

# **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES DEL ADN MITOCONDRIAL: SÍNDROME DE MELAS Y SÍNDROME DE LEIGH.**

**Marta Jiménez Vidal**

**Trabajo de Fin de Grado 6º Grado de Medicina**

**Director: Julio Montoya Villarroya**

**Codirectora: Sonia Emperador Ortiz**

## **ÍNDICE:**

<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1. Mitocondria y ADN mitocondrial	5
2. Enfermedades asociadas al ADNmt	7
3. Síndrome de Leigh: clínica y etiología genética	8
4. Síndrome de MELAS: clínica y etiología genética	10
<b>2. Material y métodos</b>	<b>10</b>
1. Material	
2.1.1. Casos clínicos y tipos de muestras.	10
2.1.2. Material de laboratorio: aparatos y reactivos	18
2. Métodos	20
2.2.1. Recepción de muestras.	20
2.2.2. Extracción de ADN	20
- Sangre	
- Orina	
- Músculo	
- Mucosa bucal	
2.2.3. Cuantificación de ácidos nucleicos (ADN)	22
2.2.4. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR	23
2.2.5. Detección de mutaciones por PCR-RFLP	25
2.2.6. Separación electroforética de ácidos nucleicos en geles horizontales de azarosa	26
2.2.7. Secuenciación automática del mtADN	27
<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>29</b>
1. Estudio de pacientes con fenotipo asociado a síndrome de Leigh	29
2. Estudio de pacientes con fenotipo asociado a síndrome de MELAS	31
3. Screening de otras mutaciones	32
<b>4. Conclusiones</b>	<b>33</b>
<b>5. Bibliografía</b>	<b>35</b>

## **Resumen**

El ADN mitocondrial tiene unas características propias y su localización en un orgánulo citoplasmático implica que la herencia de este genoma difiera de la del ADN nuclear en el modo de herencia, la poliplasmia, la segregación mitótica, la expresión umbral y la alta tasa de mutación. Las enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt tienen como característica común el estar producidas por una deficiente síntesis de ATP. Las mitocondrias son componentes fundamentales de todos los tejidos y órganos, por lo que estas enfermedades serán, en general, multisistémicas y darán lugar a amplio espectro de fenotipos. El síndrome de Leigh o encefalomiopatía mitocondrial necrotizante infantil subaguda es una enfermedad neurodegenerativa, genéticamente heterogénea causada por mutaciones tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial, por lo que puede presentar diversos tipos de herencia. El síndrome de MELAS es uno de los síndromes mitocondriales multisistémicos mejor definidos desde el punto de vista clínico. Los criterios invariables son episodios de accidentes cerebrovasculares antes de los 40 años, encefalopatía caracterizada por crisis epilépticas focales o generalizadas, acidosis láctica y/o fibras rojo rasgadas, además de dos de los siguientes síntomas: baja estatura, demencia, cefaleas recurrentes y vómitos. El objetivo de este estudio es el análisis genético-molecular del ADNmt de varios pacientes con síndrome de Leigh y síndrome de MELAS. Asimismo, se ha realizado la búsqueda de mutaciones en familiares relacionados por la vía materna. En este estudio se ha realizado el análisis genético mitocondrial de 22 personas, 20 pacientes y 2 familiares, principalmente por las técnicas de RFLP-PCR de los cuales se han obtenido 9 positivos.

*Palabras clave: Enfermedades mitocondriales. ADN mitocondrial. Síndrome de Leigh. Mutación T8993G. Mutación T9176C. Síndrome de MELAS. Mutación A3243G*

## **Summary**

Mitochondrial DNA has its own characteristics and its location in a cytoplasmic organelle implies that this genome differs from nuclear DNA in the mode of

inheritance, the polyplasmia, mitotic segregation, the threshold expression and high mutation rate . The diseases caused by mutations in mtDNA common feature being produced by deficient synthesis of ATP. Mitochondria are essential components of all tissues and organs, so that these diseases will generally multisistémics and lead to broad spectrum of phenotypes. Leigh syndrome or subacute necrotizing mitochondrial encephalomyopathy child is a genetically heterogeneous neurodegenerative disease, caused by mutations in both nuclear and mitochondrial genome, which can present different types of inheritance. MELAS syndrome is one of the best defined from the clinical standpoint multisystem mitochondrial syndromes. Invariable criteria are episodes of stroke before age 40, encephalopathy characterized by focal or generalized seizures, lactic acidosis and / or ragged red fibers, plus two of the following symptoms: short stature, dementia, recurrent headaches and vomiting. The objective of this study is the molecular genetic analysis of patients with mtDNA several Leigh syndrome and MELAS syndrome. It has also made the search for mutations in families related by the mother. This study was conducted mitochondrial genetic analysis of 22 people, 20 patients and 2 family, mainly by RFLP-PCR techniques which have been obtained 9 positive.

*Key words: Mitochondrial diseases. Mitochondrial DNA. Leigh syndrome. T8993G mutation. T9176C mutation. MELAS syndrome. A3243G mutation.*

## **1. Introducción:**

### **1.1. La mitocondria y el ADN mitocondrial**

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos implicados en la obtención de energía. Estructuralmente, la mitocondria tiene cuatro compartimentos diferenciados: membrana externa, membrana interna, espacio intermembranoso y la matriz mitocondrial. En este orgánulo tienen lugar múltiples funciones importantes para la célula como la oxidación de piruvato, el ciclo de Krebs, el metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y esteroides, entre otras. Otra de las funciones fundamentales de la mitocondria es la generación de energía en forma de adenosin trifosfato (ATP) mediante el sistema de fosforilación oxidativa.

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), localizado en la membrana interna mitocondrial, está compuesto por cinco complejos multienzimáticos y dos moléculas que actúan a modo de lanzadera (Coenzima Q10 y Citocromo c). Otro proceso importante en el que interviene la cadena respiratoria es la síntesis de novo de pirimidinas.

La mitocondria es el único orgánulo de la célula animal, además del núcleo, que contiene su propio ADN (llamado ADN mitocondrial, ADNmt) y su propia maquinaria de síntesis de ARN y proteínas. Este genoma, a pesar de tener un número muy reducido de genes, es muy importante, ya que codifica 13 proteínas integrantes de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa, así como parte de la maquinaria necesaria para la expresión de estas proteínas (2 rARNs y 22 tARNs). El resto de proteínas presentes en la mitocondria (aproximadamente 1500 productos génicos) son codificados por el ADN nuclear e importados al interior de la mitocondria desde el citoplasma. De hecho, la biogénesis mitocondrial es mayoritariamente dependiente de genes nucleares, tanto es así que las mitocondrias de las células sin mtADN (células Rho), deficientes en actividad respiratoria, obtenidas de forma artificial) son capaces de proliferar y segregarse a la descendencia [1].

Las células humanas contienen de 25 a 100000 mitocondrias por célula dependiendo de la demanda energética de los diferentes tejidos; y cada mitocondria contiene desde 1 hasta 25 moléculas de ADNmt [2].

El ADNmt humano es una molécula de doble hebra, circular, cerrada y superenrollada de 16.569 pares de bases (pb) [3]. Las dos cadenas que componen el ADNmt se denominan hebra H (o pesada) y hebra L (o ligera). La cadena H contiene los genes que codifican 2 rARNs, 14 tARNs y 12 polipéptidos, mientras que en la cadena ligera (L) se encuentran los genes que codifican 8 tARNs y 1 proteína (ND6), sumando entre ambas cadenas un total de 37 genes. De estos, 24 genes son necesarios para la traducción del ADNmt (2 ARN ribosómicos y 22 ARN de transcripción) y 13 codifican subunidades del sistema OXPHOS, siete subunidades del complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), una subunidad del complejo III (citocromo b), tres subunidades del complejo IV (COI, COII y COIII), y dos subunidades del complejo V o ATP sintasa (ATP6 y ATP8).

El ADNmt se caracteriza por presentar una organización genética extremadamente compacta. Los genes se disponen uno tras otro en la cadena pesada, sin tramos no codificantes intermedios. Sin embargo, el elemento más significativo de la compactación en el ADNmt es que ningún gen mitocondrial posee intrones. En el ADNmt humano, además, existe solapamiento entre genes contiguos como es el caso de las subunidades 6 y 8 de la ATPasa y los genes ND4 y ND4L (que presentan solapamientos de 46 y 7 nucleótidos, respectivamente). La mayor parte de genes codificantes de proteínas no tienen codón de terminación. Estos presentan una T ó TA justo después del último codón con sentido y estas bases preceden al extremo 5' del gen adyacente. El codón de terminación para la traducción se forma por poliadenilación del extremo 3' del mARN. La única zona del ADNmt que no codifica algún gen es un pequeño fragmento que corresponde al 7 % de la molécula, la región de control, localizado en torno al origen de replicación de la cadena H. Aún sin ser una región codificante, en ella se encuentran los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión del ADN, por lo que a esta zona se le conoce como región de control (CR). Otra característica distintiva de la

organización genética mitocondrial es que los genes de los tARNs se sitúan separando los genes de los rARN y los genes codificantes de proteínas. Esta disposición es muy importante para el procesamiento del ARN.

## 1.2. Enfermedades asociadas al ADN mitocondrial.

El concepto de enfermedad mitocondrial fue introducido en 1962, cuando un grupo de investigadores de la Universidad Karolinska en Estocolmo, describía a una joven sueca con severo hipermetabolismo sin disfunción tiroidea [4]. Este ejemplo de investigación clínica se basó en tres grupos de datos:

- i. Evidencias morfológicas de mitocondrias anormales en músculo.
- ii. Datos bioquímicos de desacoplamiento de la oxidación y fosforilación en mitocondrias musculares.
- iii. Buena correlación entre los defectos bioquímicos y los síntomas clínicos.

La localización del sistema genético mitocondrial en un orgánulo citoplasmático implica que la herencia de este genoma difiera de la del ADN nuclear:

a. *Modo de herencia*: el ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna. Esto se debe al elevado número de copias de ADNmt que contienen los óvulos y a que las mitocondrias del espermatozoide se eliminan en los primeros estadios de división celular.

b. *Poliplasmia*: el número de moléculas de ADNmt es, en general, muy elevado y varía entre unas pocas en las plaquetas a unas 100.000 copias en el oocito. La mayor parte de los tejidos contienen entre unas 1.000 y unas 10.000 copias por célula. En un principio, todas las células de un individuo normal tienen el mismo tipo de ADNmt (homoplasma). Sin embargo, debido a la alta tasa de mutación del ADNmt es probable que aparezca una mutación y que puedan coexistir dos poblaciones de ADNmt, una normal y otra mutada (heteroplasma).

c. *Segregación mitótica*: cuando existe una heteroplasma, las moléculas de ADNmt segregan al azar entre las células hijas, durante la división celular, pudiendo dar lugar a tres posibles genotipos: homoplásmicos normal y mutante

y heteroplásmico con porcentajes variables de ADNmt mutado. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje y naturaleza del ADN mutado que contenga.

*d. Expresión umbral:* mientras un tejido tenga un porcentaje de copias de ADNmt normal, este podrá funcionar perfectamente al producir la cantidad necesaria de ATP para su funcionamiento. Sin embargo, cuando el número de copias de ADNmt mutado sobrepase un nivel determinado, diferente para cada tejido, la producción de ATP se verá disminuida y, por debajo de un nivel umbral, aparecerán las manifestaciones de la enfermedad.

*e. Alta tasa de mutación:* el ADNmt es muy vulnerable y presenta una tasa de mutación espontánea 10-20 veces superior a la del ADNn. Este hecho puede ser consecuencia de la alta producción de radicales de oxígeno que se originan constantemente en la mitocondria y que dañan a un ADN con información genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y en el que los mecanismos de reparación parecen ser insuficientes. [5]

Las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt tienen como característica común el estar producidas por una deficiente síntesis de ATP. De este modo, dentro de las enfermedades debidas a defectos en el metabolismo mitocondrial, son enfermedades originadas concretamente por defectos que afectan a los componentes de los complejos multienzimáticos I, III, IV y/o V.

Las mitocondrias son componentes fundamentales de todos los tejidos y órganos, por lo que estas enfermedades serán, en general, multisistémicas y darán lugar a amplio espectro de fenotipos. En algunos casos, los síntomas de la enfermedad podrán encuadrarse en síndromes bien definidos, sin embargo, otras veces presentan solapamiento de síntomas, o, como sucede en los niños, estos no quedan muy claramente definidos por no haberse desarrollado del todo. Asimismo, en algunos casos, las enfermedades mitocondriales pueden afectar solamente a un tejido específico como el nervio óptico en la neuropatía óptica hereditaria de Leber o a las células cocleares en un tipo de sordera mitocondrial. [6]



### 1.3. Síndrome de Leigh

El síndrome de Leigh o encefalomiopatía mitocondrial necrotizante infantil subaguda es una enfermedad neurodegenerativa, genéticamente heterogénea causada por mutaciones tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial, por lo que puede presentar diversos tipos de herencia. Lo anterior lleva a defectos en las vías metabólicas, así como en el sistema de fosforilación oxidativa y origina una deficiencia en la producción de adenosín trifosfato (ATP). [7] Esta deficiencia tiene manifestaciones diversas y afecta a varios órganos; se presenta con síntomas como: ataxia, atrofia óptica, retardo en el desarrollo motor e intelectual, crisis convulsivas, hipotonía, debilidad, letargia, vómitos, oftalmoplejía externa, pérdida de visión, lesiones características en los ganglios basales y anomalías respiratorias, entre otras. El síndrome de Leigh con herencia materna (MILS) se ha asociado a una mutación T8993G en el gen del ADNmt, la cual codifica la subunidad 6 de la ATP sintetasa, que sustituye una leucina por una arginina en el codón 156. Este cambio de aminoácido puede dañar la producción del ATP mediante la alteración de la carga eléctrica del canal del complejo de la ATP sintetasa. Además, esta mutación se ha asociado al síndrome de NARP.[8] En general, la enfermedad se manifiesta como NARP cuando el porcentaje de moléculas de ANDmt mutadas en el paciente varía entre un 60 y 90% y como síndrome de Leigh si este porcentaje supera el 95%. Estudios familiares muestran que esta mutación segrega rápidamente hacia la homoplasmia dentro del mismo árbol genealógico. Formas menos graves del síndrome de Leigh se han asociado con un cambio T a C en la misma posición del ADNmt (T8993C). [9]

Asimismo se han encontrado mutaciones en la posición T9176C y menos frecuentemente en otras posiciones. En el año 2000 se describieron tres pacientes con síndrome de Leigh, con una deficiencia en el complejo I de la cadena respiratoria que presentaba una mutación (G14459A) la cual se había descrito anteriormente asociada a la neuropatía óptica hereditaria de Leber. Recientemente se ha comprobado que esta mutación presenta una alta variabilidad clínica [10]

#### 1.4. Síndrome de MELAS

El síndrome de MELAS es uno de los síndromes mitocondriales multisistémicos mejor definidos desde el punto de vista clínico. Los criterios invariables son episodios de accidentes cerebrovasculares antes de los 40 años, encefalopatía caracterizada por crisis epilépticas focales o generalizadas, acidosis láctica y/o fibras rojo rasgadas, además de dos de los siguientes síntomas: baja estatura, demencia, cefaleas recurrentes y vómitos.[11] En 1990, Goto y colaboradores describieron una mutación puntual del ADNmt (A3243G en el gen ARNt<sup>Leu</sup>) vinculada al síndrome de MELAS [12], y desde entonces se han descrito más de ocho mutaciones puntuales específicas en el ADNmt, aunque la primera es la más común. La combinación de alteraciones específicas del ADNmt con el MELAS y otros síndromes mitocondriales multisistémicos (MERF, NARP, síndrome de Kearns-Sayre, etc.) ha permitido estudiar la variabilidad del fenotipo clínico, la superposición de signos clínicos característicos de otros síndromes mitocondriales y ha posibilitado su diagnóstico diferencial, así como un diagnóstico mucho más precoz de los mismos, ante la sospecha clínico/bioquímica de encefalopatía mitocondrial. [13]

El objetivo de este estudio de este estudio es el análisis genético-molecular del ADNmt de varios pacientes con síndrome de Leigh y síndrome de MELAS. Asimismo, se ha realizado la búsqueda de mutaciones en familiares relacionados por la vía materna.

#### **Material y métodos:**

##### 2.1. Material biológico

El ADN humano se obtuvo a partir de distintas muestras biológicas: sangre, biopsias musculares, orina y mucosa bucal.

Las muestras de pacientes e individuos control procedían de diversos centros tanto nacionales como internacionales.

### 2.1.1. Casos clínicos

Se ha realizado el análisis genético mitocondrial de 22 personas, 20 pacientes y 2 familiares con clínica sugestiva de síndrome de Leigh o síndrome de MELAS, aunque no se recibió información clínica de todas las muestras recibidas.

Dentro de los 22 casos analizados, parte estaban diagnosticados con anterioridad. Debido a la baja tasa de incidencia de las enfermedades mitocondriales, se vio conveniente volver a realizar los análisis, sobre todo para el aprendizaje correcto de las técnicas diagnósticas.

#### *a) Pacientes para estudio de Síndrome de Leigh*

##### Caso 1

Niño de casi 3 años con embarazo normal, pero sin llanto al nacer.

Clínicamente la familia refiere desde hace 2 semanas ataques de risa todo el día, un solo día y periodos de risa casi continuos con recesos de 5 minutos. Come poco y tiene dificultad para la deglución.

En la exploración física se observa un retraso global del desarrollo, microcefalia, se encuentra por debajo del percentil 3 en relación a peso y talla y se encuentra irritable, sin sostén cefálico adecuado. Visualmente sin fijación ni seguimiento, con pupilas isocóricas.

También presenta un tono muscular disminuido de forma global, con predominio axial, reflejos miotáticos aumentados y tendencia a la espasticidad de miembros inferiores.

Aporta analítica en la cual se aprecia un aumento de los triglicéridos y de la fosfatasa alcalina, y una elevación del lactato en gasometría sin acidosis metabólica.

En el electromiograma presenta datos de polineuropatía con mayor afección de fibras motoras de tipo axonal y patrón mixto neuropático/miopático.

En el electroencefalograma se objetiva actividad paroxística occipital bilateral.

En la resonancia magnética atrofia a nivel de núcleos lenticulares bilaterales así como a nivel del de mesencéfalo bilateral, visible en fase T2 y flair.

Se reciben muestras de sangre para estudio del mtDNA.

De los pacientes 2, 3 y 4 no se recibe información alguna, solo que la paciente 4 es madre del paciente 3; de los tres muestras de sangre para estudio.

### Caso 5

Niña de edad desconocida con un retraso mental estático sin origen conocido. En los último meses ha presentado varios status con lesión en resonancia sugestivas de MELAS.

En tratamiento con decorenone desde hace un año, sin presentar crisis durante todo ese tiempo.

En la última resonancia, aparecen dos pequeñas lesiones simétricas, lineales en el putamen.

Del paciente 6 no se recibe información clínica, muestras de sangre para el estudio.

### Caso 7

Paciente fallecido a los 8 meses por fallo respiratorio. La clínica fue de hiperlactacidemia severa desde el nacimiento con hipotonía y retraso madurativo.

Diagnóstico prenatal de crecimiento intrtauterino retardado y arteria umbilical única. En RMN fetal se aprecia una megacisterna magna y un foco hiperintenso frontal sugestivo de sangrado o calcificación. Tras la visualización de la ecografía en 2º trimestre de gestación, se sospecha comunicación interventricular, pero no se confirma en la ecografía del tercer trimestre.

Tras nacimiento se realiza eco cerebral en la que se observan imágenes sugestivas de calcificaciones periventriculares y un posible quiste subependimario en un ventrículo izquierdo con paredes irregulares. El tercer

ventrículo es visible. Se observa megacisterna magna izquierda y una hiperecogenicidad llamativa en lóbulo frontal izquierdo.

En la RNM se encuentran los siguientes hallazgos: megacisterna magna, múltiples focos de alteración de intensidad de señal en hemisferios cerebelosos en surcos caudotalámicos próximos al agujero de monro, en zona parasagital posterior derecha y probablemente intraventriculares. Discreta atrofia del lóbulo temporal izquierdo. Estos hallazgos son compatibles con focos de sangrado y/o calcificación que sugiere infección prenatal.

En la TC craneal se observan dos imágenes puntiformes hiperdensas intraventriculares en plexos coroideos de atrio izquierdo y asta frontal derecha en relación con pequeños focos hemorrágicos; así como dos focos puntiformes de sangrado extraaxiales en fosa posterior. Megacisterna magna. Se descartan calcificaciones.

Se realiza despistaje de infección prenatal siendo las serologías de Lues y TORCH negativas, así como la PCR de CMV en orina.

En gasometrías se observan de forma repetida ácidos lácticos elevados (cifra superior de 11,3. Al alta 4,8) sin acidosis ni alteración de bicarbonato compensador, motivo por el que se amplía estudio (coagulación, hematológico, ácido pirúvico, amonio, sulfiteo, cuerpos cetónicos en orina, transferrina con déficit de carbohidratos, prueba de talón, homocisteína, fondo de ojo) resultando normal.

Se reciben muestras de músculo para análisis genético de mutaciones.

De los casos 8, 9 10 y 11 no se recibe información clínica. La paciente 9 es la madre del paciente 8, y de ambos se reciben muestras de sangre y orina para el estudio. Del paciente 10 se reciben muestras de músculo, y del paciente 11 muestras de sangre.

*b) Pacientes para estudio de Síndrome de MELAS*

Caso 12

Se trata de un varón de 41 años de edad con historia de migraña con aura visual (sin antecedentes familiares) e hipoacusia neurosensorial progresiva de etiología no filiada.

Hallazgo de atrofia cerebelosa vista en neuroimagen comparada con estudios previos pero clínicamente silente.

Con diabetes mellitus mal controlada, en estudio por los endocrinos. No catalogada como tipo 1 o 2, inicialmente estuvo en tratamiento con ADO, actualmente con insulina.

Actualmente presenta escotoma visual por retinopatía, en estudio por oftalmología.

Se reciben muestras de sangre, orina y mucosa bucal para estudio genético.

Caso 13

Niño de 9 años que recientemente ha presentado un accidente cerebrovascular agudo con infarto en la zona occipital.

Clínicamente asociado a cefaleas migrañosas, epilepsia y ptosis palpebral.

Se envía muestra de orina para estudio genético y se recibe también una muestra de sangre de la madre, caso 14.

Caso 15

Niño de 12 años con antecedentes de disminución de movimientos durante el embarazo. Retraso en el desarrollo motor, logró sostén cefálico a los 2 años, sedestación a los 3 y no camina, actualmente en silla de ruedas.

En el electromiograma se evidencia daño neuropático.

En la biopsia muscular hallados agregados mitocondriales en COX, sin datos de daño neurológico ni distrofia muscular, la velocidad de la conducción nerviosa es normal.

El cariotipo es normal, la RNM normal, y visual y auditivamente normal.

En la exploración física se observa alopecia de cejas y pestañas así como hipotrofia de extremidades inferiores con hiporreflexia y disminución de la sensibilidad. La fuerza en extremidades superiores es 4/5, en muslos 1/5 y en piernas 2/5.

Se recibe muestra de sangre para estudio genético.

#### Caso 16

Mujer de 60 años con dificultad para la marcha, que tras ser intervenida quirúrgicamente de ambas caderas, ha quedado en silla de ruedas.

Hace 1 año cuadro de hemiplejía derecha por posible accidente cerebrovascular agudo.

Presenta dificultad en el habla e hipoacusia, además de cierta disfagia e imposibilitada para realizar una vida normal sin ayuda.

No refiere antecedentes familiares conocidos.

Se envía muestra de sangre para el estudio.

#### Caso 17

Mujer de 35 años que debuta hace un año con un cuadro de cefalea en hemicráneo derecho retroocular con posterior cuadro comicial. Es dada de alta de neurología con tratamiento comicial tras TC craneal con lesión ocupante de espacio de origen supuestamente vascular.

A los 3 meses episodio similar con TC informado sin lesiones agudas.

Actualmente a la exploración física apariencia normal, con disartria piramidal leve. Buena orientación y marcha hemipléjica por claudicación hipotónica de extremidades inferiores. Hipotonía muscular en hemicuerpo izquierdo.

En el balance muscular se aprecia una hemiparesia izquierda directa no proporcional, con mayor afectación faciobraquial 1/5.

Babinsky izquierdo positivo.

Se recibe muestra de sangre para el estudio.

### Caso 18

Mujer de 26 años, actualmente en estudio por neurología por parestesias en manos tras traumatismo craneoencefálico en 2011. Presenta una RMN craneal en la cual se objetivan lesiones en sustancia blanca que planteaban diagnóstico diferencial entre patología desmielinizante y vascular.

En los dos siguientes años presento varios cuadros neurológicos con alteración sensitiva hemicorporal izquierda, y distintas crisis si filiación establecida, con diagnóstico diferencial entre comiciales y psicógenas. Presenta en todo este tiempo cefaleas de características tensionales y/o vasculares, náuseas, vértigos

Realizado estudio genético de CADASIL (arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía) con resultado negativo

Actualmente en la RMN craneal presenta persistencia de las múltiples lesiones de sustancia blanca, hiperintensas en las secuencias T2 y flair, de predominio en la región parieto-occipital y subcorticales, sin cambios, sin afectar al cuerpo calloso, ni fosa posterior. No se detectan anomalías de la línea media. Sistema ventricular de tamaño y morfología normales. Cisternas de la base libre. Unión creaneovertebral de morfología normal.

Se recibe muestra de sangre para estudio.



### Caso 19

Varón de 27 años con antecedentes de epilepsia mioclónica juvenil, de inicio a los 22 años. A los 10-12 años inicio de cefalea hemicraneal, orientado en ese momento como migraña.

Epilepsia mal controlada con toma de la medicación errática, y requiriendo varios ingresos, en UCI en 2012 por status epiléptico convulsivo generalizado en contexto de privación de sueño y en neurología, con episodios de crisis relacionadas con el sueño y mioclonias matinales.

Actualmente cuadro de epilepsia más cefalea y fotopsias. Última RMN craneal con hallazgo de displasia cortical occipital derecha.

Se recibe muestra de sangre para estudio.

### Caso 20

Niña de 9 años de edad que debuta con cuadro de cefalea asociada a náuseas y vómitos acompañado de desorientación, sin obedecer órdenes sencillas. Pérdida de fuerza en hemicuerpo izquierdo con dolor en hombro y abdomen, de ese mismo lado, acompañado de fiebre.

En el examen neurológico está despierta, desorientada, no obedece órdenes sencillas, no colaborativa, reactiva a estímulos externos con pupilas isocóricas fotorreactivas. Se queja de dolor y moviliza las cuatro extremidades, fuerza muscular aparentemente conservada y reflejos positivos, no patológicos. Lllaman la atención una marcada rigidez de nuca y movimientos tónico-clónicos en hemicuerpo izquierdo.

En la RNM craneal de hace 2 años hallazgos compatibles con infarto cerebral reciente que compromete los lóbulos temporal, occipital y parietal izquierdos, con leve herniación transtentorial del uncus. Actualmente se aprecian múltiples áreas de captación anormal de contraste y anormalidad de señal.

Se envían muestras de sangre para su análisis, y también de su madre, caso 21.

## Caso 22

Niño de 11 años que consulta por trastorno motor crónico, con torpeza motora, lentitud en la ejecución de actividades (andar, saltar, subir escaleras o hablar) que aumenta de forma progresiva con la edad. Carácter tímido y retraído con dificultad en la escolarización, sobre todo en el lenguaje expresivo.

Diagnosticado en 2007 de neuritis óptica con dolor ocular y pérdida de agudeza visual con PEV alterados. Se le realizó RM cerebral, sin hallazgos de interés.

Recientemente se le realiza otra RM cerebral donde se observa afectación de los ganglios de la base. En la biopsia muscular se aprecian signos de necrosis, regeneración e infiltrados inflamatorios significativos.

### 2.1.2. Material de laboratorio: aparatos y reactivos

#### Aparatos

El agua empleada fue purificada por ósmosis inversa en el sistema de purificación de agua Milli-Ro 4 de **Millipore** y posteriormente desionizada.

La esterilización de las soluciones y material de plástico se llevó a cabo en autoclave marca **Selecta** modelo 437- G a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. El material de vidrio se esterilizó en una estufa **Selecta**, a 140°C durante 6 horas.

Las reacciones de PCR tuvieron lugar en termocicladores **Biometra**, modelos T3 y Trio Termoblock y de la marca **Eppendorf** modelo Mastercycler personal. Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en un sistema de placas de **Applied Biosystems**, modelo ABIPRISM 7700.

Se utilizó un concentrador a vacío de la marca **Eppendorf** modelo 5301, para la eliminación de los restos de etanol en la preparación del DNA.

Las electroforesis "horizontales" se realizaron en soportes de **Pharmacia** modelos GNA-100, GNA-200 y de **Bio-Rad** modelo Wide Mini-Sub Cell GT y Mini-sub Cell GT. Las fuentes de alimentación utilizadas fueron **Bio-Rad Power/Pack 300** e ISCO modelo 452.

Los geles se visualizaron con un transiluminador UV **Fotodyne** 300 DNA. El escaneado de los geles se realizó con un aparato de UV modelo Gel Doc 1000 de **Bio-Rad** y se analizaron con el programa informático Molecular Analyst™, versión 1.5 también de **Bio-Rad**.

Para manejar pequeños volúmenes se usaron pipetas automáticas graduables marca **Gilson**, modelos P10 (10 µl), P 20 (20 µl), P 100 (100 µl), P 200 (200 µl), P 1.000 (1 ml) y Finnpipette de 5 µl. Una pipeta **Gilson** P10 de 0,5 a 10µl se utilizó exclusivamente para las preparaciones de PCR. Se utilizaron un juego de pipetas de la marca **Gilson** exclusivamente para la preparación de las PCR-cuantitativas.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada **Kontron**, modelo Centrikon H-401 con rotor fijo A 8.24 y un rotor basculante AS 4.7, y en una centrífuga refrigerada **Sorval** modelo RC 5B Plus, con rotores SS-34 y HS-4. Los pequeños volúmenes se centrifugaron en microcentrífugas **Eppendorf** modelo 5415D para preparaciones en tubos eppendorf, modelo 5415R para centrifugaciones a temperatura controlada y de la marca SIGMA modelo 2.16 con rotor 11122 para las placas de 96 pocillos.

Las pesadas se realizaron en balanzas eléctricas **Sartorius** modelos 28.42, 1265 MP y AND modelo ER 120 A.

Para el almacenamiento de soluciones, medios, reactivos y muestras biológicas se utilizó un frigorífico congelador **Edesa**, un arcón congelador marca **Veredeca** y un ultracongelador (-80°C) de la marca **Koxka**.

El hielo se obtuvo en una máquina **Iberna** y fue triturado en una picadora **Staff**.

### Reactivos

Todos los productos químicos usados eran, al menos, de grado analítico (PA). Las principales casas comerciales utilizadas en este trabajo fueron **SIGMA-Aldrich**, **Panreac**, **Roche**, **Amersham**, **Promega**, **Merck**, **Invitrogen**, **SERVA**, **Applied Biosystems**.

Las enzimas de restricción utilizadas son de **Roche**, **Takara**, **New England Biolabs**, **Promega**, **GIBCO**, **SIGMA-Aldrich**, **Invitrogen**, **Fermentas**.

La enzima polimerasa utilizada para las reacciones de PCR fue “REDTaq™ DNA polymerase” de **SIGMA** (D-4309) y “Taq DNA polymerase” de **ROCHE**. Los oligonucleótidos empleados en dichas PCR fueron suministrados por **Isogen, Invitrogen y SIGMA-Genosys**.

Para las sucesivas extracciones fenólicas se utilizó una mezcla de fenol con cloroformo-alcohol isoamílico (25:25:1) llevada a un embudo de decantación al que se añadió 8-hidroxiquinoleína hasta una concentración de 0,1%. La mezcla resultante se saturó con Tris-HCl 10mM pH=7,4, NaCl 0,1 M, SDS 0,5% y EDTA-Na 1mM. Una vez separadas las fases se recogió la fase fenólica y se almacenó a 4°C en frasco oscuro.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Recogida de muestras, registro y almacenaje

Las muestras fueron etiquetadas y registradas en la base de datos del laboratorio, donde se les asignó un número de caso.

La sangre fue tratada en las 24 horas siguientes a su extracción o conservada a -70°C. Las biopsias se procesaron generalmente después de congelarse a -70°C.

Tras el análisis todas las muestras de ADN son almacenadas en cámara frigorífica, conservadas a 4°C

Las muestras de sangre (extraídas en tubos con EDTA) se mantuvieron a 4°C hasta que se procesaron (24-48 h siguientes a su extracción).

Las muestras de biopsias musculares se recibieron congeladas en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 2.2.2. Extracción de ADN

#### Aislamiento de ADN a partir de sangre

La sangre (6-8 ml) se colocó en tubos estériles y se diluyó con cuatro volúmenes de tampón TE (TRIS-HCl 20 mM pH=8, EDTA-Na 5mM). Los tubos

se agitaron suavemente. Seguidamente, se centrifugó a 5000 rpm en la centrífuga Sorval con el rotor SS-34 durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, que contenía la mayor parte de los eritrocitos, y el sedimento obtenido se resuspendió en 15 ml de tampón TE (20:5) con agitación en Vortex. Una vez resuspendido, se completó el volumen del tubo a 40 ml y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Este lavado se repitió hasta que se obtuvo un sedimento blanco. El sedimento, compuesto principalmente por leucocitos, se resuspendió en TE (20:5) en un volumen correspondiente a la mitad del volumen de sangre inicial. Las células se lisaron mediante la adición de proteinasa K (200 µg/ml) y SDS hasta una concentración final de 0,4 %. Se incubó a 37°C durante toda la noche.

Posteriormente, los ácidos nucleicos se extrajeron con una mezcla de fenolcloroformo-alcohol isoamílico (Fenol-IAC 25:25:1). Para ello, se añadió en primer lugar 1/10 volúmenes de acetato amónico 7,5 M con el fin de facilitar la formación de la interfase y seguidamente se añadieron 1,5 volúmenes de Fenol-IAC. Se agitó vigorosamente para que ambas fases, acuosa y fenólica, se mezclaran de forma homogénea y se centrifugó a 3000 rpm.

Separadas las dos fases, se procedió a recoger con pipeta Pasteur, en un nuevo tubo de centrífuga, la fase acuosa (superior) en la que permanecía el DNA, y se repitió de nuevo todo el proceso de extracción. A la fase acuosa final se le añadió 1,5 volúmenes de una mezcla de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1) que nos ayudó a retirar los restos de fenol que se pudieron haber arrastrado. Se agitó manualmente durante 5 minutos y se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos a 20°C en un rotor A 8.24, para separar nuevamente las fases. Los ácidos nucleicos, presentes en la fase acuosa (superior) recogida en este último paso, se precipitaron por adición de dos volúmenes de Etanol absoluto previamente enfriado a -20°C. Los tubos se invirtieron varias veces y se observó la aparición de un ovillo de DNA que se recogió con una pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se dejó secar en un concentrador (Eppendorf Concentrator 5301) para eliminar los restos de etanol y el ADN se resuspendió en 300 µl de agua destilada estéril, agitando en el termoblock a 37°C durante un día para la disolución completa del DNA.

### Músculo

Para la obtención de ADN a partir de biopsias de músculo la muestra se pulverizó en un mortero de porcelana con N<sub>2</sub> líquido.

El polvo obtenido se transfirió a un tubo eppendorf donde se resuspendió en 0,5 ml del tampón 1xRSB cuya composición era: 10 mM TRIS-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA. Las células se lisaron mediante la adición de proteinasa K (20 µg/ml tampón 1xRSB) y SDS hasta una concentración final de 1%. Se incubó a 37°C toda la noche ó a 50°C durante 3 horas. Posteriormente, los ácidos nucleicos se extrajeron con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Fenol-IAC). Para esto, se añadió un volumen de Fenol-IAC, se agitó el eppendorf durante un minuto y se centrifugó a 3.000 rpm en microfuga. La fase acuosa (fase superior) se extrajo con Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1) que nos ayudó a retirar los restos de fenol. A la fase acuosa recogida se le añadió NaCl hasta 0,2 M y dos volúmenes de etanol frío. En el caso de no formarse anillo (que se procedería de igual manera que en el ADN extraído a partir de sangre), las muestras se mantuvieron a -20°C durante toda la noche ó a -70°C durante una hora y el DNA se recogió por centrifugación a 4°C durante 30 minutos a 13.000 rpm. Una vez eliminados los restos de etanol, el DNA se resuspendió en 200 µl de agua. Se dejó agitando en el termoblock a 37°C durante dos días para la disolución del DNA.

Otros tejidos: orina y mucosa bucal.

Para la extracción de ADN a partir de otros tejidos se procedió de igual modo que en la extracción de sangre, salvo en la preparación de las muestras, en la que se ajustó las concentraciones de tampón TE, SDS y proteinasa K a las características del tejido.

#### 2.2.3 Cuantificación de ácidos nucleicos por espectofotometria.

Para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos en nuestras preparaciones, se realizó la lectura de la absorbancia utilizando un NanoDrop® (Figura 1). Así, tras la realización de un blanco, utilizando para ello el mismo disolvente en el que está disuelta la muestra (generalmente agua), se depositaron 2 µl de la preparación de ácidos nucleicos en el lugar apropiado del aparato y se obtuvo directamente tanto la concentración en ng/µl como la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm (Abs260/Abs280).

La relación de las absorbancias obtenidas a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) da idea del grado de pureza de la preparación, considerándose una buena pureza cuando se obtienen relaciones  $A_{260}/A_{280} \approx 1,8$  para ARN y  $A_{260}/A_{280} \approx 2,0$  para ADN.



Figura 1: NanoDrop ND-1000

#### 2.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En las reacciones de PCR en las que se utilizó ADN genómico como molde, se añadieron entre 100 ng y 500 ng de ADN total, extraído según se detalla en el apartado 2.2.2 a una mezcla de reacción de 50 µl de volumen final.

Se utilizaron dos taq DNA polimerasas: “*Taq DNA Polimerase*” de **ROCHE** (Tabla 1). En cada uno de los casos, la mezcla de reacción fue diferente y se detalla a continuación:

**Tabla 1: Reactivos usados para la amplificación por PCR utilizando la enzima “*Taq DNA Polimerase*” de ROCHE**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µl)</b>	<b>Concentración final</b>
<b><i>Tampón 10X</i></b>	5	1X
<b><i>Mezcla dNTPs (10 mM cada)</i></b>	1	0,2 mM cada uno
<b><i>Cebador Forward 25 µM</i></b>	0,5	0,25 µM
<b><i>Cebador Reverse 25 µM</i></b>	0,5	0,25 µM
<b><i>Taq Polimerasa (5U/ µl)</i></b>	0,25	1,25 U/ µl
<b><i>ADN</i></b>	-	100 ng
<b><i>Agua</i></b>	Hasta 50 µl	-

Para minimizar el error debido a la manipulación de volúmenes pequeños y para facilitar el trabajo, se preparó una mezcla de reacción previa que contenía todos los reactivos necesarios para todas las muestras, exceptuando el ADN. En cada tubo de reacción se puso el agua necesaria para llevar el volumen a 50 µl, se añadió la parte proporcional de la mezcla previa y a continuación se puso el ADN. Con el fin de comprobar la ausencia de contaminación durante la manipulación de los reactivos, en cada experimento se utilizó además de las muestras a analizar, un tubo adicional que contenía la mezcla de reacción sin ADN en el que no debe darse amplificación y por ello lo llamaremos blanco.

Variando la secuencia de los oligonucleótidos podemos amplificar cualquier región del ADN, pero este cambio implicará un ajuste de las condiciones generales de la amplificación, estableciendo una temperatura de hibridación adecuada para cada par de cebadores empleados (el ajuste se puede hacer utilizando esta fórmula:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ ). Por otro lado, el tiempo de extensión o elongación dependerá del tamaño del fragmento a amplificar, siendo normalmente 1 minuto por cada 1000 bases. Aún así, las condiciones generales se resumen en la Tabla 2.



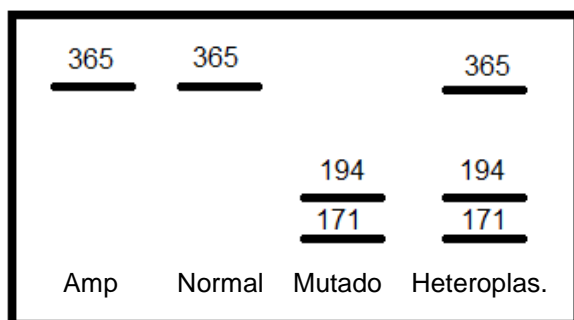
**Tabla 2: Condiciones generales de la PCR**

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA	Nº DE CICLOS
<b><i>Desnaturalización Previa</i></b>	5 minutos	94°C	1 CICLO
<b><i>Desnaturalización</i></b>	1 minuto	94°C	30-35 CICLOS
<b><i>Hibridación</i></b>	1 minuto	T <sup>a</sup> óptima para cada pareja de cebadores	
<b><i>Elongación</i></b>	1-3 minuto	72°C	
<b><i>Elongación Final</i></b>	5 minutos	72°C	1 CICLO

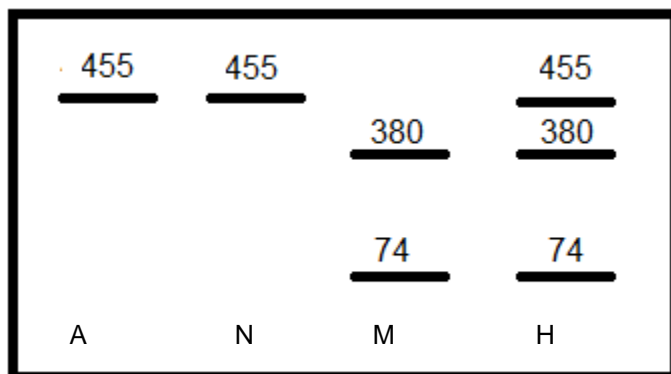
2.2.5 Digestión de ADN mitocondrial con enzimas de restricción para estudio de mutaciones mediante polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción.

Los fragmentos de ADN amplificados se digirieron tomando 5 µl de producto amplificado y llevándolo hasta un volumen final de 10 µl que contenía el tampón de incubación correspondiente al enzima y 5U del enzima de restricción. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 20 minutos con la enzima Fast Digest Apa I para la detección de la mutación 3243 A>G, 10 minutos con la enzima Fast Digest Hpa II para la detección de la mutación 8993 T>C/G y a 65°C durante 5 minutos con la enzima Fast Digest BSE NI para la detección de la mutación 9176 T>C.

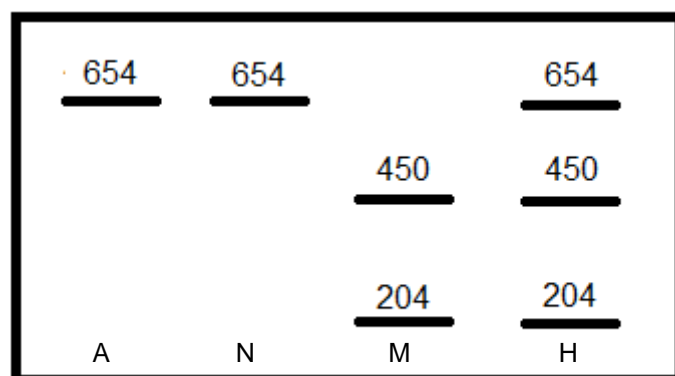
#### **Fragmentos de ADN en la detección de la m.8993T>C/G**



### Fragmentos de ADN en la detección de la m9176T>C



### Fragmentos de ADN en la detección de la m3243A>G



2.2.6. Separación electroforética de los ácidos nucleicos: electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio.

Para comprobar la amplificación del material genético mediante PCR se utilizaron geles de agarosa de distinto porcentaje para la separación de los fragmentos amplificados y teñidos con bromuro de etidio para permitir su visualización al exponerlos bajo luz ultravioleta.

Los geles se prepararon disolviendo agarosa en tampón de electroforesis TBE (Tris 50 mM, ácido bórico 50 mM, y EDTA 1 mM) a unos 60–70° C. Las concentraciones de trabajo variaron entre el 0.5 y el 2% (p/v) según el tamaño de los fragmentos que se quisieran separar. Posteriormente, y con el gel aún caliente, se añadió bromuro de etidio (10 mg/ml) hasta una concentración final

de 0.5 µg/ml, se mezcló cuidadosamente y se vertió sobre el molde del gel, con el peine ya puesto y se dejó gelificar por enfriamiento.

Para cargar las muestras en el gel, estas se mezclaron con 1/3 del volumen de colorante (Ficoll 400 al 30 % y azul de bromofenol al 0.1% (p/v) en TBE). Como marcador de pesos moleculares se utilizó “1 Kb DNA Ladder” de Invitrogen. La electroforesis se desarrolló en tampón TBE 1X, aplicando un voltaje de 80–100 V, durante aproximadamente media hora.

El resultado se visualizó tras la exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta, en nuestro caso en el transiluminador *GelDoc 2000* de **BioRad** para la captura de imágenes y para su posterior análisis se utilizó el software asociado a este equipo: *Quantity One® 1-D*.

#### 2.2.7. Secuenciación automática del mtDNA

La secuenciación de los productos de amplificación por PCR se llevó a cabo de forma automática, en el Servicio de Secuenciación de Ácidos Nucleicos de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los electroferogramas recibidos se analizaron mediante el programa Sequencher 4.1.4.

Para realizar la secuenciación completa del genoma mitocondrial se realiza la amplificación, purificación y posterior secuenciación automática del mtADN completo dividido en 8 fragmentos. Las características de estos fragmentos se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3: Fragmentos empleados para la secuenciación completa del mtDNA**

FRAGMENTO	OLIGO 5' - 3'	Hebra	SECUENCIA 5' --> 3'	TAMAÑO (pb)	Tª melting
<b>F1</b>	hmtL 569	L	AACCAAACCCCAAAGACACC	2452	<b>58 ° C</b>
	hmtH2982	H	CTGATCCAACATCGAGGTCG		
<b>F2</b>	hmtL2797	L	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	2417	<b>58 ° C</b>
	hmtH5174	H	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG		
<b>F3</b>	hmtL5061	L	AGCAGTTCTACCGTACAACC	2476	<b>58 ° C</b>
	hmtH 7497	H	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC		
<b>F4A</b>	hmtL7336	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	955	<b>62 ° C</b>
	hmtH 8251	H	GCTATAGGGTAAATACGGGC		
<b>F4B</b>	COIL 8018	L	CCGATTGAAGCCCCATTG	1272	<b>62 ° C</b>
	COH9250	H	GGGCTGGGTTTTACTATATG		
<b>F4C</b>	hmtL 8815	L	CTCATTTACACCAACCACCC	1140	<b>62 ° C</b>
	L6H	H	CTTCGAAGCCAAAGTGAT		
<b>F5</b>	hmtL 9611	L	TCCCACTCCTAAACACATCC	2539	<b>58 ° C</b>
	hmtH 12111	H	AAACCCGGTAATGATGTCCG		
<b>F6</b>	L1L	L	TACTCTTCAATCAGCCACAT	2811	<b>62 ° C</b>
	hmtH 14559	H	GATTGTTAGCGGTGTGGTCG		
<b>F7</b>	hmtL 14130	L	TCTTCCCACTCATCTAACC	2590	<b>58 ° C</b>
	hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG		
<b>F8</b>	hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1643	<b>58 ° C</b>
	hmtH 626	H	TTTATGGGGTGATGTGAGCC		

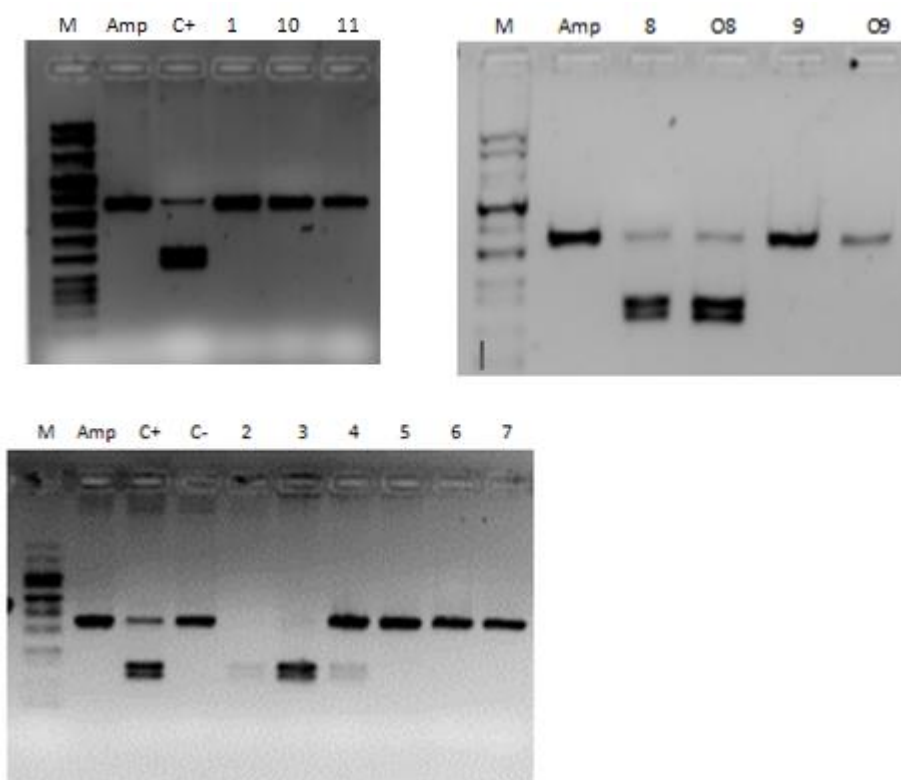
PROGRAMA:	DESNATURALIZACIÓN	94°C - 5 min	35 ciclos
	DESNATURALIZACIÓN	94°C - 45 seg	
	HIBRIDACIÓN	Tªmelting- 30 seg	
	ELONGACIÓN	72°C - 3 min	
	ELONGACIÓN final	72°C - 5 min 4°C - ∞	

## **Resultados y discusión**

A continuación se presentan los resultados de los análisis genéticos realizados en las muestras antes mencionadas.

### **3.1. Pacientes con estudio de Síndrome de Leigh**

Realizamos el análisis de esta mutación a todos los pacientes cuyas características clínicas indiquen uno de estos síndromes. Esta mutación se analiza mediante PCR-RFLP con la enzima HpaII.



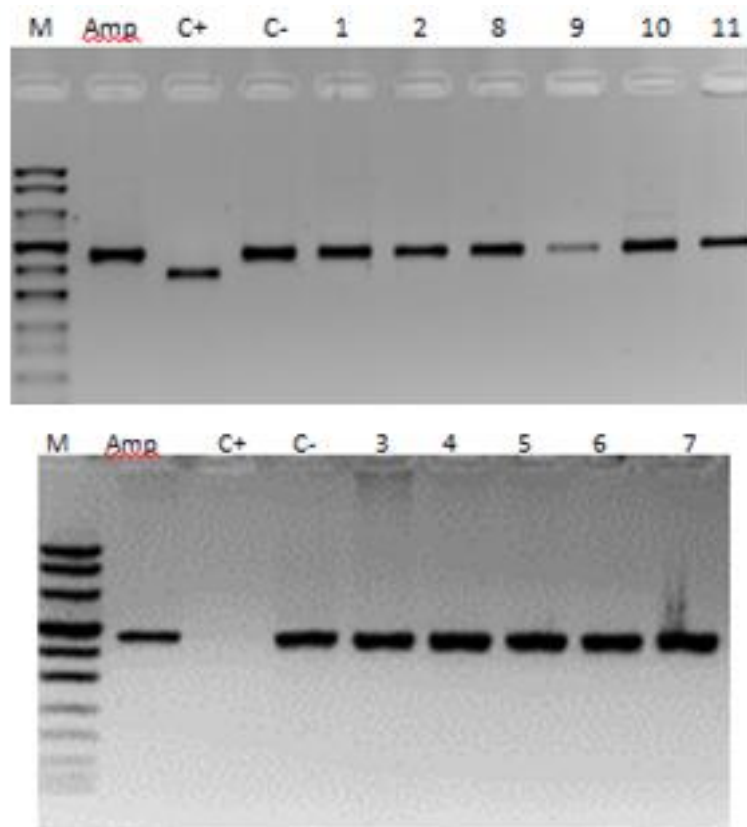
**Figura 2. Análisis de la mutación m.8993T>G/C en las muestras de los pacientes 1-11.** M indica el marcador de peso molecular, amp amplificado sin digerir, C+ control positivo de la mutación y C- control negativo. Los números indican el número de caso y O8 y O9 indican que la muestra del paciente es de orina (todas las demás son de sangre)

Los pacientes 2, 3, 4 y 8 presentan la mutación, mientras que el resto no. Por desgracia no se cuenta con información clínica para poder concluir si los síntomas eran los típicos asociados a la mutación portadora. Cabe destacar

que la muestra del caso 9, madre del caso 8 es negativo, lo cuál hace pensar que en el paciente 8 se produjo una mutación de novo.

En todos los pacientes en los que se encontró la mutación se hizo un posterior estudio de heteroplasma, obteniéndose un 100% de formas mutadas en los casos 2 y 3. En el caso 4, la madre del paciente 3, sólo se encontrón un 4% de heteroplasma, lo cual explica la ausencia de síntomas en la mujer. En el caso 8 el porcentaje de heteroplasma encontrado en sangre fue del 90% y en orina del 95%.

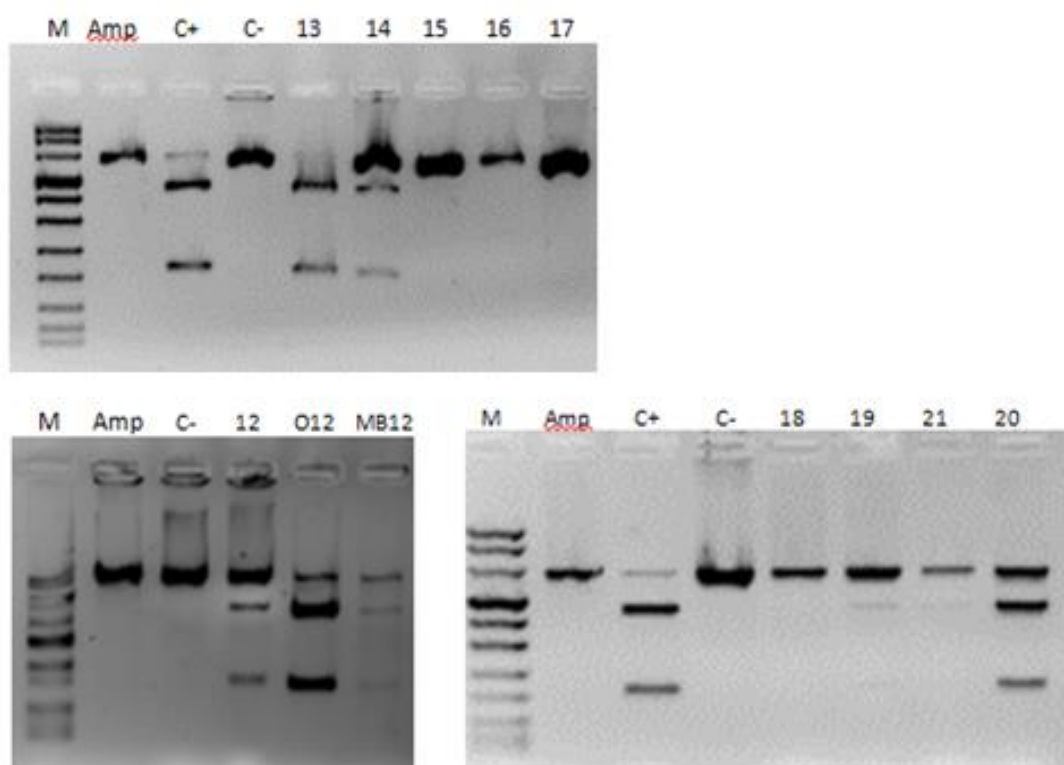
Además de la m.8993T>C/G, en los casos con sospecha de síndrome de Leigh se buscan otras posibles mutaciones asociadas, en este caso, otra de las más frecuentes de ellas la m.9176T>C



**Figura 3. Análisis de la mutación m.9176T>C en las muestras de los pacientes 1-11.**

Ninguno de los casos presentó la mutación.

### 3.2. Pacientes con estudio de Síndrome de Melas



**Figura 4. Análisis de la mutación m.3243A>G en las muestras de los pacientes 12-21.** O12 y MB12 indican muestras de orina y mucosa bucal respectivamente, del paciente 12.

Los pacientes 12, 13, 14, 19, 20 y 21 presentan la mutación. La clínica de todos los pacientes, antes descrita, es propia del síndrome.

El porcentaje de heteroplasmia en el caso 12 fue del 15% en sangre, del 90% en orina y del 30% en las muestras de mucosa bucal. El paciente 13 presentaba una heteroplasmia del 95% y el 14 tan solo del 15%.

En el paciente 19 se observó una heteroplasmia del 5% y en el paciente 20 del 50%. El caso 21, la madre del paciente 20, solo se obtuvo una heteroplasmia del 5%.

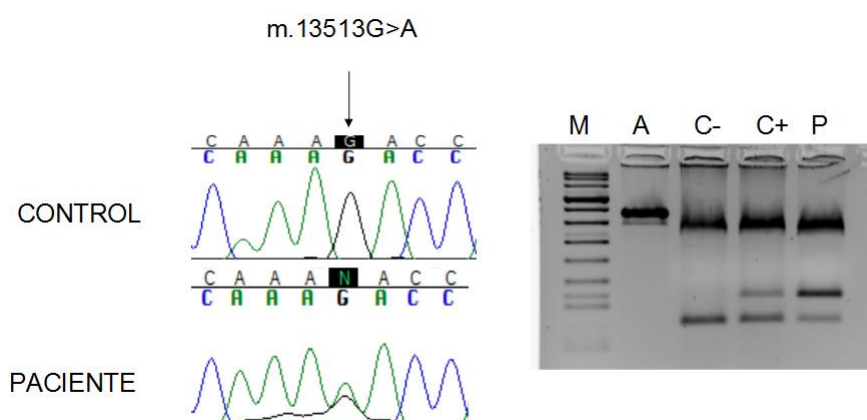
Como se puede observar en algunos casos, el porcentaje de heteroplasmia se correlaciona en ocasiones con el grado de afectación clínica de los pacientes. Así, cabe destacar que en el paciente 13, presentando una heteroplasmia del 95% en sangre, presentaba afectación generalizada desde edad muy temprana, a diferencia del 12. En cuanto al caso 12, reseñar que aunque en sangre y mucosa bucal la heteroplasmia es baja, en orina es del 90%. Se ha observado en algunos casos, que el grado de heteroplasmia en la orina se

correlaciona con la afectación muscular. Sería muy conveniente si se demostrara esa asociación, para así poder diagnosticar la enfermedad sin necesidad de hacer la biopsia muscular, una prueba muy invasiva.

Además, también se observan muy bajos grados de heteroplasmia en pacientes sin afectación, como el caso 21, detectada tras el diagnóstico de su hija. Es este caso se puede observar como en la niña (caso 20) se presenta el síndrome mientras que en la madre, que tiene una heteroplasmia tan solo del 4%, la mutación pasa desapercibida. Esto es característico de las mutaciones mitocondriales, la segregación genotípica y fenotípica, van unidas y el efecto umbral, antes nombrado, cuando el número de copias de ADNmt mutado sobrepasa un nivel determinado, la producción de ATP se y, por debajo de un nivel umbral, aparecerán las manifestaciones de la enfermedad.

### 3.3. Screening de mutaciones del ADN mitocondrial

En el caso del paciente 22 se ha realizado una secuenciación completa del ADNmt, por presentar una clínica muy inespecífica y no tener una sospecha diagnóstica clara.

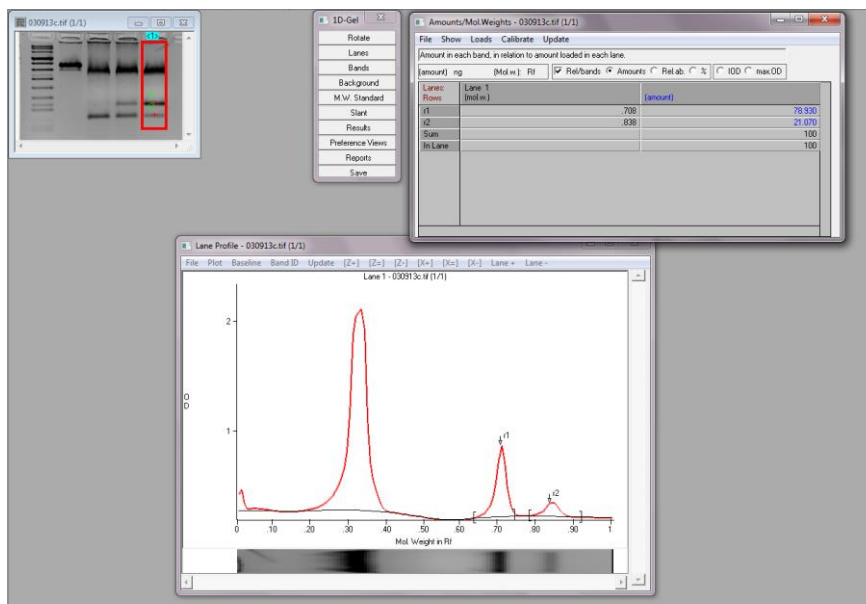


**Figura 5. Secuenciación y posterior PCR-RFLP de la muestra del paciente 22.**

En el estudio de la secuencia de DNA mitocondrial, todas las mutaciones encontradas son polimorfismos descritos anteriormente pertenecientes al haplogrupo poblacional I2, excepto la mutación **G13513A** presente en gen ND5 (complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial). Esta mutación ha sido descrita como mutación patológica.



Se confirmó la presencia de la mutación mediante la técnica de PCR-RFLP, encontrándose en un porcentaje de heteroplasmia del **75%** aproximadamente, en el tejido estudiado.



**Figura 6. Estudio del porcentaje de heteroplasmia mediante el programa Gel-Pro Analyser.**

## **Conclusiones**

En este trabajo se resume la experiencia de nuestro laboratorio en el Diagnóstico Genético de Enfermedades Mitocondriales en el periodo de 1 mes que abarca este trabajo. Se ha realizado el análisis genético mitocondrial de 22 personas, 20 pacientes y 2 familiares, principalmente por las técnicas de RFLP-PCR de los cuales se han obtenido 9 positivos.

De estos pacientes, 2 fueron de nueva recepción, es decir, estudiados en el momento de realizar el trabajo, los casos 11 y 12. El paciente 11 resultó negativo para las mutaciones estudiadas asociadas a síndrome de Leigh, mientras que en el paciente 12 se encontró la mutación 3243A>G, asociada a síndrome de MELAS.

El resto, fueron analizados a partir muestras previamente estudiadas y almacenadas.

La facilidad del análisis del mtDNA está llevando a realizar no sólo el diagnóstico de fenotipos claramente mitocondriales sino como herramienta

para el diagnóstico diferencial de otras patologías no causadas por mutaciones en el ADNmt.

Como se viene comprobando en los últimos años la secuenciación completa del ADNmt ha permitido observar que mutaciones en este genoma son mucho más frecuentes en enfermedades mitocondriales de lo esperado hasta el momento, por ello, la secuenciación del genoma mitocondrial debería realizarse en pacientes candidatos a padecer síndromes relacionados con patología mitocondrial.

Personalmente, la oportunidad de desarrollar este trabajo de laboratorio me ha permitido aprender un número de técnicas diagnósticas con las que no estaba en absoluto familiarizadas, y una aproximación al trabajo de laboratorio real.

## **Bibliografía**

1. King, M. P., and Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500-503.
2. Diez-Sanchez, C., RuizPesini, E., Lapena, A. C., Montoya, J., PerezMartos, A., Enriquez, J. A., and LopezPerez, M. J. (2003). Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod* 68, 180-185.
3. Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de-Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 427-465.
4. Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., and Afzelius, B. (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondria respiratory chain control: A correlated clinical, biochemical and morphological study. *J Clin Invest* 41, 1776-1804.
5. Montoya, J., Playán, A., Solano, A., Alcaine, M.J., LópezPérez, M.J., PérezMartos, A. (2000). Enfermedades del ADN mitocondrial. *Rev Neurol* 31, 324-333.
6. Montoya Villaroya, J., Emperador Ortiz, S., Gallardo-López, E., Ruiz-Pesini, E. ()Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial.
7. Playán A., Solano-Palacios, A., González de la Rosa, J.B., Merino-Arribas, J.M., Andreu, A.L., López-Pérez, M., Montoya, J. (2002) Síndrome de Leigh producido por una mutación *de novo* T8993G en el ADN mitocondrial. *Rev Neurol* 34, 1124-1126.
8. Alcaine, M.J., Solano, A., Playán, A., Vilaseca, M.A., Martí, M., López-Pérez, M.J. et al. (2001). Síndrome de NARP producido por una mutación T>G *de novo* en la posición 8993 del ADN mitocondrial humano.
9. López-Gallardo, E., Emperador, S., Solano, A., Llobet, L., Martín-Navarro, A., López-Pérez, M.J., et al. (2014) Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations.) *Human Molecular Genetics* 23, 6191-6200.
10. Gutiérrez, A., Saldaña-Martínez, A., García-Ramírez, R., Rayo-Mares, D., Carreras, M., López-Pérez, M.J., et al (2009). Síndrome de Leigh causado por la mutación G14459A del ADN mitocondrial en una familia mexicana. *Rev Neurol* 49, 248-250.
11. Coelho-Miranda, L., Playan, A., Artuch, R., Vilaseca, M.A., Colomer, J., Briones, P., et al. (2000). Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS) en edad pediátrica con la mutación

A3243G en el gen del ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> del ADN mitocondrial. Rev Neuro 31, 804-811.

12. Goto, Y.-i., Nonaka, I., and Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathies. Nature 348, 651-653.

13. Pérez López-Fraile, M.I., Barrena R., Montoya, J., Marta, E. (2006). Evolución hasta el fallecimiento de dos miembros de una familia con la mutación A3243G y fenotipo MELAS frente a diabetes mellitus. Neurología 21(6), 327-332.