado a otro del citoplasma hacia las zonas necesitadas de energía. Los microtúbulos, y sus proteínas asociadas intervienen en tales desplazamientos. Al conjunto de mitocondrias de la célula se le denomina condrioma celular.

Estas presentan una estructura con 2 compartimientos bien definidos (matriz y espacio intermembranal), delimitados por las membranas interna y externa, como se puede observar en la figura 1, con características morfológicas, funcionales y de permeabilidad muy diferentes. (Arredondo, Venet, Román y Ramírez, 2012). Las dos membranas limitan tres espacios acuosos: el intermembranal, el intracrestal y la matriz mitocondrial (de Gómez y Nuñez, 2012).

La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones (crestas) con multitud de complejos enzimáticos y proteínas que regulan el paso de metabolitos. Esta resulta especialmente impermeable a iones, debido a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina y a la gran cantidad de bombas y transportadores específicos, como el translocador de nucleótidos de adenina.

La membrana externa carece de crestas, y en condiciones fisiológicas, su permeabilidad es menos selectiva, gracias a la presencia de una proteína denominada porina, que permite el paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6,000 daltones (Arredondo, Venet, Román y Ramírez, 2012).

En la matriz mitocondrial se encuentra el DNA, los ribosomas y las enzimas para llevar a cabo procesos metabólicos. La matriz es el centro de numerosas funciones, como se muestra en la figura 2, en primer lugar, de reacciones metabólicas como las que conducen a la oxidación de los ácidos grasos (betaoxidación) o de los ácidos carboxílicos que derivan de los azúcares (ciclo de Krebs). El intermediario común es la acetilcoenzima A. Pero la función primordial es la generación de energía en

forma de ATP por parte de la membrana interna, gracias a la cadena de transporte de electrones y al proceso de fosforilación oxidativa. Esta organización se denomina cadena respiratoria (Serratrice y Desnuelle, 2004).

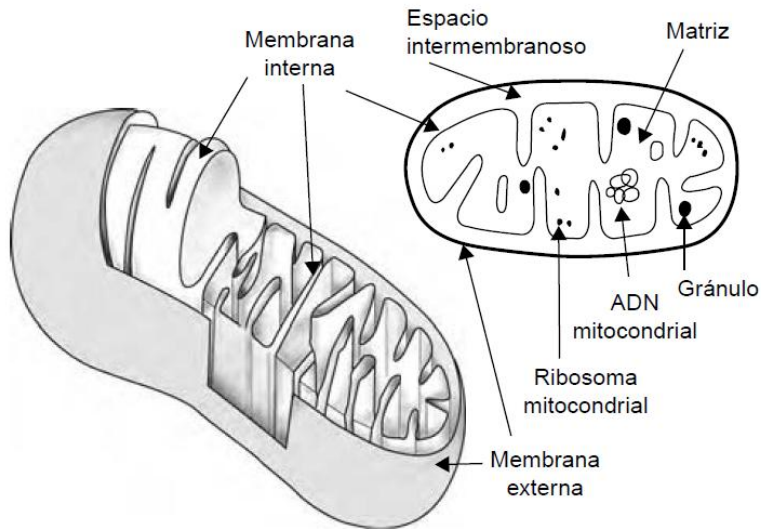


Figura 1. Esquema de la morfología mitocondrial (Serratrice y Desnuelle, 2004).

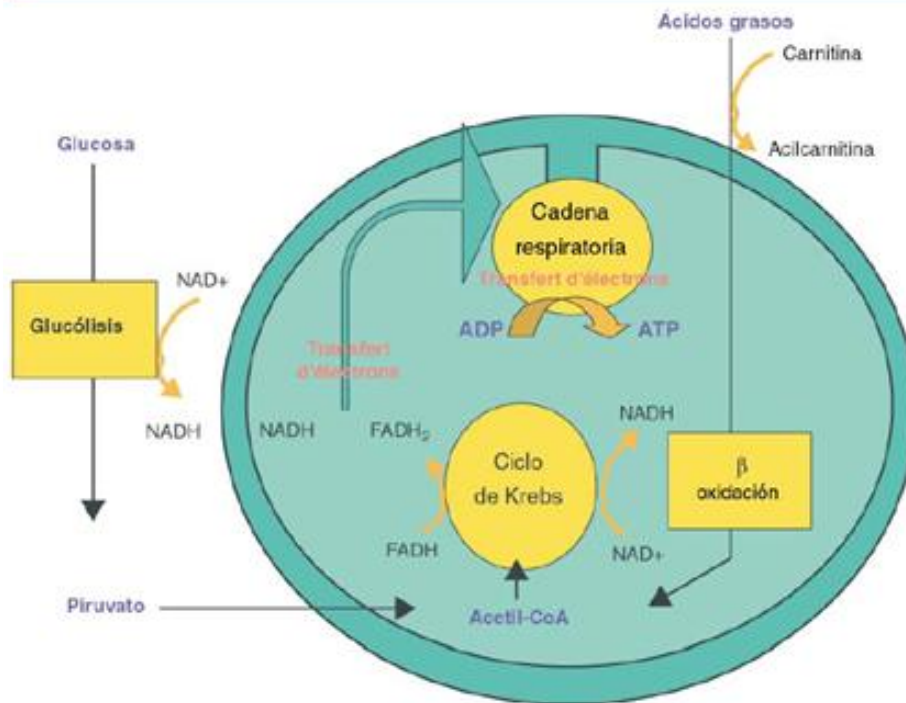


Figura 2. Esquema general del funcionamiento de la mitocondria (Serratrice y Desnuelle, 2004).

1.2.3 Sistema OXPHOS

En la mitocondrias se produce la mayor parte de la energía que requieren las células para su funcionamiento. En la membrana interna de estos orgánulos se encuentra el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), ruta final del metabolismo energético mitocondrial que conduce a la síntesis de ATP.

La cadena respiratoria está organizada en cinco complejos multienzimáticos en los que participan mas de 85 polipéptidos y que presentan la peculiaridad de estar codificados por los dos sistemas genéticos de la célula: 13 están codificados en el DNA mitocondrial (mtDNA) y el resto lo está en el DNA nuclear (nDNA). De este modo solamente el sistema OXPHOS y el ribosoma mitocondrial dependen de la expresión coordinada de ambos genomas, constituyendo un caso único en la célula (Montoya, López, Emperador y Ruiz, 2018).

Los cinco complejos multienzimáticos funcionan principalmente como transportadores de electrones:

- El complejo I (o NADH-coenzima CoQ reductasa), que contiene alrededor de 46 subunidades diferentes (codificadas por 39 genes de origen nuclear y 7 de origen mitocondrial).
- El complejo II (o succinato-CoQ reductasa), está compuesto por cuatro subunidades (codificadas por genes exclusivamente de origen nuclear).
- El complejo III (o ubiquinona-citocromo C reductasa), formado por 11 subunidades (codificadas por 10 genes de origen nuclear y 1 de origen mitocondrial)
- El complejo IV (o citocromo C oxidasa), está constituido por dos citocromos (a y a₃), dos átomos de cobre y 13 subunidades proteicas (codificadas por 10 genes de origen nuclear y 3 de origen mitocondrial).
- El complejo V (o ATP-sintetasa), formado por 14 subunidades (codificado por 12 genes de origen nuclear y 2 de origen mitocondrial) (Feillet, Schmitt, Gherardi y Bonnemains, 2014).

La cadena respiratoria utiliza dos transportadores de electrones. La ubiquinona (coenzima Q₁₀) y el citocromo C. La síntesis de ATP implica procesos coordinados, como se muestra en la Figura 3 de transporte de electrones: fundamentalmente los iones H⁺ (liberados en el ciclo de Krebs por el NADH⁺ y por el FADH⁺ tras la oxidación del acetilcoenzima A, que proviene de las vías metabólicas glucídica y lipídica).

El complejo I transfiere los iones H⁺ a la coenzima Q (o ubiquinona), y después el complejo III lo hace al citocromo C. Son transportados a lo largo de la cadena hacia el complejo IV, que cede el oxígeno molecular a los electrones, lo que supone la producción de agua.

Al mismo tiempo, los protones se transportan de forma transitoria a través de la membrana interna hacia el espacio intermembranoso mediante los complejos I, III y IV, que generan una fuerza promotora.

Por último, el complejo V asegura el retorno de los iones H^+ a la matriz, lo que permite la liberación de energía utilizada para la fosforilación del ADP en ATP. Es la fosforilación oxidativa. Una proteína de transporte específica del ATP, la adenina nucleótido translocasa (ANT), dirige el intercambio ADP-ATP contra su gradiente de concentración (Serratrice y Desnuelle, 2004).

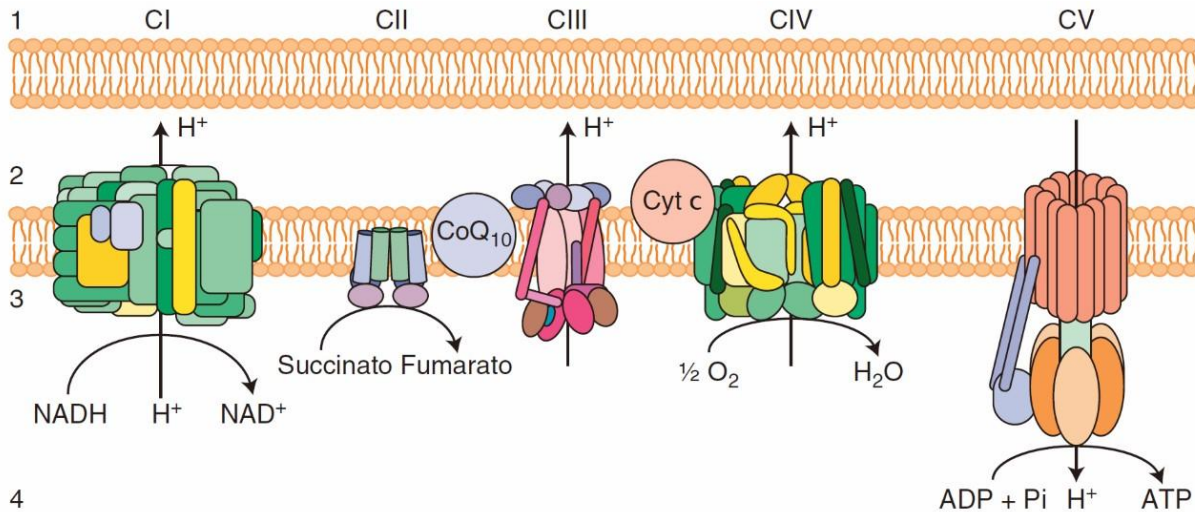


Figura 3. Cadena respiratoria mitocondrial.

La cadena respiratoria es un sistema multienzimático formado por cinco complejos (CI-CV) cuya finalidad es la producción de adenosintrifosfato (ATP). Los cuatro primeros complejos provocan un gradiente electroquímico a nivel del espacio intermembranoso mitocondrial; este gradiente permite a continuación producir ATP mediante el complejo V (o ATP sintasa). ADP: adenosindifosfato; Pi: fosfato inorgánico; NAD: dinucleótido de nicotinamida y adenina; NADH: Dinucleotido de nicotinamida y adenina reducido. CoQ_{10} : Ubiquinona. Cyt c: Citocromo C. 1. Membrana externa; 2. Espacio intermembranoso; 3. Membrana interna; 4. Matriz mitocondrial (Feillet, Schmitt, Gherardi y Bonnemains, 2014).

1.2.4 Genoma mitocondrial

Una de las particularidades de estos organelos es la de poseer un sistema genético propio con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene (Arredondo, Venet, Román y Ramírez, 2012).

El genoma mitocondrial ha sido extensamente estudiado, es de herencia materna, ya que el óvulo aporta 100,000 copias de DNA y la cabeza del espermatozoide aporta solo 100 copias de su DNA.

El ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) humano es una molécula bicatenaria, circular, cerrada, sin extremos, con un peso molecular de 11,000,000 daltones aproximadamente, se replica a partir de un solo punto de origen y es muy pequeño. La secuencia del genoma mitocondrial del ser humano se conoce en su totalidad, no posee secciones no codificantes, está compuesto por 16569 pares de bases y contiene un pequeño número de genes, distribuidos entre las cadenas H (pesada o heavy) y L (ligera o light) (Arredondo, Venet, Román y Ramírez, 2012). Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de la molécula de DNA. El mtDNA tiene información para 37 genes frente a los 20,000-25,000 genes del DNA cromosómico nuclear humano. Los 37 genes del mtDNA codifican

para: 2 ácidos ribonucleicos ribosómicos (rRNA), componentes de los ribosomas específicos mitocondriales, 22 de transferencia (tRNA), que son capaces de leer todo el código genético y 13 polipéptidos que forman parte de 4 de los 5 complejos multienzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa, etapa terminal de la ruta de producción de ATP. Estos péptidos corresponden a 7 subunidades del complejo I; una subunidad del complejo III; 3 subunidades del complejo IV y 2 subunidades del complejo V. El resto de los polipéptidos componentes de estos complejos, así como el complejo II completo, están codificados en el DNA nuclear (Solano, Playán, López-Pérez y Montoya, 2001).

Otra característica importante del DNA mitocondrial es que no se recombina, lo cual implica que los únicos cambios que puedan haber ocurrido en el DNA mitocondrial se deben exclusivamente a mutaciones a lo largo de multitud de generaciones. Presentan además, una elevada tasa de mutación debido a 3 aspectos fundamentales: la generación de radicales de oxígeno por la cadena respiratoria, no posee histonas que lo protejan y presenta muy pocos sistemas de reparación.

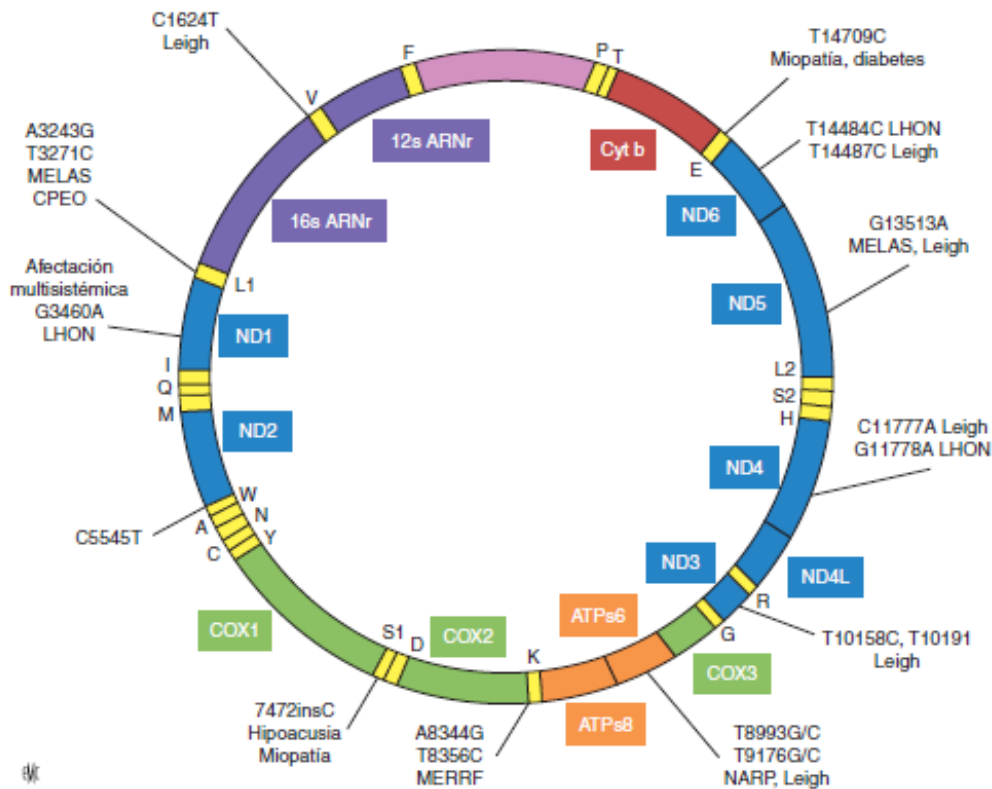


Figura 4. Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA).

El genoma mitocondrial es una molécula de DNA circular bicatenaria de 16,569 pares de bases. Esta molécula posee 37 genes que codifican dos ácidos ribonucleicos ribosómicos (RNAr) (violeta), 22 RNA de transferencia (amarillo) y 13 genes que codifican las subunidades proteicas de los complejos de la cadena respiratoria (complejo I: azul; complejo III: rojo; complejo IV: verde; complejo V: naranja). Los RNA de transferencia codifican los aminoácidos siguientes: prolina (P), treonina (T), glutamato (E), leucina (L1 y L2), serina (S1 y S2), histidina (H), arginina (R), glicina (G), lisina (K), aspartato (D), triptófano (W), asparagina (N), tirosina (Y), alanina (A), cisteína (C), isoleucina (I), glutamina (Q), metionina (M), valina (V), fenilalanina (F). Las principales mutaciones del mtDNA se describen en la figura. Una misma mutación puede provocar varios tipos de afecciones y una misma enfermedad puede relacionarse a varias mutaciones. LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber; MELAS: encefalomiopatia, acidosis láctica y episodios de pseudoictus, MERRF: Epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas; CPEO: Oftalmoplejía crónica progresiva; NARP: Neuropatía sensitiva, epilepsia y retraso mental (Feillet, Schmitt, Gherardi y Bonnemains, 2014)

1.2.5 Segregación mitótica y efecto umbral

El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular debido a que las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas por lo que si en una célula coexisten dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia), a lo largo de las divisiones se podrán originar tres genotipos diferentes: homoplásmico para el DNA mitocondrial normal, homoplásmico para el DNA mutado y heteroplásmico. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje de DNA mutado que contenga. Si el número de moléculas de mtDNA dañado es relativamente bajo se produce una complementación con las moléculas de DNA normal y no se manifestará el defecto genético. Cuando el DNA mutado sobrepasa un umbral determinado se manifestará un fenotipo patogénico (efecto umbral), es decir, si la producción de ATP llega a estar por debajo de los mínimos necesarios para el funcionamiento de los tejidos, debido a la producción defectuosa de proteínas codificadas en el mtDNA, se manifiesta la enfermedad. El número de moléculas de DNA es diferente en cada órgano y tejido según la cantidad de energía requerida para su funcionamiento. Por ello, los órganos que preferentemente se afectan son la visión, el cerebro, corazón, riñón e hígado, así como tejidos como el músculo esquelético.

El mtDNA presenta una tasa de mutación espontánea 10 veces superior a la del DNA nuclear. Este fenómeno puede estar causado porque en la mitocondria se producen continuamente radicales de oxígeno, como consecuencia de la oxidación final de los compuestos carbonados, que pueden dañar a un DNA que no está protegido por proteínas. Debido a este hecho, la variación de secuencias entre individuos de una misma especie es muy grande, hasta unos 70 nucleótidos, y en un mismo individuo se estará generando, a lo largo de la vida, una pequeña heterogeneidad en el mtDNA. De este modo, se ha llegado a proponer que la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar en el envejecimiento pueda ser debida a una acumulación de este daño mitocondrial (Solano, Playán, López-Pérez y Montoya, 2001).

1.3 Enfermedades mitocondriales

Como todo material genético, el mtDNA está sujeto a sufrir mutaciones, algunas de las cuales pueden dar lugar a una gama heterogénea de enfermedades humanas denominadas síndromes mitocondriales o encéfalo-miopatías mitocondriales. Estas enfermedades afectan principalmente a órganos y tejidos con una alta demanda energética, como es el cerebro, los músculos y el sistema endócrino. Entre sus manifestaciones clínicas se incluyen debilidad muscular, intolerancia al ejercicio, ceguera, retraso mental, demencia, epilepsia progresiva, neuropatías sensoriales, ataxia y disfunción renal. Las alteraciones mitocondriales también se han relacionado con otros defectos metabólicos como la diabetes, la obesidad, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y el cáncer.

Son frecuentes y se estima que su prevalencia es de 10-15 casos por cada 100,000 habitantes. Algunas afectaciones se atribuyen al recién nacido y al niño y otras aparecen con más frecuencia en el adolescente o en el adulto. En el niño suelen observarse: la hipotonía neonatal con acidosis láctica, el gravísimo síndrome de Leigh, miocardiopatías y miopatías, el síndrome de Toni-Debré-Fanconi, así como anemias sideroblásticas. En el adulto, las más comunes son las oftalmoplejias (aisladas o

asociadas a diferentes afectaciones neurológicas), las diferentes encefalopatías (con epilepsia y mioclonias, o con accidentes cerebrovasculares de repetición), la atrofia óptica de Leber, las miocardiopatías, la diabetes insulinoresistente o no, la insuficiencia hepática grave y combinaciones más o menos atípicas de afectaciones multiviscerales a priori independientes (Serratrice y Desnuelle, 2004)

1.3.1 Clasificación

El amplio abanico de alteraciones en el metabolismo oxidativo mitocondrial, condiciona cuadros heterogéneos englobados bajo la denominación de enfermedades mitocondriales. En su clasificación se han tenido en cuenta aspectos bioquímicos o genéticos, siendo difícil una clasificación que correlacione ambas con la clínica, por los motivos siguientes (Eiris, Gómez, Blanco y Castro-Gago, 2008):

1. Una misma anomalía bioquímica o molecular se asocia con diferentes fenotipos clínicos
2. Un mismo fenotipo clínico puede obedecer a anomalías bioquímicas o moleculares diferentes
3. La severidad de la afectación clínica no se correlaciona con la intensidad del déficit bioquímico
4. Un órgano bioquímica y molecularmente afectado, aunque clínicamente silente en un momento determinado, puede manifestar su disfunción con la evolución del proceso.
5. El continuo descubrimiento de nuevas expresiones clínicas y de nuevos fundamentos genético-moleculares.

Por lo cual encontraremos variadas formas de clasificación como a continuación y como lo muestran las tablas 1 y 2:

Clasificación por defectos del metabolismo energético:

1. Defectos en la oxidación de los ácidos grasos
2. Defectos del metabolismo del piruvato
3. Déficit de la piruvato carboxilasa
4. Déficit de la piruvato deshidrogenasa
5. Defectos en ciclo de Krebs
6. Defectos en el acoplamiento oxidación-fosforilación
7. Defectos en la cadena respiratoria mitocondrial

Clasificación genética de las enfermedades mitocondriales:

1. Alteraciones del mtDNA
 - Deleciones únicas (habitualmente esporádicas)
 - Duplicaciones o duplicaciones/deleciones (herencia materna)
 - Mutaciones puntuales (herencia materna)
2. Alteraciones del nDNA

3. Alteraciones de los genes que codifican proteínas mitocondriales
 - Mutaciones en genes que codifican para subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial (complejos I y II) (HAR)
 - Mutaciones en proteínas ancilares (complejos III, IV y V) (HAR)
4. Alteraciones en la importación de proteínas mitocondriales (HAR).
5. Alteraciones en la comunicación intergenómica
 - Deleciones múltiples del mtDNA (HAD, HAR)
 - Depleción del mtDNA (HAR)
 - Defectos en la traducción del mtDNA (HAR)
6. Alteraciones en el medio lipídico
 - Síndrome de Barth (HXR)

(Eiris, Gómez, Blanco y Castro-Gago, 2008)

Tabla 1. Principales enfermedades mitocondriales
(Jiménez, 2003)

Mutaciones puntuales en genes codificantes de proteínas	Neuropatía óptica hereditaria de Leber NARP/MILS Intolerancia al ejercicio Necrosis estriatal bilateral
Mutaciones puntuales en genes de tRNA	MELAS MERRF Síndromes de overlap MELAS/MERRF Miopatía Combinaciones variables multisistémicas de cardiomiopatía, miopatía, OEP, disfunción endocrina, encefalopatía y sordera neurosensorial
Mutaciones puntuales en el gen para el rRNA de 12s	Hipoacusia neurosensorial inducida por aminoglucósidos
Reorganizaciones del DNA mitocondrial (duplicaciones/deleciones únicas)	Síndrome de Kearns-Sayre Oftalmoplejía externa progresiva Síndrome de Pearson

Tabla 2. Enfermedades mitocondriales: principales alteraciones bioquímicas y genéticas.
(Serratrice y Desnuelle, 2004).

Fenotipo	Déficit de los complejos de la cadena respiratoria	Alteración genética	Herencia
Mioglobinuria de esfuerzo	Complejos I, IV	Delección mtDNA Pleioplásmica	Autosómica recesiva
Miopatías mitocondriales tardías		Delecciones múltiples mtDNA	Esporádica
Miopatías por AZT		Deplecciones mtDNA	Adquirida
MIMAC	Complejos I, IV	Mut 3.260, 3.303 (ARN ^r ^{leu}) Pleioplásmica	Materna
MERRF	Variedades, sobre todo complejo I, IV	Mut 8.344; 8.356 (ARN ^t ^{lys})	Materna
MELAS	Complejo I	Mut 3.243 ⁺⁺ , 3.271, 3252 (ARN ^t ^{leu})	Materna
ATPasa 6 (NARP) (MNGIE)	0	Mut 8.993 Delecciones múltiples ADNmt	Materna Autosómica dominante
Kearns-Sayre	Complejos I, II, III, IV	Delecciones únicas	Esporádica +++, autosómica dominante o recesiva
Wolfram DIDMOAD		Duplicaciones únicas Delecciones pleioplásmicas Alteraciones del genoma nuclear y mitocondrial	Autosómica recesiva

1.3.2 Clínica de las enfermedades mitocondriales

Si bien existen una serie de síndromes clínicos bien definidos, su característica principal es la heterogeneidad en sus manifestaciones, que viene en parte condicionada por los fenómenos de heteroplasma, segregación mitótica y efecto umbral, de tal modo que cada tejido requiere un determinado porcentaje de mitocondrias afectadas para que se exprese el proceso. Así, la expresión fenotípica de una mutación patogénica del mtDNA no sigue las reglas de la herencia mendeliana y depende en gran medida de las proporciones de mtDNA normal y mutado que existen en un tejido en particular (heteroplasma). El efecto umbral representa la proporción mínima de mtDNA mutado necesaria para alterar el metabolismo oxidativo a un nivel suficiente para que se produzca la disfunción de un determinado órgano o tejido.

Prácticamente, cualquier síntoma o constelación de síntomas relacionados con afectación de cualquier órgano o tejido puede ser reflejo de disfunción mitocondrial, siendo especialmente sugerentes los hechos siguientes (tabla 3):

1. Evidencia de trastorno multistémico progresivo, que afecte en proporción y cronología variable al SNC, sistema nervioso periférico, ojos, audición, musculatura estriada y corazón.
2. Oftalmoplejía externa progresiva, en especial si va asociada a retinitis pigmentaria.
3. Asociación de polimioclonías y ataxia
4. Existencia de ataxia cerebelosa con trastornos sensoriales propioceptivos.
5. Debilidad muscular e intolerancia al ejercicio asociada a un síndrome neurológico.
7. Síndrome de talla baja y déficit de audición progresivo (Eiris, Gómez, Blanco y Castro-Gago, 2008).

Tabla 3. Principales signos y síntomas en relación con la edad que sugieren una enfermedad mitocondrial (Eiris, Gómez, Blanco y Castro-Gago, 2008).

	RN ó Prenatal-1 mes	1 mes-1año	1año-10 años	10 años-20 años
Síntomas o signos principales -Cualquiera puede ser el de presentación -Aislados o combinados en distintas asociaciones	Hipotonía central o periférica	Debilidad miopática	Debilidad miopática	Debilidad miopática
	Encefalopatía	Retraso psicomotor	Intolerancia ejercicio	Intolerancia ejercicio
	Defecto crecimiento	Defecto de crecimiento	Ptosis palpebral	Oftalmoplejía
	Insuficiencia hepática	Trastorno hematológico	Oftalmoplejía	Convulsiones
	Miocardopatía	Regresión neurológica	Regresión neurológica	Atrofia óptica
	Trastorno alimentario	Convulsiones	Convulsiones	Retinitis pigmentaria
	Trastorno hematológico	Trastorno gastrointestinal	Defecto crecimiento	Regresión neurológica
	Dismorfia facial	Coma	Retraso psicomotor	Miocardopatía
	Hipoventilación	Alteraciones oculares	Ataxia	Migraña
	Apneas		Diabetes	Ataxia
	Convulsiones		Miocardopatía	Hipoacusia neurosensorial
	Microcefalia		Disfunción neurológica intermitente	
	Ptosis palpebral		Hipoacusia neurosensorial	
		Retinitis pigmentaria		
		Trastorno hematológico		
		Síndrome mala absorción		
		Otros trastornos endocrinos		
Síndromes principales		Leigh	MERRF	CPEO
		MILS	MELAS	LHON
		Alpers	Kearns-Sayre	MERRF
		Pearson	NARP	MELAS
		Déficit benigno de la CIT-C oxidasa	MNGIE	Kearns-Sayre
			CPEO	MNGIE
			Pearson	NARP
			Miopatía	Leigh
			Miocardopatía	

1.3.3 Diagnóstico

Se fundamenta en la sospecha clínica, sugerida por los datos de anamnesis y exploración física y apoyada inicialmente por los resultados de exploraciones complementarias generales y más adelante, específicas de disfunción mitocondrial. Una posible herencia materna puede sugerirse por la presencia de “signos blandos”, como talla corta, sordera y migrañas en miembros de la rama materna.

El estudio metabólico inicial se orientará a la demostración de una alteración en el estado de oxidorreducción plasmática, que consiste en la determinación de la glucemia, ácidos grasos libres, de cuerpos cetónicos y sobre todo, del ácido láctico y del ácido pirúvico. Incluirá:

a) Determinación de ácido láctico y pirúvico en sangre y, eventualmente, en especial si predomina la afectación del SNC, en LCR. Una muestra aislada normal en ayunas no descarta una disfunción mitocondrial y es preferible la valoración del comportamiento del ácido láctico: a) una hora después de la ingesta del desayuno habitual b) tras la administración de 1,5 g/Kg de glucosa por vía oral o, c) tras la realización de un ejercicio físico leve-moderado (20 minutos de ejercicio, con una FC de 130-140 lpm pueden triplicar el lactato basal en condiciones normales, multiplicándose por 10 en algunos casos de disfunción mitocondrial). Una hiperlactacidemia persistente (>2.5 mmol/l) permiten sospechar de una enfermedad mitocondrial (Feillet, Schmitt, Gherardi y Bonnemains, 2014).

b) Relación ac. láctico/ ac. pirúvico. Indicador del estado redox citoplasmático. Un valor inferior a 20 puede indicar defectos a nivel del complejo piruvato deshidrogenasa o de las enzimas gluconeogénicas, mientras que un cociente sostenidamente elevado (mayor de 20 y especialmente de 25) sugerirán una deficiencia de piruvato carboxilasa o un defecto de la cadena respiratoria mitocondrial.

c) Relación hidroxibutirato/acetoacetato. Indicador del estado redox intramitocondrial; su elevación (3-hidroxibutirato/acetoacetato >2) también será indicativa de disfunción mitocondrial.

d) Cuantificación de aminoácidos en sangre. Una alanina elevada en sangre y/o LCR se encuentra en especial en los casos de Déficit de piruvato deshidrogenasa.

e) Ácidos orgánicos en orina. Puede poner de manifiesto la existencia de aciduria dicarboxílica (Eirís, Gómez, Blanco y Castro-Gago, 2008).

La ausencia de estas anomalías bioquímicas no descarta nunca de forma absoluta una enfermedad mitocondrial y, si existe una fuerte sospecha clínica, se deben realizar estudios radiológicos, en especial, análisis enzimológicos para comprobar la existencia de esta enfermedad.

- **Enzimología**

Cuando la clínica y las pruebas complementarias (laboratorio clínico y anatomía patológica) suscitan una fuerte sospecha de enfermedad mitocondrial, el análisis enzimológico es una etapa esencial del

diagnóstico. Este análisis suele realizarse en una biopsia muscular. Permite medir la actividad de los complejos de la cadena respiratoria de forma aislada o combinada. Estos análisis muestran distintos tipos de resultados:

- Un déficit de un solo complejo apunta hacia una deficiencia de una de las subunidades proteicas de dicho complejo o de una proteína de ensamblaje específico del complejo. Estas afectaciones de un único complejo pueden estar relacionadas con mutaciones que afecten a los genes nucleares o del mtDNA.
- Un déficit múltiple de los complejos I, III, IV y V, con actividad normal del complejo II, es muy sugestivo de una afectación del mtDNA, en especial los síndromes de deleciones y depleciones. El mtDNA codifica las subunidades de todos los complejos de la cadena respiratoria, salvo el complejo II, que por consiguiente, es normal.

• **Estudio genético**

Los estudios genéticos confirman el diagnóstico y pueden permitir el acceso a un diagnóstico prenatal. El doble origen genómico y el elevado número de genes implicados requieren un estudio preciso de cada situación (clínica, estudio de los antecedentes familiares, árbol genealógico, datos bioquímicos, radiológicos, morfológicos, enzimológicos, etc.) antes de comenzar estos estudios (Feillet, Schmitt, Gherardi y Bonnemains, 2014).

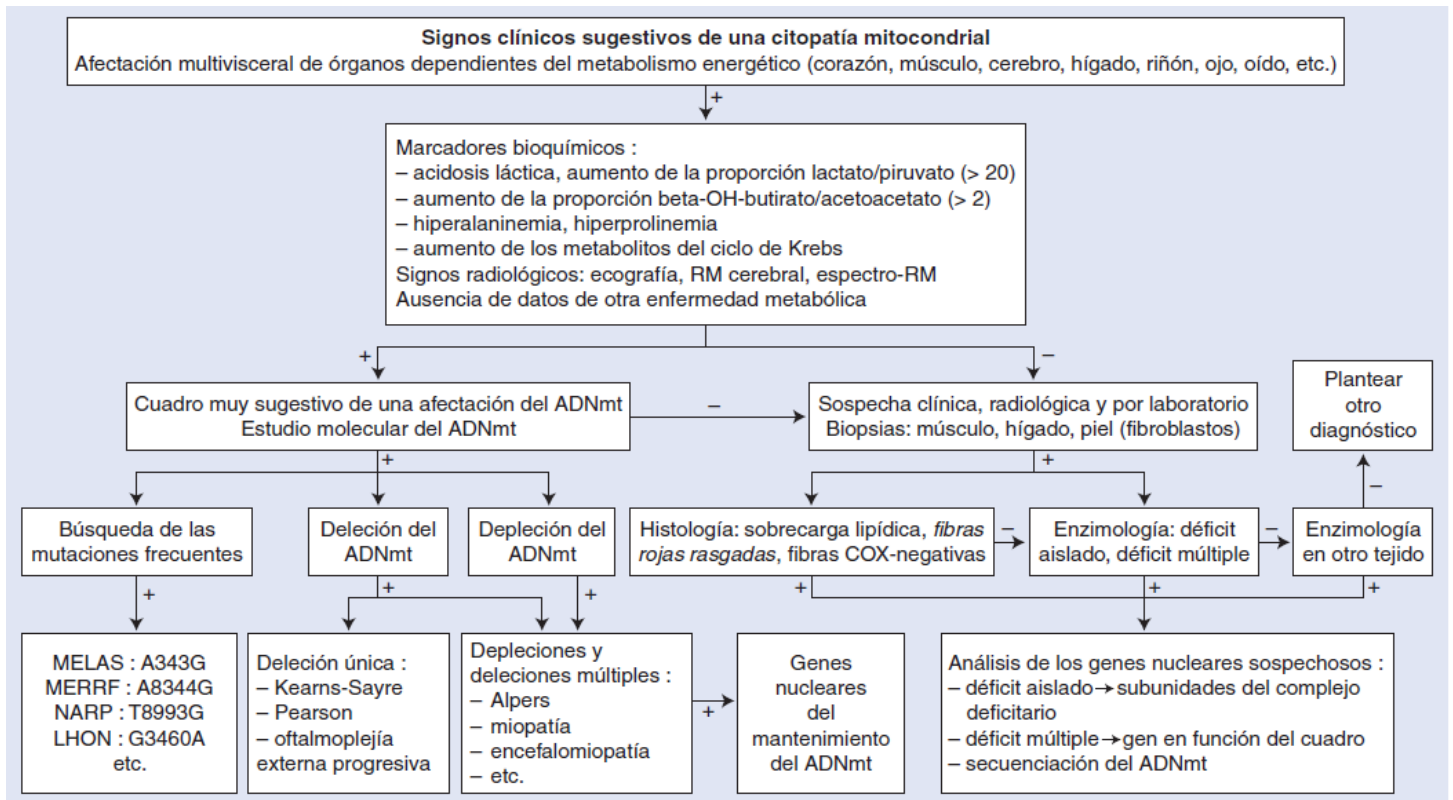


Figura 5. Árbol de decisiones. Actitud ante una sospecha de enfermedad mitocondrial.

RM: Resonancia magnética; ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial; COX: citocromo C oxidasa (Feillet, Schmitt, Gherardi y Bonnemains, 2014).

1.4 Haplogrupos

Existen dos aspectos relevantes del DNA mitocondrial (mtDNA) que lo hacen especialmente útil en los estudios evolutivos humanos. En primer lugar, su transmisión es por vía materna y por lo tanto no sufre recombinación. En segundo lugar, la secuenciación evolutiva del mtDNA es mucho mayor que la del gen nuclear medio. En consecuencia, existe un número importante de mutaciones del mtDNA que se han acumulado de forma secuencial a lo largo de la radiación de los linajes maternos conforme las poblaciones humanas que han colonizado diferentes regiones geográficas del mundo se han distanciado. Los estudios del mtDNA de una amplia gama de poblaciones humanas han revelado un número estable de sitios polimórficos en las regiones de codificación de mtDNA que se denominan haplogrupos (De Lorenzo, Serrano, Portero-Otín y Pamplona, 2011).

Podríamos definir un haplogrupo como una agrupación de haplotipos que comparten ciertas sustituciones diagnósticas (definidas por enzimas de restricción o por secuenciación directa) y que presentan un origen común. Se trata de mutaciones neutrales o silenciosas, cuando el nucleótido que se modifica no altera el funcionamiento del producto de la traducción; es decir no se asocian con patologías y tienden a perpetuarse en el individuo e incluso en poblaciones étnicas. A ese tipo de mutaciones inocuas se les denomina polimorfismos, son homoplásmicas y tienen características antropológicas regionales. Esto implica que los polimorfismos que definen cada haplogrupo se produjeron exclusivamente en las líneas antecesoras de todos los haplotipos que lo integran. El concepto de haplogrupo fue introducido por vez primera por A. Torroni, D. Wallace y colaboradores a inicios de los 90'.

La aplicación de este tipo de estudios en muestras de diferentes continentes por separado reveló la existencia de localizaciones geográficas de los haplogrupos mitocondriales, de manera que podían distinguirse haplogrupos exclusivamente africanos, europeos y asiáticos respectivamente. Esta característica ha resultado ser de extrema utilidad para la inferencia de patrones migratorios dentro y fuera de cada continente.

La nomenclatura inicial propuesta por Wallace y Torroni identifica los haplogrupos principales designándolos con una letra mayúscula (Ej: A, B, C, D, H, I, L, U, V). Los haplogrupos pueden dividirse, a su vez, estos se designan con un número después de la letra correspondiente (Ej: L2). Las subdivisiones al nivel siguiente se realizan alternando letras minúsculas y números (Ej: U5a1b). Las líneas que presentan los motivos (del inglés "motif") propios de un haplogrupo pero no los de los diferentes sub-haplogrupos del mismo se designan con un asterisco (*) y habitualmente reciben el nombre de paragrupos en lugar de haplogrupos (Ej: J*). Cuando dos o más haplogrupos previamente definidos comparten una serie de motivos que sugieren un origen común, se tiende a agruparlos uniendo los nombres de los diferentes clados (Ej: HV, JT) (Wallace, Brown y Lott, 1999)

En la tabla 4 se muestra la frecuencia de la presencia de los diferentes haplogrupos en el mundo.

Tabla 4 Frecuencias estimadas de haplotipos en todo el mundo (%)
(Derbeneva, 2009)

REGION	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	Others	
Africa								17	0	5	2	46	3	1	0		4	15	3	0	1			3.5	
Middle East	0.5	0.4	0.8	0.7		0	0	22	2	13	5	6	3	3.8	1	0	9	15	1	2	3	0	0	12.7	
South East Asia		13																						?	
Australia and Oceania		23										1	7	48	7										?
West Europe				0.5	0			41	2	9	5	1	1	0.5	0		8	18	7	2	2		0	2.2	
East Europe	1.2	0.1	2.2	2.2	1	1	35	2	8	4		2	1	1			11	22	3	1	1	0	1	3.9	
Caucasus	0.5	0.2	3.6	3.9	1		23	2	7	6	0	1	2.5	3			10	22	1	2	4		0	6.1	
Central Asia	6.6	4.5	12	15	5	5	15	1	3	1	0	6	1.5	1			6	9.6	0	2	0	1	2	4.8	
East Asia	6.5	16	5.2	26	0	11	4	0.6		1			15	3.1	2		0	0.1		0		1	2	0.5	
Siberia	7.5	2.5	30	19	0	4	5	4.2	0	2	0		3	3	1	1	2	6.1	0	0	0	4	1	1.1	
North America	43	23	18	10	1																	3		0.4	
South and Central Americas	28	27	21	19	1							2												0	2.4

Se ha encontrado que las mutaciones que dan forma a los haplogrupos mitocondriales también tienen influencia en diversos fenotipos patológicos y no patológicos. Sin embargo se conoce relativamente poco de la asociación de los haplogrupos mitocondriales con fenotipos específicos causados por mutaciones en el mtDNA, sin embargo ya se han realizado trabajos que buscan despejar esta incógnita; y en el futuro se contará con más información para tratar de correlacionar estas variantes.

1.5 Hipoacusia

1.5.1 Fisiología de la audición

Cuando un objeto produce un sonido, éste causa cambios en el aire que lo rodea que se alejan de esta fuente de origen. El oído es el órgano encargado de captar y transmitir estas ondas sonoras al cerebro para que sean interpretadas como sonido. Para que esto suceda, las ondas tienen que pasar a través de diferentes áreas del oído (oído externo, medio e interno), cada una de las cuales tiene una función definida y específica.

El oído externo incluye la oreja y el conducto auditivo externo. La oreja permite captar ondas y enviarlas a través de un “embudo” al conducto auditivo externo, al final del cual está la membrana timpánica (tímpano).

El tímpano que está conectado con tres huesecillos, martillo, yunque y estribo (cadena osicular) transmite estas vibraciones al oído interno (figura 6). El estribo está en contacto con los líquidos del oído interno como un pistón rodeado por un émbolo llamado ventana oval. En el oído medio también está la trompa de Eustaquio, que lo comunica con la parte de atrás de la faringe. La trompa se abre cuando deglutimos, y permite así que la presión del oído medio (que está lleno de aire) sea igual a la presión del medio ambiente (Goycoolea, 2016).

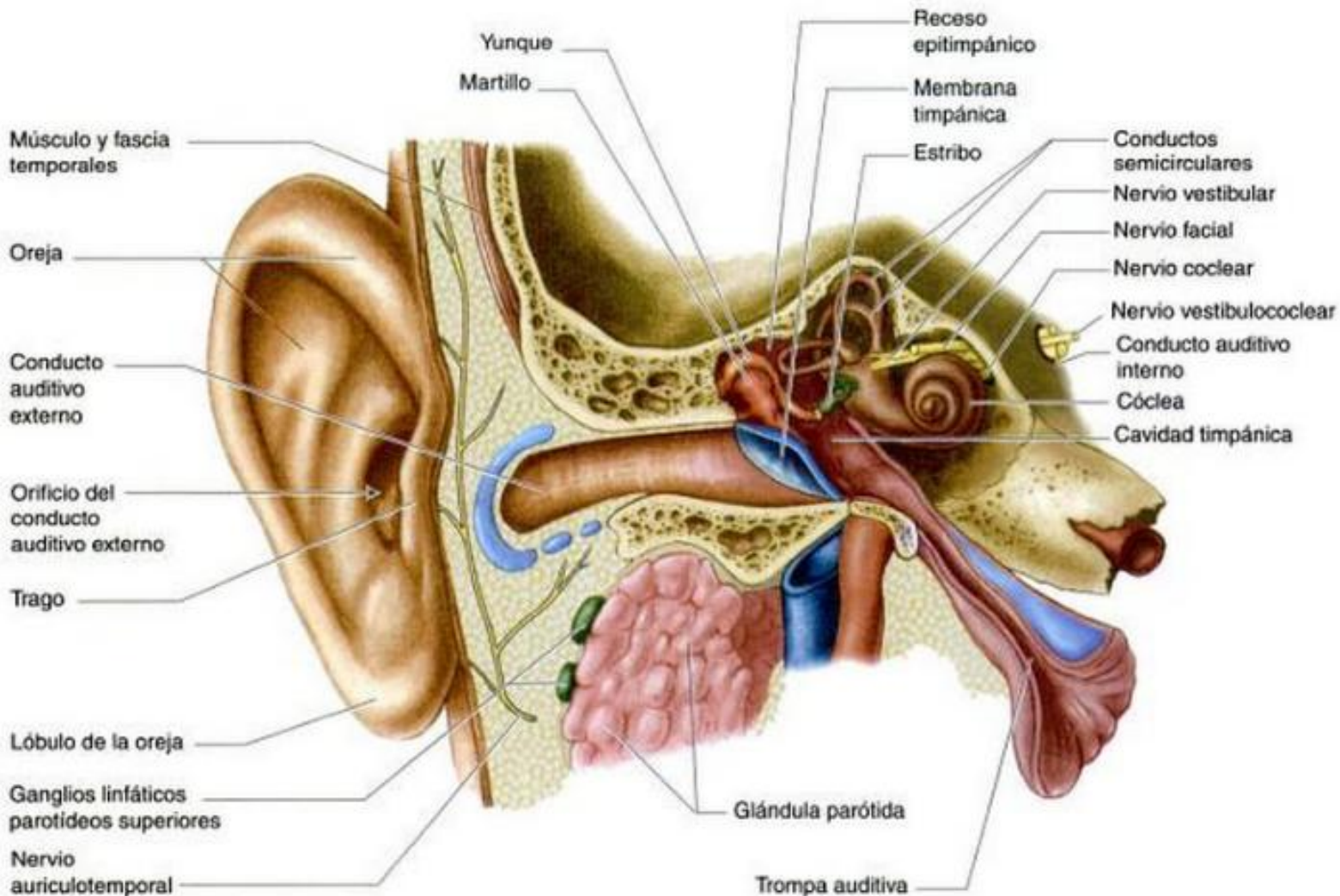


Figura 6. Esquema del oído.

Se muestra una sección coronal del oído. El oído tiene tres porciones: externa, media e interna. El oído externo está formado por la oreja y el conducto auditivo externo. El oído medio es un espacio aéreo en el que se localizan los huesecillos. El oído interno contiene el laberinto membranoso; sus principales divisiones son el laberinto coclear y el laberinto vestibular (Moore y Dalley, 2009).

El oído interno contiene receptores para dos sistemas sensoriales: el sistema auditivo (audición) y el vestibular (orientación espacial y equilibrio). El oído interno contiene los llamados laberintos óseo y membranoso. El laberinto óseo (hueso con una cavidad dentro de él) está lleno de un líquido llamado perilinfa y contiene tres cavidades principales: el vestíbulo (que alberga al sáculo y al utrículo), la cóclea y los canales semicirculares. Estas cavidades están formadas por una serie de ductos membranosos comunicados entre sí, inmersos en la perilinfa, y que a su vez contienen un líquido llamado endolinfa. Los canales semicirculares (responden a aceleración rotatoria), el sáculo y el utrículo (responden a aceleración lineal) forman el laberinto membranoso del sistema vestibular. El laberinto membranoso del sistema auditivo lo constituye el ducto coclear, que contiene las células ciliadas del órgano de Corti.

El laberinto óseo de la cóclea entonces está lleno de perilinfa. En medio de su lumen y bañado en perilinfa está el ducto coclear (escala media) bañado en endolinfa y que contiene el órgano de Corti que está alojado y descansa sobre una membrana llamada membrana basilar. Es en el órgano de Corti donde las ondas sonoras que llegan a la endolinfa y al vibrar la membrana basilar, son transformadas por sus células ciliadas en impulsos eléctricos. El órgano de Corti contiene dos tipos de células ciliadas: una hilera de células ciliadas internas, y tres hileras de células ciliadas externas. Las ciliadas internas son solo receptoras, se depolarizan mecánicamente (pasivamente) con las vibraciones de la membrana basilar y transmiten señales a las células ganglionares (que originan las fibras del nervio auditivo). Las células ciliadas externas son motoras además de sensoriales, y contribuyen a la sensibilidad y selectividad auditiva (se elongan y contraen con los estímulos auditivos pues tienen una proteína que lo permite llamada prestina).

Las células cocleares no solo transforman el sonido en impulsos eléctricos, sino que también preservan las frecuencias. Lo hacen por tener una organización llamada tonotópica a través del ducto coclear. Las células ciliadas en la base de la cóclea son estimuladas por frecuencias agudas, mientras las apicales lo son por las graves.

Las terminaciones nerviosas que las células ciliadas estimulan son las (dendritas) de las células ganglionares que están alojadas en el centro de la cóclea en el llamado ganglio espiral. Las terminaciones (axones) de las células ganglionares forman las fibras nerviosas del nervio auditivo que van a los núcleos del tronco cerebral. De allí van en forma ipsi y contralateral (por el mismo lado del oído estimulado y también por el lado opuesto) haciendo distintas conexiones (sinapsis) en distintos núcleos celulares hasta llegar a la corteza cerebral.

Cuando se mide la audición, se evalúa la conducción aérea y ósea. Esto permite determinar el tipo de pérdida auditiva (ej. conductiva, neurosensorial o mixta), al comparar la audición a través de conducción aérea (a través del oído medio) y ósea (enviando estímulos a través del cráneo saltándose el oído medio) (Goycoolea, 2016).

1.5.2 Definición de Hipoacusia

La audición es la capacidad del individuo para detectar, procesar e interpretar las vibraciones sonoras. La capacidad auditiva tiene un papel fundamental en el desarrollo y la relación de la persona con el medio. La hipoacusia o pérdida auditiva es uno de los problemas de salud más comunes. Puede manifestarse en diferentes grados y ser temporal o permanente. De forma genérica la hipoacusia se define como la merma de la capacidad auditiva por alteración en alguna parte de la vía auditiva desde el pabellón auricular hasta la corteza auditiva. Es la pérdida mayor o menor de la audición. La pérdida total de la audición se denomina anacusia.

Para realizar una definición más exacta es necesario tener en cuenta algunos conceptos fisiológicos y físicos. El oído humano es capaz de detectar vibraciones sonoras entre 20 y 20,000 Hertzios (Hz), aunque desde el punto de vista clínico, es importante las frecuencias comprendidas entre 125 y 8,000 Hz. Entre estas frecuencias se encuentran las denominadas conversacionales, que son las de 500, 1000 y 2000 Hz, y que sirven para definir los grados de hipoacusia. En lo referente a la intensidad sonora, esta se mide en decibelios (dB). Clínicamente la hipoacusia se define por la intensidad mínima en la que el individuo es capaz de detectar el sonido, de tal manera que una hipoacusia leve cuando esta intensidad (umbral) se encuentre entre 21 y 40 dB, moderada entre 41 y 70 dB, severa entre 71 y 90 dB, profunda entre 91 y 119 dB e hipoacusia total o cofosis cuando el paciente no sea capaz de oír sonidos de 120 dB (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015)

1.5.3 Prevalencia en México

Los resultados del XII Censo General de Población y Vivienda 2000, reportaron casi tres personas con discapacidad auditiva por cada mil habitantes en el país, esto significa alrededor de 281 mil personas.

Se observa al interior de las entidades federativas que la de mayor prevalencia de discapacidad auditiva fue Yucatán, al contar con 4.4 personas con discapacidad auditiva por cada mil habitantes, seguida por Zacatecas e Hidalgo ambas con cuatro personas. En contraste, Baja California (1.7), Chiapas (1.9) y Quintana Roo (2), fueron las entidades de menos prevalencia con esta discapacidad.

La estructura por edad de las personas con discapacidad auditiva, muestra que a medida que se incrementa la edad también aumenta la proporción de personas con esta característica; es decir, más de la mitad (55.4%) de la población con discapacidad auditiva tenía 60 años, más del 22.8% se encontraba entre los 30 - 59 años y 20.6% eran menores de 30 años.

Existen diversas causas por las que se pueden adquirir este tipo de discapacidad, en México 38.2% de la población declaró padecerla debido a la edad avanzada (presbiacusia). La presbiacusia afectó más a las mujeres (40.6%) que a los hombres (36.3%). Las enfermedades resultaron ser la segunda causa de la discapacidad auditiva con 25.5%. De las personas con esta discapacidad, el 16.2% de los casos tuvieron su origen alrededor del nacimiento, relacionados en gran medida con factores hereditarios, enfermedades eruptivas de la madre (rubéola, sarampión, varicela, etc.), ingestión de antibióticos durante el embarazo, incompatibilidad sanguínea (INEGI, 2004).

1.5.4 Clasificación

La hipoacusia se clasifica según los que se muestran a continuación:

1. **Clasificación topográfica:** Existen diferentes tipos de hipoacusia, según el lugar en el que asienta la lesión, basados en la diferenciación anatómica y funcional del oído:
 - Oído externo
 - Oído medio
 - Oído interno

Teniendo en cuenta esta diferenciación, las hipoacusias se pueden clasificar en los siguientes grupos:

A. Hipoacusia de transmisión o conductiva

La patología se sitúa anatómicamente en el oído externo o en el oído medio. El oído interno “receptor” está normal. Se produce una alteración de la anátomo-fisiología normal que impide que el oído externo y medio conduzcan adecuadamente las ondas sonoras al receptor auditivo y la vía auditiva.

En el oído externo, las alteraciones congénitas (malformaciones), la patología infeccioso-inflamatoria, los cuerpos extraños y los tumores pueden originar una hipoacusia de transmisión, siendo los tapones de cerumen y la patología infecciosa los más frecuentes con mucha diferencia. Entre las causas de hipoacusia transmisiva, en el oído medio podemos encontrar las malformaciones, los procesos infeccioso-inflamatorios y sus secuelas, los traumatismos, las alteraciones de la cadena osicular por fijación y los tumores, siendo la patología infecciosa y sus posibles secuelas sobre la membrana timpánica y la cadena osicular las causas más frecuentes (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015)

B. Hipoacusia neurosensorial

En las hipoacusias neurosensoriales la disfunción se halla en el receptor auditivo que se encuentra en la cóclea (sensorial) o en el nervio-vía auditiva (neural). El oído interno tiene una fisiología compleja y su función básicamente es transformar una energía mecánica en un impulso eléctrico que estimula el nervio y la vía auditiva. Son más frecuentes las hipoacusias de origen coclear. Un gran porcentaje de ellas son idiopáticas, aunque muchas tienen un condicionamiento genético.

Otros mecanismos que conducen al daño o disfunción de la cóclea son las malformaciones, los traumatismos, la sobreestimulación acústica (trauma sonoro), la ototoxicidad, el envejecimiento del órgano auditivo y los fenómenos inmunomediados o autoinmunes. La patología infecciosa por extensión desde el oído medio o el espacio meníngeo puede dañar de forma severa el receptor auditivo.

La hipoacusia neural por afectación del VIII par craneal o la vía auditiva es menos frecuente, siendo la etiología más frecuente los tumores del ángulo pontocerebeloso (schwannoma del VIII par craneal). Otras causas menos frecuentes son la meningitis, las enfermedades desmielinizantes o

neurodegenerativas y las malformaciones. El rasgo cualitativo más importante de las hipoacusias neurosensoriales es la alteración en la inteligibilidad del lenguaje (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015).

C. Hipoacusia mixta

En esta situación encontramos una combinación de mecanismos, bien por patologías coincidentes que afectan ambas regiones, o bien por progresión de algunas patologías.

2. **Clasificación cuantitativa:** Dependiendo de la pérdida de audición:

- A. Leve o ligera: 21-40 dB
- B. Moderada: 41-70 dB
- C. Severa: 71-90 dB
- D. Profunda: 91-119 dB
- E. Deficiencia auditiva total: >120 dB

3. **Clasificación evolutiva:** Según la progresión en el tiempo

- A. Hipoacusias estables: Son las que no modifican el umbral de audición con el paso del tiempo.
 - B. Hipoacusias progresivas: Aquellas en las que el déficit auditivo va aumentando con mayor o menor rapidez, pero inexorablemente, a lo largo de los años.
 - C. Hipoacusias rápidamente progresivas: Evolucionan con gran prontitud, profundizándose en el plazo de algunas semanas o meses.
 - D. Hipoacusias bruscas: Son procesos de variada etiopatogenia, en los que la hipoacusia se instaura de forma brusca, en un breve plazo de minutos u horas
 - E. Hipoacusia fluctuante: Determinados procesos evolucionan con una audición cambiante.
- (Collazo, Corzón y de Vergas, s.f.)

4. **Clasificación en relación con adquisición del lenguaje**

- A. Hipoacusia prelocutiva: Tiene lugar antes del desarrollo del lenguaje hablado. Va a tener una enorme trascendencia, ya que dificulta o impide el aprendizaje del habla y altera la progresión cultural.
- B. Hipoacusia postlocutiva o postlingual: La hipoacusia aparece cuando el lenguaje está bien desarrollado.
- C. Hipoacusia perilocutiva: La hipoacusia aparece durante la adquisición del lenguaje.

5. **Clasificación cronológica**

- A. Prenatales: Son aquellas hipoacusias que aparecen antes del nacimiento. Pueden ser genéticas o adquiridas. Además pueden asociarse o no a otras malformaciones congénitas: formas asociadas o sindrómicas y formas puras, no sindrómicas o aisladas.
- B. Perinatales: Son aquellas hipoacusias que aparecen durante el parto o en las primeras horas del periodo neonatal.
- C. Postnatales: Aquellas hipoacusias que aparecen con posterioridad al nacimiento. (Collazo, Corzón y de Vergas, s.f.)

1.5.5 Causas de hipoacusia neurosensorial

Hipoacusia inducida por ruido

La exposición diaria acumulativa en el tiempo a ruidos tiene impacto en la capacidad auditiva y constituye la segunda causa más frecuente de hipoacusia. Se trata de una entidad compleja en la cual influyen factores ambientales y también genéticos.

Se encuentra asociada no sólo a lesiones cocleares sino también a daños en las vías auditivas centrales. Los estudios de asociación genética han identificado factores genéticos fundamentalmente asociados a estrés oxidativo que condicionan una susceptibilidad para la aparición de tal hipoacusia.

El mecanismo fisiopatológico involucra generalmente la lesión mecánica directa de las estructuras cocleares y una sobrecarga metabólica secundaria a sobreestimulación, lo que supone un exceso de liberación de óxido nítrico que puede dañar las células ciliadas. Asimismo, la generación de radicales libres de oxígeno, tóxicos para las membranas, y la disminución de las concentraciones de magnesio, debilitan las células ciliadas al disminuir la concentración intracelular de calcio (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015).

Hipoacusia por ototóxicos

La ototoxicidad es el efecto nocivo, reversible o irreversible, producido sobre el oído por diversas sustancias denominadas ototóxicas y que afectan a la audición y/o al equilibrio. La hipoacusia se inicia a menudo en frecuencias altas y con el uso continuo de la medicación ototóxica empeora, pudiendo incluso progresar hasta después de haber suspendido la exposición al ototóxico. Cualquier pérdida auditiva asociada a tratamiento antibiótico o quimioterapéutico es de carácter permanente. La exposición prolongada a aminoglicósidos produce toxicidad vestibular y coclear. Existe una predisposición genética para el desarrollo de ototoxicidad con aminoglicósidos.

Los antecedentes familiares y personales siguen siendo actualmente las herramientas más valiosas para la prevención de la ototoxicidad secundaria a aminoglicósidos. El orden relativo de toxicidad

coclear se distribuye así: gentamicina > tobramicina > amikacina > neomicina. Otros antibióticos orales que pueden ser causa de ototoxicidad son eritromicina y tetraciclina. Estos últimos tienen un efecto ototóxico más pronunciado en pacientes con insuficiencia renal. Muchos agentes quimioterápicos producen hipoacusia, siendo los más descritos cisplatino, 5-fluorouracilo, bleomicina (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015).

Prebiacusia

Se trata de la pérdida de audición asociada al envejecimiento y es una causa de hipoacusia frecuente a nivel mundial. Se describe como una pérdida auditiva de etiología multifactorial progresiva y de años de evolución, simétrica y de predominio en frecuencias agudas, en un paciente de edad avanzada. Su presentación y curso clínico tienden a ser variables.

Entre sus factores de riesgo se encuentran: bajo estatus socioeconómico, exposición a ruidos, exposición a ototóxicos, infecciones, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes, patología vascular, alteraciones inmunológicas, factores hormonales y predisposición genética.

Traumatismos

Las fracturas de peñasco que son fracturas de la base de cráneo en las que la hipoacusia tiene una importancia secundaria, con otros riesgos potencialmente vitales para el paciente. Clásicamente las fracturas de peñasco se han clasificado en transversales y longitudinales, dependiendo del trazo de la fractura. pueden producir una hipoacusia neurosensorial por afectación del oído interno. Atendiendo a la clasificación clásica de este tipo de fracturas, las transversales se asocian con más frecuencia a daño en el oído interno y, por tanto, a hipoacusia neurosensorial irreversible que suele ser severa, incluso completa.

Hipoacusia súbita

Se define como una pérdida auditiva neurosensorial de al menos 30 dB en 3 frecuencias contiguas de una audiometría, que se desarrolla en un período menor de 72 horas.

Se presentan 5-20 casos por 100.000 habitantes por año. Hasta el 75% de los casos se observan en mayores de 40 años sin clara distinción entre géneros. Suele ser unilateral y raramente (4%) puede ser bilateral; en estos casos la mayor parte de las veces se presenta de manera asincrónica (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015).

Hipoacusias autoinmunes

Se trata de una hipoacusia neurosensorial rápidamente progresiva (en pocos meses) bilateral fluctuante, unilateral o súbita. Se puede asociar a acúfeno y a síntomas vestibulares y se puede

desarrollar de dos maneras, la denominada órganoespecífica, en la que solo existen síntomas a nivel del oído, y la no órgano-específica, en la que la clínica otológica aparece en el seno de otra enfermedad inmunomediada (lupus, artritis reumatoide, vasculitis, tiroiditis) (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015).

1.5.6 Diagnóstico etiológico de las hipoacusias neurosensoriales

Para obtener un diagnóstico etiológico es necesario conocer con precisión los antecedentes familiares y personales, realizar una meticulosa exploración física y, cuando esté indicado, solicitar estudios complementarios radiológicos, bioquímicos o genéticos.

1.5.6.1 Antecedentes familiares

La construcción de un buen árbol genealógico es el punto de partida para un adecuado asesoramiento genético. En condiciones ideales debería cubrir 3 generaciones y, como mínimo, debe incluir las exploraciones audiológicas y otológicas de los familiares de primer grado del caso índice. La penetrancia incompleta, la expresividad variable y la heterogeneidad genética y alélica son factores que deben ser tenidos en cuenta a la hora de valorar un árbol genealógico y, sobre todo, durante el asesoramiento genético de los familiares.

Durante la evaluación de una determinada genealogía siempre ha de tenerse en cuenta la posibilidad de falsas paternidades, adopciones o, incluso, la posibilidad de que la mutación haya surgido *de novo*, siendo por lo tanto el paciente el primer portador en la familia (Cabanillas y Cadiñanos, 2011).

1.5.6.2 Antecedentes personales

Una detallada historia clínica ha de incluir información sobre la salud materna, el embarazo, el parto y el periodo posnatal. Ha de prestarse especial atención al uso de fármacos potencialmente ototóxicos, incluyendo el consumo de alcohol durante el embarazo. También han de considerarse las infecciones, especialmente las meningitis bacterianas. Siempre es necesario descartar la presencia de enfermedad en otros órganos o sistemas, especialmente neurológica, oftalmológica o vestibular. Asimismo, en los niños es importante constatar la adecuada consecución de los diferentes hitos del desarrollo psicomotor.

Debe ser concreta, enfatizando en el tiempo de evolución: súbita (en horas o días), fluctuante (semanas), rápidamente progresiva (en menos de 6 meses) o de evolución lenta (años), uni o bilateral, simétrica o asimétrica, afectación de la inteligibilidad (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015).

1.5.6.3 Exploración física

El primer objetivo ha de ser clasificar la hipoacusia como sindrómica o no sindrómica. Para ello es necesaria una exploración meticulosa y sistemática, con atención a los signos característicos de los síndromes más frecuentes (malformaciones auriculares, quistes branquiales, flequillo blanco, telecantus, bocio, anomalías esqueléticas y craneofaciales, etc.) (Cabanillas y Cadiñanos, 2011).

1.5.6.4 Estudios complementarios

Tienen especial relevancia las pruebas audiológicas. A grandes rasgos existen dos tipos de pruebas: subjetivas y objetivas. En las pruebas subjetivas se requiere una colaboración activa del paciente para expresar su percepción de la audición. Estas pruebas incluyen la acumetría, la audiometría tonal (prueba más importante que define el tipo y grado de hipoacusia) y la audiometría verbal (mide el aspecto cualitativo de la audición). Las pruebas objetivas se basan en la detección de una respuesta fisiológica ante un estímulo sonoro. No requieren colaboración activa del paciente. La prueba principal es la de potenciales auditivos evocados del tronco cerebral, que tienen especial relevancia en la exploración audiológica infantil y se reducen al ámbito de la atención especializada (Olarieta, García, Pérez y Rivera, 2015).

Tras el adecuado estudio audiológico, el tipo de hipoacusia y la edad del paciente deben dirigir la selección de las pruebas que han de solicitarse. Entre la batería de estudios que se deben considerar están la resonancia magnética (RM), la tomografía computarizada (TC), la ecografía renal, las serologías (citomegalovirus, toxoplasma, sífilis, rubéola, etc.), la bioquímica de sangre y orina, el electrocardiograma, o el fondo de ojo y la electroretinografía.

1.5.6.5 Estudios genéticos

Cuando no es posible identificar una causa evidente, los tests genéticos son la prueba diagnóstica con un mayor rendimiento en las hipoacusias neurosensoriales no sindrómicas, tanto en los niños, como en los adultos.

A la hora de plantear el estudio de las hipoacusias hereditarias resulta fundamentalmente necesario tomar en cuenta:

- Penetrancia incompleta: sólo un porcentaje de los individuos portadores del gen alterado manifiesta la enfermedad.
- Expresividad variable: la severidad de las manifestaciones clínicas difiere entre individuos portadores de una misma mutación.
- Heterogeneidad genética: mutaciones en genes diferentes pueden producir una misma manifestación clínica.
- Heterogeneidad alélica: una misma mutación puede dar lugar a enfermedades diferentes (Cabanillas y Cadiñanos, 2011).

1.5.7 Genes más frecuentemente implicados en Hipoacusias neurosensoriales no sindrómicas

La mayoría de los genes responsables de las hipoacusias genéticas no sindrómicas codifican proteínas involucradas en el desarrollo, estructura y función de la cóclea.

En las siguientes tablas 5, 6 y 7 se muestran los más de 50 genes identificados hasta el momento. Nótese que, debido a la heterogeneidad alélica y genética previamente descritas, un mismo gen puede

aparecer en más de una tabla. Del mismo modo, algunos de estos genes son también responsables de hipoacusias sindrómicas.

Tabla 5. Genes implicados en hipoacusias genéticas no sindrómicas de herencia autosómica recesiva.

(Cabanillas y Cadiñanos, 2011)

Locus	Gen	Proteína	Locus	Gen	Proteína
DFNB1A	<i>GJB2</i>	Conexina 26 ^a	DFNB29	<i>CLDN14</i>	Claudina 14
DFNB1B	<i>GJB6</i>	Conexina 30 ^a	DFNB30	<i>MYO3A</i>	Miosina IIIA
DFNB2	<i>MYO7A</i>	Miosina VIIA ^a	DFNB31	<i>WHRN</i>	Whirlina ^a
DFNB3	<i>MYO15A</i>	Miosina XVA	DFNB35	<i>ESRRB</i>	ESRRB
DFNB4	<i>SLC26A4</i>	Pendrina ^a	DFNB36	<i>ESPN</i>	ESPN
DFNB6	<i>TMIE</i>	TMIE	DFNB37	<i>MYO6</i>	Miosina VI ^a
DFNB7/DFNB11	<i>TMC1</i>	TMC1	DFNB39	<i>HGF</i>	Factor de crecimiento hepatocítico
DFNB8/DFNB10	<i>TMPRSS3</i>	TMPRSS3	DFNB49	<i>MARVELD2</i>	MARVELD2
DFNB9	<i>OTOF</i>	Otoferlina	DFNB53	<i>COL11A2</i>	Colágeno XI, $\alpha 2^a$
DFNB12	<i>CDH23</i>	Cadherina 23 ^a	DFNB59	<i>PJVK</i>	Pejvakina
DFNB16	<i>STRC</i>	Estereocilina	DFNB61	<i>SLC26A5</i>	Prestina
DFNB18	<i>USH1C</i>	Harmonina ^a	DFNB63	<i>LRTOMT</i>	LRTOMT
DFNB21	<i>TECTA</i>	α -Tectorina	DFNB66/67	<i>LHFPL5</i>	LHFPL5
DFNB22	<i>OTOA</i>	Otoancorina	DFNB77	<i>LOXHD1</i>	LOXHD1
DFNB23	<i>PCDH15</i>	Protocadherina 15 ^a	DFNB79	<i>TPRN</i>	Taperina
DFNB24	<i>RDX</i>	Radixina	DFNB82	<i>GPSM2</i>	GPSM2
DFNB25	<i>GRXCR1</i>	GRXCR1	DFNB84	<i>PTPRQ</i>	PTPRQ
DFNB28	<i>TRIOBP</i>	TRIOBP		<i>GJB3</i>	Conexina 31 ^a

^a Estos genes pueden ocasionar también una hipoacusia sindrómica.

Tabla 6. Genes implicados en hipoacusias genéticas no sindrómicas de herencia autosómica dominante.

(Cabanillas y Cadiñanos, 2011)

Locus	Gen	Proteína	Locus	Gen	Proteína
DFNA1	<i>DIAPH1</i>	DIAPH1	DFNA13	<i>COL11A2</i>	Colágeno XI, $\alpha 2^a$
DFNA2A	<i>KCNQ4</i>	KCNQ4	DFNA15	<i>POU4F3</i>	POU4F3
DFNA2B	<i>GJB3</i>	Conexina 31 ^a	DFNA17	<i>MYH9</i>	MYH9 ^a
DFNA3A	<i>GJB2</i>	Conexina 26 ^a	DFNA20/26	<i>ACTG1</i>	$\gamma 1$ -Actina
DFNA3B	<i>GJB6</i>	Conexina 30 ^a	DFNA22	<i>MYO6</i>	Miosina VI ^a
DFNA4	<i>MYH14</i>	MYH14	DFNA28	<i>GRHL2</i>	GRHL2
DFNA5	<i>DFNA5</i>	DFNA5	DFNA36	<i>TMC1</i>	TMC1
DFNA6/DFNA14/DFNA38	<i>WFS1</i>	Wolframina ^a	DFNA44	<i>CCDC50</i>	CCDC50
DFNA8/DFNA12	<i>TECTA</i>	α -Tectorina	DFNA48	<i>MYO1A</i>	Miosina IA
DFNA9	<i>COCH</i>	Coclina	DFNA50	<i>MIRN96</i>	Micro-RNA 96
DFNA10	<i>EYA4</i>	EYA4 ^a	DFNA51	<i>TJP2</i>	Proteína de uniones estrechas 2
DFNA11	<i>MYO7A</i>	Miosina VIIA ^a		<i>CRYM</i>	μ -Cristalina

^a Estos genes pueden ocasionar también una hipoacusia sindrómica.

Tabla 7. Genes implicados en hipoacusias genéticas no sindrómicas de herencia ligada al cromosoma X o mitocondrial. (Cabanillas y Cadiñanos, 2011)

Herencia ligada al CR X		
Locus	Gen	Proteína
DFNX1	<i>PRPS1</i>	Fosforibosilpirofosfatasa sintetasa 1 ^a
DFNX2	<i>POU3F4</i>	POU3F4
Herencia mitocondrial		
Gen	Proteína	
<i>MTRNR1</i>	ARN ribosómico mitocondrial 12S	
<i>MTTS1</i>	ARN de transferencia mitocondrial serina 1 ^a	

^a Estos genes pueden ocasionar también a una hipoacusia sindrómica.

1.6 Mutación A1555G

La mutación A1555G consiste en una sustitución de Adenina (A) por Guanina (G) en el nucleótido 1555 del gen 12S RNAr del DNA mitocondrial.

Esta mutación se considera la causa más frecuente de hipoacusia poslocutiva en la población española. En algunos individuos, la pérdida de audición se desencadena como consecuencia de la administración de antibióticos aminoglucósidos, mientras que en otros la hipoacusia aparece espontáneamente (Cabanillas y Cadiñanos, 2011).

1.6.1 Mutación A1555G relacionada a la ototoxicidad de los aminoglucósidos

La ototoxicidad se define como el conjunto de las alteraciones, por lo general irreversibles, de las estructuras sensoriales del oído interno (cóclea y vestíbulo) inducidas por los tratamientos administrados por vía local o general. Hay varias clases terapéuticas implicadas, las principales son los antibióticos aminoglucósidos y macrólidos, la aspirina y los salicilatos, los diuréticos del asa, algunos antimicóticos, la quinina y sus derivados (Dulon, Mosnier y Bouccara, 2013).

Los aminoglucósidos son, sin duda alguna, los antibióticos más utilizados en el mundo para combatir las infecciones graves causadas por bacterias gramnegativas, sobre todo la tuberculosis. Sin embargo, el uso de estas moléculas debe someterse a un control estricto, porque causan efectos secundarios tóxicos graves sobre el riñón y el oído interno.

La ototoxicidad puede agravarse por una exposición al ruido o por factores de predisposición genética mitocondrial.

Los aminoglucósidos son moléculas de amplio espectro muy eficaces contra muchas cepas bacterianas gramnegativas como: *Brucella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Los aminoglucósidos producen una amplia gama de acciones pleiótropas sobre las bacterias, de las que cuatro son relevantes: alteración de la síntesis proteica, alteración de la síntesis de ácido desoxirribonucleico y de ácido ribonucleico, inhibición de la respiración y, por último, degradación de la membrana bacteriana. El transporte de aminoglucósidos al interior de las bacterias se realiza esencialmente en tres fases: La primera implica la fijación de estas moléculas policatiónicas a las cargas negativas de las cabezas polares de los fosfolípidos de la superficie externa de la membrana plasmática. Esta fijación inicial a la superficie bacteriana es rápida y reversible, y se puede inhibir de forma competitiva por una concentración elevada de iones divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} . La segunda fase es dependiente de energía e implica al transporte de los aminoglucósidos a través de la membrana plasmática y su contacto subsiguiente con los ribosomas. Esta etapa puede desbloquearse por los inhibidores de la cadena respiratoria, como el dinitrofenol y la carbonil cianuro-m-clorofenil-hidrazona, moléculas que producen una degradación del potencial de membrana celular (interior negativo). En el mecanismo de transporte a través de la membrana citoplasmática podrían participar las quinonas y otros elementos de la cadena respiratoria. La tercera fase del transporte intracelular implica la fijación irreversible de estas moléculas a los ribosomas bacterianos, sobre todo a la subunidad 30S, lo que altera la traducción de los RNA mensajeros y causa errores de lectura del código genético. Esta interacción con los ribosomas altera la síntesis proteica, lo que da origen al efecto bactericida.

Aunque la administración de dosis elevadas de aminoglucósidos durante periodos prolongados de tiempo produce ototoxicidad en la mayor parte de los individuos, existe un componente genético que determina una mayor susceptibilidad al efecto ototóxico de dosis bajas de estos antibióticos. La mutación A1555G en el gen rRNA 12S del genoma mitocondrial es responsable de hipoacusia no sindrómica, así como de un incremento en la susceptibilidad a la acción ototóxica de los aminoglucósidos. Parece que la mutación A1555G aumenta la similitud del rRNA 12S humano con su homólogo 16S bacteriano, produciendo un incremento en la unión del antibiótico. La alta concentración que alcanzan los aminoglucósidos en la endolinfa y en la perilinfa provocaría un mayor daño en las células del oído interno (Gallo *et al.*, 2004).

La mutación A1555G se ha encontrado en numerosas familias de diferentes países, y especialmente en España, donde está presente aproximadamente en el 15-20% de los casos familiares de hipoacusia no sindrómica, independientemente del patrón de herencia y la edad de inicio. Esta mutación es transmitida por las madres a todos sus descendientes, tanto varones como mujeres. Se estima que el 17-33% de los pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos son portadores de la mutación A1555G (Gallo *et al.*, 2004).

Es por eso que en México debido al mestizaje esperamos que se encuentre presente la mutación A1555G en al menos un 5% en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica y presenten antecedentes familiares de hipoacusia por uso excesivo de antibióticos.

1.6.2 Diagnóstico genético molecular

Esta enfocado a la demostración de alteraciones en el mtDNA. Al ser un caso de transmisión materna debe de investigarse la mutación puntual del mtDNA.

Para este tipo de determinación, el DNA de un individuo se extrae y es amplificado usando la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa o PCR, luego tratado con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de DNA a diferentes longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa, lo que proporciona un patrón de bandas que es único para un DNA en particular (Gutiérrez, 2009).

1.6.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de DNA; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el DNA amplificado.

Los componentes de una reacción de PCR son: el molde de DNA, un par de oligonucleótidos que serán utilizados como primers. Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de DNA puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente), la Taq DNA polimerasa, desoxinucleótidos (dNTPs), cationes divalentes y el buffer en donde se llevará a cabo la reacción.

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión.

- **Desnaturalización:** En esta etapa, las cadenas de DNA son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

- **Hibridación:** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.
- **Extensión:** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de DNA. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Tamay, Ibarra y Velasquillo, 2013).

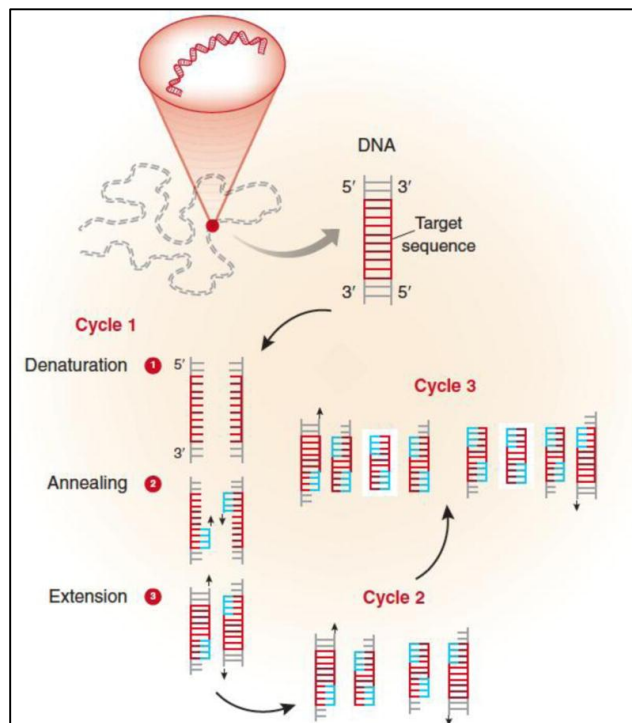


Figura 7. Ciclo de amplificación de la PCR. (Garibyan y Avashia, 2014)

1.6.2.2 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

La metodología RFLP requiere la utilización de enzimas de restricción y sondas. Las enzimas de restricción son endonucleasas aisladas de bacterias que reconocen secuencia específicas, normalmente de cuatro a seis pares de bases (pb), y cortan el DNA en esa secuencia concreta.

El polimorfismo detectado por los RFLPs se basa en el hecho de que pequeños cambios en la secuencia de DNA pueden modificar los patrones de corte de las endonucleasas de restricción (Torres y Moreno, 2018).

2. Planteamiento del problema

Diferentes mutaciones del DNA mitocondrial están implicadas en el desarrollo de hipoacusia neurosensorial no sindrómica. Una de ellas, la mutación A1555G, del gen MTRNR1, es una causa frecuente de hipoacusia neurosensorial no sindrómica, exacerbada de manera notable tras la exposición a aminoglucósidos. Al ser una mutación en el DNA mitocondrial, esta es transmitida por las madres a todos sus descendientes. En diferentes países de Asia como China y Japón, y en países Europeos como España se ha encontrado que el 17-33% de los pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos son portadores de dicha mutación.

En México no se han reportado estudios que muestren dicha relación. Por lo que en este trabajo nos planteamos si, ¿Existe la presencia de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial en pacientes pediátricos con diagnóstico de Hipoacusia Neurosensorial No sindrómica en nuestro medio?

3. Justificación

Se estima que al menos el 60% de las hipoacusias de inicio precoz responden a una causa genética. El 40% restante se atribuye a causas ambientales. Entre estas últimas destacan las infecciones prenatales (citomegalovirus, herpesvirus, rubéola, toxoplasma, etc.), las infecciones posnatales (meningitis bacterianas), el sufrimiento fetal, la hiperbilirrubinemia o los fármacos ototóxicos. Es importante tener en cuenta que la presencia de una causa ambiental no excluye necesariamente la existencia de una predisposición genética subyacente. Cuando se analizan genéticamente pacientes con hipoacusias etiquetadas como ambientales es relativamente frecuente la identificación de mutaciones patogénicas. Esto es cierto tanto en el caso de hipoacusias de inicio precoz, como en las de inicio tardío, donde la interacción entre los factores ambientales y genéticos resulta aún mas compleja.

Para el caso de las hipoacusias genéticas no sindrómicas, existe una gran variedad de genes responsables. Dentro de las hipoacusias prelinguales no sindrómicas el 80% se hereda según un patrón autosómico recesivo, el 18% siguen un patrón autosómico dominante y el 2% restante corresponde a las hipoacusias de herencia ligada al cromosoma X y al genoma mitocondrial (Cabanillas y Cadiñanos, 2011)

Este trabajo se centrará en la búsqueda de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes pediátricos mexicanos, ya que es una causa frecuente que se ha encontrado en otros países, de hipoacusia neurosensorial bilateral poslocutiva no sindrómica, exacerbada de manera notable tras la exposición a aminoglucósidos, sobre todo la estreptomina.

Identificar la presencia de una predisposición genética tiene múltiples ventajas, tanto para los individuos sanos como para lo que ya han presentado la enfermedad. Los beneficios para el paciente se pueden clasificar en diferentes áreas:

- Prevención: Resulta eficaz al ser condicionada la hipoacusia por la sensibilidad a los aminoglucósidos.
- Diagnóstico: Al conocer la causa de la sordera ayuda al paciente y a sus padres a asimilar emocionalmente el diagnóstico, acelerando el inicio de su implicación en el tratamiento rehabilitador.
- Tratamiento: El conocer la causa de la sordera puede resultar útil en la toma de decisiones terapéuticas.
- Reproducción: Presenta un patrón de herencia característico, ya que afecta a ambos sexos por igual, sólo se transmite por vía materna y afecta al 100% de los descendientes de una mujer afectada (Morales *et al*, 2010).

4. Objetivo General

Determinar la presencia de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes pediátricos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica mediante un análisis genético.

4.1 Objetivos específicos

1. Recopilar la información para conocer los pacientes con hipoacusia neurosensorial que se encuentren activos en el CRIT Estado de México, en el área de Comunicación Humana mediante el expediente electrónico y expediente clínico del registro de pacientes con esta patología. Así mismo pacientes de ejercicio de consulta privada de Comunicación Humana y Foniatría.
2. Delimitar la población de pacientes con hipoacusia neurosensorial bilateral de causa no conocida, que se les ha descartado malformación en el sistema nervioso central, trastorno metabólico, parálisis cerebral de cualquier etiología.
3. Buscar la presencia de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes previamente seleccionados mediante la extracción del DNA en células de la mucosa oral, cuantificación de la concentración y pureza de las mismas, amplificación del fragmento específico (PCR) utilizando un termociclador programado previamente y la digestión con la enzima de restricción *BcoDI* para así evidenciar la presencia o ausencia de la mutación.
4. Identificar el haplogrupo mitocondrial para cada uno de los pacientes mediante PCR-RFLP específicos y así saber si existe una relación entre el haplogrupo y esta patología.
5. Determinar si es útil la detección de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes con hipoacusia neurosensorial no sindrómica bilateral.

5. Hipótesis

Presencia de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes con Hipoacusia Neurosensorial no Síndrónica ni sintomática.

Hipótesis Alternativa

Ausencia de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes con Hipoacusia Neurosensorial no Síndrónica ni sintomática.

Controles

Positivo: Se considerará a aquella persona que durante el estudio sea positivo a la mutación A1555G del DNA mitocondrial con diagnóstico de Hipoacusia neurosensorial

Negativo: Aquella persona sin diagnóstico de hipoacusia

5.1 Criterios de selección

Inclusión:

- Pacientes mexicanos con edad de 0 a 18 años
- Ambos géneros
- Diagnóstico de certeza de Hipoacusia neurosensorial de causa no conocida
- Hipoacusia por ototoxicidad inducida por aminoglucósidos.
- Pacientes que se encuentren activos en el área de comunicación humana del CRIT Estado de México.
- Pacientes externos del CRIT Estado de México procedentes de consulta particular con el Dr. Luis Carlos Gómez Rojas y la Dra. Laura Gutiérrez Valdez de la especialidad de Audiología y Foniatría.
- Firma de Carta de Consentimiento informado.

Exclusión:

- Pacientes diagnosticados con Hipoacusia Conductiva
- Pacientes con diagnóstico de hipoacusia neurosensorial no síndrónica causado por exposición a ruido, traumatismos, hipoacusias autoinmunes, infecciones.
- Pacientes con diagnóstico de Hipoacusia neurosensorial en conjunto con malformaciones en el sistema nervioso central, trastorno metabólico, parálisis cerebral de diversa etiología.

Eliminación:

- Datos proporcionados erróneos y no concuerda con los criterios de inclusión

6. Variables

- Variable independiente: Pacientes con diagnóstico de Hipoacusia Neurosensorial No Síndrónica de causa no conocida o por ototoxicidad.
- Variable dependiente o variable de medición: Presencia de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial

7. Metodología

Una vez que se aprobó el protocolo por el comité de investigación y de ética del Centro de Rehabilitación e Inclusión Infantil Teletón del Estado de México, se llevó a cabo de la siguiente manera.

Se identificaron a los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión por un análisis de expediente clínico, con el apoyo del Dr. Luis Carlos Gómez Rojas.

Se agendó una cita con los padres para darles indicaciones sobre el trabajo propuesto y de esta manera mantenerlos informados. Así como firmaron la hoja de consentimiento informado.

Posteriormente se realizó la toma de muestra y toma de los datos principales (anexo 1) de cada uno de los pacientes.

Así también se consideraron pacientes externos del CRIT Estado de México, procedentes de consulta particular con el Dr. Luis Carlos Gómez Rojas y la Dra. Laura Gutiérrez Valdez de la especialidad de Audiología y Foniatría.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio 8 a cargo del doctor José Francisco Montiel Sosa, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A cada paciente se le dió a conocer su resultado por un escrito, como se puede observar en el anexo 4.

7.1 Tipo de muestreo

Se considerarán a todos los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión descritos, y a menos que el número de muestras sea superior a 50, se tendrá que realizar un muestreo aleatorio sistemático.

7.1.1 Diseño estadístico

Observacional, prospectivo, descriptivo y transversal.

7.2 Material y equipo

7.2.1 Obtención de células de la mucosa bucal

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Solución de fosfatos de sodio y potasio pH 7.00
- Jeringa 2 ml
- Cepillo para citología cervical
- Guantes de látex
- Cubrebocas

7.2.2 Extracción de DNA a partir de células de la mucosa bucal

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Termomixer a 50°C
- Vortex
- Micropipetas
- Microcentrífuga con capacidad para 14000 rpm
- Agua libre de nucleasas
- Solución de lisis
- Proteinasa K
- Fenol-Cloroformo
- Etanol absoluto (96%)

7.2.3 Cuantificación de concentración y pureza del DNA

- Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000
- Micropipeta de 0.5-10 μ L.
- Agua libre de nucleasas

7.2.4 Amplificación de la región específica por PCR

- Tubos de 200 μ L
- Micropipetas
- Agua libre de nucleasas
- Muestra de DNA
- Solución Master Mix de Promega (Taq polimerasa, DNTP's, MgCl₂, Buffer)
- Termociclador
- Primers

7.2.5 Electroforesis en gel de agarosa

- Matraz Erlenmeyer 125 ml
- Probeta de 100 ml
- Balanza analítica
- Horno de microondas
- Parafilm
- Micropipetas
- Vórtex
- Cámara horizontal de electroforesis
- Fuente de poder
- Agarosa y buffer TAE 1x
- Bromuro de etidio
- Marcador de peso molecular 1kb Promega

- Fragmento de mtDNA amplificado (producto PCR)

7.2.6 R.F.L.P

- Producto de PCR
- Enzima de restricción *BcoDI*
- Tubo eppendorf de 2 ml
- Termomixer
- Micropipetas

7.3 Métodos

7.3.1 Obtención de células de la mucosa bucal

1. Colocarse los guantes de látex y cubrebocas antes de realizar el raspado.
2. Etiquetar correctamente el tubo eppendorf con la identificación correspondiente.
3. Agregar aproximadamente 1 ml de solución de fosfatos en el tubo eppendorf y sumergir el cepillo.
4. Introducir el cepillo húmedo en la boca y hacer un raspado en el interior de las mejillas.
5. Sacudir el cepillo en la solución de fosfatos y desecharlo. Cerrar correctamente el tubo eppendorf.
6. Para transportar la muestra se coloca en un recipiente a 4°-8°C (Zacarías, 2015).

7.3.2 Extracción de DNA a partir de raspado bucal: Fenol- Cloroformo

Antes de realizar la extracción considerar los siguientes aspectos:

- Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente (15-25°C)
- Preparar el termomixer a 50°C para usarlo en el paso 4.

1. Centrifugar la muestra a 1500 rpm por diez minutos y decantar el sobrenadante.
2. Agregar 1000 µl de solución de lisis y agitar en vortex.
3. Agregar 7 µl de proteinasa K.
4. Incubar por dos horas la muestra en el termomixer a 50°C.
5. Subir la temperatura a 60°C por una hora.
6. Agregar 500 µl de fenol-cloroformo y agitar 10 veces manualmente.
7. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
8. Separar la fase acuosa cuidadosamente en un tubo eppendorf.
9. Agregar etanol absoluto (96%) alrededor de 1000 µl a la fase acuosa previamente separada y mezclar.
10. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
11. Decantar y dejar que seque en el termomixer a 37°C.

12. Agregar 50µl de agua libre de nucleasas.

7.3.3 Cuantificación de concentración y pureza de DNA

1. Conectar el Nanodrop e iniciar el programa en la computadora, poniendo la opción de ácidos nucleicos.
2. Levantar el brazo del espectrofotómetro y colocar 2µl de agua libre de nucleasas y RNAasas, presionar “enter” para iniciar el equipo.
3. Levantar el brazo y limpiar con papel absorbente, colocar 2µl del blanco, en este caso será agua libre de nucleasas y presionar en “leer blanco”.
4. Limpiar con papel absorbente, colocar 2µl de la muestra problema y presionar para leer.

7.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La pareja de Primers provienen del Laboratorio 8 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, estos fueron adquiridos previamente y obtenidos a partir de un artículo para amplificar todo el DNA mitocondrial (24 parejas de primers). Se buscó la pareja de primers que amplificara la posición 1555, obteniendo un amplificado de 801pb.

Tabla 8. Preparación de una reacción de PCR para un volumen de 25 µl

Reactivo	Volumen
PCR Master mix (kit)	12.5 µl
Primer forward mutation 1555 CGATCAACCTCACCTCT	0.5 µl
Primer reverse mutation 1555 TGGACAACCAGCTATCACCA	0.5 µl
DNA	1 µl
Agua libre de nucleasas	cbp 25 µl

Del mismo modo se prepara un tubo blanco (control negativo) sustituyendo el DNA por agua. Se agitan los tubos perfectamente, se centrifugan rápidamente (un pulso) y se colocan dentro del termociclador previamente programado a: 95°C, 2' (precalentamiento); 95°C, 30" (desnaturalización), 60°C, 30" (alineamiento), 72°C, 1'30" (elongación) [35 ciclos]; 72°C, 5'; 4°C ∞ (incubación).

7.3.5 Electroforesis

- a) Preparación del gel de agarosa y del molde:
 1. Preparar una solución de agarosa al 1% en TAE 1X: pesar 0.5g de agarosa y disolver por ebullición (calentar en horno de microondas) en un matraz Erlenmeyer la agarosa en 50 ml de buffer TAE 1X, dejar enfriar a 45°C.

2. Tomar el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa.
 3. Cuando la temperatura de la solución esté a 45°C, vaciar el líquido en un molde de acrílico colocando un peine con capacidad de 20µl por orificio para formar los pozos. Solidificar a temperatura ambiente aproximadamente 15 minutos.
 4. Retirar el peine cuando el gel haya solidificado
- b) Preparación de la cámara para la electroforesis
1. Colocar el gel en una cámara de electroforesis que contenga 300ml de amortiguador TAE 1X cubriendo completamente el gel.
 2. En el primer carril se carga 3µl del marcador de peso molecular *Invitrogen*.
 3. Para preparar la muestra mezclar en papel parafilm, usando micropipeta, 4µl de DNA, 3µl de buffer de carga y 3µl del colorante bromuro de etidio (0.01µg/ml). Depositar en un carril del gel.
 4. Cerrar la cámara. El cátodo se conecta en el extremo cercano a los pocillos, de modo que el DNA migre hacia el ánodo. Aplicar un flujo eléctrico de 90 Volts por 45 minutos aproximadamente.
 5. Sacar el gel de la cámara y colocarlo en el transiluminador con lámpara de luz UV para observar el DNA.

7.3.6 R.F.L.P

Se somete a digestión los productos obtenidos en la PCR con la endonucleasa de restricción *BcoDI*, con una concentración de 10,000 unidades/ml, donde una unidad es definida como la cantidad de enzima requerida para digerir 1µg de λDNA en una hora a 37°C en un volumen total de reacción de 50 µl. La enzima de restricción reconoce la siguiente secuencia:



Se realizó de la siguiente manera:

1. Combinar los siguientes componentes a temperatura ambiente en el orden indicado por la tabla 9:

Tabla 9. Preparación de R.F.L.P

	Producto PCR
Agua libre de nucleasas	3.8 µl
Buffer	1 µl
DNA	5 µl
Enzima <i>BcoDI</i>	0.2 µl
Volumen total	10 µl

2. Mezclar e incubar a 37°C por 45 minutos en el termomixer
3. Preparar un gel de agarosa al 1% a 90 Volts, como en los procedimientos anteriores descritos para correr la muestra
4. Sacar nuevamente el gel y colocarlo en el transiluminador con lámpara de luz UV para observar el DNA, verificar si hubo corte o no de la enzima y así determinar si existe o no la mutación.
5. Si la enzima reconoce la secuencia y corta el mtDNA, se obtendrán dos fragmentos, uno de 321pb y el otro de 480pb.

7.3.7 Haplogrupos

A partir de la extracción de DNA de cada una de las muestras se realizó la PCR para determinación de los diferentes haplogrupos con las mismas condiciones como lo marca el punto 7.3.4, variando únicamente los primers. En la tabla 10 se presentan las parejas de primers utilizadas para cada haplogrupo, así como el marcador que determina el Haplogrupo.

Tabla 10. Primers utilizados en la PCR para la determinación de los diferentes haplogrupos.

Haplogrupos	Primer Forward	Primer Reverse	Marcador de Haplogrupo
A	TGAAAATGTTTAGACGGGCTCACA	GTTCCAGTGAGTTCACCCTCTA	A663G
B	CACTGTAAAGCTAACTTAGCAT	ACAGTTTCATGCCCATCGTC	Delección de 9pb (8281-8269)
C	AAACAACCCAGCTCTCCCTAA	TCCAAAGACCACATCATCGA	A13263G

Para el Haplogrupo A:

- Con la PCR se obtuvo un fragmento de 121pb y se sometió a RFLP con las mismas condiciones que el punto 7.3.6, variando únicamente la enzima y la electroforesis que se realizó en un gel de agarosa al 3%. La enzima que se utilizó fue *Hae III*, el cual corta al reconocer la siguiente secuencia:



- Si la enzima corta, se obtendrán dos fragmentos, uno de 55pb y otro de 66pb.
- Se utilizaron controles positivos para haplogrupo A, determinados previamente por el laboratorio con otros trabajos de investigación.

Para el Haplogrupo B:

- Con la PCR se obtuvo un fragmento de 121pb para un Haplogrupo B negativo y un fragmento de 112 pb para un Haplogrupo B positivo, el cuál se reveló en un gel de Agarosa al 3%.
- Se utilizaron controles positivos y negativos para Haplogrupo B determinados anteriormente por el laboratorio con otros trabajos de investigación.

Para el Haplogrupo C:

- Con la PCR se obtuvo un fragmento de 976pb y se sometió a RFLP con las mismas condiciones que el punto 7.3.6, variando únicamente la enzima. La enzima que se utilizó fue *Alu I*, el cual corta al reconocer la siguiente secuencia:



- Si la enzima corta se obtendrán 4 fragmentos con una longitud de 691pb, 263pb, 11pb y 11pb. Los dos fragmentos de 11pb por su pequeño tamaño no serán perceptibles en el gel de Agarosa.
- Se utilizaron controles positivos para haplogrupo C, determinados previamente por el laboratorio con otros trabajos de investigación.

8. Aspectos éticos

Cada uno de los participantes que aceptaron ingresar al estudio, firmaron previamente una carta de consentimiento informado, que se encuentra en el anexo 3.

El proyecto de investigación, se apegó a los lineamientos de acuerdo a la NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Así también concuerda con las normas internacionales: Declaración de Helsinki de la asociación médica mundial sobre los principios éticos para las investigaciones médicas en los seres humanos, así como el protocolo de Estambul: Manual para la investigación y documentación eficaces de la tortura y otros tratos o penas crueles, inhumanos o degradantes.

9. Resultados

Tabla 11. Datos clínicos y audiométricos de los 15 pacientes que se sometieron al análisis para la detección de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial.

Caso	Sexo	Edad (años)	Inicio de HNS	Grado de HNS	Uso de AMG	Casos Familiares	Edad	Grado de HNS	Uso de AMG
1	F	2	Prelingual	Profunda	No	1	4	Profunda	No
2	M	4	Prelingual	Profunda	No	1	2	Profunda	No
3	F	3	Prelingual	Profunda	No	-	-	-	-
4	M	6	Postlingual	Profunda	Si	-	-	-	-
5	M	6	Postlingual	Profunda	Si	-	-	-	-
6	M	3	Prelingual	Profunda	No	1	3	Profunda	No
7	M	3	Prelingual	Profunda	No	1	3	Profunda	No
8	M	17	Postlingual	Profunda	No	-	-	-	-
9	F	8	Postlingual	Severa	Si	-	-	-	-
10	F	8	Postlingual	Moderada	Si	-	-	-	-
11	F	9	Postlingual	Profunda	Si	-	-	-	-
12	F	6	Postlingual	Profunda	Si	-	-	-	-
13	M	5 (meses)	Prelingual	Profunda	No	-	-	-	-
14	M	6	Postlingual	Profunda	Si	-	-	-	-
15	F	10	Postlingual	Profunda	Si	-	-	-	-

(F)- Femenino, (M)- Masculino, (HNS)- Hipoacusia Neurosensorial, (AMG)- Aminoglucósidos

Tabla 12. Concentración de DNA total (ng/μl) y relación de pureza de las muestras de los pacientes.

Muestra	Concentración (ng/μl)	Concentración de la dilución (ng/μl)	Relación 260/280
(control negativo)	1506.3	96.9	1.74
1	227.9	93.8	1.76
2	147.4	99.6	1.77
3	541.2	89.8	1.74
4	763.7	99.7	1.77
5	652.3	94.6	1.69
6	339	89.7	1.84
7	1210	83.7	1.70
8	406.2	93.8	1.72
9	1163.3	87.3	1.75
10	307.3	95.4	1.77
11	201.6	93.4	1.87
12	174.1	98.9	1.83
13	910.1	104.4	1.87
14	344.2	104.9	1.74
15	227.4	87.7	1.70

PRODUCTOS DE PCR

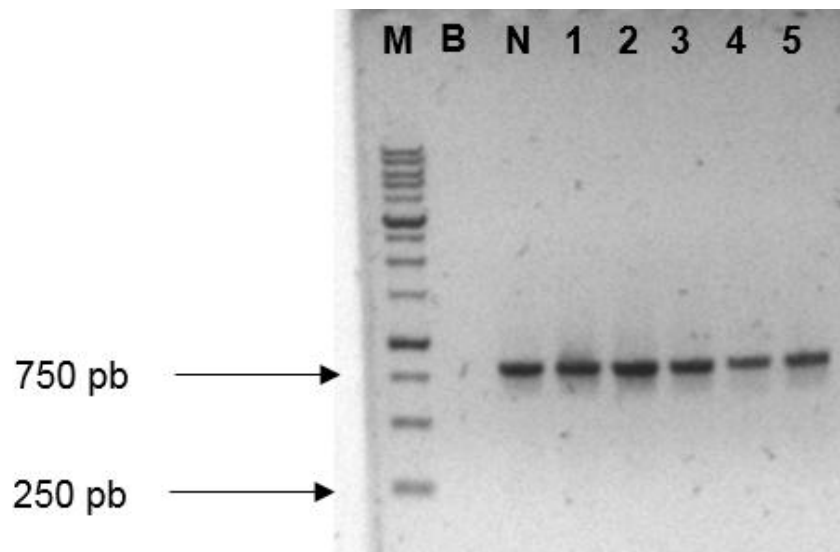


Figura 8. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 1-5.

Se puede observar un amplificado de 801pb. M: Marcador 1kb *Invitrogen*; B: Blanco; N: Control negativo; **1 al 5: Pacientes**

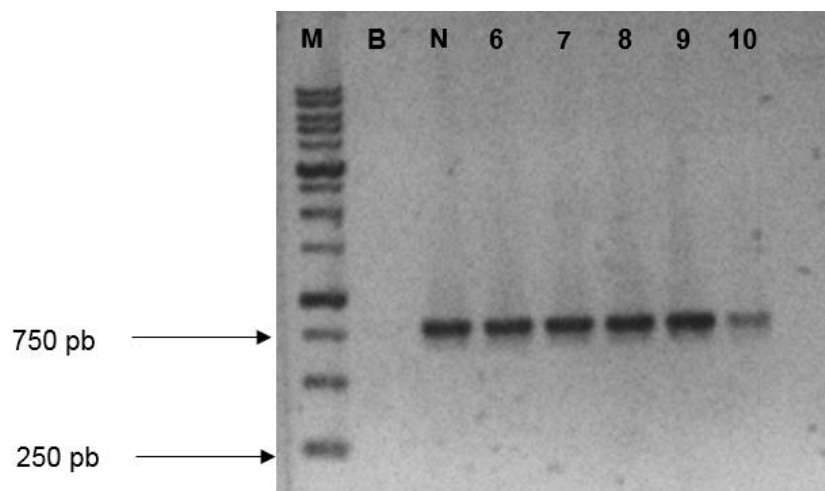


Figura 9. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 6-10.

Se puede observar un amplificado de 801pb. M: Marcador 1kb *Invitrogen*; B: Blanco; N: Control Negativo; **6-10: Pacientes**.

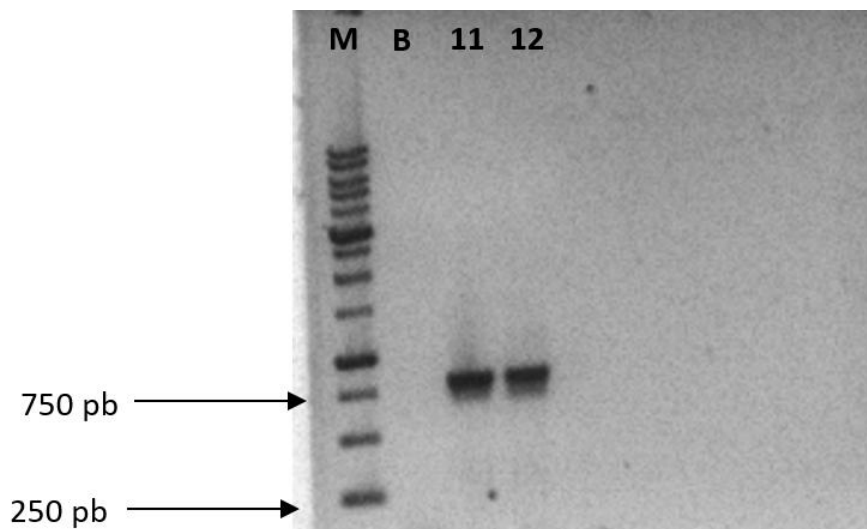


Figura 10. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 11 y 12.

Se puede observar un amplificado de 801pb. M: Marcador 1kb *Invitrogen*; B: Blanco; **11 y 12: Pacientes.**

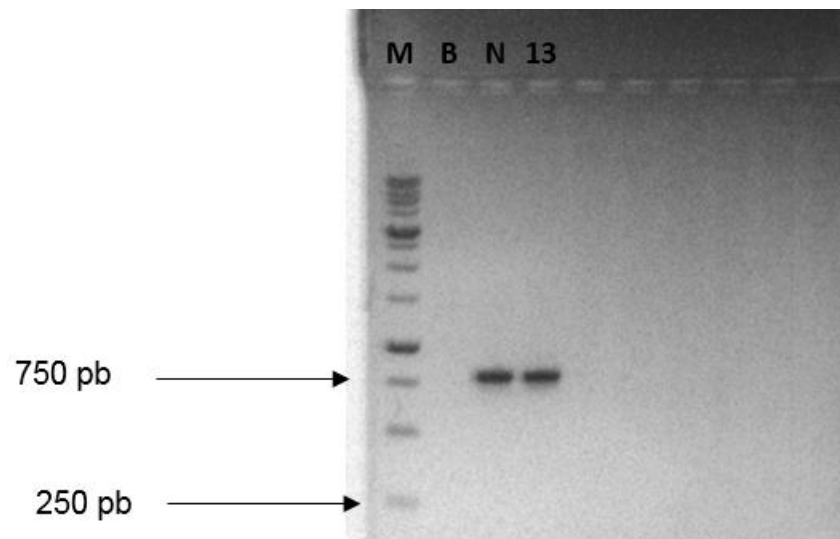


Figura 11. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado del paciente 13.

Se puede observar un amplificado de 801pb. M: Marcador 1kb *Invitrogen*; B: Blanco; N: Control Negativo; **13: Paciente.**

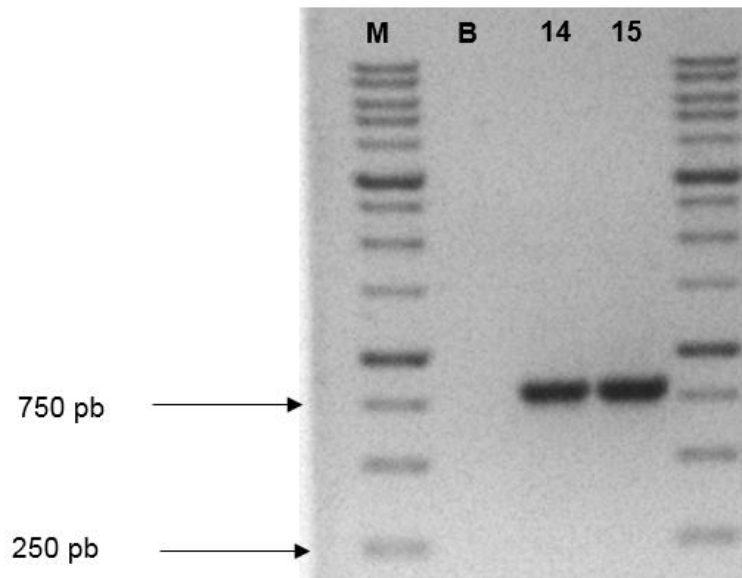


Figura 12. Productos de PCR en gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el amplificado de los pacientes 14 y 15.

Se puede observar un amplificado de 801pb. M: Marcador 1kb *Invitrogen*; B: Blanco; 14 y 15: **Pacientes**.

RFLP

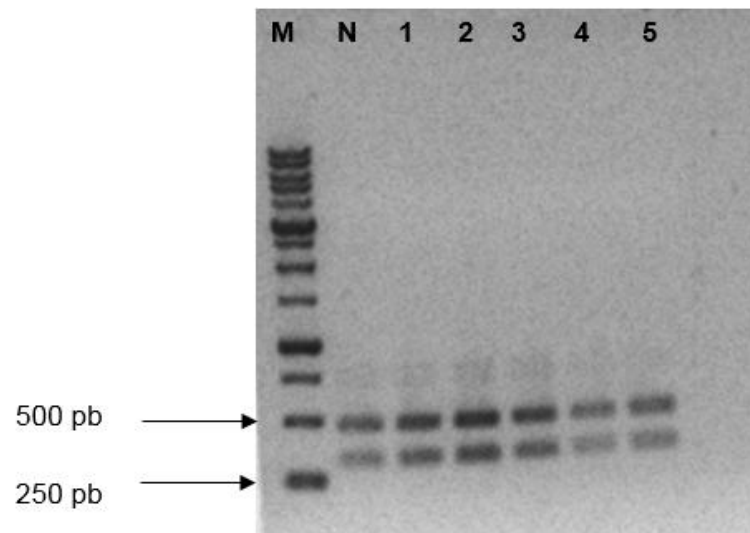


Figura 13. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima *BcoDI* de los pacientes 1 al 5. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.

M: Marcador de peso molecular de 1kb; N: Control negativo; 1-5: Pacientes. Se observa dos fragmentos en todas las muestras, una de 321pb y la otra de 480pb.

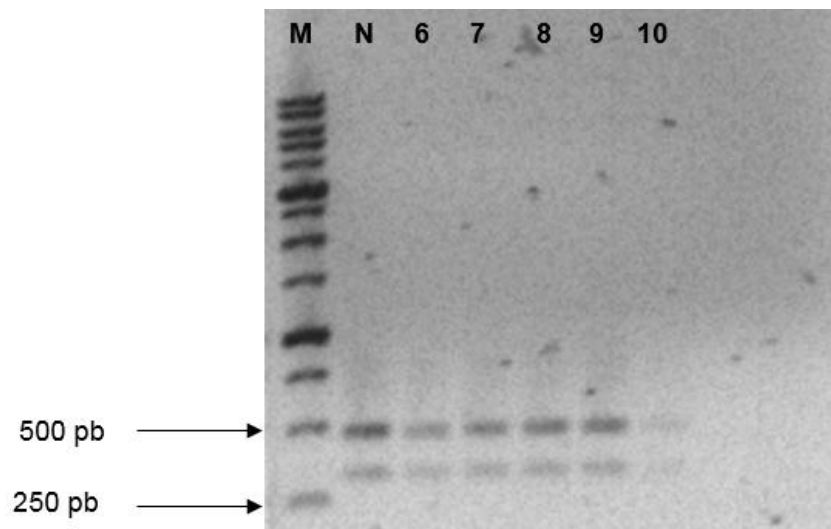


Figura 14. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI de los pacientes 6-10. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.

M: Marcador de peso molecular de 1kb; N: Control negativo; 6-10: Pacientes. Se observa dos fragmentos en todas las muestras, una de 321pb y la otra de 480pb.

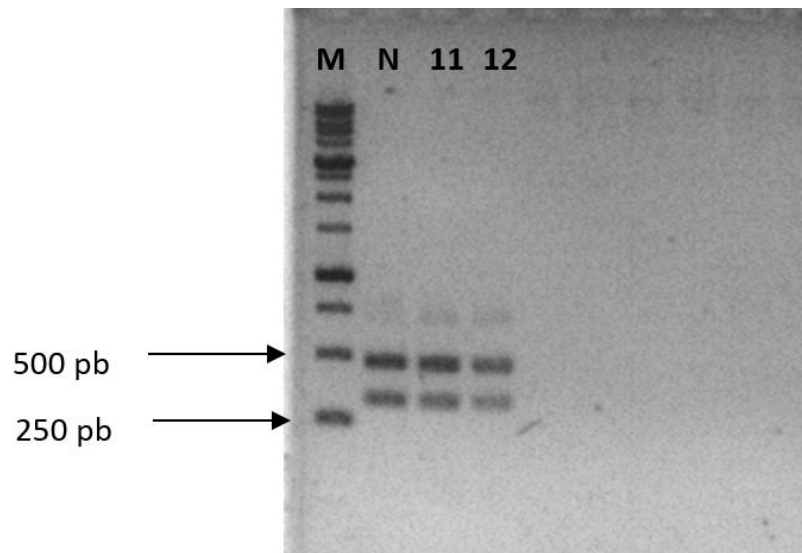


Figura 15. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI de los pacientes 11 v 12. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.

M: Marcador de peso molecular de 1kb; N: Control negativo; 11 y 12: Pacientes. Se observa dos fragmentos en todas las muestras, una de 321pb y la otra de 480pb.

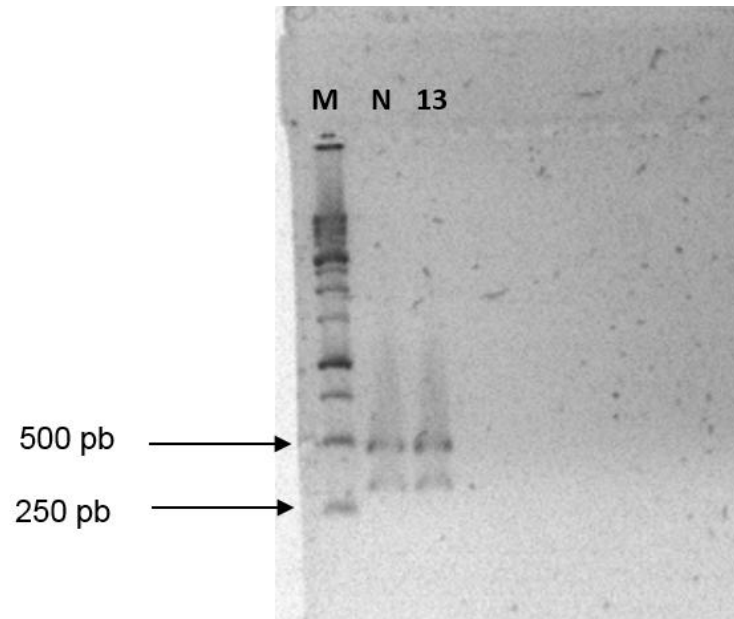


Figura 16. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI del paciente 13. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.

M: Marcador de peso molecular de 1kb; N: Control negativo; 13: Paciente. Se observa dos fragmentos en todas las muestras, una de 321pb y la otra de 480pb.

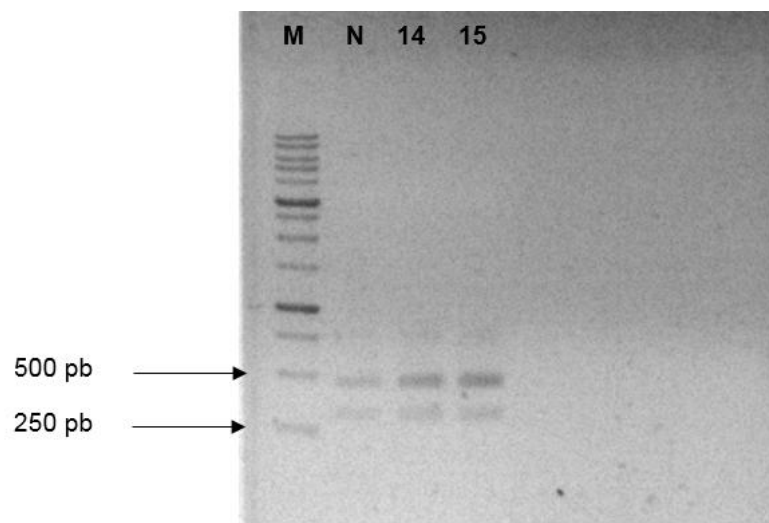


Figura 17. Fragmentos de restricción para la mutación A1555G con la enzima BcoDI de los pacientes 14 y 15. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt.

M: Marcador de peso molecular de 1kb; N: Control negativo; 14 y 15: Pacientes. Se observa dos fragmentos en todas las muestras, una de 321pb y la otra de 480pb.

Haplogrupos

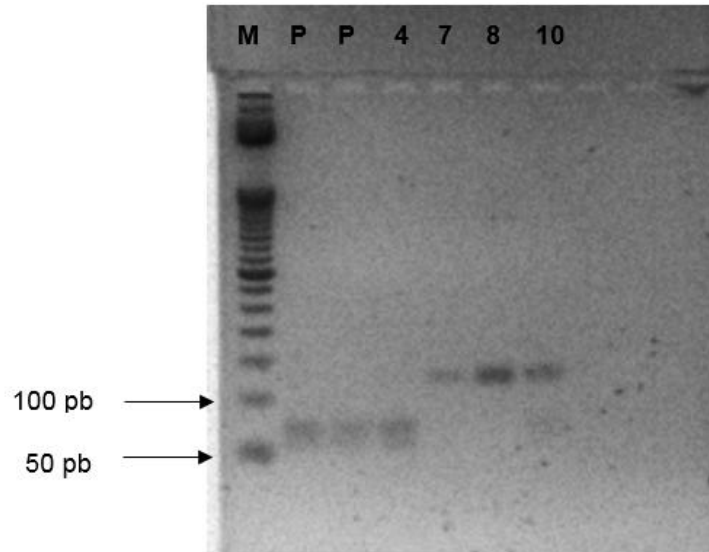


Figura 18. Gel de Agarosa (3%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima *Hae III* para Haplogrupo A. Pacientes 4, 7, 8 y 10.

M: Marcador de Peso molecular 50pb; P: Controles positivos para Haplogrupo A; 4, 7, 8 y 10: Pacientes. El paciente 4 se observan dos cortes, uno de 55pb y otro de 66pb.

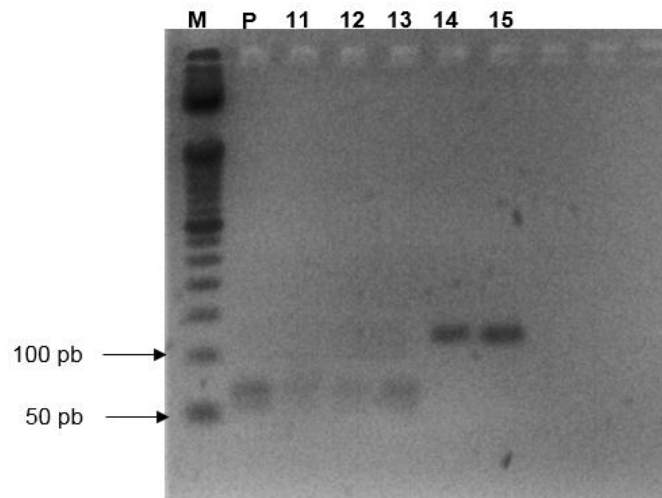


Figura 19. Gel de Agarosa (3%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima *Hae III* para Haplogrupo A. Pacientes 11,12,13,14 y 15.

M: Marcador de Peso molecular 50pb; P: Control positivo para Haplogrupo A; 11,12,13,14 y 15: Pacientes. En los pacientes 11, 12 y 13 se observan dos cortes, uno de 55pb y otro de 66pb.

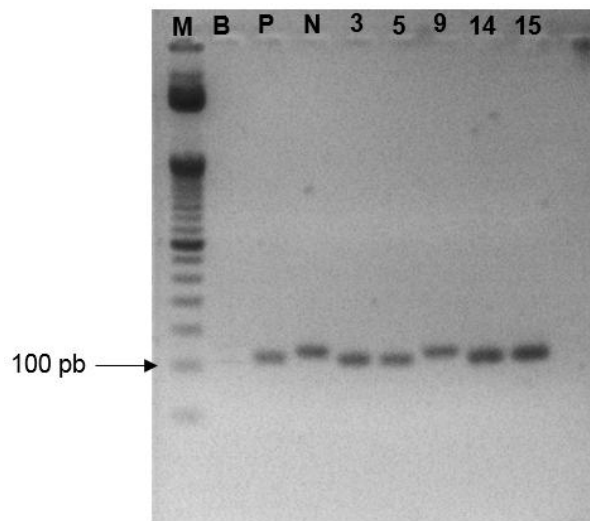


Figura 20. Gel de agarosa (3%), tinción BrEt , que muestra el amplificado para detección de Haplogrupo B. Pacientes 3,5,9,14 y 15.

M: Marcador de peso molecular de 50 pb; B: Blanco; P: Control Positivo Haplogrupo B; N: Control Negativo Haplogrupo B; 3,5,9,14 y 15: Pacientes. Para haplogrupo B se observa un amplificado de 112 pb.

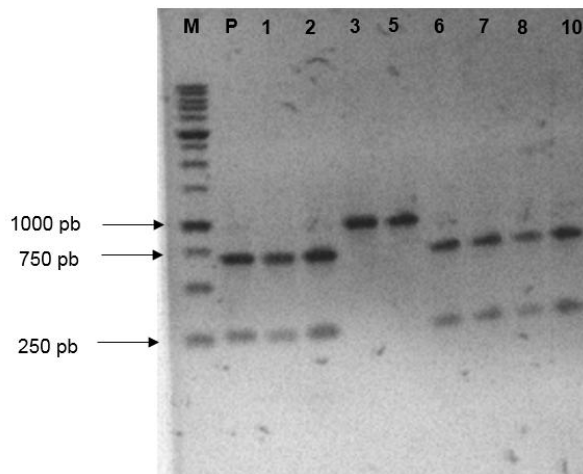


Figura 21. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima *Alu I* para Haplogrupo C. Pacientes 1,2,3,5,6,7,8 y 10.

M: Marcador de Peso molecular 1kb; P: Control positivo para Haplogrupo C; 1,2,3,5,6,7,8 Y 10: Pacientes. En los pacientes 1,2,6,7,8 Y 10 se observan dos cortes, uno de 691pb y otro de 263 pb.

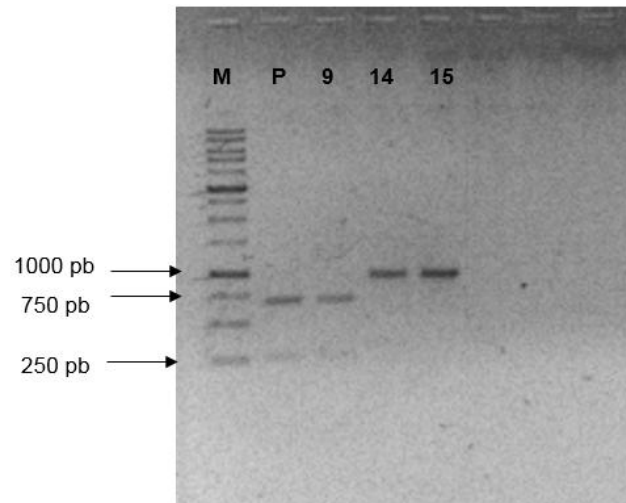


Figura 22. Gel de Agarosa (1%), tinción BrEt , que muestra el corte con la enzima *Alu I* para Haplogrupo C. Pacientes 9, 14 y 15.

M: Marcador de Peso molecular 1kb; P: Control positivo para Haplogrupo C; 9, 14 y 15: Pacientes. En el paciente 9 se observan dos cortes, uno de 691pb y otro de 263.

Tabla 13. Haplogrupos determinados mediante RFLP de los pacientes estudiados.

Haplogrupo	Pacientes	Total	Porcentaje
A	4, 11, 12 y 13	4	26.6%
B	3, 5, 14 y 15	4	26.6%
C	1, 2, 6, 7, 8, 9 y 10	7	46.6%

Tabla 14. Haplogrupos determinados mediante RFLP de los controles negativos para la mutación A1555G

Haplogrupo	Controles Negativos para mutación A1555G
A	4
B	1
C	0

10. Discusión

La Hipoacusia Neurosensorial es uno de los desórdenes congénitos más comunes. La incidencia es de aproximadamente 1 de 1000 nacimientos en el mundo. Más de la mitad de ellos (alrededor del 60%) se atribuye a una causa genética. Es por ello, que cada vez es más importante el estudio genético en los pacientes con Hipoacusia Neurosensorial. Hay cuatro tipos de patrones de herencia que se han encontrado en la pérdida de la audición, que son: Autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al cromosoma X y de herencia mitocondrial. Alrededor del 75% al 85% de los casos de pérdida de audición prelingual no sindrómica se manifiestan de manera Autosómica recesiva, del 15 al 25% de los casos corresponden de manera autosómica dominante y del 1 al 3% se encuentran ligadas al cromosoma X (Pereira, Lemos, Orate, Belintani y Maniglia, 2008). Hay formas heredadas exclusivamente de la madre, la herencia mitocondrial que se encuentra presente en aproximadamente 0.5% a 1% de los casos con Hipoacusia Neurosensorial por causas genéticas (Pereira, Lemos, Orate, Belintani y Maniglia, 2008).

La mutación A1555G en el gen del rRNA 12S del genoma mitocondrial que resulta de la substitución de una adenina por una guanina en la posición 1555 del DNA mitocondrial, es el responsable de Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica, así como de un incremento en la susceptibilidad a la acción ototóxica de los aminoglucósidos (Gallo *et al.*, 2004). Se ha sugerido que esta substitución de bases nitrogenadas genera un nuevo par C-G aumentando la similitud del rRNA 12S humano con su homólogo 16S bacteriano, importante región de sitio de acción para los aminoglucósidos, produciendo un incremento en la unión del antibiótico. La alta concentración que alcanzan los aminoglucósidos en la endolinfa y en la perilinfa provocan un mayor daño en las células del oído interno (Gallo *et al.*, 2004). En contraste con las otras enfermedades de origen mitocondrial que usualmente afecta solo una parte del DNA mitocondrial (heteroplasmia), la mutación asociada a la Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica es generalmente homoplásmica, que quiere decir que todo el DNA mitocondrial aparece mutado y los fenotipos difieren considerablemente dentro de los miembros de una misma familia, desde hipoacusia profunda hasta una audición normal (Pereira, Lemos, Orate, Belintani y Maniglia, 2008).

Aunque las mutaciones en el DNA mitocondrial son etiológicamente relevantes en la HNS, se han realizado pocos estudios en países en desarrollo, especialmente en México. Resulta de gran importancia su estudio, debido al consumo masivo de aminoglucósidos en los últimos 50 años en México, apareciendo casos de Hipoacusia Neurosensorial no Sindrómica asociada al uso de aminoglucósidos. Así también porque la vigilancia continua del uso de antibióticos y del perfil de resistencia bacteriana a estos medicamentos es un área relativamente nueva. En este trabajo se buscó encontrar si existe una asociación de la mutación A1555G en pacientes pediátricos con Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica con o sin antecedentes de exposición a aminoglucósidos. Dicho estudio fue aprobado por el Comité de Ética y de Investigación del CRIT Estado de México. Los 15 pacientes fueron seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión con apoyo de dos especialistas en comunicación, audiología, otoneurología y foniatría, quienes se basaron en pruebas audiológicas: Audiometría tonal y vía ósea, logaudiometría, timpanometría y reflejo

estapedial, potenciales evocados auditivos de tallo cerebral y emisiones otoacústicas, así como se obtuvieron datos relevantes como antecedentes personales y familiares, que se ven resumidos en la tabla No. 11. Como puede observarse en las figuras 14-18 se utilizaron controles negativos procedentes de pacientes sanos sin Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica, obteniendo dos cortes por la enzima *BcoDI*, una de 321pb y la otra de 480pb. La mutación A1555G no se encontró en el 100% de las muestras de estudio, por lo que de igual manera como se observa en las figuras se obtuvieron dos fragmentos para cada uno de los pacientes. De esta manera se rechaza la hipótesis planteada: Presencia de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes con Hipoacusia Neurosensorial no Sindrómica ni sintomática, y se acepta la hipótesis alternativa debido a la ausencia de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial en nuestra muestra de pacientes con Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica.

Así también para las 15 muestras se determinó el haplogrupo, mediante PCR y RFLP. Se encontraron 4 muestras pertenecientes a haplogrupo A, que corresponde al 26.6% del total de los pacientes analizados, 4 para haplogrupo B con un 26.6% y 7 para haplogrupo C con un 46.6%. Estos haplogrupos se encuentran reportados en la base de datos Mitomap, donde en Norteamérica la mayor prevalencia es Haplogrupo A con 43%, haplogrupo B con 23% y haplogrupo C con 18%. Se sabe que en México la mezcla biológica inició durante y después de la Conquista Española en 1519, involucrando a los nativos americanos, españoles y esclavos africanos, teniendo como resultado una población mestiza que actualmente constituye el 93.3% del total de la población (Martínez *et al*, 2013). Un estudio reporta que en México el 92.9% de la población es Nativoamericana, con una frecuencia del haplogrupo A del 47.04%, haplogrupo B del 23.7%, haplogrupo C con un 15.9% y haplogrupo D con 6.2%. El linaje Europeo constituye un 4.4% de la población y el Africano es menor siendo 1.89% (Martínez *et al*, 2013). Con la determinación de haplogrupos se confirmó que el estudio realizado fue con población originaria de América. Es interesante hacer notar que el haplogrupo que fue de mayor prevalencia en el estudio fue el C con una prevalencia de 46.6%, aunque este se encuentre normalmente en menor proporción que el A y el B, lo cual podría indicar la asociación de dicho haplogrupo como un factor de riesgo con el desarrollo de Hipoacusia Neurosensorial. No existen reportes que mencionen dicha asociación, sin embargo podría seguir estudiándose en un número considerable de muestras a fin de comprender mejor este tipo de patologías y si en realidad los haplogrupos pueden ser un factor de riesgo o protección para su desarrollo. Se sabe que las variantes genéticas que definen los haplogrupos afectan a todos los tipos de genes y podrían ser factores de susceptibilidad para el desarrollo de determinados fenotipos (Montoya, 2010). Por ejemplo se ha asociado que pacientes amerindios de haplogrupo B, presentan niveles mayores de lípidos post-tratamiento en pacientes tratados con Atorvastatina en comparación con pacientes de haplogrupo A, C ó D (Lagos *et al*, 2010).

Se ha encontrado que la frecuencia de las mutaciones en el DNA mitocondrial difieren entre las diferentes poblaciones. Según lo revelado por estudios recientes muestran que la mutación A1555G es una causa frecuente de Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica asociada o no con el uso de aminoglucósidos en Asia, poblaciones árabes y sudafricanas. Esto se presenta rara vez en la mayoría

de los países europeos (a excepción de España) y poblaciones americanas. El hecho de que la mutación ha sido detectada con mayor frecuencia en países asiáticos como China o Japón, no significa que es realmente más frecuente en estas poblaciones, más bien se relaciona por que en estos países en los 70's hubo un uso indiscriminado de los aminoglucósidos, apareciendo muchos casos de Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica severa, con lo cual las familias fueron identificadas y en consecuencia hasta el día de hoy es posible localizarlas; mientras que en los países Europeos donde el uso de aminoglucósidos ha sido restringido exclusivamente para infecciones graves, motivo por el cual se han encontrado casos más esporádicos.

Se encuentra reportado que la frecuencia de la mutación en pacientes pediátricos Chinos es del 13-25% con pérdida de audición inducida por el uso de Aminoglucósidos (Chen, Wang y Fu, 2011). Así también la mutación A1555G se ha encontrado en numerosas familias en España, que está presente aproximadamente en el 15-20% de los casos familiares de hipoacusia no sindrómica, independientemente del patrón de herencia y de la edad de inicio y se estima que el 17-33% de los pacientes con ototoxicidad por aminoglucósidos son portadores de la mutación A1555G (Gallo *et al*, 2004). Mientras que un estudio en Brazil, donde se incluyeron 27 pacientes con Hipoacusia Neurosensorial No Sindrómica con o sin antecedentes de uso de aminoglucósidos y 100 neonatos como grupo control negativo, no encontraron la presencia de la mutación en el total de la muestra (Pereira, Lemos, Orate, Belintani y Maniglia, 2008). En Argentina se realizó un estudio de 1042 muestras que se recolectaron de manera aleatoria y anónima, buscando la presencia de la mutación A1555G y todas salieron negativas a la mutación (Gravina, Foncuberta, Caron, Barrero y Chertkoff, 2007). La Universidad de Oklahoma de la Facultad de Ciencias de la Salud, realizó un estudio similar con 31 pacientes Nicaraguenses con Hipoacusia Neurosensorial y con antecedentes de uso de gentamicina, obteniendo como resultado que no fue encontrado ninguna mutación patogénica en el gen 12S rRNA concluyendo que la mutación A1555G es relativamente rara en la población Nicaraguense (Saunders, Greinwald, Vaz y Guo 2009).

Los resultados de acuerdo con estos estudios mencionados y los obtenidos en este trabajo, se concluye que la mutación A1555G no es prevalente en América. Sin embargo habría que establecer la prevalencia real de esta mutación con un número mayor de muestras y así identificar si el tipo de población se encuentra relacionada con el desarrollo de Hipoacusia Neurosensorial no sindrómica ó si es debido a las dificultades por localizar a dichas familias con antecedentes de Hipoacusia, así como de exposición de aminoglucósidos.

11. Conclusiones

- Se realizó el análisis genético en 15 pacientes pediátricos con diagnóstico de Hipoacusia Neurosensorial No Sindrónica, con o sin antecedentes de uso de aminoglucósidos, descartando la presencia de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial, una posible causa del desarrollo de dicha patología.
- Se logró seleccionar a los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión provenientes del CRIT Estado de México, así como de consulta privada con el apoyo de dos especialistas en audiología.
- Se realizó una toma correcta de raspado bucal para el posterior análisis genético de cada uno de los pacientes. Posteriormente se consiguió extraer el DNA total por el método de fenol cloroformo, obteniendo buena concentración y pureza, con una relación de 260/280 entre 1.69 y 1.87, permitiendo realizar el análisis correspondiente. Y finalmente se obtuvo una correcta amplificación de los fragmentos de interés de 801pb en el que se buscó la mutación A1555G en el DNA mitocondrial.
- Se descartó la posibilidad de la presencia de la mutación A1555G en el DNA mitocondrial de los 15 pacientes mediante la técnica de RFLP con la enzima de restricción *BcoDI*.
- Se determinó el haplogrupo mitocondrial de cada paciente mediante las técnicas de PCR y RFLP y así establecimos que trabajamos con población nativa Americana.
- Es posible que la detección de la mutación A1555G del DNA mitocondrial no sea de gran relevancia en pacientes mexicanos con Hipoacusia Neurosensorial No Sindrónica, por su baja prevalencia, vale la pena ampliar este estudio con mayor cantidad de pacientes con Hipoacusia Neurosensorial No Sindrónica asociada o no al uso de aminooglucósidos.

12. Referencias

- Arredondo, A., Venet, G., Román, O. y Ramírez, E. (2012). Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. *MEDISAN*, 16(5), 795-805.
- Abelardo, S., Playán, A., López, J. y Montoya, J. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud pública de México*, 43 (2), 151-161.
- Cabanillas, R. y Cadiñanos, J. (2011). Hipoacusias hereditarias: asesoramiento genético. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 63(3), 218-229.
- Chen, G., Wang, X. y Fu, S. (2011). Prevalence of A1555G mitochondrial mutation in Chinese newborns and the correlation with neonatal hearing screening. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 75(4), 532-534.
- Collazo, T., Corzón, T. y de Vergas, J. (s.f). *Evaluación del paciente con hipoacusia*. Madrid, España: SEORL PCF.
- De Gómez, M. y Nuñez, C. (2012). La mitocondria en el centro del universo celular. *Mensaje Bioquímico*, XXXVI, 65-81.
- De Lorenzo, D., Serrano, J., Portero-Otín, M. y Pamplona, R. (2011). *Nutrigenómica y nutrigenética*. Barcelona: LIBROOKS BARCELONA.
- Derbeneva, O. (2009). Estimated Worldwide Haplotype Frequencies (%). <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/HaplogroupFreqs>.
- Dulon, D., Mosnier, I. y Bouccara, D. (2013). Ototoxicidad farmacológica. *EMC-Otorrinolaringología*, 42(1), 1-13.
- Eirís, J., Gómez, C., Blanco, M. y Castro-Gago, M. (2008). Enfermedades mitocondriales. *Asociación Española de Pediatría*. 105-112.
- Feillet, F., Schmitt, E., Gherardi, R. y Bonnemains, C. (2014). Enfermedades mitocondriales. *EMC-Pediatría*, 49(2), 1-12. doi: 10.1016/S1245-1789(14)67271-1.
- Gallo, J., Arellano, B., Morales, C., Modamio, S., Moreno-Pelayo, M., Ramírez, R., del Castillo, I. y Moreno, F. (2004). Prevalencia de la mutación A1555G en el ADN mitocondrial en pacientes con patología auditiva o vestibular debida a la ototoxicidad de los aminoglucósidos. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 55, 212-217. doi: 10.1016/S0001-6519(04)78511-8.

- Garibyan, L. y Avashia, N. (2014). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.*, 133(3), doi: 10.1038/jid.2013.1.
- Goycoolea, M. (2016). Introducción y Perspectiva general de la hipoacusia neurosensorial. *Rev. Med.Clin. Condes*, 27(6), 721-730. doi: 10.1016/j.rmcl.2016.11.002.
- Gravina, L., Foncuberta, M., Caron, R., Barreiro, C. y Chertkoff, L. (2007). Carrier frequency of the 35delG and A1555G deafness mutations in the Argentinean population: Impact on the newborn hearing screening. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 71(4), 639-643. Doi: 10.1016/j.ijporl.2006.12.015.
- Gutiérrez, A. (2009). La mutación G14459A del mtDNA asociada al síndrome de Leigh en familia mexicana (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
- INEGI. (2004). Las personas con discapacidad en México: una visión censal. Recuperado de: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/76/702825497842/702825497842_23.pdf
- Jiménez, A. (2003). *Manual de neurogenética*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Lagos, J., Lemus, J., Sierra, F., Mella, R., Fuentes, F., Ocares, G., Rosales, A., Salazar, L., Durán, D. y Guzmán, N. (2010). Asociación de niveles de lípidos y haplogrupos Amerindios de DNA mitocondrial en individuos chilenos hipercolesterolémicos tratados con Atorvastatina, *Revista Chilena de cardiología*, 29(2), 208-213. doi: 10.4067/S0718-85602010000200006.
- Martínez, G., Salazar, J., Haro, J., Rubi, R., Velarde, J., Muñoz, J., López, M., Carrillo, E., Canseco, L., López, M. y Rangel, H. (2013). Maternal Admixture and Population Structure in Mexican-Mestizos base on mtDNA haplogroups, *American Journal of Physical Anthropology*, 151(4), 526-537. doi: 10.1002/ajpa.22293.
- Montoya, J. (2010). *Del genoma mitocondrial a la enfermedad*, Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza, España.
- Montoya, J., López, E., Emperador, S. y Ruiz, E. Enfermedades del ADN mitocondrial. Recuperado de: <https://analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1341/1388> el 22 de febrero del 2018.
- Moore, K. y Dalley, A. (2009). *Anatomía con orientación clínica*, México, Editorial Médica Panamericana.
- Morales, C., Gallo-Terán, J., Señaris, B., Fontalva, A., González, R. y Fernández, J.L. (2011). Prevalencia de la mutación A1555G del gen MTRNR1 en pacientes con hipoacusia

- postloculativa sin antecedentes familiares de sordera. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 62(2), 83-86. doi:10.1016/j.otorri.2010.08.003.
- Olarieta, J., García, F., Pérez, N. y Rivera, T. (2015). Hipoacusia. *Medicine*, 11(91), 5445-5454. doi: 10.1016/j.med.2015.11.014.
- Pereira, L., Lemos, B., Orate, M., Belintani, V. y Maniglia, J. (2008). Screening of the mitochondrial A1555G mutation in patients with sensorineural hearing loss. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 74 (5), 731-736. doi: 10.1016/S1808-8694(15)31384-7.
- Saunders, J., Greinwald, J., Vaz, S. y Guo, Y. (2009). Aminoglycoside ototoxicity in Nicaraguan children: Patient risk factors and mitochondrial DNA results. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 140(1), 103-107.
- Serraticce, J. y Desnuelle, C. (2004). ¿Cuándo hay que pensar en una enfermedad mitocondrial?. *EMC-Tratado de Medicina*, 8(4), 1-9. doi: 10.1016/S1636-5410(04)70320-7.
- Solano, A., Playán, A., López-Pérez, M.J. y Montoya, J. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Pública de México*, 43(2), 151-161.
- Tamay, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 2(2), 70-78.
- Torres, M. y Moreno, S. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. Recuperado de: http://fernando.gonzalez.unileon.es/web_mex16/Libro/quince.pdf el 12 de febrero del 2018..
- Wallace, DC., Brown, M. y Lott, M. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease, *Gene*, 238: 211-230. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00295-4.
- Zacarías, M. (2015). Búsqueda de *Leishmania Mexicana* en muestras no convencionales para su potencial aplicación diagnóstica (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

13. Conflicto de intereses

El abajo firmante, Laura Rebeca Rivera Mijangos, como investigadora principal del Protocolo de tesis “Asociación de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes pediátricos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica” declara que:

- No se encuentra en una situación de conflicto de intereses con respecto al presente protocolo. El conflicto de intereses puede ser de índole económica o ser fruto de afinidades políticas, de relaciones familiares o sentimentales o de cualquier tipo de relación o de intereses comunes.
- Que no ha hecho ni hará ningún tipo de oferta de la que pueda derivarse alguna ventaja con respecto al presente protocolo;
- Que no ha concedido ni concederá, no ha intentado ni intentará obtener, y no ha aceptado ni aceptará ningún tipo de ventaja, financiera o en especie, en favor de una persona o en nombre de ésta, cuando tal ventaja constituya una práctica ilegal o implique corrupción, directa o indirectamente, por ser un incentivo o una recompensa relacionada con la ejecución del presente protocolo.



Laura Rebeca Rivera Mijangos

14. Anexo 1. Hoja de recolección de datos

Nombre: _____ No. Folio: _____
Sexo: _____ Edad: _____ Ocupación: _____
Diagnóstico: _____
Probable causa: _____

ANTECEDENTES PERSONALES

Uso durante el embarazo o después del parto de Aminoglucósidos:
Infecciones prenatales o postnatales:
Consumo de alcohol, tabaco y/o drogas durante el embarazo:

PATOLÓGICOS

Cardiovasculares: _____ Quirúrgicos: _____
Pulmonares: _____ Alérgicos: _____
Digestivos: _____ Medicamentos: _____
Renales: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

Padre:
Enfermedades que padece:
Madre
Enfermedades que padece:
Hermanos: ¿Cuántos?
Enfermedades que padecen:

15. Anexo 2. Carta de confidencialidad

CARTA CONFIDENCIALIDAD PARA INVESTIGADORES

Tlalnepantla, Estado de México a __ de __ del 2018

Yo Alumna pBQD Laura Rebeca Rivera Mijangos, hago constar, en relación al protocolo titulado *ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN A1555G DEL DNA MITOCONDRIAL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA* me comprometo a resguardar, mantener la confidencialidad y no hacer mal uso de los documentos, expedientes, reportes, estudios, actas, resoluciones, oficios, correspondencia, acuerdos, contratos, convenios, archivos físicos y/o electrónicos de información recabada, estadísticas o bien, cualquier otro registro o información relacionada con el estudio mencionado a mi cargo, o en el cual participo como investigador, así como a no difundir, distribuir o comercializar con los datos personales contenidos en los sistemas de información, desarrollados en la ejecución del mismo.

Estando en conocimiento de que en caso de no dar cumplimiento se procederá acorde a las sanciones civiles, penales o administrativas que procedan de conformidad con lo dispuesto en la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental, la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares y el Código Penal del Distrito Federal, y sus correlativas en las entidades federativas, a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, y demás disposiciones aplicables en la materia.

A t e n t a m e n t e

pBQD Laura Rebeca Rivera Mijangos

16. Anexo 3. Carta de consentimiento informado

En la ciudad de Tlalnepantla, Estado de México a _____ de _____ de _____ y con fundamento en los artículos 80 y 81 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Prestación de Servicios de Atención Médica en las normas y procedimientos de la medicina en general y en los lineamientos y políticas propias de la Fundación Teletón México AC.. Se otorga la presente:

Autorización y consentimiento informado para la realización del proyecto de investigación, que otorgan, como el “paciente”, el (la) menor _____ con número de expediente _____ y con diagnóstico de _____ y como responsable de “el paciente”; el (la) señor (a) _____ expresamente a Fundación Teletón México A.C (en lo sucesivo “el Centro Médico”), y al profesional del área médica _____, en los siguientes términos:

- I. Título del proyecto de investigación: *ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN A1555G DEL DNA MITOCONDRIAL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA*
- II. Aceptamos y autorizamos que se lleve a cabo la investigación de “el paciente”, que se hace referencia en el punto anterior.
- III. Manifestamos que el profesional del área médica (investigador nos ha informado veraz y oportunamente del proyecto de investigación lo siguiente:
 - a) La explicación de lo que supone la experiencia y las posibles consecuencias o riesgos que pueden derivarse de la participación de “El paciente” y su familia en la investigación.
 - b) La descripción de los objetivos de investigación de determinar la presencia de la mutación A1555G del DNA mitocondrial en pacientes pediátricos con hipoacusia neurosensorial de causa no conocida.
 - c) Las características básicas del diseño de investigación: Toma de datos generales de el paciente, toma de muestra (raspado bucal), procesamiento de la muestra en el laboratorio, entrega de resultado.
 - d) Revisión del expediente clínico de “El paciente”.
 - e) Entiendo además los beneficios que el presente estudio posee para el cuidado y tratamiento de “El paciente”.
 - f) Preguntar en cualquier momento de la investigación las dudas que surjan.
- IV. Es de nuestro conocimiento que seremos libres de retirarnos de la presente investigación en el momento en el que así se desee o bien de no contestar algún cuestionamiento sin que se afecte la atención que recibimos de “la fundación” como paciente.
- V. Aceptamos y autorizamos a “la fundación” a usar y explotar los resultados según convenga a los intereses de “la fundación”, y que tenga como objetivo la investigación y avance de la ciencia.
 Por lo anterior en este acto, cedemos a favor de “la fundación” en ningún caso y bajo ningún concepto tendrá la obligación de pagarnos cantidad alguna o regalías u otorgarnos algún apoyo económico.

- VI. Que se nos ha explicado en forma expresa, clara y precisa el contenido del presente documento, así como sus alcances y fines.

PACIENTE

RESPONSABLE DEL PACIENTE

Nombre, Firma y/o huella

Nombre y Firma Parentesco de "El paciente"

**PROFESIONAL DEL AREA MÉDICA
INVESTIGADOR**

Laura Rebeca Rivera Mijangos
pBioquímica Diagnóstica

TESTIGO

TESTIGO

Nombre y firma

Nombre y firma

17. Anexo 4. Ejemplo de Resultado de paciente



ESTUDIO GENÉTICO DE MUTACIÓN A1555G EN DNA MITOCONDRIAL

Nombre del paciente:

Edad:

Sexo:

Tipo de muestra: Raspado bucal

Diagnóstico: Hipoacusia Neurosensorial No Sindrónica

Antecedentes de importancia:

Método utilizado:

Extracción de DNA: A partir de una muestra de raspado bucal por el método de fenol-cloroformo

Cuantificación de DNA: Espectrofotometría

Amplificación de DNA: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Detección de la mutación: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Resultados

Tabla No. 1 Concentración de DNA total (ng/μl) de dos controles negativos y del paciente:

Muestra	Concentración (ng/μl)
1 (control negativo)	1506.3
14 Paciente	344.2

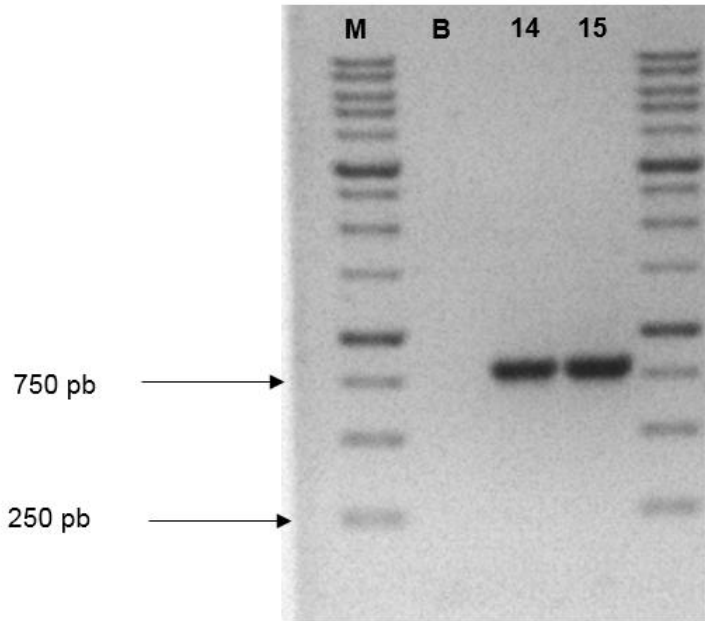


Figura 1. Gel de agarosa al 1% que muestra el amplificado del **paciente**. Se puede observar un amplificado de 801pb. M: Marcador 1kb *Invitrogen*; B: blanco. **14: Paciente**

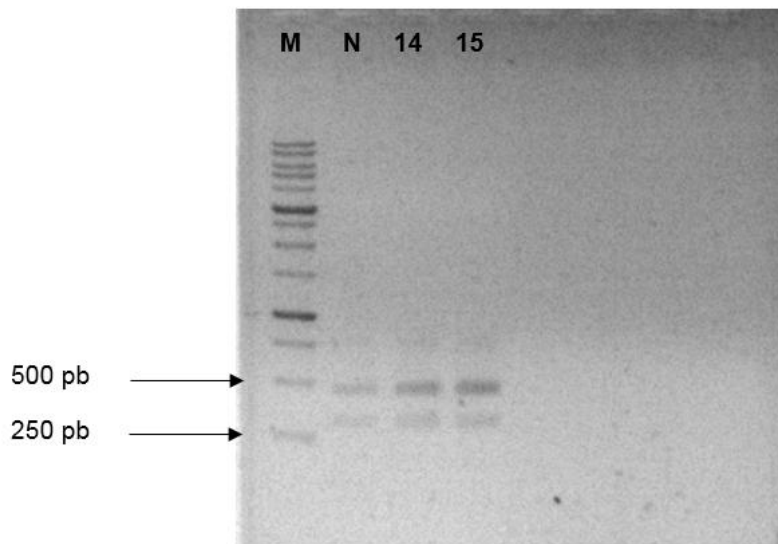


Figura 2. Gel de agarosa al 1% después de someter las muestras a RFLP con la enzima de restricción *BcoDI*. M: Marcador de peso molecular de 1kb; N: Control negativo, **14: Paciente**. Se observa dos fragmentos en todas las muestras, una de 321pb y la otra de 480pb.

RESULTADO: NEGATIVO A LA MUTACIÓN A1555G

pB.Q.D Laura Rebeca Rivera Mijangos

18. Anexo 5. Ley General de Salud

La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para la investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables, adoptada por:

18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, Junio de 1964 y enmendada por la

29ª Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, octubre 1975

35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983

41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989

48ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000

Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002.

Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004.

59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008.

De acuerdo a lo que se establece en La Ley General de Salud en materia de investigación para la salud en México en el TÍTULO SEGUNDO de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos CAPÍTULO I Disposiciones comunes ARTÍCULO 14 La investigación en seres humanos deberá desarrollarse conforme a las siguientes bases: I. ARTÍCULO 17.- Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Para efectos de este Reglamento, esta investigación se clasifica en la siguiente categoría: Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: obtención de saliva.