



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

“Análisis molecular integral del mtDNA en pacientes con potencial predisposición a hipoacusia no sindrómica mediante secuenciación del genoma mitocondrial completo”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

PRESENTA:

JONATHAN JOSUÉ BALDERAS CORREA

ASESORA:

- DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CO-ASESORA:

- DRA. ANA ELVIA SÁNCHEZ MENDOZA

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

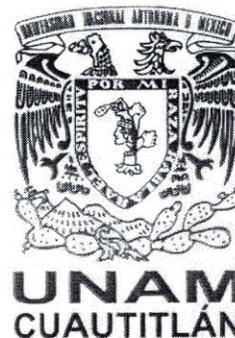
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
SECRETARIA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Análisis molecular integral del mtDNA en pacientes con potencial predisposición a hipoacusia no sindrómica mediante secuenciación del genoma mitocondrial completo

_____, que presenté para obtener el título/grado de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Jonathan Josué Balderas Correa 419062826

Nombre y número de cuenta del egresado(a)



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



UNAM

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN C. SERGIO ARTURO QJEDA PIEDRA
Jefe del Departamento de Titulación
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 y examen profesional**

Análisis molecular integral del mtDNA en pacientes con potencial predisposición a hipoacusia no sindrómica mediante secuenciación del genoma mitocondrial completo.

Que presenta el pasante: **Jonathan Josué Balderas Correa**

Con número de cuenta: **419062826** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de octubre de 2024.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
VOCAL	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	
SECRETARIO	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	
1er. SUPLENTE	Dr. Samuel Alvarez Almazán	
2do. SUPLENTE	M. en C. Oscar Rodríguez Espinosa	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

SAOP/yhm*

“Si un perdedor hace muchos esfuerzos, quizás pueda sobrepasar el poder que tiene un guerrero distinguido”

- Son Goku

Agradecimientos

Al proyecto "ADN marcador mitocondrial y nuclear en diferentes fenotipos de especies de importancia biomédica, alimentaria y biotecnológica" con clave C12407, por proporcionar los materiales necesarios para la realización de este trabajo.

Del mismo modo, se agradece al Dr. José Francisco Montiel Sosa, titular del Laboratorio 18 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES- Cuautitlán UNAM Campo 4, lugar donde se llevó a cabo la parte experimental del trabajo.

A Laura Márquez y Nelly López, responsables del laboratorio de Secuenciación Genómica del Instituto de Biología UNAM (LaNaBio) por proporcionar el servicio de secuenciación.

A la Dra. Maritere Domínguez Rojas, por su paciencia y dedicación para instruirme para la realización de este trabajo, así como su calidad de profesora durante mi etapa académica y ser una inspiración para mí y muchos compañeros de la carrera.

A la Dra. Ana Elvia Sánchez Mendoza, por su apoyo y asistencia en el laboratorio, sin su ayuda no lo habría logrado.

Finalmente, agradezco a la Maestra Josefina, Lulú, profesora Vaely y compañeros del laboratorio que me acompañaron durante este proceso.

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mis padres que fueron un soporte esencial en mi etapa universitaria. A familia y primos que creyeron en mí.

A mis amigos y compañeros de carrera que estuvieron en las buenas y en los momentos difíciles, demostrándome su apoyo incondicional ¡Mil gracias!

Profesora María Teresa, por preocuparse por mi bienestar y estar presente en una etapa crucial de mi vida.

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro (QEPD), usted creyó en mí y me dio ánimos justo cuando más lo necesitaba.

De igual manera a cada uno de los profesores de la carrera que me tuvieron paciencia y la pasión para transmitirme sus conocimientos.

A Akira Toriyama sensei, por crear personajes que me enseñaron a superar mis límites incluso en situaciones adversas.

A mi perrita Maya, por acompañarme en las noches cuando me desvelaba haciendo tarea. Este trabajo es para ti, por ser mi motor de vida y la razón de no rendirme cada día.



A cada uno de ustedes, gracias infinitamente (:

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Capítulo 1. Mitocondria.....	2
1.1 Fosforilación oxidativa	2
1.2 Genoma mitocondrial.....	3
1.3 Herencia mitocondrial	5
1.4 Segregación replicativa.....	5
1.5 Heteroplasmia y efecto umbral	6
1.6 Haplogrupos mitocondriales	7
Capítulo 2. Enfermedades mitocondriales	9
2.1 Etiología de las enfermedades mitocondriales.....	9
2.2. Clasificación de las enfermedades mitocondriales	9
2.3 Principales enfermedades mitocondriales.....	10
Capítulo 3. Enfoque diagnóstico y terapéutico.....	13
3.1 Diagnóstico general	13
3.2 Diagnóstico genético.....	14
3.3 Tratamiento de las enfermedades mitocondriales	18
Justificación	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos.....	20
Diagrama de flujo experimental	21
Materiales y Métodos	22
Población de estudio	22
Criterios de selección	22
□ RFLP's	22
Amplificación del genoma mitocondrial completo	23
□ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
□ Electroforesis en gel de agarosa.....	24
Secuenciación Sanger.....	24
Análisis bioinformático	25
□ Alineamiento de secuencias con bases de datos.....	25
Resultados	27
Discusión	34
Conclusiones	38

Perspectivas	38
Referencias	39
Anexos	45

Índice de figuras

Figura 1. <i>Genoma mitocondrial humano</i>	4
Figura 2. <i>Segregación replicativa y efecto umbral en la heteroplasmia</i>	7
Figura 3. <i>Geografía de los haplogrupos mitocondriales</i>	8
Figura 4. <i>Mapa enfermedades asociadas a mutaciones en el mtDNA</i>	10
Figura 5. <i>Procedimiento de la secuenciación mediante la técnica Sanger</i>	17
Figura 6. <i>Vista de la herramienta MITOMASTER para analizar secuencias</i>	26
Figura 7. <i>RFLPs realizados con la enzima BcoDI para identificar la mutación A1555G</i>	27
Figura 8. <i>RFLPs realizados con la enzima XbaI para identificar la mutación G7444A</i>	27
Figura 9. <i>Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 1-8 de la muestra 41</i>	28
Figura 10. <i>Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 9-16 de la muestra 41</i> ..	28
Figura 11. <i>Electroforesis en gel de agarosa 1.5% Amplificados 17-24 de la muestra 41</i> ...	28
Figura 12. <i>Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 1-8 de la muestra 18</i>	29
Figura 13. <i>Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 9-16 de la muestra 18</i> ..	29
Figura 14. <i>Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 17-24 de la muestra 18</i> ..	29
Figura 15. <i>Electroferograma de la región donde se localiza A1555G en la muestra 41</i> ..	30
Figura 16. <i>Electroferograma de la secuencia donde se localiza G7444A en la muestra 18</i>	30

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Principales mutaciones mitocondriales y sus patologías asociadas</i>	12
Tabla 2. <i>Preparación de mezcla de reacción de PCR para volumen de 25 µL</i>	23
Tabla 3. <i>Mutaciones identificadas en la muestra 41</i>	31
Tabla 4. <i>Mutaciones identificadas en la muestra 18</i>	33

Abreviaturas

- ADP: adenosín difosfato
- ATP: adenosín trifosfato
- CoQ: ubiquinona/coenzima Q10
- CPEO: oftalmoplejía externa crónica progresiva
- ddNTP: didesoxinucleótidos trifosfato
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- dNTP: desoxinucleótido trifosfato
- FADH₂/FAD⁺: flavina adenina dinucleótido
- KSS: síndrome de Kearns-Sayre
- LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber
- MELAS: acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares
- MERRF: Epilepsia mioclónica y fibras rojas irregulares
- mtDNA: ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- NADH/NAD⁺: Nitotinamida adenina dinucleótido
- NARP: neuropatía, ataxia y síndrome de retinosis pigmentaria
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PS: Síndrome de Pearson
- RFLPs: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
- RNA: ácido ribonucleico
- ROS: radicales libres de oxígeno
- rRNA: ácido ribonucleico ribosomal
- TALENS: nucleasas efectoras similares a los activadores de transcripción
- tRNA: ácido ribonucleico de transferencia
- ZFN: endonucleasas con dedos de zinc

Resumen

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos que pueden ser causados tanto por mutaciones en el DNA nuclear, como en el mtDNA. Diversas mutaciones que afectan al mtDNA se han relacionado con la hipoacusia no sindrómica, una discapacidad que se caracteriza por la pérdida de la audición. Las mutaciones A1555G y G7444A son las que más destacan al asociarse con mayor susceptibilidad a desarrollar este fenotipo por el consumo de antibióticos aminoglucósidos.

Sin embargo, a pesar de los avances en la identificación de estas y otras mutaciones en el mtDNA, el diagnóstico molecular sigue siendo un desafío para este tipo de enfermedades. En este contexto, en el presente estudio se emplea la secuenciación del genoma mitocondrial completo mediante la técnica Sanger en pacientes con presunta predisposición a desarrollar hipoacusia no sindrómica.

Para ello, se contó con las muestras de 65 individuos, de los cuales, se seleccionaron dos casos con homoplasmia para las mutaciones A1555G y G7444A previamente caracterizadas mediante RFLPs. De este modo, la secuenciación del genoma mitocondrial permitió descartar la presencia de estas y otras mutaciones asociadas a la hipoacusia no sindrómica, además de identificar variantes genéticas relevantes. Por lo tanto, este enfoque demostró ser más específico y preciso, proporcionando un diagnóstico integral que puede guiar a un manejo y enfoque terapéutico adecuado para cada paciente.

Introducción.

Capítulo 1. Mitocondria

La mitocondria es un organelo que se localiza en el citoplasma celular. En dicho organelo es donde se lleva a cabo la respiración celular, mecanismo mediante el cual la célula puede obtener energía. Esto como producto de la degradación de moléculas del exterior, en presencia de oxígeno para generar productos como CO_2 , agua y la energía que se almacena en forma de adenosín trifosfato (ATP)(Curtis et al., 2021).

Las mitocondrias presentan una membrana externa y una membrana interna la cual se caracteriza por tener crestas, lugar donde ocurren las reacciones químicas de la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs como parte de la respiración celular (Fernández, 2019). Adicionalmente, participa en la coordinación de la glucosa, lípidos, aminoácidos y metabolismo de nucleótidos, además de ser uno de los mayores productores de especies reactivas de oxígeno (ROS)(Chen et al., 2023)

1.1 Fosforilación oxidativa

El metabolismo comprende un conjunto de procesos que aprovecha carbohidratos, lípidos y proteínas para obtener energía. Los productos generados a través de reacciones químicas en procesos anabólicos y catabólicos se utilizan en el ciclo de Krebs con el propósito de generar sustratos que participan en la cadena de transporte de electrones, permitiendo la realización de la fosforilación oxidativa (Nolfi-Donagan et al., 2020).

La fosforilación oxidativa es un proceso en el que se sintetiza ATP a través de una cadena de transporte de electrones, compuesta por complejos enzimáticos incrustados en la membrana interna de la mitocondria. Durante este proceso, se consume oxígeno a medida que los electrones se transportan gradualmente a lo largo de estos complejos, donde ocurren reacciones de oxidación y reducción. Paralelamente a la cadena de transporte de electrones, se genera un gradiente electroquímico que bombea protones H^+ al espacio intermembrana para producir ATP (Pilar et al., 2014; van der Blik et al., 2017). Conocer la estructura y función de cada complejo proteico de la cadena de transporte de electrones, es esencial para comprender cómo se produce el ATP.

La cadena de transporte de electrones, además de componerse de complejos proteicos transmembrana, también posee transportadores como la ubiquinona (CoQ) y el citocromo C, los cuales funcionan como puentes electrónicos entre cada complejo. Los electrones generados a partir de NADH y FADH_2 en el ciclo de Krebs se donan al complejo I, también conocido como NADH ubiquinona oxidorreductasa, y al complejo II (succinato deshidrogenasa). Los electrones de NADH se transfieren a la CoQ a través del complejo I, generando NAD^+ a través de reacciones de oxidación y reducción, liberando la energía necesaria para bombear protones H^+ al espacio intermembrana de la mitocondria (Zhao et al., 2019).

El complejo II desempeña un papel fundamental tanto en el ciclo de Krebs como en la cadena de transporte de electrones, ya que cataliza la conversión de succinato a fumarato. Aunque, al igual que el complejo I, transporta electrones a la CoQ oxidando FADH_2 a FAD^+ ,

a diferencia del complejo I, no bombea protones a través de la membrana (Nolfi-Donagan et al., 2020).

El complejo III, también conocido como oxidorreductasa CoQ-citocromo c, recibe los electrones de la CoQ y los transporta hacia el citocromo c, que actúa como portador de electrones para luego transferirlos al complejo IV (citocromo oxidasa c). Este último transfiere los electrones al oxígeno (O₂) y acepta protones H⁺ para formar agua (Nolfi-Donagan et al., 2020).

El transporte de electrones libera la energía necesaria para bombear protones (H⁺) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intramembranoso. Este gradiente, mantenido a través de la membrana mitocondrial interna, genera una energía potencial que se utiliza para la producción de ATP (Starr et al., 2018). Este potencial crea una fuerza protón-motriz que se asocia con el complejo V, conocido como ATP sintasa. En conjunto con el gradiente de electrones, este mecanismo da lugar al acoplamiento quimiosmótico, generando cambios conformacionales en los dominios de la ATP sintasa, lo que permite la producción de ATP a partir de ADP y fosfato (Curtis et al., 2021; Nolfi-Donagan et al., 2020; Zhao et al., 2019).

1.2 Genoma mitocondrial

A diferencia de otros organelos celulares, las mitocondrias contienen su propio material genético. Si bien la mayoría de los componentes proteicos de las mitocondrias están codificados por el genoma nuclear, el genoma mitocondrial es un componente crítico y esencial en la codificación de la maquinaria de la producción de energía celular (Sharma & Sampath, 2019).

El DNA mitocondrial (mtDNA), a diferencia de los cromosomas eucariotas, se encuentra fuera del núcleo y presenta una organización y patrón de herencia distintos (B. Pierce, 2015). Su estructura física se caracteriza por ser circular en la mayoría de los animales, cerrada covalentemente y de tamaño uniforme (Gray, 2018). En el citoplasma, las mitocondrias se encuentran en múltiples copias, cada una con su propio DNA (Jorde Lynn et al., 2016).

El mtDNA codifica numerosos componentes de la fosforilación oxidativa, siendo crucial para la producción de ATP. Es responsable de la codificación de 13 polipéptidos que forman las subunidades de los complejos de la cadena transportadora de electrones. Sin embargo, la mayoría de las proteínas mitocondriales se codifican en el genoma nuclear y se translocan a través de sistemas de las membranas mitocondriales externa e interna. Además, el mtDNA codifica dos RNA ribosómicos (rRNA 12S y 16S) y 22 RNA de transferencia (tRNA) para la traducción mitocondrial (Sharma & Sampath, 2019). Es importante destacar que, en esta traducción, las mitocondrias presentan excepciones al código genético estándar; por ejemplo, en el mtDNA humano y de levaduras, el codón UGA se traduce como triptófano en lugar de actuar como señal de terminación (Gray, 2018).

El genoma mitocondrial humano consta de aproximadamente 16,569 pares de bases organizados en una molécula bicatenaria con un alto porcentaje de DNA codificante y la ausencia de intrones (Jorde Lynn et al., 2016). Su composición difiere en las bases

nitrogenadas, ya que presenta una cadena pesada (H, Heavy) con más nucleótidos de guanina y una cadena ligera (L, Light) con más nucleótidos de citosina. Como se muestra en la figura 1, la mayoría de la información se encuentra en la cadena pesada, que sirve de molde para ambos rRNA, 14 de los tRNA y 12 de los 13 polipéptidos que conforman la cadena transportadora de electrones. En contraste, la cadena ligera solo actúa como molde para 8 tRNA y 1 polipéptido. Los promotores de ambas cadenas se localizan en una pequeña región reguladora llamada "bucle D", donde se inicia la transcripción y replicación del mtDNA (Habbane et al., 2021; B. Pierce, 2015; Solari & Roubicek, 2011).

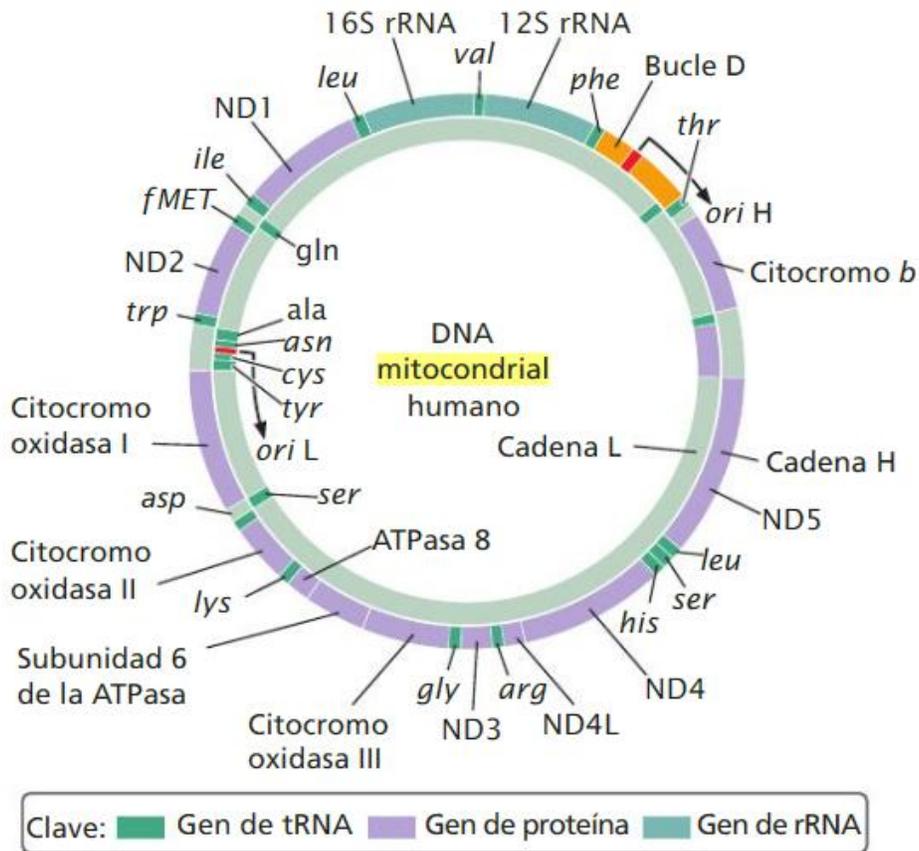


Figura 1. Genoma mitocondrial humano. Reproducida de Pierce, Benjamin A., 2015

1.3 Herencia mitocondrial

Como se mencionó previamente, el mtDNA carece de intrones y se hereda exclusivamente por vía materna, ya que las moléculas de mtDNA de los espermatozoides no se incorporan al embrión en desarrollo (Jorde Lynn et al., 2016). Se ha planteado la hipótesis de que la alta demanda energética en los espermatozoides previo a la fertilización produce un daño significativo al mtDNA, el cual podría ser defectuoso para la descendencia. Por consiguiente, el ovocito fertilizado degrada el mtDNA del espermatozoide mediante ubiquitinación y la destrucción de estos mediante el sistema de autofagia (Skorecki & Cohen, 2022; Wei & Chinnery, 2020).

A su vez, el mtDNA heredado por vía materna da lugar a una reducción del número de mitocondrias que se heredarán. Durante la producción de los ovocitos primarios, se transfiere un número seleccionado de copias de dicho material genético. Como resultado, solo una pequeña parte del mtDNA estará presente en el óvulo maduro. Esto implica una disminución del mtDNA entre generaciones, fenómeno conocido como "cuello de botella", el cual altera la probabilidad de que la descendencia herede mutaciones presentes en la madre (Parakatselaki & Ladoukakis, 2021; Zhang et al., 2018).

Por lo tanto, dado que cada ovocito hereda una proporción diferente de mtDNA, las mutaciones presentes pueden expandirse clonalmente a lo largo de la vida, provocando que un genotipo se reproduzca con mayor frecuencia. La dirección de este cambio puede verse influenciada por la selección a favor o en contra de una variante en particular. Generalmente, las moléculas mutadas con una ventaja replicativa verán aumentado su nivel durante la vida de un individuo (Wei & Chinnery, 2020).

1.4 Segregación replicativa

Una de las diferencias fundamentales entre el genoma mitocondrial y el nuclear radica en su capacidad de replicarse durante cualquier fase del ciclo celular, lo que implica que el número de copias del mtDNA no es fijo y suele ser considerablemente mayor que el número de copias del DNA nuclear. Durante la división celular, tanto en mitosis como en meiosis, la distribución de las mitocondrias en las células hijas se produce de manera aleatoria. A este proceso se le conoce como "segregación replicativa", el cual contribuye a una proporción variable de moléculas de mtDNA presentes a nivel celular, en distintos tejidos e incluso entre individuos (Cohn et al., 2023; Jankovic J et al., 2022).

Además, una molécula de mtDNA mutada puede replicarse con mayor frecuencia que otra, generando un cambio en la proporción de moléculas mutadas y de tipo silvestre. Como se ilustra en la figura 2, la distribución aleatoria de las mitocondrias durante la división celular, junto con la replicación aleatoria de las moléculas de mtDNA, contribuye a cambios en la proporción de estas moléculas en las células de un individuo a lo largo de su vida (Gonçalves, 2019; Stewart & Chinnery, 2015).

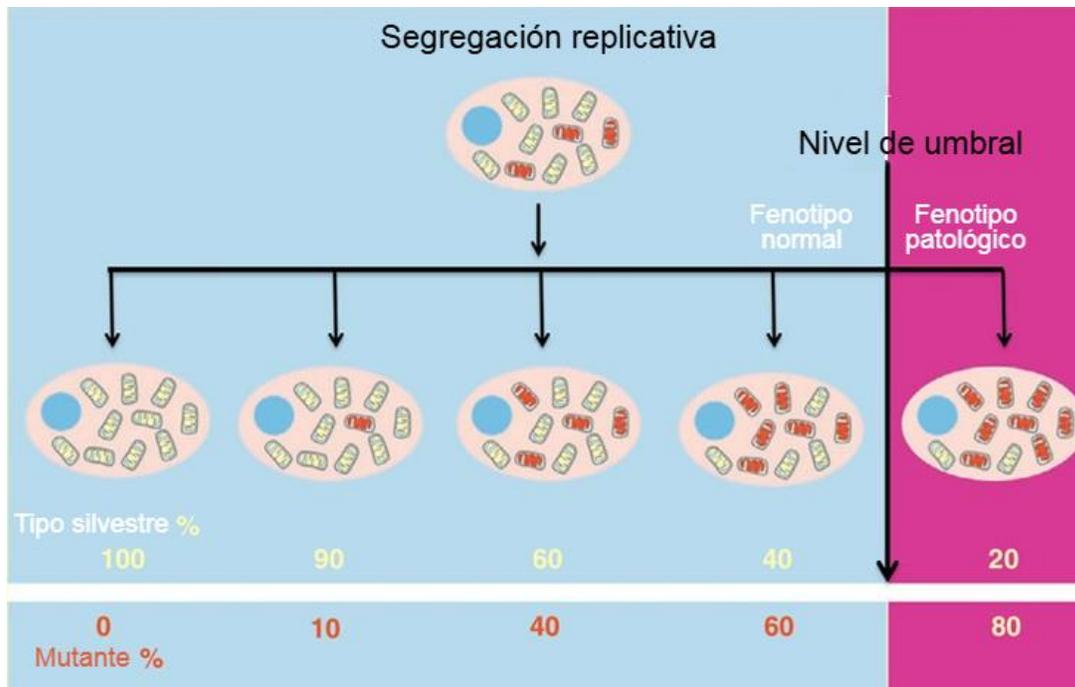


Figura 2. Segregación replicativa y efecto umbral en la heteroplasmia. Modificada de: Goodman, S. R. 2021

1.5 Heteroplasmia y efecto umbral

Cabe resaltar que la tasa de mutación del mtDNA es aproximadamente 10 veces mayor que la del DNA nuclear. Dicha diferencia significativa es atribuible a la ausencia de mecanismos de reparación eficientes y a la producción de ROS durante la fosforilación oxidativa. Aunado a ello, el mtDNA se encuentra presente en múltiples copias dentro de cada mitocondria, y cada célula alberga cientos de miles mitocondrias (Gonçalves, 2019).

Debido a que no todas las copias de mtDNA se ven afectadas por mutaciones al mismo tiempo ni de la misma manera, junto con los efectos de la segregación replicativa y el fenómeno de cuello de botella, se observan variaciones en el genoma mitocondrial dentro de una misma célula. En este fenómeno, conocido como heteroplasmia, coexisten moléculas mutantes con moléculas de tipo silvestre (Ludwig-Słomczyńska & Rehm, 2022). A su vez, puede ocurrir la replicación y herencia exclusiva de moléculas de mtDNA que sean únicamente mutantes o silvestres, a este fenómeno se le denomina homoplasmia (Gonçalves, 2019). Esto implica que, si una mutación está presente, puede replicarse con mayor frecuencia que la de tipo silvestre y viceversa, lo que puede conducir a cambios en la frecuencia de alelos, conocidos generalmente como nivel de heteroplasmia (Zhang et al., 2018).

La heteroplasmia es crucial en el contexto de enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial. Estas enfermedades, vinculadas a mutaciones en el mtDNA, son difíciles de predecir debido a que no presentan un patrón de herencia mendeliano. Por lo tanto, el desarrollo de una patología está intrínsecamente relacionado con la proporción de moléculas de mtDNA mutadas en comparación con las de tipo silvestre, es decir, el nivel de

heteroplasmia. Este nivel se correlaciona con el grado de afectación del órgano y, por ende, con el fenotipo clínico asociado a la mutación (Parakatselaki & Ladoukakis, 2021)

Las moléculas de mtDNA de tipo silvestre pueden compensar la disfunción mitocondrial causada por moléculas mutadas. Sin embargo, si las moléculas de mtDNA mutadas predominan en mayor proporción, el mtDNA de tipo silvestre resultará insuficiente para compensar la deficiencia mitocondrial generada por la alta carga de mutación (Bernardino Gomes et al., 2021; Parakatselaki & Ladoukakis, 2021). A este fenómeno se le conoce como “efecto umbral”, que representa el mínimo número necesario de moléculas de mtDNA mutantes para manifestar un fenotipo clínico. Este umbral varía según el tipo de mutación y el tejido afectado, generalmente situándose entre el 60 y 80% de heteroplasmia (figura 2)(Goodman Steven R., 2021; Wei & Chinnery, 2020) Los órganos más afectados son aquellos que dependen de una alta actividad metabólica, por lo que la mayoría de las mutaciones mitocondriales están asociadas a enfermedades neurológicas, cardiovasculares y degenerativas. La progresión de estas enfermedades no solo depende de la mutación en sí misma, sino también de factores ambientales, genéticos y epigenéticos, lo que dificulta la predicción del desarrollo de la enfermedad (Korchivaia et al., 2023)

El mtDNA, al presentar mutaciones a lo largo de todo su genoma, conlleva una amplia variedad de fenotipos clínicos, lo que genera un comportamiento específico para diferentes variantes patógenas. Dentro de las variantes homoplásmicas de importancia clínica, las más conocidas son aquellas que causan la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), donde generalmente solo se ve afectado un tejido u órgano específico (Bernardino Gomes et al., 2021; Stewart & Chinnery, 2015; Wei & Chinnery, 2020).

Por otra parte, las mutaciones heteroplásmicas patógenas suelen afectar a varios tejidos y sistemas, además de una variabilidad considerable en el fenotipo clínico entre individuos y órganos. Un ejemplo notable de esto es la mutación A3243G, que puede dar lugar a un espectro de trastornos que van desde la encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares (MELAS), hasta sordera o intolerancia a la glucosa (Bernardino Gomes et al., 2021; Skorecki & Cohen, 2022; Wei & Chinnery, 2020).

1.6 Haplogrupos mitocondriales

Dado que el mtDNA tiene un modo de herencia uniparental, las variantes en los genes mitocondriales son heredados exclusivamente de madre a hijo. Esto quiere decir que en el linaje materno del mtDNA, se pueden clasificar diferentes grupos genéticos de acuerdo con polimorfismos que comparten entre sí. Estas secuencias que comparten variantes específicas tienen un ancestro matrilineal común y surgieron inicialmente a partir de una célula germinal en estado de heteroplasmia. Estas mutaciones sobrevivieron a los cuellos de botella genéticos a lo largo de varias generaciones hasta alcanzar un estado de homoplasmia. La clasificación de dichas secuencias de mtDNA según las mutaciones que comparten recibe el nombre de "haplogrupos" (Hernández, 2023; Stewart & Chinnery, 2015).

Los haplogrupos mitocondriales han sido fundamentales para estudiar las migraciones de las poblaciones humanas a lo largo del tiempo, lo que nos permite rastrear su proveniencia. Esta evidencia respalda la hipótesis de que el mtDNA tuvo su origen en África, proporcionando las secuencias más antiguas. El haplogrupo más antiguo del que se tiene registro es el macrohaplogrupo “L”, que data de hace aproximadamente 150,000 años. Este se divide en los haplogrupos L0-L5, que se dispersaron por toda África (McCormick et al., 2018; Stewart & Chinnery, 2015).

A medida que las poblaciones humanas migraron fuera de África, surgieron nuevos haplogrupos. Hace aproximadamente 65,000 años, el haplogrupo L3 dio origen a los haplogrupos M y N, que se dispersaron fuera de África para establecerse en otros continentes. El haplogrupo M se estableció en Asia, donde dio origen a los haplogrupos C, D, G y Z. Por otro lado, el haplogrupo N también migró a Asia y generó los haplogrupos A, B, F y O, además de desplazarse hacia Europa, donde dio origen a I, X, W y R. Partiendo del haplogrupo R, se desarrollaron el resto de haplogrupos europeos como H, J, T, U y V. Finalmente, los haplogrupos A, C y D se establecieron en América aproximadamente hace 20000 años al cruzar el estrecho de Bering. Así mismo, otras migraciones posteriores trajeron los haplogrupos B y X a América del Norte (Gonçalves, 2019; Hernández, 2023)

En la figura 3, se observa la diversidad geográfica de los haplogrupos de acuerdo con la migración de las poblaciones humanas.

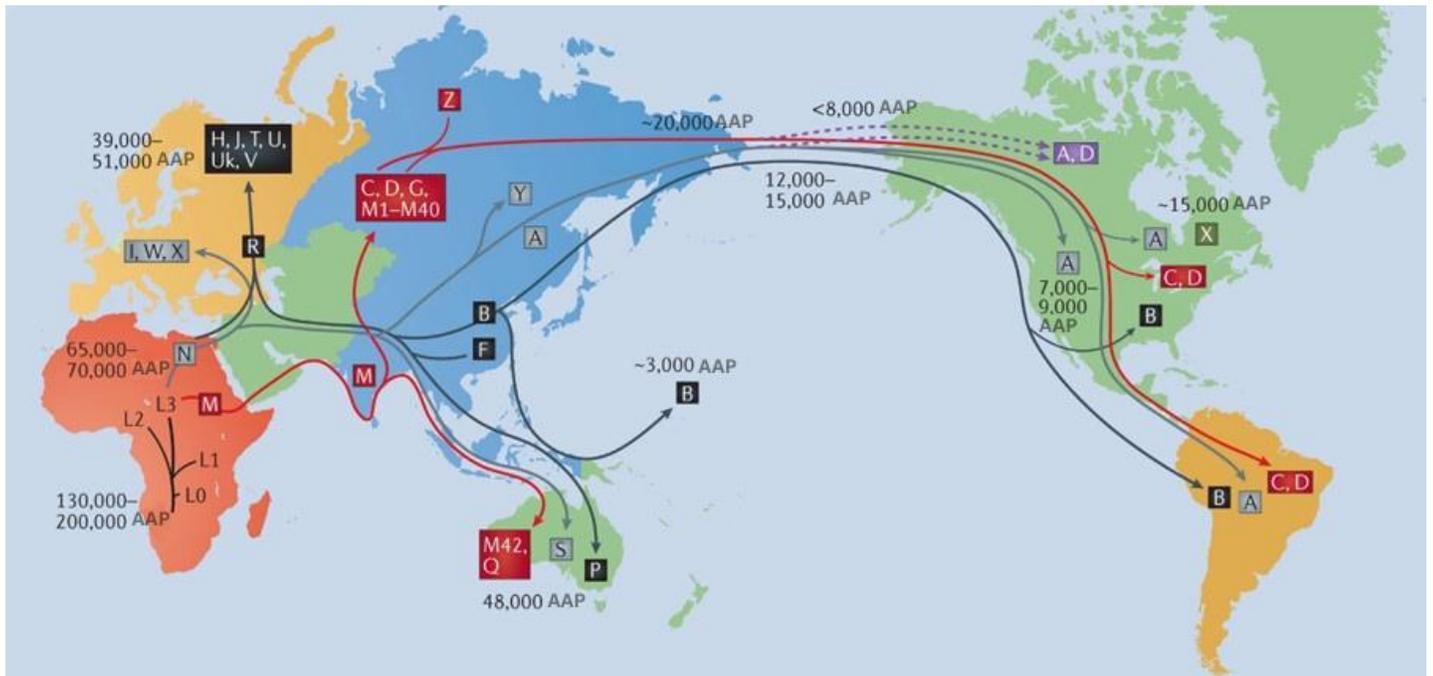


Figura 3. Geografía de los haplogrupos mitocondriales. AAP: años antes del presente. Modificada de: Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. 2015

Por otra parte, es esencial señalar el impacto que pueden tener ciertos haplogrupos en la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales, ya que algunos grupos étnicos con determinado haplogrupo no van a presentar la misma sintomatología observada en otros, por lo que se tiene la hipótesis de que existe cierta influencia de los haplogrupos en el fenotipo de las enfermedades mitocondriales. Varias investigaciones han relacionado polimorfismos específicos asociados a determinados haplogrupos con el riesgo de desarrollar Parkinson, Diabetes tipo II, Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos (Chinnery & Gomez-Duran, 2018; McCormick et al., 2018; Wei & Chinnery, 2020).

Capítulo 2. Enfermedades mitocondriales

2.1 Etiología de las enfermedades mitocondriales

Como se mencionó anteriormente, las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la producción de la mayor parte de ATP necesario para el funcionamiento celular, a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, siendo también la principal fuente de ROS. Por lo tanto, las enfermedades mitocondriales resultan de la alteración en la fosforilación oxidativa o de las funciones mitocondriales integrales (Stenton & Prokisch, 2020).

Este grupo de enfermedades abarca trastornos causados por mutaciones tanto en el mtDNA como en el DNA nuclear, que codifican proteínas participantes en las funciones mitocondriales, dando lugar a defectos en estas vías (Gorman et al., 2016). Cambios en los componentes proteicos y ribosómicos, derivados de mutaciones mitocondriales, generan manifestaciones clínicas variables que afectan principalmente al cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado y sistema endócrino (Habbane et al., 2021). En humanos, las células que componen los tejidos de estos órganos tienen elevados requerimientos energéticos suministrados por las mitocondrias, lo que resulta en umbrales bajos para la manifestación de síntomas de enfermedades mitocondriales (van der Bliet et al., 2017). Estos defectos suelen combinarse en aspectos neurológicos y miopáticos, provocando errores congénitos en el metabolismo. Las características clínicas de los trastornos mitocondriales dependen de su participación en el metabolismo energético, manifestando variabilidad fenotípica dentro de las familias, dependiendo del grado de heteroplasmia, distribución en tejidos y umbral biológico. Además, las manifestaciones clínicas pueden aparecer en cualquier etapa de la vida (Bradley Schaefer & Thompson Jr., 2016).

2.2. Clasificación de las enfermedades mitocondriales

Las mutaciones responsables de las enfermedades mitocondriales se han asociado principalmente a trastornos neurológicos y neuromusculares. Estas mutaciones se pueden clasificar de acuerdo con el daño que ocasionan al mtDNA; desde reordenamientos que pueden ser deleciones simples o a gran escala y mutaciones puntuales (Rouzier et al., 2022).

Por otra parte, las mutaciones del mtDNA también se pueden clasificar con base en la función mitocondrial: mutaciones en genes que codifican para tRNA y rRNA, que están implicados en la síntesis de proteínas; y genes que codifican para algunas de las 13 subunidades que forman los complejos proteicos que conforman la cadena transportadora de electrones (Gorman et al., 2016; Habbane et al., 2021). Como se puede observar en la

figura 4, se encuentran los diferentes trastornos y patologías mitocondriales asociados a mutaciones que se han identificado en el mtDNA.

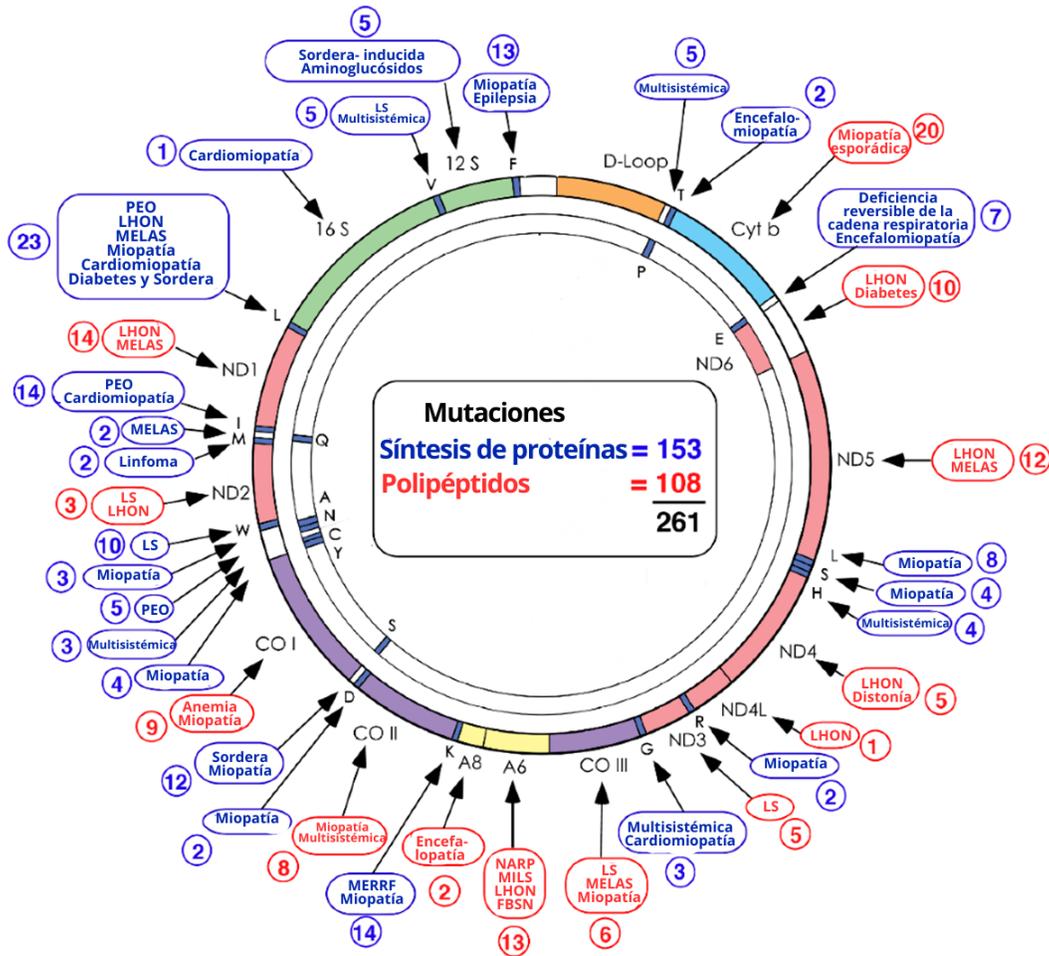


Figura 4. Mapa enfermedades asociadas a mutaciones en el mtDNA. MELAS: encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares; LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber; MERRF: epilepsia mioclónica con fibras rojas; NARP: neuropatía, ataxia y síndrome de retinosis pigmentaria; KSS: síndrome de Kearns-Sayre; LS: síndrome de Leigh; PEO: oftalmoplejía externa progresiva; FBSN: necrosis estriatal bilateral familiar; MILS: síndrome de Leigh heredado vía materna. *Modificada de:* DiMauro, S. 2019.

2.3 Principales enfermedades mitocondriales

Como hemos revisado, la naturaleza del mtDNA presenta una amplia variedad de fenotipos clínicos como resultado de los tejidos donde hay mayor nivel de heteroplasmia, así como la propia dinámica mitocondrial. Además, los síntomas más específicos incluyen aquellos asociados a tejidos y órganos de alta demanda energética. Por lo tanto, los síntomas de la mayoría de las patologías asociadas a mutaciones mitocondriales incluyen algunas formas

de ceguera, disfunción renal, problemas cardíacos, sordera, trastornos neuromusculares y hasta trastornos del sistema endocrino como la diabetes (Habbane et al., 2021).

Las mutaciones del mtDNA caracterizadas como reordenamientos, se han identificado como deleciones únicas o múltiples, que pueden ser simples o a gran escala, de las cuales los síndromes o trastornos más comunes incluyen el síndrome de Kearns-Sayre (KSS), oftalmoplejía externa crónica progresiva (CPEO) y el síndrome de Pearson (PS) (Bernardino Gomes et al., 2021).

KSS se caracteriza por ser una miopatía mitocondrial debido a una gran deleción que se puede heredar vía materna o de forma somática. Las características clínicas de los pacientes suelen presentarse antes de los 20 años las cuales incluyen principalmente retinopatía, ataxia, debilidad muscular, arritmias y deterioro cognitivo severo (Habbane et al., 2021; Ryzhkova et al., 2018). KSS suele confundirse con otros síndromes como PS y CPEO. CPEO se caracteriza también por ser una miopatía mitocondrial, presentando síntomas como oftalmoplejía, caída bilateral de los párpados, degeneración pigmentaria de la retina y disfunción general del sistema nervioso central (Ryzhkova et al., 2018).

Por otra parte, PS también es causada por deleciones simples a gran escala con fenotipo clínico muy similar a los anteriormente mencionados, pero con la diferencia que la deleción suele encontrarse en otros tejidos además del muscular (Habbane et al., 2021). Algunos síntomas adicionales indican problemas gastrointestinales, acidosis láctica y anemia. Cabe destacar que los pacientes que sobreviven al PS pueden desarrollar el fenotipo de KSS (DiMauro & Emmanuele, 2020; Yoshimi et al., 2022).

Del mismo modo, las mutaciones puntuales en el mtDNA también se han caracterizado por presentar una amplia variedad de fenotipos clínicos que causan una amplia heterogeneidad en las enfermedades mitocondriales. Estas mutaciones pueden ocurrir en cada gen del genoma mitocondrial, desde aquellos que codifican para tRNA, rRNA o genes que codifican para alguna de las subunidades de la cadena transportadora de electrones (Zhu & Wang, 2017).

Una de las mutaciones puntuales más comunes es A3243G, que se ha asociado a fenotipos clínicos como sordera, diabetes y síndromes más graves como MELAS. Esto se debe a un cambio conformacional en el tRNA^{Leu}, afectando a la síntesis de proteínas (Greaves et al., 2012; Klopstock et al., 2021). Como ocurre en la mayoría de los síndromes mitocondriales, existe un defecto metabólico que conlleva a síntomas como acidosis láctica, dolor de cabeza, náuseas, vómitos similares a migraña, epilepsia y episodios similares a accidente cerebrovascular. Así mismo, otro síndrome con síntomas similares es la epilepsia mioclónica con fibras rojas (MERRF) que a diferencia de MELAS, los pacientes presentan fibras rojas rasgadas en el tejido muscular, además de que la mutación característica de este síndrome es A8344G (Tetsuka et al., 2021).

Por consiguiente, otro de los trastornos causados por mutaciones puntuales es la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), donde su principal característica clínica es la pérdida de la visión causada por una alteración en el nervio óptico (Habbane et al., 2021). Esta enfermedad tiene la particularidad de estar asociada a una carga de múltiples mutaciones del mtDNA que codifican para subunidades del complejo I de la cadena transportadora de electrones. En concreto G3460A, G11778A y T14484C se encuentran en

el 90% de los pacientes, aunque hay una mayor cantidad de mutaciones que han asociado a esta enfermedad (Zeviani & Carelli, 2021).

De igual manera, es importante destacar el síndrome de Leigh, el cual está relacionado etiológicamente con una mutación puntual del mtDNA (T8993G). En este síndrome, también se han identificado mutaciones en genes nucleares que están implicados en la función mitocondrial. Por otro lado, la variante T8993G también se ha asociado con neuropatía, ataxia y síndrome de retinosis pigmentaria (NARP), que comparte un fenotipo clínico similar al síndrome de Leigh, incluyendo ataxia, convulsiones y disfunción respiratoria. Sin embargo, el síndrome de NARP se distingue por características adicionales como neuropatía muscular, retinopatía pigmentaria y un curso clínico más lento de la enfermedad (Finsterer, 2023; Ryzhkova et al., 2018).

En la Tabla 1 se resumen las patologías más comunes asociadas a mutaciones identificadas en el mtDNA.

Tabla 1. Principales mutaciones mitocondriales y sus patologías asociadas

Patología	Gen	Mutación
Mutaciones puntuales del mtDNA		
MELAS	<i>MT-TL1</i>	A3243G
LHON	<i>MT-ND1</i>	G3460A
	<i>MT-ND4</i>	G11778A
	<i>MT-ND6</i>	T14484C
MERFF	<i>MT-TK</i>	A8344G
NARP	<i>MT-ATP6</i>	T8993G
Síndrome de Leigh		T8993C
Hipoacusia no sindrómica	<i>MT-RNR1/12S rRNA</i>	A1555G
		C1494T
	<i>MT-CO1</i>	G7444A
Deleciones en el mtDNA		
KSS	Varios genes	Delección única a gran escala
PS		
CPEO		

MELAS: encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares; LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber; MERFF: epilepsia mioclónica con fibras rojas; NARP: neuropatía, ataxia y síndrome de retinosis pigmentaria; KSS: síndrome de Kearns-Sayre; PS: síndrome de Pearson; CPEO: oftalmoplejía externa crónica progresiva. Nota. Adaptado de: Zapico, S. C., & Ubelaker, D. H. 2013; Ryzhkova, A. I. et al., 2018; Habbane, M. et al., 2021

2.3.1 Hipoacusia neurosensorial no sindrómica asociada a mutaciones del mtDNA

La hipoacusia se caracteriza por la pérdida de la audición en leve o mayor grado por alteración en alguna parte de la vía auditiva, la cual puede presentarse de forma sindrómica (se manifiesta con otros órganos y tejidos afectados) y no sindrómica. Esta discapacidad auditiva tiende a aumentar su prevalencia conforme a la edad. Sin embargo, se han establecido causas genéticas relacionadas a la hipoacusia no sindrómica, de las cuales el 1% corresponde a mutaciones caracterizadas en el mtDNA (Martín et al., 2023; MedlinePlus, 2019)

Dentro de las mutaciones mitocondriales que causan hipoacusia no sindrómica, resaltan aquellas que desarrollan un fenotipo clínico asociado al consumo de aminoglucósidos, siendo el gen *MT-RNR1/12S rRNA* el punto crítico de estas mutaciones. A menudo, las mutaciones del mtDNA que se detectan en el gen *MT-RNR1/12S rRNA* en pacientes con sordera son A1555G y C1494T (Ding et al., 2020; Fu et al., 2021). Estas mutaciones aumentan la susceptibilidad de unión de aminoglucósidos al rRNA12S, conduciendo a errores de traducción mitocondrial que afectan la síntesis de proteínas de la cadena transportadora de electrones (Gao et al., 2017).

El mecanismo más estudiado en cuanto a la susceptibilidad a la ototoxicidad por aminoglucósidos en A1555G sigue el principio de que al existir un cambio de una adenina por guanina en la posición 1555 del genoma mitocondrial, se genera un nuevo emparejamiento de GC. La estructura del rRNA 12S es similar al rRNA 16S de *E. coli*, generando un sitio de unión a aminoglucósidos que modifica la estructura del rRNA 12S, resultando en traducción errónea de proteínas mitocondriales. Como consecuencia, hay inhibición en la síntesis de ATP, aumento de ROS y liberación de factores apoptóticos que conducen a la muerte de las células del oído (Fu et al., 2021; Kim et al., 2022; Rivetti et al., 2023).

A su vez, también se han identificado mutaciones del mtDNA en genes que codifican para proteínas que forman parte de los complejos de la cadena transportadora de electrones, que tienen impacto en el desarrollo de la hipoacusia. En particular el gen *MT-CO1*, que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa, destacan las mutaciones G7444A y A7443G. Estas mutaciones modifican el codón de paro del gen *MT-CO1*, dando lugar a 3 aminoácidos adicionales (Lys-Gln-Lys) en el extremo C del polipéptido, generando una proteína potencialmente aberrante (Joo et al., 2023). Adicionalmente, G7444A es adyacente al sitio del precursor de tRNA Ser (UNC) en la cadena L del genoma mitocondrial, de modo que esta mutación puede alterar el procesamiento de este tRNA causando disfunción mitocondrial (Liu et al., 2015).

Sin embargo, G7444A no produce un fenotipo de importancia clínica por sí sola, aunque en algunos pacientes se ha identificado pérdida auditiva de diversa gravedad. Esta variante se ha asociado a hipoacusia no sindrómica principalmente en pacientes que tuvieron exposición a aminoglucósidos, además de que tiene mayor impacto al tener sinergia con la mutación A1555G, donde se ha visto que tiene influencia en su penetrancia y expresividad (Gao et al., 2017; Joo et al., 2023).

Capítulo 3. Enfoque diagnóstico y terapéutico

3.1 Diagnóstico general

El primer paso en el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial es la sospecha clínica de la patología. Esto se logra a través de la evaluación de los antecedentes médicos y la sintomatología presentada por el paciente. Sin embargo, en el caso de las enfermedades mitocondriales, la presentación de síntomas es muy heterogénea, lo que puede dificultar el diagnóstico. Además, es importante tener en cuenta que estos síntomas pueden estar ausentes en pacientes portadores de mutaciones en el mtDNA de importancia clínica (Klopstock et al., 2021; Ryzhkova et al., 2018).

Por consiguiente, se recomienda el uso de biomarcadores que evalúen la función mitocondrial, los cuales consisten en una serie de pruebas bioquímicas en sangre, orina y otros tejidos biológicos. Además, suelen incluirse pruebas de imagenología como tomografía axial computarizada y/o la resonancia magnética nuclear, que ayudan a confirmar la sospecha clínica (Parikh et al., 2015).

Como parte del cribado bioquímico, se realizan pruebas para evaluar la disfunción metabólica, las cuales incluyen análisis de ácido láctico, piruvato, aminoácidos, ácidos orgánicos, lipoproteínas, carnitina y ensayos enzimáticos de la cadena respiratoria. Sin embargo, se debe tener precaución al interpretar los resultados de dichas pruebas, ya que algunas no son específicas de las enfermedades mitocondriales, pero es importante llevarlas a cabo. Además, se deben realizar pruebas adicionales para confirmar la enfermedad mitocondrial (Muraresku et al., 2018; Murayama et al., 2019).

Adicionalmente, se pueden realizar pruebas bioquímicas invasivas que requieren una biopsia del tejido afectado, generalmente músculo. Entre las pruebas más comunes se incluye el análisis histoquímico para evaluar la actividad de la citocromo c oxidasa y succinato deshidrogenasa, con el fin de detectar deficiencias en la cadena respiratoria. Así mismo, en el tejido muscular, se suele realizar un análisis cualitativo de fibras rojas rasgadas, que indican una acumulación de grumos de mitocondrias afectadas. Por otro lado, para complementar el diagnóstico, el análisis inmunohistoquímico de cada uno de los complejos de la cadena de transporte de electrones es esencial para detectar su abundancia y proporcionar información valiosa para el diagnóstico (Gorman et al., 2016).

Ahora bien, si los antecedentes familiares no son claros o no están disponibles, así como ambigüedades en los resultados bioquímicos e histoquímicos que evalúan la actividad enzimática, el siguiente paso para confirmar y/o complementar el diagnóstico son las pruebas moleculares. Estas pruebas permiten identificar mutaciones específicas en el mtDNA que podrían estar causando la patología. Además, posibilitan un enfoque terapéutico más específico para el paciente y brindan asesoramiento genético en caso de planificación familiar (Davis et al., 2018; Wong et al., 2010).

3.2 Diagnóstico genético

Las pruebas moleculares para identificar mutaciones genéticas causantes de trastornos mitocondriales respaldan el diagnóstico al ofrecer un enfoque más específico y preciso. La identificación de una mutación genética asociada a una enfermedad mitocondrial, además de confirmar el diagnóstico, pone fin a la incertidumbre y permite un asesoramiento terapéutico y genético adecuado (Parikh et al., 2015).

Dependiendo de los resultados del análisis bioquímico, se procede con la identificación de deleciones o mutaciones puntuales en un panel específico de genes, por ejemplo, genes que codifican para complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones (Gorman et al., 2016).

Las pruebas genéticas más comunes para identificar mutaciones mitocondriales y su nivel de heteroplasmia se basan en métodos de PCR. Dichos métodos comprenden la amplificación de genes específicos, para posteriormente realizar una digestión mediante

enzimas de restricción o secuenciación directa del producto de PCR. En caso de obtener resultados negativos en el análisis de genes específicos, es aconsejable considerar la secuenciación del genoma mitocondrial completo mediante la técnica Sanger o la secuenciación de nueva generación (NGS) para verificar el diagnóstico. Esto ayuda a excluir falsos positivos y falsos negativos, ya que los métodos convencionales como PCR-RFLP suelen tener un límite de detección alto y baja sensibilidad, lo que podría llevar a diagnósticos incorrectos (Legati et al., 2021; Wong et al., 2010).

3.2.1 PCR-RFLPS

Para poder estudiar adecuadamente el mtDNA se pueden aplicar los métodos convencionales; el más utilizado es la amplificación de secuencias específicas que se desean estudiar para obtener suficiente cantidad de mtDNA para análisis posteriores (Duan et al., 2018).

La amplificación de fragmentos de DNA es realizada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), principalmente para enriquecer genomas a pequeña escala como el mtDNA. Esta consiste en la síntesis de millones de copias de DNA durante varios ciclos repetidos. Para poder amplificar la secuencia de interés, la PCR requiere de 4 elementos esenciales: DNA molde o secuencia diana; *Taq* polimerasa, enzima que va a polimerizar las nuevas cadenas de DNA; *primers* o cebadores que van a hibridar con la cadena molde para iniciar el proceso de replicación; y finalmente los dNTP's, unidades que va a ir añadiendo la polimerasa a la cadena molde (de Dios, 2013).

Uno de los métodos utilizados para estudiar mutaciones puntuales en el mtDNA, es mediante la restricción enzimática a partir de la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) en secuencias amplificadas mediante la PCR. Para ello, se deben diseñar *primers* específicos que amplifiquen a la secuencia donde se encuentre la mutación. Una vez que se obtienen suficientes copias de la región de interés, es digerida mediante enzimas de restricción, las cuales se caracterizan por cortar en sitios específicos de secuencias de DNA. Dependiendo de la enzima que se utilice para la digestión, puede escindir secuencias mutadas o normales de manera diferencial. Los productos de la digestión se pueden observar en un gel de agarosa o poliacrilamida, que nos permite separar los fragmentos obtenidos con base a su tamaño, de tal manera que es posible identificar aquellas muestras que presentan la mutación *versus* las secuencias normales de acuerdo con la enzima en particular utilizada (Naini et al., 2020; B. A. Pierce, 2023).

Sin embargo, aunque la restricción enzimática seguida de la PCR es un método sencillo y fue ampliamente utilizado en su momento, para el caso del mtDNA se ha asociado con una baja sensibilidad y un alto límite de detección que puede producir falsos positivos y falsos negativos. Además de que la propia amplificación mediante la PCR puede generar un sesgo considerable al coexistir secuencias de mtDNA con diferentes variantes, por lo que está sujeto a generar diferencias en la amplificación de alelos conduciendo a que el diagnóstico no sea certero. Por lo tanto, para el diagnóstico genético de estas enfermedades, se ha optado por enfoques más eficientes como la secuenciación (Legati et al., 2021; Mavraki et al., 2023).

3.2.2 Secuenciación Sanger

La secuenciación es uno de los métodos moleculares más utilizados para el análisis de DNA, ya que nos permite obtener información acerca de su estructura y función al determinar el orden exacto de pares de bases. Actualmente, existen diferentes métodos de secuenciación, siendo el método Sanger o “didesoxi” el estándar para secuenciar cualquier fragmento de DNA, basándose en la elongación de este mediante una DNA polimerasa (B. A. Pierce, 2023).

El principio del método didesoxi o Sanger se basa en la replicación del DNA, donde se utilizan desoxinucleótidos para la síntesis (dNTPs) y sustratos especiales conocidos como didesoxinucleótidos (ddNTPs), los cuales carecen de un grupo 3'-OH. Por lo tanto, al incorporarse un ddNTP, la síntesis de la nueva cadena de DNA se detiene al no poder unirse más nucleótidos (Karki, 2017; Shen, 2019).

El procedimiento para este método comienza con un templado o plantilla de DNA, ya sea producto de la PCR o un fragmento clonado, ya que se requiere una cantidad considerable de DNA. Esta plantilla de DNA se divide en cuatro muestras diferentes, donde cada una contendrá: un cebador complementario al extremo 3' de la cadena molde, una DNA polimerasa, los cuatro desoxinucleótidos para la síntesis de la cadena de DNA y una baja concentración de un solo tipo de ddNTP diferente para cada disolución (Karp, 2018).

La reacción comienza con un aumento de la temperatura con la finalidad de desnaturalizar el DNA a secuenciar. Luego, se reduce la temperatura para permitir que el cebador hibride con la cadena molde. A partir del cebador, la DNA polimerasa va añadiendo cada uno de los dNTPs correspondientes y un ddNTP. Dado que los ddNTP están en menor concentración que los dNTPs, se permite que los ddNTPs se incorporen de manera aleatoria, finalizando la síntesis de ADN y obteniendo cuatro grupos de fragmentos de diferente longitud por cada una de las reacciones que abarcan todo el DNA molde (Aguilar, 2016).

La secuencia de DNA complementaria se puede leer a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida, donde el contenido de cada una de las cuatro muestras se analizará en un carril al lado del otro, de manera que la secuencia se lee a partir de las bandas de cadena más corta hasta la más grande, lo que permite identificar la posición de cada nucleótido en la cadena de DNA (B. A. Pierce, 2023).

Anteriormente, el método de secuenciación Sanger se realizaba de manera manual. Actualmente, el procedimiento se puede realizar de forma automatizada al utilizar un fluorocromo para marcar cada ddNTP en el extremo 3', con un color diferente para cada tipo, lo que permite realizar una única reacción. El proceso de desnaturalización, hibridación y síntesis se lleva a cabo muchas veces, hasta obtener cadenas de DNA de diferente tamaño. Los fragmentos obtenidos se separan mediante una electroforesis capilar, donde migran a través de un láser que excita el fluorocromo para poder ser identificado por un detector que determina cada nucleótido de la secuencia al presentar una longitud de onda específica (Aguilar, 2016; Karp, 2018).

Como se puede observar en la figura 5, los datos analizados por el detector son interpretados en un ordenador, el cual genera un electroferograma que permite visualizar la secuencia de nucleótidos como una serie de picos. Una vez que se ha determinado la secuencia de interés, se pueden emplear herramientas bioinformáticas para su análisis, así

como su comparación con otras secuencias disponibles en las distintas bases de datos que se encuentran en internet (Aguilar, 2016; B. A. Pierce, 2023).

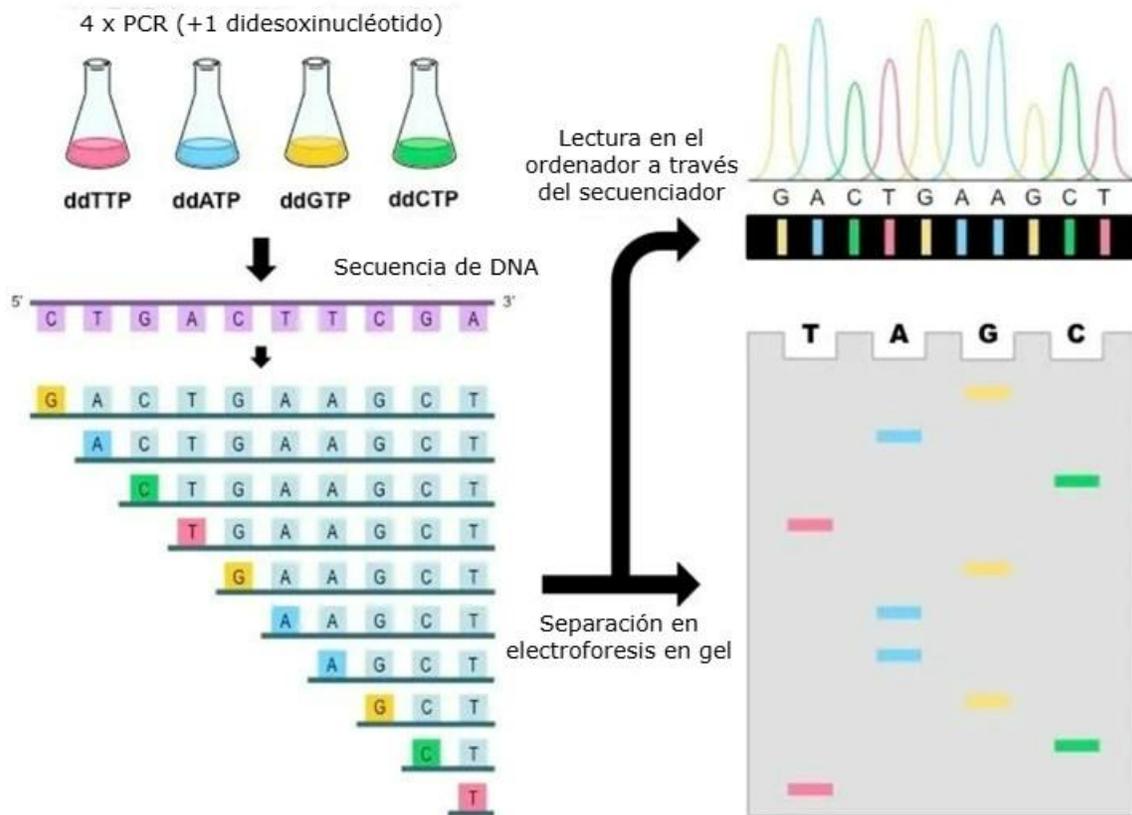


Figura 5. Procedimiento de la secuenciación mediante la técnica Sanger. Modificada de: Karki, G. 2018.

El método tradicional de secuenciación Sanger para el análisis de variantes en el mtDNA se basa en amplificar genes específicos mediante la técnica de PCR o la amplificación del genoma completo mediante combinaciones de cebadores superpuestos. El enfoque diagnóstico que ha utilizado este método ha sido el estándar de oro en los últimos 20 años (Duan et al., 2018; Mahmud et al., 2022).

Sin embargo, a pesar de ser más confiable que la restricción enzimática, la secuenciación Sanger presenta limitaciones en cuanto a su eficiencia y su capacidad para detectar mutaciones, especialmente en el mtDNA, así como evaluar los niveles de heteroplasmia. Es por lo que actualmente, la secuenciación de próxima generación (NGS) se ha destacado como el enfoque más adecuado. La NGS ha revolucionado nuestra comprensión molecular de los trastornos mitocondriales al ofrecer una mayor sensibilidad y eficiencia, lo que permite obtener diagnósticos más precisos, especialmente en el análisis del genoma mitocondrial completo. Por lo tanto, se espera que la NGS se emplee como método diagnóstico de primera línea para enfermedades mitocondriales (Horvath & Chinnery, 2019; Legati et al., 2021; Mahmud et al., 2022).

3.3 Tratamiento de las enfermedades mitocondriales

Dada la heterogeneidad de los síntomas en las enfermedades mitocondriales, el enfoque del tratamiento puede variar significativamente. Esta amplia variedad de presentaciones clínicas ha dificultado establecer terapias efectivas. Los enfoques tradicionales se centraban en abordar los síntomas asociados con la disfunción mitocondrial debida a la deficiencia de ATP (Aldossary et al., 2022; Hirano et al., 2018).

Dentro del enfoque farmacológico, se han utilizado vitaminas y suplementos dietéticos para contrarrestar esta disfunción metabólica. Sin embargo, su uso no ha sido estandarizado, además de no mostrar una eficacia significativa. El objetivo terapéutico de estas sustancias es funcionar como antioxidantes, sustratos mitocondriales y/o cofactores. El más utilizado es la coenzima Q10 (CoQ10), que si bien, ha mostrado resultados favorables en algunos pacientes, aún carece de evidencia sólida que muestre un efecto terapéutico significativo debido a su éxito limitado (Hirano et al., 2018; Hong et al., 2023).

Del mismo modo, se ha recurrido al uso de L-carnitina, ácido fólico y vitaminas cuando estos se encuentran deficientes. Sin embargo, de acuerdo con la Sociedad de Medicina Mitocondrial, el uso de fármacos y suplementos en conjunto para tratar estas afecciones, mejor conocido como “cocteles mitocondriales”, no ha sido completamente validado y puede generar efectos secundarios. Además, puede dificultar la evaluación de la eficacia individual de cada compuesto, así como la identificación de posibles interacciones entre ellos (Hirano et al., 2018; Murayama et al., 2019).

Por otra parte, hay terapias emergentes dirigidas específicamente a la disfunción mitocondrial, que podrían considerarse como “terapias adaptadas a enfermedades”. Estos enfoques pueden abarcar desde la eliminación de compuestos tóxicos específicos relacionados con la disfunción mitocondrial, hasta métodos que modifiquen la dinámica mitocondrial para activar la biogénesis y compensar con mitocondrias que contengan secuencias silvestres. También, se han evaluado terapias de reemplazo mitocondrial, en las que se sustituye el mtDNA mutante por mtDNA silvestre en ovocitos, con el objetivo de prevenir la transmisión materna de mutaciones (Hirano et al., 2018; Murayama et al., 2019; Russell et al., 2020).

Aunque actualmente existen enfoques terapéuticos interesantes que se centran en la actividad mitocondrial respaldados por ensayos clínicos que han arrojado resultados significativamente favorables, la propia naturaleza del mtDNA sigue siendo un desafío para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades mitocondriales. Por lo tanto, se han explorado estrategias de terapia génica para manipular el mtDNA, con el objetivo de eliminar las secuencias que portan las mutaciones relacionadas con patologías específicas (Gorman et al., 2016; Hong et al., 2023; Russell et al., 2020).

Sin embargo, también es crucial considerar estrategias terapéuticas que aborden los signos y síntomas específicos de los órganos afectados, ya que se requieren intervenciones especializadas para tratar problemas como la sordera, cardiopatías, diabetes, pérdida de la visión y deficiencias neuromusculares, comunes en pacientes con enfermedades mitocondriales. De esta manera, la intervención dirigida a órganos específicos se vuelve

esencial para el cuidado integral de los pacientes (Gorman et al., 2016; Ng & Turnbull, 2016).

3.3.1 Edición génica

Como se ha señalado, uno de los factores que influyen en el desarrollo de las enfermedades mitocondriales es el nivel de heteroplasmia, que debe superar un umbral bioquímico para manifestar un fenotipo clínico. Es por ello, que, como parte de las terapias dirigidas desarrolladas en los últimos años, se ha explorado la manipulación del propio mtDNA para atacar aquellas moléculas portadoras de mutaciones causantes de la enfermedad. Este enfoque resulta particularmente efectivo para tratar padecimientos asociados con mutaciones monogénicas (Di Donfrancesco et al., 2022).

Estas tecnologías aprovechan la degradación del mtDNA cuando se producen roturas de doble cadena, con el objetivo de aplicar este método a las secuencias mutantes para disminuir los niveles de heteroplasmia. Entre las técnicas que han demostrado resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo*, se encuentran las endonucleasas de restricción dirigidas a mitocondrias, las endonucleasas con dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras similares a los activadores de transcripción (TALENS)(Hirano et al., 2018).

En este ámbito, se ha observado que las técnicas más prometedoras son las ZFN y TALENS, especialmente al implementar un sistema dual ZFN/TALENS que permite que un sistema reconozca las secuencias de mtDNA silvestre adyacentes a la región mutada, mientras que otro sistema reconoce la mutación y las bases adyacentes. Esta "degradación selectiva" ha demostrado una reducción en las moléculas mutantes de mtDNA en modelos de ratones con heteroplasmia, y también ha sido eficaz en la disminución de la carga mutacional en ovocitos de otros mamíferos. Por lo tanto, podría considerarse como una alternativa prometedora para prevenir la transmisión materna de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el mtDNA (Gorman et al., 2016).

Justificación

Los trastornos mitocondriales como grupo de enfermedades causadas por mutaciones hereditarias o somáticas generan disfunción metabólica al afectar a la cadena respiratoria y por ende la producción de energía de la célula. Como consecuencia, la mayoría de los síntomas están asociados a órganos de alta demanda energética.

Sin embargo, dada la naturaleza y complejidad del mtDNA, estas enfermedades se caracterizan por tener una amplia variedad de fenotipos clínicos, lo que representa un desafío diagnóstico para identificar aquellas mutaciones que las causan y por ende dificulta establecer un enfoque terapéutico adecuado para los pacientes.

Gracias al avance tecnológico en pruebas moleculares, se han empleado diferentes métodos para estudiar las mutaciones en el mtDNA, principalmente RFLPs a partir de amplificadores de genes mediante la técnica de PCR. Sin embargo, aunque estas técnicas proporcionan información más directa que las pruebas bioquímicas convencionales, siguen teniendo deficiencias en cuanto a rendimiento y sensibilidad. Por lo tanto, se ha optado por las tecnologías de secuenciación con la finalidad de establecer un diagnóstico más integral y oportuno, que no solo ayuda al pronóstico de la enfermedad, sino también a establecer medidas terapéuticas específicas de la enfermedad.

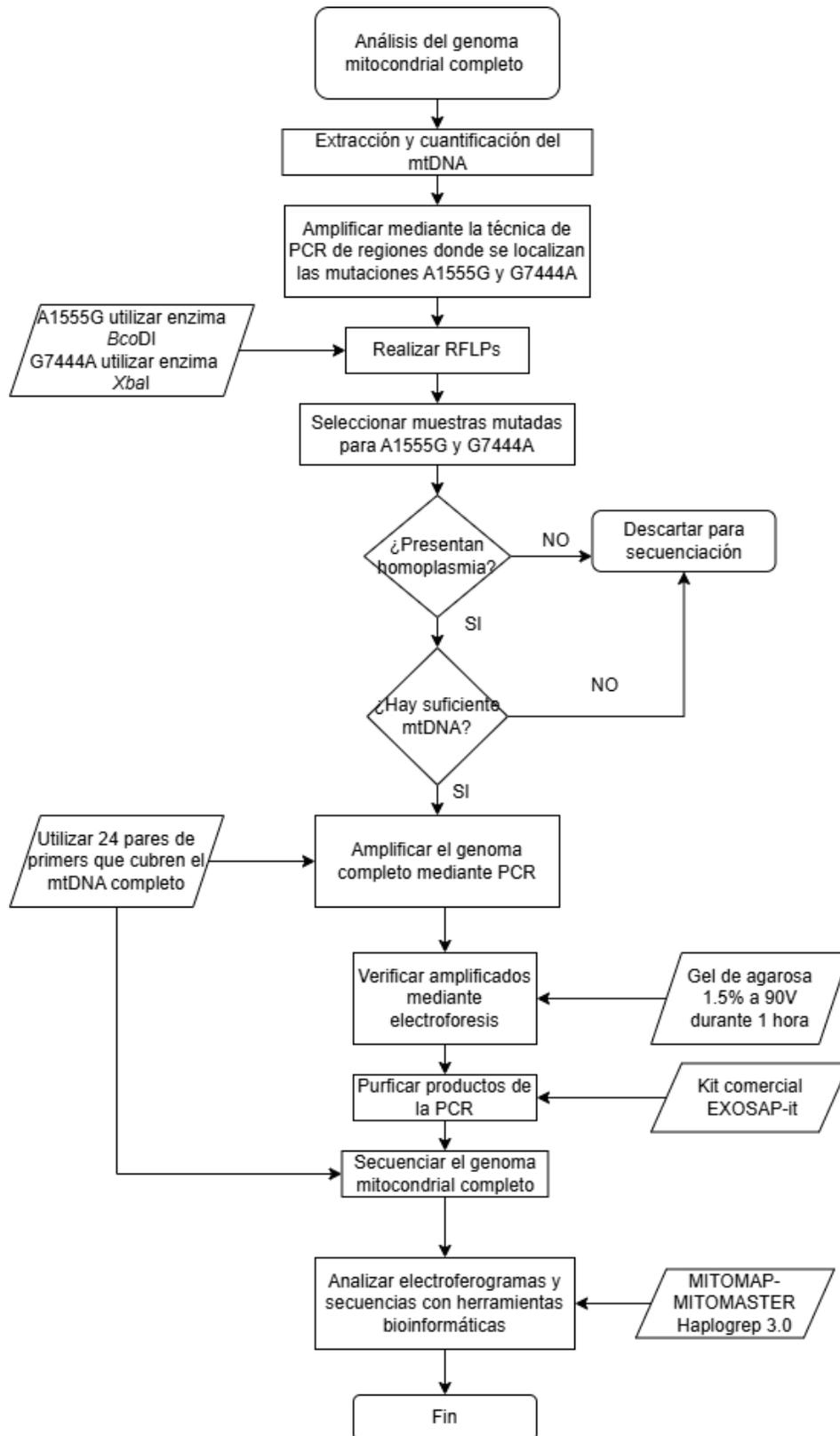
Objetivo general

Secuenciar el genoma mitocondrial completo en pacientes con presunta predisposición a desarrollar hipoacusia no sindrómica mediante la técnica Sanger con el fin de obtener un diagnóstico molecular más completo y preciso al evaluar otras variantes genéticas, así como confirmar mutaciones previamente caracterizadas.

Objetivos específicos

- Utilizar la técnica de PCR punto final para amplificar 24 fragmentos que integran el genoma mitocondrial completo y verificar cada uno de los productos amplificados mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa.
- Secuenciar los productos amplificados de mtDNA mediante la técnica Sanger para obtener la secuencia del genoma mitocondrial completo y realizar un análisis genético integral utilizando herramientas bioinformáticas.
- Confirmar el diagnóstico de las mutaciones A1555G y G7444A, caracterizadas por la técnica PCR-RFLP, mediante el análisis de la secuenciación del genoma mitocondrial completo.

Diagrama de flujo experimental



Materiales y Métodos

Población de estudio

Se utilizaron muestras provenientes de diferentes familias, sumando un total de 65 individuos con rango de edad de 6 a 79 años. A cada individuo (o a su tutor, en el caso de menores de edad) se le proporcionó una carta de consentimiento informado, así como un cuestionario donde se recabaron sus datos personales y posibles problemas de audición. El cuestionario se obtuvo por la guía clínica elaborada por el Ministerio de Salud de Chile (2013).

Criterios de selección

Las muestras seleccionadas ya habían sido sometidas a la extracción del mtDNA. Además, se evaluaron su concentración y pureza en el Nano-Drop ND-1000, así como la integridad del DNA mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

Estas etapas fueron llevadas a cabo por la Lic. en Bioquímica Diagnóstica Andrea Serrano Mares (2022) en el laboratorio L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.

- RFLP's

Se identificaron mutaciones puntuales asociadas a la hipoacusia no sindrómica mediante la técnica de RFLPs, específicamente A1555G y G7444A. La identificación de estas mutaciones fue llevada a cabo por mi compañera de licenciatura Fabiola Gómez, en el laboratorio 18 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria que se encuentra en la FES-Cuautitlán Campo 4.

Para ello, se realizó la amplificación de las regiones que contienen las mutaciones de interés mediante la técnica de PCR. Posteriormente, se sometieron a la restricción enzimática. Se utilizó la enzima *BcoDI* para analizar la mutación A1555G, donde las muestras con secuencias que no presentan la mutación generan fragmentos de 480 y 321 pb, mientras que las secuencias de las muestras con la mutación alteran el sitio donde la enzima realiza el corte, obteniendo solamente el amplificado de 801 pb.

Por otra parte, para la mutación G7444A se empleó la enzima *XbaI*, la cual produce de 581 y 188 pb en las secuencias sin mutación, mientras que, en las secuencias mutadas la enzima no realiza el corte, por lo que solamente se obtiene el amplificado de 749 pb.

Los productos de la restricción enzimática fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

Por consiguiente, de las muestras mutadas, se seleccionaron aquellas que presentaron una presunta homoplasmia al no generar fragmentos de restricción por la presencia del alelo mutado en la secuencia donde ocurre la restricción enzimática. Así mismo, se descartaron muestras que no tuvieran suficiente concentración para llevar a cabo la amplificación de

todo el genoma mitocondrial mediante la PCR. Para este estudio, los pacientes seleccionados presentan las siguientes características:

- a) Hombre de 52 años, sin comorbilidades relevantes con presunta homoplasmia para la mutación A1555G, caracterizada mediante la técnica RFLPs
- b) Mujer de 47 años con diagnóstico de hipertensión y presunta homoplasmia para la mutación G7444A, caracterizada mediante la técnica RFLPs

Amplificación del genoma mitocondrial completo

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar el genoma mitocondrial completo de las muestras seleccionadas, se utilizaron 24 pares de *primers* que amplifican fragmentos de 600-900 pb aproximadamente. Estos *primers* fueron diseñados por Rieder y colaboradores (1998), y fueron proporcionados por el laboratorio 18 de Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán Campo 4.

En la tabla 2 se detallan los reactivos y sus respectivos volúmenes para preparar la mezcla de reacción de 25 μ L de PCR de acuerdo con el kit de Promega GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix para cada uno de los 24 amplificadores.

Tabla 2. Preparación de mezcla de reacción de PCR para volumen de 25 μ L

Reactivo	Volumen
GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Kit)	12.5 μ L
Primer Forward	0.5 μ L
Primer Reverse	0.5 μ L
DNA	1.0 μ L
Agua libre de nucleasas	10.5 μ L

Además, se preparó un tubo blanco, donde se reemplazó DNA por agua libre de nucleasas. Los tubos se agitan y centrifugan durante algunos segundos con la finalidad de homogeneizar la solución. Las condiciones para la PCR fueron: precalentamiento a 95°C durante 2', seguido de una desnaturalización a 95°C durante 30", alineamiento a 60°C durante 45", elongación a 72°C durante 1' [35 ciclos] y finalmente la etapa de incubación a 72°C durante 5"; 4°C ∞ .

- **Electroforesis en gel de agarosa**

Para la visualización de los amplificadores de la PCR se requirió de la electroforesis en geles de agarosa, los cuales fueron preparados al 1.5%. El procedimiento para la preparación del gel y corrida del mismo fue el siguiente:

- a) Preparación gel de agarosa 1.5%

Se pesaron 0.75 g de agarosa y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Luego, se añadió 50 mL de buffer TAE 1X y se calentó la mezcla en horno de microondas hasta que se disolviera la agarosa por completo. Seguido de ello, se agregó una gota de bromuro de etidio (BrEt 0.5 µg/uL) y mezcló perfectamente. En el soporte del gel, una vez cerrados los extremos, se colocaron los peines adecuados. Después, se vertió la solución de agarosa en el soporte del gel, evitando la formación de burbujas. Una vez solidificado, se retiró el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis con la orientación correcta. Por último, se llenó la cámara con buffer TAE 1X, asegurándose de cubrir perfectamente el gel y los pocillos.

- b) Carga y corrida del gel.

En un trozo de papel Parafilm, se colocaron gotas de 3 µL de BrEt diluido (0.01 µg/uL), correspondiente al número de muestras, blanco y marcador de peso molecular. Así mismo, se añadieron gotas 3 uL del buffer de carga (Blue/Orange Loading Dye 6X) a un lado de las gotas de BrEt sin mezclarlas. Posteriormente, se añadieron 5 µL del producto de la PCR y se mezclaron perfectamente con los otros componentes. Seguidamente, se pipeteó la mezcla y se depositó en el pocillo correspondiente. Para el marcador de peso molecular (Cleaver Scientific 100bp DNA Ladder) se pipeteó 1.5 µL, se mezcló con 3 uL de BrEt y se depositó en el primer pocillo.

Una vez cargadas todas las muestras, blanco y marcador de peso molecular, se cerró la cámara de electroforesis y se conectó a la fuente de poder. Las condiciones para la corrida se ajustaron a 90 V durante 1 hora aproximadamente. Al finalizar la corrida, se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se visualizaron los amplificadores en un fotodocumentador.

Secuenciación Sanger

- a) Purificación de los productos de la PCR

Previo a la secuenciación, se purificaron los productos de la PCR con la finalidad de eliminar el exceso de nucleótidos no alineados y cebadores presentes en la mezcla de reacción. Para los 24 amplificadores de cada muestra, se utilizó el kit comercial ExoSap-IT para una purificación enzimática. Este reactivo requiere estar en hielo durante su uso.

Como primer paso, se mezcló 2 µL de ExoSap-IT con 5 µL de producto de la PCR. Después, se incubó a 37°C durante 15' y se realizó una segunda incubación a 80°C durante 15' con el fin de inactivar ExoSap-IT. Tras finalizar la incubación, el producto de la PCR está listo para usarse en secuenciación.

b) Secuenciación de los productos de la PCR

La secuenciación de los 24 productos de la PCR de cada muestra se realizó de acuerdo con el protocolo del kit BigDye Terminator v. 3.1 con modificaciones validadas por el Laboratorio de Secuenciación Genómica del Instituto de Biología UNAM, lugar donde se realizó el servicio de secuenciación.

Los *primers* que se seleccionaron para la secuenciación fueron los mismos que se utilizaron para los 24 amplificadores de la PCR. Además, cabe señalar que la secuenciación se realizó de manera bidireccional con la finalidad de disminuir errores al momento de realizar la lectura de secuencias.

Análisis bioinformático

Para poder observar los resultados de la secuenciación, se empleó el programa “Chromas”, que permite visualizar los electroferogramas que contienen la secuencia de nucleótidos de cada uno de los 24 fragmentos secuenciados para cada muestra y poder identificar las mutaciones de interés, así como posible heteroplasmia. Adicionalmente, permite extraer la secuencia en formato FASTA.

- Alineamiento de secuencias con bases de datos

Para identificar las mutaciones de cada genoma secuenciado, se comparó las secuencias en formato FASTA con secuencias de referencia que se encuentran disponibles en bases de datos. Para el caso particular de secuencias de mtDNA, la opción más adecuada es la base de datos de MITOMAP, la cual es un recurso muy importante para la identificación y análisis de variantes del mtDNA.

En el análisis de cada una de las secuencias, MITOMAP ofrece la herramienta MITOMASTER, que realiza alineamientos con la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (rCRS), la cual ha sido el estándar para reportar variantes en el mtDNA. Para hacer uso de esta herramienta, se accedió a través del sitio oficial de MITOMAP: <http://mitomaster.mitomap.org/>, donde en su página de inicio se encuentran disponibles cada una de las herramientas e información de esta base de datos.

Como se observa en la figura 6, en el protocolo básico para utilizar MITOMASTER, como primer paso se seleccionó la especie de la que se desea comparar la secuencia. Posteriormente se seleccionó el archivo que contiene la secuencia FASTA que se extrajo anteriormente. Una vez que el archivo FASTA está cargado, como tercer paso se envió para que la herramienta realizara el alineamiento y detectara las variantes genéticas que se encuentran en la secuencia (Lott et al., 2013).

Como resultado, MITOMASTER proporcionó las variantes encontradas, la calidad de estas, y aquellas que han sido reportadas en la literatura por su posible o directa asociación a algunos fenotipos clínicos. Del mismo modo, a través de esta herramienta se encontraron variantes asociadas a determinados haplogrupos, las cuales se calcularon por medio de la herramienta “Haplogrep 3.0”, la cual tiene enlace directo con MITOMAP. Así mismo, se

confirmó la calidad de las variantes y su asociación con determinado haplogrupo, accediendo directamente a su sitio oficial <http://haplogrep.uibk.ac.at/> (Lott et al., 2013; Schönherr et al., 2023).

Submit sequence as file upload or paste into text area

Step 1 [Select conservation species of interest](#)
Currently selected conservation species: all

Step 2
Option 1 **Fasta file** use this for sequences in a file of [fasta format](#). *Please note that each sequence may take over a second to process.*

Option 2 **Copy-paste** paste sequences in [fasta format](#).

1) Seleccionar la especie con la que se desea comparar la secuencia

2) Seleccionar el archivo que contiene la secuencia en formato FASTA que se desea analizar

3) Enviar el archivo para su análisis

Figura 6. Vista de la herramienta MITOMASTER para analizar secuencias. Modificada de <http://mitomaster.mitomap.org/>. 2023

Resultados

A partir de la restricción enzimática mediante la técnica de RFLPs, se obtuvo el genotipo correspondiente a cada mutación. Como se puede observar en las figuras 7 y 8, se seleccionaron la muestra 41, que presenta homoplasmia para A1555G al presentar únicamente el amplificado de 801 pb, y la muestra 18, que presenta homoplasmia para G7444A, donde solamente se visualiza el amplificado de 749 pb.

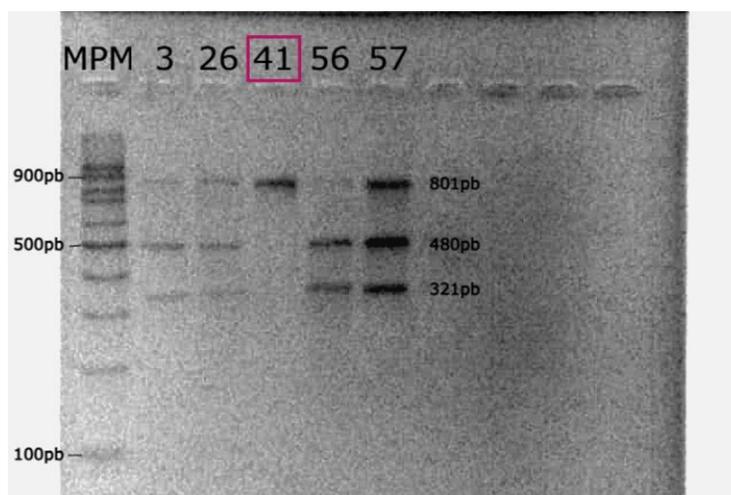


Figura 7. RFLPs realizados con la enzima *BcoDI* para identificar la mutación A1555G. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% a 90V; MPM: marcador de peso molecular; 3, 26, 56, 57: muestras mutadas heteroplásmicas; 41: muestra homoplásmica mutada. Nota: Adaptado de Gómez F. 2022.

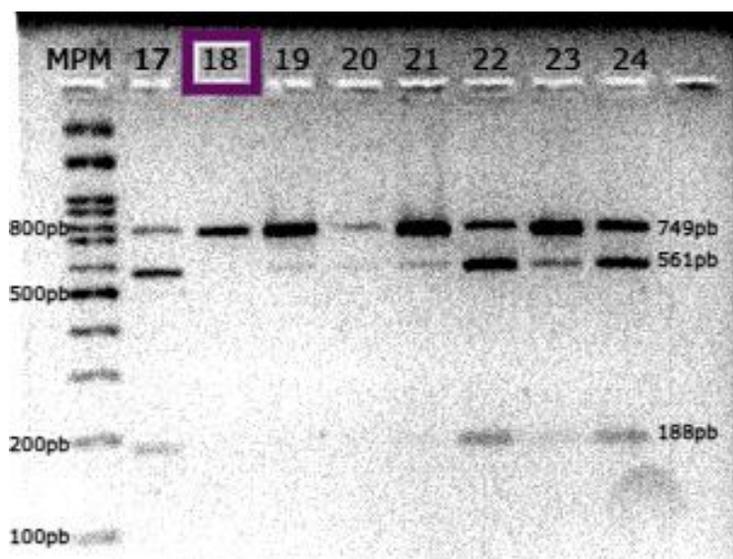


Figura 8. RFLPs realizados con la enzima *XbaI* para identificar la mutación G7444A. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% a 90V; MPM: marcador de peso molecular; 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24 muestras con heteroplasmia; 18: muestra con homoplasmia. Nota: Adaptado de Gómez F. 2022.

De las muestras seleccionadas con base en los resultados de los RFLPs, se amplificó el genoma mitocondrial completo. En las figuras 9-11 se muestran los productos de la PCR, donde se utilizaron 24 pares de *primers* que cubren el genoma mitocondrial. En este caso, se presenta la muestra 41, que se encontró homoplásmica para A1555G de acuerdo con los resultados de los RFLPs.

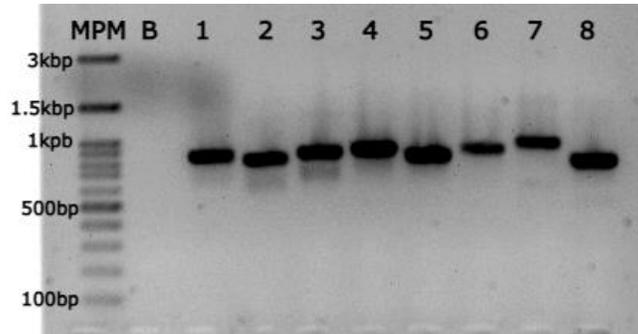


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 1-8 de la muestra 41 (A1555G). MPM: marcador de peso molecular. B: blanco.

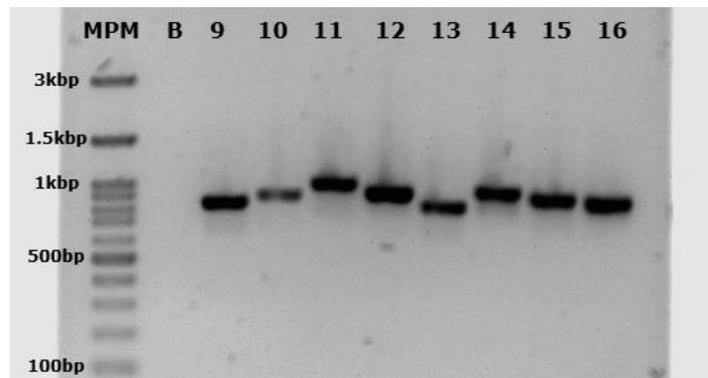


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 9-16 de la muestra 41 (A1555G) MPM: marcador de peso molecular. B: blanco.



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% Amplificados 17-24 de la muestra 41 (A1555G). MPM: marcador de peso molecular. B: blanco.

Del mismo modo, se amplificó el genoma mitocondrial de la muestra 18, la cual se encontró en homoplasmia para la mutación G7444A de acuerdo con los resultados de los RFLPs. En las figuras 12-14 se muestran las electroforesis de los productos de la PCR para esta muestra, donde se visualizan los 24 amplificados que cubren el genoma mitocondrial completo.

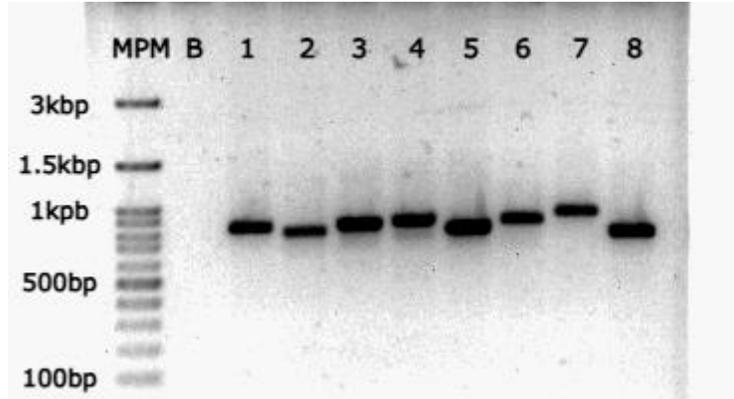


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 1-8 de la muestra 18 (G7444A). MPM: marcador de peso molecular. B: blanco.

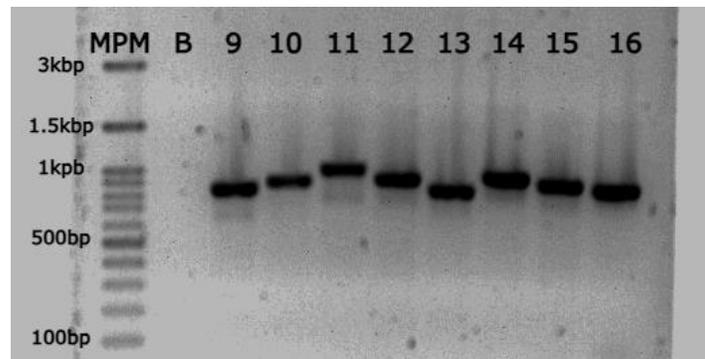


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 9-16 de la muestra 18 (G7444A). MPM: marcador de peso molecular. B: blanco.

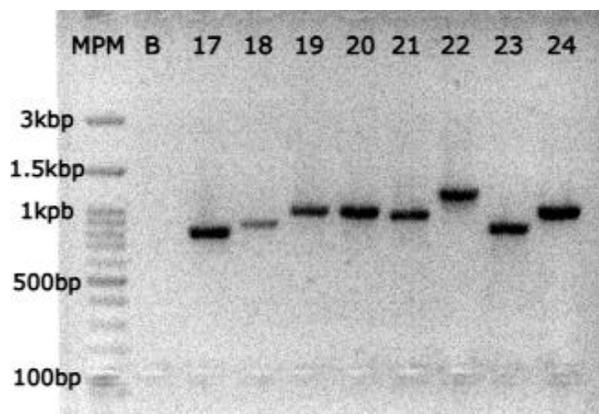


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificados 17-24 de la muestra 18 (G7444A). MPM: marcador de peso molecular. B: blanco.

Posteriormente, en las figuras 15 y 16 se muestran los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación Sanger de las regiones donde se localizan las mutaciones A1555G para la muestra 41 y G7444A para la muestra 18. En ambas secuencias se encontró el alelo silvestre en estado de homoplasmia, lo que indica la ausencia de estas mutaciones.

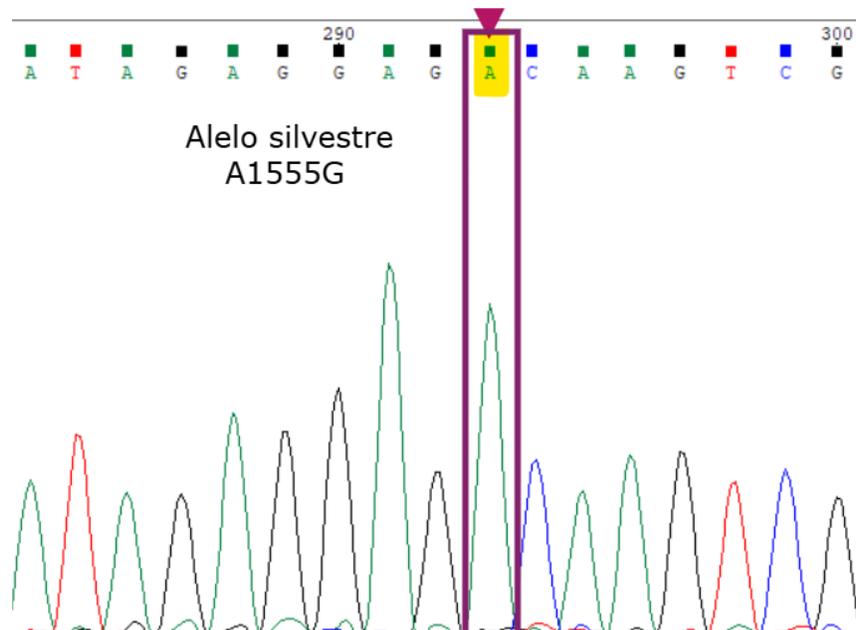


Figura 15. Electroferograma de la región donde se localiza A1555G en la muestra 41.

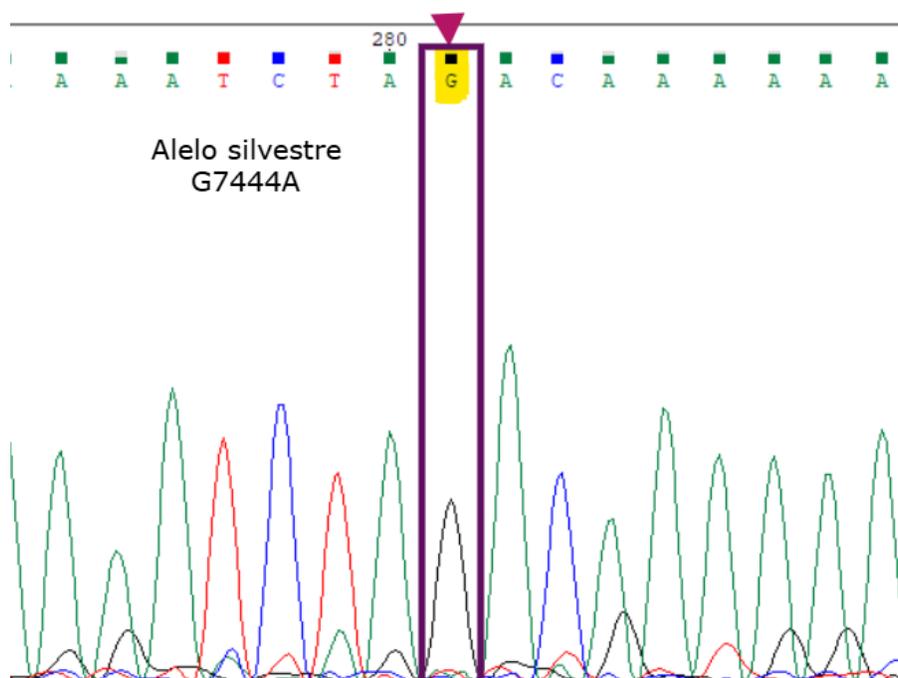


Figura 16. Electroferograma de la secuencia donde se localiza G7444A en la muestra 18.

Así mismo, en las tablas 3 y 4 se reportan las variantes encontradas a partir de los alineamientos de las secuencias en formato FASTA utilizando la herramienta MITOMASTER de la base de datos MITOMAP. Adicionalmente, se indica si existe un fenotipo asociado a cada variante y la predicción del haplogrupo según la herramienta haplogrep 3.0.

Tabla 3. Mutaciones identificadas en la muestra 41

Locus	Posición	Cambio de nucleótido	Haplogrupo asociado/ fenotipo clínico	Consecuencia molecular/Cambio de aminoácido
<i>MT-DLOOP2</i>	195	T-C	Haplogrupo M1 Melanoma Trastorno bipolar	Región control (no codificante)
	263	A-G	Haplogrupo M1	
	310	T-C	Haplogrupo M1 Posible factor de protección contra el glaucoma de tensión arterial	
	489	T-C	Haplogrupo M1	
<i>MT-RNR1</i>	750	A-G	Haplogrupo H2a	12S rRNA (sin alteración)
	1438	A-G	Haplogrupo H	
<i>MT-RNR2</i>	2092	C-T	Haplogrupo D1	16S rRNA (sin alteración)
	2706	A-G	Haplogrupo J1	
	3010	G-A	Haplogrupo J1 Síndrome de Vómitos Cíclicos (VGS)	
	3190	C-T	Haplogrupo H2a	
<i>MT-ND2</i>	4769	A-G	Haplogrupo D1g4	Mutación sinónima
	4823	T-C	Haplogrupo D1g4	
	4883	C-T	Haplogrupo D1g4 Glaucoma	
	5178	C-A	Haplogrupo D1g4 Longevidad mejorada Protección en Diabetes, infarto al miocardio y aterosclerosis.	L237M
<i>MT-CO1</i>	6170	C-T	Haplogrupo L0	Mutación sinónima
	7028	C-T	Haplogrupo HV	
<i>MT-ATP8</i>	8414	C-T	Haplogrupo D1m Riesgo de Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) Policitemia de alta altitud (HAPC) Longevidad	L17F
<i>MT-ATP8/MT-ATP6</i>	8548	T-C	Haplogrupo D1m	S8P
<i>MT-ATP6</i>	8701	A-G	Haplogrupo D1m	T59A
	8860	A-G	Haplogrupo H1a	T112A
<i>MT-CO3</i>	9540	T-C	Haplogrupo L3	Mutación sinónima
<i>MT-ND3</i>	10398	A-G	Haplogrupo D1m Longevidad Riesgo de cáncer de mama TDAH Síndrome metabólico Alteración del pH celular.	T114A

	10400	C-T	Haplogrupo D1m	Mutación sinónima
<i>MT-ND4L</i>	10754	A-G	Haplogrupo D1m	
<i>MT-DN4</i>	10873	T-C	Haplogrupo D1m	
	11465	T-C	Haplogrupo B5a	
	11719	G-A	Haplogrupo B5a	
<i>MT-ND5</i>	12705	C-T	Haplogrupo N	
<i>MT-ND6</i>	14668	C-T	Haplogrupo Z2 Trastorno depresivo asociado	
<i>MT-CYB</i>	14766	C-T	Haplogrupo Z2	T7I
	14783	T-C	Haplogrupo Z2 Posible asociación con el mal de altura o mal de montaña	Mutación sinónima
	15043	G-A	Haplogrupo M Trastorno depresivo mayor Esquizofrenia Trastorno Bipolar	
	15301	G-A	Haplogrupo M Posible factor del mal de altura o de montaña	
	15326	A-G	Haplogrupo M	T194A
<i>MT-DLOOP1</i>	16223	C-T	Haplogrupo D1m	Región control (no codificante)
	16316	A-G	Haplogrupo D1m	
	16325	T-C	Haplogrupo D1m	
	16362	T-C	Haplogrupo D1m	

Nota: Los cambios de nucleótidos y posición de la mutación se obtienen de acuerdo con la secuencia de referencia de Cambridge (rCRS) que utiliza la herramienta MITOMASTER para realizar los alineamientos, además de proporcionar la predicción del haplogrupo. Los haplogrupos asociados se confirmaron con la herramienta "Haplogrep 3.0" (<https://haplogrep.i-med.ac.at/>).

Variantes reportadas por MITOMAP con posible asociación a enfermedad (<http://www.mitomap.org>, 2023)

Tabla 4. Mutaciones identificadas en la muestra 18

Locus	Posición	Cambio de nucleótido	Haplogrupo asociado/ fenotipo clínico	Consecuencia molecular/Cambio de aminoácido
<i>MT-DLOOP2</i>	73	A-G	Haplogrupo C	Región control (no codificante)
	263	A-G	Haplogrupo M1	
	310	T-C	Haplogrupo M1 Posible factor de protección contra el glaucoma de tensión arterial	
	489	T-C	Haplogrupo M1	
<i>MT-RNR1</i>	750	A-G	Haplogrupo H2a	12S rRNA (sin alteración)
	1438	A-G	Haplogrupo H	
<i>MT-RNR2</i>	2706	A-G	Haplogrupo HV	16S rRNA (sin alteración)
<i>MT-ND1</i>	3552	T-C	Haplogrupo C Hipertensión matrilineal Resistencia al edema pulmonar de gran altitud (HAPE) Marcador hGC	Mutación sinónima
<i>MT-ND2</i>	4715	A-G	Haplogrupo F1f	Mutación sinónima
	4769	A-G	Haplogrupo F1f	
<i>MT-CO1</i>	7028	C-T	Haplogrupo M8	
	7196	C-A	Haplogrupo M8	
<i>MT-ATP6</i>	8584	G-A	Haplogrupo M8	A20T
	8701	A-G	Haplogrupo M8	T59A
	8860	A-G	Haplogrupo H1aw	T112A
<i>MT-CO3</i>	9540	T-C	Haplogrupo C	Mutación sinónima
	9545	A-G	Haplogrupo C	
<i>MT-ND3</i>	10398	A-G	Longevidad Riesgo de cáncer de mama TDAH Síndrome metabólico Alteración del pH celular.	T114A
	10400	C-T	Haplogrupo D1m	Mutación sinónima
<i>MT-ND4</i>	10873	T-C	Haplogrupo L3	Mutación sinónima
	11719	G-A	Haplogrupo T1a	
	11914	G-A	Haplogrupo T1a Posible susceptibilidad a penfigoide ampolloso	
	12705	C-T	Haplogrupo N	
<i>MT-ND5</i>	12717	C-T	----	Mutación sinónima
	13263	A-G	Haplogrupo W3a	
	14318	T-C	Haplogrupo C	
<i>MT-CYB</i>	14766	C-T	Haplogrupo C	TI7
	14783	T-C	Haplogrupo C Posible asociación con el mal de altura	Mutación sinónima
	15043	G-A	Haplogrupo M8 Asociado al Trastorno Depresivo Mayor Posible factor en el mal de altura o de montaña.	

	15301	G-A	Haplogrupo M8 Posible factor en el mal de altura o de montaña LHON	
	15326	A-G	Haplogrupo M8	T194A
	15487	A-T	Haplogrupo M8	Mutación sinónima
<i>MT-DLOOP1</i>	16051	A-G	Haplogrupo Cb1 Posible susceptibilidad a penfigoide ampoloso	Región control (no codificante)
	16223	C-T	Haplogrupo Cb1	
	16298	T-C	Haplogrupo Cb1 Factor protector para el riesgo de accidente cerebrovascular (hg V)	
	16325	T-C	Haplogrupo Cb1	
	16327	C-T	Haplogrupo Cb1	

Nota: Los cambios de nucleótidos y posición de la mutación se obtienen de acuerdo con la secuencia de referencia de Cambridge (rCRS) que utiliza la herramienta MITOMASTER para realizar los alineamientos, además de proporcionar la predicción del haplogrupo. Los haplogrupos asociados se confirmaron con la herramienta "Haplogrep 3.0" (<https://haplogrep.i-med.ac.at/>).

Variantes reportadas por MITOMAP con posible asociación a enfermedad (<http://www.mitomap.org>, 2023)

Discusión

Las enfermedades mitocondriales representan un grupo heterogéneo de trastornos que afectan principalmente al metabolismo celular, causando disfunción en tejidos y órganos que dependen de una alta demanda energética. Muchos de estos trastornos son causados por mutaciones en el mtDNA que pueden ser heredadas a través de la vía materna o presentarse en células somáticas que con el tiempo pueden acumularse causando fenotipos de importancia clínica (Rossmann et al., 2021).

Sin embargo, se deben de tener varias consideraciones para comprender las enfermedades mitocondriales, ya que, por su propia heterogeneidad, suelen presentarse a diferentes edades, además de tener signos y síntomas variables. Como primer punto debemos recordar que, a diferencia del DNA nuclear, hay múltiples copias de mtDNA por cada mitocondria, además de que hay más de una mitocondria por cada célula. Posteriormente, es importante considerar que este mtDNA se hereda exclusivamente por vía materna, por lo que las mutaciones van a tener este patrón de herencia y finalmente el fenómeno de homoplasmia y heteroplasmia, donde la expresión clínica va a depender del nivel de heteroplasmia que presente una mutación, es decir, la proporción que existe entre el mtDNA mutante y el de tipo silvestre. Además, se debe de tener en cuenta cómo la segregación replicativa y los cuellos de botella genéticos van a alterar los niveles de heteroplasmia en el mtDNA. Cada una de estas características que son propias del mtDNA representa un desafío diagnóstico, que puede prolongarse durante mucho tiempo o incluso llegar a diagnósticos contradictorios (Davis et al., 2018; Ng & Turnbull, 2016; Schlieben & Prokisch, 2020).

Es por ello que el diagnóstico genético juega un papel muy importante en la detección de mutaciones asociadas a enfermedades mitocondriales al identificar su etiología molecular. Por otro lado, a pesar de que existen diferentes métodos para identificar mutaciones en el mtDNA, por la propia naturaleza de este, no todas las técnicas van a mostrar resultados con la misma fidelidad. Las tecnologías de secuenciación son el método estándar y confiable para caracterizar y analizar mutaciones en el mtDNA, además de que la secuenciación de genoma completo permite realizar un diagnóstico más integral, rápido y de mayor rendimiento (Klopstock et al., 2021; Ng & Turnbull, 2016; Wong et al., 2010).

En las figuras 7 y 8 se visualizan los geles de agarosa al 2.5% donde se realizó la electroforesis de los RFLPs para caracterizar las mutaciones A1555G y G7444A, asociadas con hipoacusia no sindrómica por consumo de aminoglucósidos. Se seleccionaron las muestras mutadas que presentaban homoplasmia: la muestra 41 para la mutación A1555G y la muestra 18 para la mutación G7444A, ya que estas mutaciones suelen identificarse en pacientes con homoplasmia o altos niveles de heteroplasmia, superando el umbral bioquímico y manifestando síntomas de pérdida auditiva (Liu et al., 2015; Wang et al., 2019).

Sin embargo, al comparar con los electroferogramas de la secuenciación Sanger (figuras 15 y 16), los resultados difieren completamente. De acuerdo con los RFLPs, ambas mutaciones en sus respectivas muestras mostraron aparente homoplasmia al no presentar cortes en la secuencia de acuerdo con las enzimas de restricción utilizadas. Por otro lado, en los electroferogramas se observa homoplasmia del alelo silvestre, es decir, el alelo A para A1555G y el alelo G para G7444A. Por lo tanto, los resultados de la secuenciación indican que ambos pacientes no presentan estas variantes asociadas a la pérdida auditiva. Aunado a ello, la intensidad de los picos en los electroferogramas en ambas posiciones no muestra ningún nivel de heteroplasmia que sugiera la presencia del alelo mutante para A1555G y G7444A. Del mismo modo, esto se corroboró al realizar los alineamientos de cada uno de los amplificadores secuenciados en la base de datos MITOMAP (Tabla 3 y Tabla 4), donde no se encontró la presencia de estas mutaciones en sus respectivos genes.

Este contraste de resultados, donde los RFLPs caracterizaron las mutaciones A1555G y G7444A, mientras que la secuenciación descartó su presencia, puede asociarse con la sensibilidad y eficiencia que ofrece cada una de estas técnicas, así como con los sesgos y errores potenciales en el análisis de secuencias de mtDNA. Cabe señalar que ambos métodos se basan en la técnica de PCR para amplificar regiones específicas de interés. En el caso de los RFLPs, estas regiones amplificadas son posteriormente analizadas para caracterizar las mutaciones, mientras que en la secuenciación se amplificaron 24 fragmentos superpuestos que cubren todo el genoma mitocondrial.

Aunque existen diferencias entre la secuenciación y los RFLPs, se debe considerar que la posible heteroplasmia en las copias de mtDNA puede generar sesgos durante la amplificación por PCR. La variación en la proporción de variantes puede alterar la amplificación, favoreciendo ciertos alelos (Legati et al., 2021; Li et al., 2010; Mavraki et al., 2023; Naini et al., 2020). Además, la técnica de RFLPs ofrece una baja sensibilidad para la detección de mutaciones mitocondriales, principalmente debido al efecto de la heteroplasmia. Adicionalmente, puede ocurrir la pérdida o creación de un sitio de restricción, que a menudo, puede causar problemas durante la digestión enzimática (Calabrese et al., 2020).

Así mismo, se debe de tener en cuenta que la baja sensibilidad y el alto límite de detección de los RFLPs dificultan la identificación de los niveles de heteroplasmia en una mutación mitocondrial. Por lo tanto, es recomendable utilizar la secuenciación Sanger para detectar variantes de importancia médica cuando los métodos basados en enzimas de restricción o tecnologías como la PCR cuantitativa (qPCR) no son capaces de caracterizarlas adecuadamente (Mahmud et al., 2022).

Por consiguiente, dada la complejidad del fenotipo de las enfermedades mitocondriales, es recomendable incluir la secuenciación completa del genoma mitocondrial en los algoritmos diagnósticos. Esto proporciona información más precisa en comparación con pruebas que se basan únicamente en la medición de marcadores bioquímicos. En este contexto, la secuenciación Sanger seguida de PCR ha sido y sigue siendo el estándar para la identificación de mutaciones patógenas (Duan et al., 2018).

Sin embargo, aunque la secuenciación Sanger es un método tradicional ampliamente utilizado para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales, actualmente se prefiere la secuenciación de próxima generación (NGS). Esto se debe a que la NGS ofrece mejores resultados en términos de sensibilidad y límites de detección, especialmente para identificar niveles de heteroplasmia (Legati et al., 2021; Mahmud et al., 2022; Mavraki et al., 2023). A pesar de sus propias limitaciones, la secuenciación del genoma mitocondrial completo mediante la técnica Sanger sigue siendo útil para localizar mutaciones patógenas, como A1555G y G7444A, y para analizar otras variantes de riesgo que pueden influir en el fenotipo clínico o estar asociadas a otras enfermedades (Legati et al., 2021; Mahmud et al., 2022).

Para ello, del mismo modo que se hizo uso de la herramienta MITOMAP para corroborar la presencia de las variantes A1555G y G7444A en las muestras analizadas, se realizaron alineamientos de cada uno de los fragmentos del genoma mitocondrial para identificar mutaciones que estuvieran relacionadas con la hipoacusia no sindrómica además de las anteriormente mencionadas. Sin embargo, no se encontraron mutaciones reportadas asociadas a este fenotipo en ninguna de las muestras, incluso en el gen *MT-RNR1*, donde se esperaría encontrar mutaciones asociadas a esta afección por el consumo de aminoglucósidos, ya que este gen es un punto crítico para otras variantes reportadas, como C1494T, T1095C y A827G (Ibrahim et al., 2018).

Adicionalmente, en las tablas 3 y 4 se evidencia la identificación de variantes asociadas a determinados haplogrupos, utilizando la herramienta MITOMASTER de MITOMAP y confirmadas con la herramienta haplogrep 3.0. Los haplogrupos mitocondriales pueden desempeñar un papel crucial en el fenotipo de ciertas enfermedades, aunque esta información debe manejarse con cuidado debido a que puede ser muy variable. En el caso de la hipoacusia no sindrómica, diversos estudios han encontrado una mayor frecuencia de la mutación A1555G en determinados haplogrupos (Gao et al., 2017). En genealogías españolas, portadores de la mutación A1555G pertenecían principalmente a los haplogrupos D y H (del Castillo, 2003). Por otra parte, otro estudio realizado en pacientes coreanos con las mutaciones A1555G y G7444A, el haplogrupo D fue el más prevalente, seguido del haplogrupo M. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos análisis son estudios de asociación longitudinales a gran escala y no deben tomarse como definitivos, además de que se han realizado en pacientes portadores de las mutaciones en cuestión, a diferencia de nuestro trabajo, donde no se encontraron dichas mutaciones, lo

que impide asumir que los pacientes tengan un riesgo potencial de desarrollar pérdida auditiva por pertenecer a determinado haplogrupo (Joo et al., 2023).

Por otro lado, en el análisis del genoma mitocondrial completo de ambas muestras, se encontraron otras mutaciones asociadas a diferentes fenotipos, algunos de importancia clínica. Aunque no es el principal objetivo de este trabajo estudiarlas a fondo, es importante mencionarlas. En la Tabla 3, que presentan las variantes mitocondriales analizadas en la muestra 41; destaca la mutación T195C, asociada al haplogrupo M y relacionada con el melanoma, encontrándose con mayor frecuencia en pacientes caucásicos con esta patología (Young et al., 2019). También podemos destacar la mutación A10398G, la cual está asociada con riesgo de desarrollar cáncer de mama, además de encontrarse en pacientes con TDAH y síndrome de Leigh. Esta mutación también está presente en la muestra 18 (Tabla 4)(Jahani et al., 2020; Jiang et al., 2014).

Adicionalmente, se encontraron mutaciones como G3010A, que está asociada con el síndrome de vómitos cíclicos (CVS)(Ye, Z. et al., 2018), y otras variantes que, por el contrario, se han relacionado como factores de protección contra ciertos padecimientos e incluso con la longevidad, como es el caso de C5178A (Wu et al., 2021).

De igual manera, en la muestra 18, de acuerdo con la tabla 4, se identificaron algunas variantes también presentes en la muestra 41, como la mutación A10398G y otras mutaciones asociadas a trastornos depresivos y bipolares. Adicional a ello, destaca la presencia de las variantes G11914A y A16041G, las cuales han sido asociadas a susceptibilidad de desarrollar penfigoide ampuloso, una enfermedad autoinmune caracterizada por el desarrollo poco común de ampollas cutáneas (Russlies et al., 2019).

Es importante señalar que cada una de las variantes encontradas en ambas muestras, aunque están relacionadas con ciertos trastornos y patologías, no son la causa directa de las mismas. Por lo tanto, se debe hacer énfasis en que los fenotipos clínicos reportados son multifactoriales, además de que dichas mutaciones se asocian a los mismos debido a que se han encontrado en pacientes que los padecen, de acuerdo con la base de datos de MITOMAP (<http://www.mitomap.org>, 2023).

Sin embargo, sería prudente sugerir a cada paciente un seguimiento médico especializado para evaluar su estado de salud. Por lo tanto, para la muestra 41, es recomendable monitorear la posible aparición de vómitos intensos y estereotipados, signos asociados a CVS (Ye et al., 2018). Del mismo modo, identificar signos de riesgo a desarrollar melanoma y tomar medidas de prevención, principalmente evitando exposición prolongada a la luz solar, ayudaría a tener un mejor pronóstico y tratamiento adecuado para este paciente.

En cuanto a la muestra 18, donde se detectaron variantes asociadas a trastornos depresivos y bipolares, así como el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el penfigoide ampuloso, se sugiere un seguimiento clínico que valore signos de riesgo, principalmente aquellos que dan indicio de desarrollo a penfigoide ampuloso como lo son: aparición de ampollas tensas, lesiones cutáneas y piel inflamada (Kremer et al., 2019).

Adicionalmente, considerando que la variante A10398G fue identificada en ambas muestras, al estar reportada en pacientes con cáncer de mama, es recomendable identificar signos de riesgo para una detección temprana, principalmente en la muestra 18 que corresponde a un paciente del sexo femenino. Considerando que esta y otras mutaciones

no son la causa directa de la enfermedad, para el caso de A10398G, a pesar de ser una variante común, se ha reportado que incrementa la producción ROS, además de reportar una asociación significativa de desarrollar este tipo de cáncer en mujeres afroamericanas. Sin embargo, la asociación de esta variante con el cáncer de mama aún carece de solidez, por lo que se necesitan realizar más estudios en otras poblaciones (Jahani et al., 2020).

Finalmente, es necesario resaltar la importancia de este análisis integral del genoma mitocondrial en ambos pacientes. Las tecnologías de secuenciación, como parte de las pruebas genéticas, no solo confirman o descartan diagnósticos, como en este caso, sino que también ayudan a establecer directrices para el pronóstico y el enfoque terapéutico en las enfermedades mitocondriales. Además, contribuyen al consejo familiar para prevenir el riesgo de desarrollar ciertas patologías relacionadas con mutaciones de herencia matrilineal.

Conclusiones

- Se amplificó el genoma mitocondrial completo en ambos pacientes mediante la técnica de PCR, permitiendo la secuenciación de cada producto amplificado.
- La secuenciación a través de la técnica Sanger, descartó la presencia de las mutaciones A1555G y G7444A en ambas muestras, previamente caracterizadas mediante la técnica de RFLPs.
- El análisis bioinformático realizado a través de las herramientas MITOMAP y Haplogrep 3.0, permitió identificar variantes genéticas relevantes, haplogrupos asociados y descartar la presencia de otras mutaciones relacionadas con la hipoacusia no sindrómica.
- La secuenciación del genoma mitocondrial completo proporcionó un diagnóstico más completo y detallado en comparación con la técnica de RFLPs, siendo fundamental para un pronóstico y enfoque terapéutico adecuado.

Perspectivas

Aunque se han innovado las técnicas y métodos para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales, aún queda mucho trabajo por explorar, especialmente en nuestro país donde son pocos los laboratorios e instituciones que se encargan de diagnosticar e investigar mutaciones asociadas a estas patologías. En el contexto de la hipoacusia, síndromes y enfermedades neurodegenerativas a las que se han asociado mutaciones en el mtDNA, es vital avanzar en estas áreas.

Es por ello que este trabajo, a pesar de sus limitaciones al enfocarse en un tamaño pequeño de pacientes, proporciona una base importante para destacar la necesidad en el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales. Además, al implementar tecnologías avanzadas como la secuenciación Sanger y NGS al ofrecer una cobertura del genoma mitocondrial completo, debería implementarse en estudios a gran escala, con el fin de obtener una mejoría en la representatividad de los resultados.

Adicionalmente, al integrar todos estos factores, no solo facilitan un diagnóstico oportuno y preciso, sino que también son la pauta para un asesoramiento genético adecuado para las familias afectadas y el desarrollo de enfoques terapéuticos personalizados.

Por lo tanto, se espera que este trabajo contribuya a un mejor manejo y entendimiento de las enfermedades mitocondriales, tanto en el ámbito clínico como científico.

Referencias

1. Aguilar, M. (2016). *Biología molecular y citogenética*. Editorial Síntesis .
2. Aldossary, A. M., Tawfik, E. A., Alomary, M. N., Alsudir, S. A., Alfahad, A. J., Alshehri, A. A., Almughem, F. A., Mohammed, R. Y., & Alzaydi, M. M. (2022). Recent advances in mitochondrial diseases: From molecular insights to therapeutic perspectives. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(8), 1065–1078. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.05.011>
3. Bernardino Gomes, T. M., Ng, Y. S., Pickett, S. J., Turnbull, D. M., & Vincent, A. E. (2021). Mitochondrial DNA disorders: from pathogenic variants to preventing transmission. *Human Molecular Genetics*, 30(R2), R245–R253. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab156>
4. Bradley Schaefer, G., & Thompson Jr., J. N. (2016). *Genética médica: un enfoque integrado*. McGraw-Hill Interamericana. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbps/detail.action?docID=4626310>
5. Calabrese, C., Gomez-Duran, A., Reyes, A., & Attimonelli, M. (2020). Methods for the identification of mitochondrial DNA variants. In *The Human Mitochondrial Genome* (pp. 243–275). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819656-4.00011-5>
6. Chen, L., Zhou, M., Li, H., Liu, D., Liao, P., Zong, Y., Zhang, C., Zou, W., & Gao, J. (2023). Mitochondrial heterogeneity in diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 311. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01546-w>
7. Chinnery, P. F., & Gomez-Duran, A. (2018). Oldies but Goldies mtDNA Population Variants and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00682>
8. Cohn, R., Stephen Scherer, & Ada Hamosh (Eds.). (2023). *Thompson y Thompson. Genética y genómica en medicina*. Elsevier Health Sciences.
9. Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., & Massarini, A. (2021). *Biología en contexto social* (Editorial Médica Panamericana, Ed.; 8a edición).
10. Davis, R. L., Liang, C., & Sue, C. M. (2018). *Mitochondrial diseases* (pp. 125–141). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00010-5>
11. de Dios, T. L. (2013). *Tecnología en salud* (Vol. 2). www.medigraphic.org.mx<http://www.medigraphic.com/rid>www.medigraphic.org.mx
12. del Castillo, F. J. (2003). Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *Journal of Medical Genetics*, 40(8), 632–636. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.8.632>
13. Di Donfrancesco, A., Massaro, G., Di Meo, I., Tiranti, V., Bottani, E., & Brunetti, D. (2022). Gene Therapy for Mitochondrial Diseases: Current Status and Future Perspective. *Pharmaceutics*, 14(6), 1287. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061287>
14. DiMauro, S., & Emmanuele, V. (2020). Mitochondrial disorders due to mutations in the mitochondrial genome. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease* (pp. 401–413). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813955-4.00027-1>

15. Ding, Y., Lang, J., Zhang, J., Xu, J., Lin, X., Lou, X., Zheng, H., & Huai, L. (2020). Screening for deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutations by using a multiplex allele-specific PCR method. *Bioscience Reports*, *40*(5). <https://doi.org/10.1042/BSR20200778>
16. Duan, M., Tu, J., & Lu, Z. (2018). Recent Advances in Detecting Mitochondrial DNA Heteroplasmic Variations. *Molecules*, *23*(2), 323. <https://doi.org/10.3390/molecules23020323>
17. Fernández, D. (2019). *Biología* (Segunda). Pearson.
18. Finsterer, J. (2023). Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa Syndrome. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease*, *24*(3), 140–146. <https://doi.org/10.1097/CND.0000000000000422>
19. Fu, X., Wan, P., Li, P., Wang, J., Guo, S., Zhang, Y., An, Y., Ye, C., Liu, Z., Gao, J., Yang, J., Fan, J., & Chai, R. (2021). Mechanism and Prevention of Ototoxicity Induced by Aminoglycosides. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.692762>
20. Gao, Z., Chen, Y., & Guan, M.-X. (2017). Mitochondrial DNA mutations associated with aminoglycoside induced ototoxicity. *Journal of Otology*, *12*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.joto.2017.02.001>
21. Gonçalves, V. F. (2019). *Mitochondrial Genetics* (pp. 247–255). https://doi.org/10.1007/978-981-13-8367-0_13
22. Goodman Steven R. (2021). Chapter 5 - Mitochondria and Diseases. In S. R. Goodman (Ed.), *Goodman's Medical Cell Biology (Fourth Edition)* (Fourth Edition, pp. 139–156). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817927-7.00005-3>
23. Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*(1), 16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
24. Gray, M. W. (2018). Mitochondrial Genome ☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65365-5>
25. Greaves, L. C., Reeve, A. K., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2012). Mitochondrial DNA and disease. *The Journal of Pathology*, *226*(2), 274–286. <https://doi.org/10.1002/path.3028>
26. Habbane, M., Montoya, J., Rhouda, T., Sbaoui, Y., Radallah, D., & Emperador, S. (2021). Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. *Biomedicines*, *9*(10), 1364. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101364>
27. Hernández, C. L. (2023). Mitochondrial DNA in Human Diversity and Health: From the Golden Age to the Omics Era. *Genes*, *14*(8). <https://doi.org/10.3390/genes14081534>
28. Hirano, M., Emmanuele, V., & Quinzii, C. M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays in Biochemistry*, *62*(3), 467–481. <https://doi.org/10.1042/EBC20170114>
29. Hong, S., Kim, S., Kim, K., & Lee, H. (2023). Clinical Approaches for Mitochondrial Diseases. *Cells*, *12*(20), 2494. <https://doi.org/10.3390/cells12202494>
30. Horvath, R., & Chinnery, P. F. (2019). Diagnostic Approach to Mitochondrial Diseases. In M. Mancuso & T. Klopstock (Eds.), *Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders* (pp. 281–287). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05517-2_17
31. Ibrahim, I., Dominguez-Valentin, M., Segal, B., Zeitouni, A., & da Silva, S. D. (2018). Mitochondrial mutations associated with hearing and balance disorders. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *810*, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2018.03.003>
32. Jahani, M. M., Azimi Meibody, A., Karimi, T., Banoei, M. M., & Houshmand, M. (2020). An A10398G mitochondrial DNA alteration is related to increased risk of breast cancer, and associates with Her2 positive receptor. *Mitochondrial DNA Part A*, *31*(1), 11–16. <https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1695788>
33. Jankovic J, Mazziotta J, Pomeroy S, & Newman N. (2022). *Bradley y Daroff. Neurología clínica* (Elsevier Health Sciences, Ed.; 8va ed.).
34. Jiang, H., Zhao, H., Xu, H., Hu, L., Wang, W., Wei, Y., Wang, Y., Peng, X., & Zhou, F. (2014). Peripheral blood mitochondrial A10398G polymorphism, and risk of

- breast cancer in a Han Chinese population. *Cancer Science*, 105(6), 639–645. <https://doi.org/10.1111/cas.12412>
35. Joo, S. Y., Jang, S. H., Kim, J. A., Kim, S. J., Kim, B., Kim, H.-Y., Choi, J. Y., Gee, H. Y., & Jung, J. (2023). Prevalence and Clinical Characteristics of Mitochondrial DNA Mutations in Korean Patients With Sensorineural Hearing Loss. *Journal of Korean Medical Science*, 38(48). <https://doi.org/10.3346/jkms.2023.38.e355>
 36. Jorde Lynn, Carey John C., & Bamshad Michael J. (2016). *Genética Médica* (Elsevier, Ed.; 5ta ed.).
 37. Karki, G. (2017). *Sanger's method of gene sequencing*. Genetics, Molecular Biology. <https://www.onlinebiologynotes.com/sangers-method-gene-sequencing/>
 38. Karp, G. (2018). *Biología celular y molecular*.
 39. Kim, J., Hemachandran, S., Cheng, A. G., & Ricci, A. J. (2022). Identifying targets to prevent aminoglycoside ototoxicity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 120, 103722. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103722>
 40. Klopstock, T., Priglinger, C., Yilmaz, A., Kornblum, C., Distelmaier, F., & Prokisch, H. (2021). Mitochondrial disorders. *Deutsches Ärzteblatt International*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0251>
 41. Korchivaia, E., Silaeva, Y., Mazunin, I., & Volodyaev, I. (2023). The mitochondrial challenge: Disorders and prevention strategies. *Biosystems*, 223, 104819. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2022.104819>
 42. Kremer, N., Snast, I., Cohen, E. S., Hodak, E., Mimouni, D., Lapidoth, M., Mazor, S., & Levi, A. (2019). Rituximab and Omalizumab for the Treatment of Bullous Pemphigoid: A Systematic Review of the Literature. *American Journal of Clinical Dermatology*, 20(2), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0401-6>
 43. Legati, A., Zanetti, N., Nasca, A., Peron, C., Lamperti, C., Lamantea, E., & Ghezzi, D. (2021). Current and New Next-Generation Sequencing Approaches to Study Mitochondrial DNA. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(6), 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.03.002>
 44. Li, M., Schönberg, A., Schaefer, M., Schroeder, R., Nasidze, I., & Stoneking, M. (2010). Detecting Heteroplasmy from High-Throughput Sequencing of Complete Human Mitochondrial DNA Genomes. *The American Journal of Human Genetics*, 87(2), 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.014>
 45. Liu, Q., Liu, P., Ding, Y., DONG, X.-J., WANG, Z.-X., QIAN, Y.-E., WANG, Q., & YANG, G.-C. (2015). Mitochondrial COI/tRNASer(UCN) G7444A mutation may be associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing impairment. *Molecular Medicine Reports*, 12(6), 8176–8178. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4484>
 46. Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Xie, H. M., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., & Wallace, D. C. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics*, 44(123), 1.23.1-26. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0123s44>
 47. Ludwig-Słomczyńska, A. H., & Rehm, M. (2022). Mitochondrial genome variations, mitochondrial-nuclear compatibility, and their association with metabolic diseases. *Obesity*, 30(6), 1156–1169. <https://doi.org/10.1002/oby.23424>
 48. Mahmud, S., Biswas, S., Afrose, S., Mita, M., Hasan, Md., Shimu, Mst., Paul, G., Chung, S., Saleh, Md., Alshehri, S., Ghoneim, M., Alruwaily, M., & Kim, B. (2022). Use of Next-Generation Sequencing for Identifying Mitochondrial Disorders. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(3), 1127–1148. <https://doi.org/10.3390/cimb44030074>
 49. Martín, J. L., García, C. V., & García-Baquero, E. R. (2023). Hipoacusia. *FMC - Formación Médica Continuada En Atención Primaria*, 30(2), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.fmc.2022.09.007>
 50. Mavraki, E., Labrum, R., Sergeant, K., Alston, C. L., Woodward, C., Smith, C., Knowles, C. V. Y., Patel, Y., Hodsdon, P., Baines, J. P., Blakely, E. L., Polke, J., Taylor, R. W., & Ffatter, C. (2023). Genetic testing for mitochondrial disease: the United Kingdom best practice guidelines.

European Journal of Human Genetics, 31(2), 148–163. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01249-w>

51. McCormick, E. M., Muraresku, C. C., & Falk, M. J. (2018). Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Current Genetic Medicine Reports*, 6(2), 52–61. <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0137-x>
52. MedlinePlus. (2019, May 1). *Hipoacusia*. Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.).
53. Muraresku, C. C., McCormick, E. M., & Falk, M. J. (2018). Mitochondrial Disease: Advances in Clinical Diagnosis, Management, Therapeutic Development, and Preventative Strategies. *Current Genetic Medicine Reports*, 6(2), 62–72. <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0138-9>
54. Murayama, K., Shimura, M., Liu, Z., Okazaki, Y., & Ohtake, A. (2019). Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *Journal of Human Genetics*, 64(2), 113–125. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0528-6>
55. Naini, A., Gilkerson, R., Shanske, S., & Pang, J. (2020). *Detection of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations* (pp. 383–400). <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.009>
56. Ng, Y. S., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial disease: genetics and management. *Journal of Neurology*, 263(1), 179–191. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7884-3>
57. Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, 37, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
58. Parakatselaki, M.-E., & Ladoukakis, E. D. (2021). mtDNA Heteroplasmy: Origin, Detection, Significance, and Evolutionary Consequences. *Life*, 11(7), 633. <https://doi.org/10.3390/life11070633>
59. Parikh, S., Goldstein, A., Koenig, M. K., Scaglia, F., Enns, G. M., Saneto, R., Anselm, I., Cohen, B. H., Falk, M. J., Greene, C., Gropman, A. L., Haas, R., Hirano, M., Morgan, P., Sims, K., Tarnopolsky, M., Van Hove, J. L. K., Wolfe, L., & DiMauro, S. (2015). Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in Medicine*, 17(9), 689–701. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.177>
60. Pierce, B. (2015). *Genética: un enfoque conceptual* (Quinta). Editorial Médica Panamericana .
61. Pierce, B. A. (2023). *Fundamentos de genética*. Editorial medica panamericana.
62. Pilar, M., Valdivia, B., & Villarreal, D. (2014). *Biología general: los sistemas vivientes* (Primera). Grupo Editorial Patria.
63. Rivetti, S., Romano, A., Mastrangelo, S., Attinà, G., Maurizi, P., & Ruggiero, A. (2023). Aminoglycosides-Related Ototoxicity: Mechanisms, Risk Factors, and Prevention in Pediatric Patients. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1353. <https://doi.org/10.3390/ph16101353>
64. Rossmann, M. P., Dubois, S. M., Agarwal, S., & Zon, L. I. (2021). Mitochondrial function in development and disease. *Disease Models & Mechanisms*, 14(6). <https://doi.org/10.1242/dmm.048912>
65. Rouzier, C., Chaussonot, A., Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem Saadi, S., Fragaki, K., & Paquis-Flucklinger, V. (2022). Enfermedades mitocondriales. *EMC - Pediatría*, 57(2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(22\)46497-3](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(22)46497-3)
66. Russell, O. M., Gorman, G. S., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. (2020). Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell*, 181(1), 168–188. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.051>
67. Russlies, J., Fähnrich, A., Witte, M., Yin, J., Benoit, S., Gläser, R., Günter, C., Eming, R., Erdmann, J., Gola, D., Gupta, Y., Holtsche, M. M., Kern, J. S., König, I. R., Kiritsi, D., Lieb, W., Sadik, C. D., Sárdy, M., Schauer, F., ... Hirose, M. (2019). Polymorphisms in the Mitochondrial Genome Are Associated With Bullous Pemphigoid in Germans. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02200>
68. Ryzhkova, A., Sazonova, M., Sinyov, V., Galitsyna, E., Chicheva, M., Melnichenko, A., Grechko, A., Postnov, A., Orekhov, A., & Shkurat, T. (2018). Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations: a mini-review. *Therapeutics and Clinical Risk Management, Volume 14*, 1933–1942. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S154863>

69. Schlieben, L. D., & Prokisch, H. (2020). The Dimensions of Primary Mitochondrial Disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.600079>
70. Schönherr, S., Weissensteiner, H., Kronenberg, F., & Forer, L. (2023). Haplogrep 3 - an interactive haplogroup classification and analysis platform. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W263–W268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad284>
71. Sharma, P., & Sampath, H. (2019). Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells*, 8(2), 100. <https://doi.org/10.3390/cells8020100>
72. Shen, C.-H. (2019). *Diagnostic molecular biology*. Academic Press.
73. Skorecki, K. L., & Cohen, B. H. (2022). DNA mitochondrial: Rasgos hereditarios y enfermedades relacionadas. In J. Loscalzo, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, D. Longo, & J. L. Jameson (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna*, 21e. McGraw-Hill Education. accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1193168535
74. Solari, A., & Roubicek, M. (2011). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina* (Cuarta). Editorial Médica Panamericana.
75. Starr, C., Taggart, R., Starr, L., & Ortega, T. A. (2018). *Biología: La unidad y diversidad de la vida*.
76. Stenton, S. L., & Prokisch, H. (2020). Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*, 56, 102784. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102784>
77. Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16(9), 530–542. <https://doi.org/10.1038/nrg3966>
78. Tetsuka, S., Ogawa, T., Hashimoto, R., & Kato, H. (2021). Clinical features, pathogenesis, and management of stroke-like episodes due to MELAS. *Metabolic Brain Disease*, 36(8), 2181–2193. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00772-x>
79. van der Blik, A. M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2017). Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics*, 207(3), 843–871. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300262>
80. Wang, L., Wang, X., Cai, X., & Qiang, R. (2019). Study of mitochondrial DNA A1555G and C1494T mutations in a large cohort of women individuals. *Mitochondrial DNA Part A*, 30(2), 222–225. <https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1475477>
81. Wei, W., & Chinnery, P. F. (2020). Inheritance of mitochondrial DNA in humans: implications for rare and common diseases. *Journal of Internal Medicine*, 287(6), 634–644. <https://doi.org/10.1111/joim.13047>
82. Wong, L.-J. C., Scaglia, F., Graham, B. H., & Craigen, W. J. (2010). Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.02.024>
83. Wu, Y., Wang, X.-H., Li, X.-H., Song, L.-Y., Yu, S.-L., Fang, Z.-C., Liu, Y.-Q., Yuan, L.-Y., Peng, C.-Y., Zhang, S.-Y., Cheng, W., Ma, H.-C., Wang, L.-F., Tang, J.-M., Wang, Y.-F., & Ji, F.-Y. (2021). Common mtDNA variations at C5178a and A249d/T6392C/G10310A decrease the risk of severe COVID-19 in a Han Chinese population from Central China. *Military Medical Research*, 8(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00351-2>
84. Ye, Z., Xue, A., Huang, Y., & Wu, Q. (2018). Children with cyclic vomiting syndrome: phenotypes, disease burden and mitochondrial DNA analysis. *BMC Gastroenterology*, 18(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0836-5>
85. Yoshimi, A., Ishikawa, K., Niemeyer, C., & Grünert, S. C. (2022). Pearson syndrome: a multisystem mitochondrial disease with bone marrow failure. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 379. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02538-9>
86. Young, M. J., Jayaprakash, A. D., & Young, C. K. J. (2019). Analysis of Mitochondrial DNA Polymorphisms in the Human Cell Lines HepaRG and SJCRH30. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133245>
87. Zeviani, M., & Carelli, V. (2021). Mitochondrial Retinopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 210. <https://doi.org/10.3390/ijms23010210>

88. Zhang, H., Burr, S. P., & Chinnery, P. F. (2018). The mitochondrial DNA genetic bottleneck: inheritance and beyond. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 225–234. <https://doi.org/10.1042/EBC20170096>
89. Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z.-B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
90. Zhu, Z., & Wang, X. (2017). *Significance of Mitochondria DNA Mutations in Diseases* (pp. 219–230). https://doi.org/10.1007/978-981-10-6674-0_15

Anexos

Cuestionario y carta de consentimiento informado

Estado de México, a 24 de noviembre de 2019

Asunto: Consentimiento informado para la donación de epitelio bucal como parte de un estudio genético.

PARTICIPANTE VOLUNTARIO.

Yo: _____ autorizo voluntariamente mi participación dentro del estudio genético, que implica la toma de muestra de células epiteliales de la mucosa bucal y la proporción de datos clínicos personales, así como el uso de la información derivada del procesamiento de estos datos. Se recibió la información pertinente de la técnica de extracción de la muestra, además de la finalidad de dicho procedimiento y su uso exclusivo con fines de investigación, de acuerdo a la Ley General de Protección de Datos Personales y las normas internacionales de los datos genéticos humanos, garantizando así la privacidad de mis datos.

Edad: _____ Sexo M F Ocupación: _____
 Embarazo Sí No Hijos: Sí No ¿Cuántos? _____
 ¿Padece alguna enfermedad? Sí No ¿Cuál? _____
 ¿Realiza algún deporte? Sí No ¿Cuál? _____ Horas a la semana que lo practica _____
 ¿Consume algún medicamento? Sí No ¿Cuál? _____
 No _____
 Peso: _____ Altura: _____ IMC (Índice de Masa Corporal): _____
 Presión arterial: _____

Favor de responder el siguiente cuestionario, lea las instrucciones y cada pregunta con cuidado antes de responder.

	Sí (4)	Algunas veces (2)	No (0)
¿Alguna vez se ha sentido avergonzado al conocer personas, debido a problemas para oír?			
¿Los problemas para oír le hacen sentir frustrado al hablar con miembros de su familia?			
¿Tiene dificultad para oír cuando alguien le habla en voz baja?			
¿Alguna vez ha tenido limitaciones debido a problemas para oír?			
¿Los problemas para oír le han causado dificultades al visitar amigos, parientes o vecinos?			
¿Los problemas para oír han hecho que vaya menos seguido de lo que le gustaría a actos sociales o servicios religiosos?			
¿Los problemas para oír han causado discusiones con miembros de su familia?			
¿Los problemas para oír le causan dificultad para entender los programas de televisión o radio?			
¿Cree que su problema para oír limita su vida personal o social?			
¿Un problema para oír le causa dificultad cuando va con amigos o parientes a un restaurante?			

Total de puntos:

Estudio del material genético

Objetivo general: Extraer material genético a partir de muestra bucal mediante técnicas moleculares para realizar la caracterización de esta y relacionarlo con diversas patologías de origen genético.

Procedimientos de estudio: Se requiere la toma de una muestra de epitelio bucal mediante la técnica de enjuague con solución de sacarosa 3%

Al realizar la toma de muestra puede presentarse el siguiente inconveniente:

- Irritación de la mucosa después del procedimiento. Fuera de eso, no representa ningún riesgo para su salud o su integridad.

Las muestras obtenidas serán analizadas en el laboratorio de Citogenética por estudiantes de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicada en el Estado de México.

Si usted está de acuerdo, la parte de la muestra no utilizada en el estudio se almacenará en un biobanco. Un biobanco consiste en el almacenamiento de las muestras en condiciones adecuadas de temperaturas para realizar otros estudios en el futuro, relacionados con características genéticas que pudieran estar asociadas con diabetes, hipertensión, hipoacusia, depresión.

El biobanco en el que se conservarán sus muestras estará ubicado en la misma facultad; las muestras serán etiquetadas con un número de folio y no con su nombre, para asegurar la confidencialidad de sus datos personales y se conservarán en el biobanco indefinidamente y posteriormente serán destruidas cuando ya no se requieran.

Beneficios: No hay un beneficio directo para usted por proporcionar estas muestras ni por la información genética que se genere, pero estos datos ayudarán al estudio del material genético y su relación con diversas patologías.

Participación Voluntaria/ Retiro del estudio: Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de decidir qué muestras son las que está de acuerdo en proporcionar o de negarse a participar o de retirar su participación en el estudio en el momento en que desee. Podrá solicitar también que se retiren sus muestras del estudio sin que ello implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al investigador/a responsable del estudio Maestra en Ciencias Maritere Domínguez Rojas al correo electrónico maritere.dominguez@cuautitlan.unam.mx

Por favor marque cada uno de los recuadros de abajo para indicar su decisión

Mis muestras/información genética puede ser utilizada solo para este estudio

Mis muestras/información genética puede ser utilizada para este estudio y para investigación futura

Mis muestras pueden ser almacenadas en un banco de muestras/ biobanco, por el tiempo mencionado en este documento

Si usted entiende la información que se le ha dado en este formato, está de acuerdo en participar en este estudio de manera total o parcial y también está de acuerdo en permitir que su información de salud sea usada como se describió antes, entonces le pedimos que indique su consentimiento para participar en este estudio.

Firma del participante o tutor

Firma testigo 1

Firma testigo 2