

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Análisis genético-molecular del síndrome de Pearson

Grado en Medicina

Armando Chaure Pardos

Junio de 2015

Directores: Julio Montoya Villarroja y Sonia Emperador Ortiz

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	4
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Las mitocondrias.	5
Genética mitocondrial.....	5
Enfermedades mitocondriales.	6
Síndrome de Pearson.	7
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Material y reactivos.	10
Material biológico.....	10
Aparatos	10
Reactivos.....	12
Métodos.	12
Extracción de ADN de diferentes tejidos con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico	12
Extracción de ADN a partir células sanguíneas.	13
Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría.....	13
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	13
Amplificación del genoma mitocondrial mediante PCR-Largo para la determinación de deleciones.	14
Digestión de ADN mitocondrial con enzimas de restricción.	16
Separación electroforética de los ácidos nucleicos: Electroforesis horizontales en geles de agarosa con bromuro de etidio.	16
Análisis de deleciones por Southern blot.	17
Análisis de los límites de la deleción.....	20
RESULTADOS.	22
Caso 1: Paciente 3089	22

Caso 2: Paciente 2995	22
Análisis genético-molecular del ADN mitocondrial.....	23
DISCUSIÓN.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	33

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las familias de los pacientes, de Ariza y de Madrid, la donación de las muestras de tejido para su estudio y análisis genético-molecular.

RESUMEN

El síndrome de Pearson es una enfermedad rara, producida por deleciones en el ADN mitocondrial. Como la mayoría de las enfermedades mitocondriales, el síndrome de Pearson tiene una afectación multisistémica caracterizada por producir vacuolización de progenitores hematopoyéticos y disfunción del páncreas exocrino. En este trabajo, se presentan dos casos de posible síndrome de Pearson para su diagnóstico genético. El primer caso es un paciente cadáver, del que se tienen muestras de distintos tejidos. El segundo caso es un paciente vivo, del que se tienen muestras de sangre. El diagnóstico se realizó mediante las técnicas de PCR larga, Southern blot y PCR-digestión con enzimas de restricción. En ambos casos se llegó al diagnóstico molecular de síndrome de Pearson por la presencia de deleciones superiores al 75% que concuerdan con la clínica de los pacientes. La deleción que presenta el primer caso es de 6516 pb, no está flanqueada por secuencias de repetición y afecta a varias secuencias de ARNt, y de subunidades de citocromo C oxidasa, ATP sintetasa y NADH deshidrogenasa. Esta deleción no se ha descrito anteriormente.

SUMMARY

Pearson syndrome is a rare disease caused by deletions in mitochondrial DNA. Like most mitochondrial diseases, Pearson syndrome is a multisystem disorder characterized by producing vacuolization of hematopoietic progenitors and exocrine pancreatic dysfunction. In this work, we present two cases of possible Pearson syndrome for genetic diagnosis. The first case is a patient's body, which have samples of different tissues. The second case is a live patient, which blood samples are taken. The diagnosis was made using long PCR techniques, Southern blot and PCR-restriction enzyme digestion. In both cases we reached a molecular diagnosis of Pearson syndrome by the presence of deletions, at a level over 75%, consistent with symptoms of patients. The deletion of the first case is 6516 bp, it is not flanked by repeat sequences and affects various tRNA, cytochrome C oxidase subunits, ATP synthase and NADH dehydrogenase genes. This deletion was not previously described.

INTRODUCCIÓN

LAS MITOCONDRIAS.

Las mitocondrias son pequeños orgánulos que están presentes en la mayoría de las células eucariotas y cuya función principal es la producción de energía celular en forma de adenosíntrifosfato (ATP). Las fases finales de esta síntesis se llevan a cabo mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) de la mitocondria, el cual se compone de cinco complejos multienzimáticos codificados en parte por el ADN mitocondrial (ADNmt) y el nuclear (ADNn) (figura 1). Cambios en la secuencia de genes mitocondriales codificados en ambos genomas dan lugar a alteraciones en la síntesis de ATP, lo que produce ciertos trastornos que denominamos enfermedades mitocondriales. (1,2,3)

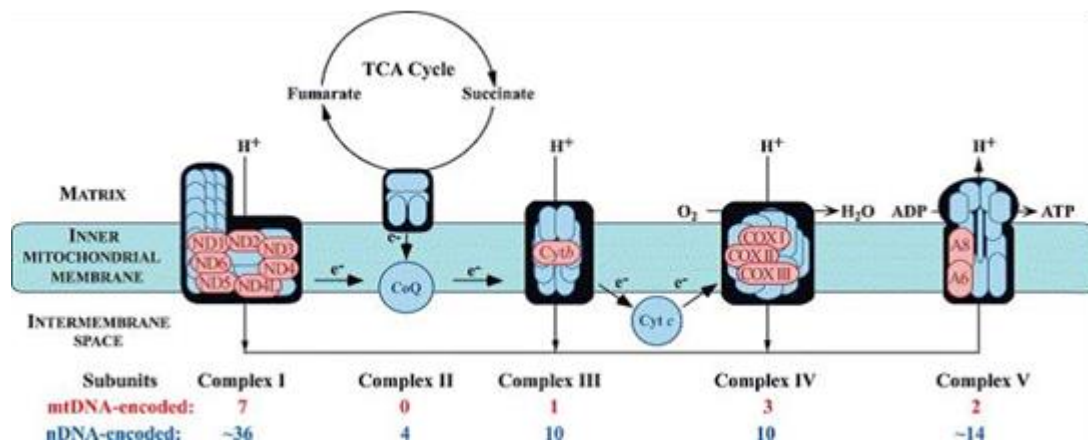


Figura 1: Esquema del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). En rojo se representan las subunidades codificadas en el ADNmt, y en azul, las subunidades codificadas en el ADN nuclear.

GENÉTICA MITOCONDRIAL

El ADNmt humano es una molécula circular de 16.569 pares de bases que codifican dos ARN ribosómicos (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 polipéptidos componentes de los complejos del sistema OXPHOS. Estos genes, se sitúan muy próximos unos de otros, sin apenas nucleótidos intermedios ni intrones (1,2,3).

El ADNmt tiene una serie de características que lo diferencian del ADNn. Una de ellas es que el ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna. Otra característica es la poliplasmia, es decir, que en cada célula hay cientos o miles de moléculas de ADNmt. También es posible la aparición de heteroplasmia, es decir, tener moléculas distintas de ADNmt en una misma célula debido a mutaciones, las cuales se distribuirán al azar a la hora de la mitosis. Además hay un efecto umbral, ya que el fenotipo dependerá de que se supere cierto porcentaje de ADNmt dañado. Por último, es importante también la alta velocidad de mutación del ADNmt, cuya tasa de mutación espontánea es unas 10 veces superior a la del ADNn. (1,2)

ENFERMEDADES MITOCONDRIALES.

Tanto mutaciones en el ADNmt como mutaciones en el ADNn, pueden producir una alteración en la síntesis del ATP y causar ciertas enfermedades en el ser humano. Sin embargo, normalmente se habla de enfermedades mitocondriales para referirse a las mutaciones del ADNmt, de herencia materna (2).

Las enfermedades mitocondriales, dado su origen, suelen dar una afectación multisistémica, en general de aquellos tejidos y órganos que más dependen de la energía mitocondrial, como son el sistema nervioso central, el músculo cardíaco y esquelético, los riñones y el sistema endocrino (1). Sin embargo, todos los tejidos tienen mitocondrias, por lo que cualquier órgano se puede ver afectado por estas enfermedades. Estas características van a dar lugar a un amplio espectro de fenotipos, ya que pueden presentarse varios síntomas bien definidos pero con poca relación aparente, o síntomas poco definidos como ocurre en los niños, o incluso verse afectado un único tejido, como ocurre con el nervio óptico en la neuropatía óptica hereditaria de Leber. (2)

Mutaciones puntuales pueden dar lugar a neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), síndrome NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentaria), síndrome de Leigh de herencia materna (MILS), síndrome de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares) o a síndrome de MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas) y otras. Deleciones pueden producir síndrome de oftalmoplejía externa progresiva (CPEO), el síndrome de Kearns-Sayre (KSS) o el síndrome de Pearson (1,2,4).

SÍNDROME DE PEARSON.

El síndrome de Pearson es una enfermedad que fue descrita por primera vez en 1979 y se calcula que tiene una incidencia de menos de 1/1.000.000 (5). En la mayoría de los casos aparecen de forma espontánea (2,6), aunque también se ha descrito la transmisión materna (7,8).

Suele deberse a grandes deleciones del ADNmt (de 2 a 9kb), en general únicas, aunque también se han descrito múltiples. En concreto, hay dos tipos de deleciones, de 4.997 y 7.436 pb, que se presentan más frecuentemente, son las deleciones comunes. Estas suelen verse flaqueadas por secuencias de repetición directa, aunque no siempre ocurre. Dada la amplitud de las deleciones, las moléculas afectas no se van a poder traducir, por lo que la mitocondria va a depender de las moléculas de ADNmt normales para realizar su función, de ahí que las deleciones se presenten siempre en heteroplasmia, pues la homoplasmia no sería compatible con la vida. El umbral se alcanza cuando hay un 60% de moléculas delecionadas (1,2,4,8).

Esta enfermedad se caracteriza por la afectación de la médula ósea, donde presentan vacuolización de progenitores granulares y eritroblásticos (figura 2), y del páncreas exocrino, aunque también pueden verse afectados otros órganos. Todo esto va a dar lugar a una anemia sideroblástica, que en ocasiones puede asociar neutropenia o trombocitopenia, malabsorción y acidosis láctica. Sin embargo, la presentación clínica es muy variable (1,2,9). Los síntomas más característicos pueden ir asociados a enfermedad hepática, tubulopatía renal, retraso en el crecimiento, oftalmoplejía externa progresiva, anomalías cardíacas, miopatía proximal con debilidad y alteraciones neurológicas (6). Además, en algunos casos, puede no presentar disfunción del páncreas exocrino, lo cual dificulta el diagnóstico de sospecha (4,10)

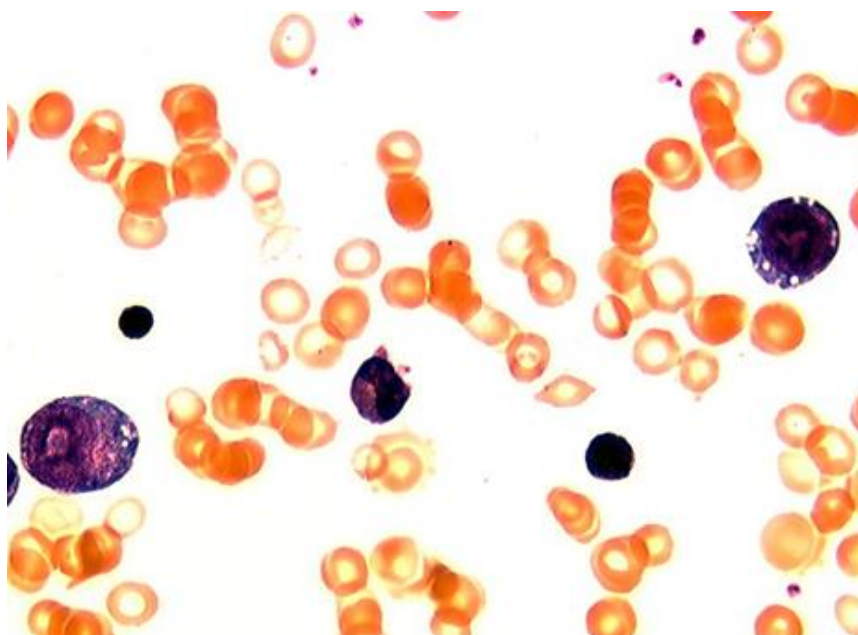


Figura 2: Frotis de médula ósea que muestra proeritrocitos vacuolados (en morado) (13).

Dado su origen mitocondrial, está producida por la presencia de delecciones grandes únicas del ADNmt, y los distintos órganos que se ven afectados, no existe un tratamiento específico para la misma. El manejo de estos pacientes será puramente sintomático, tratando las infecciones y las complicaciones metabólicas, transfundiendo sangre en casos de anemia importante y administrando enzimas pancreáticas (5).

La supervivencia en este síndrome está en torno a los tres años. Normalmente mueren por complicaciones de una sepsis, la acidosis láctica o fallo hepático (1,9,11). En aquellos pacientes que sobrepasan esta edad, es característica la resolución de los signos hematológicos y la aparición o empeoramiento de afectación neuromuscular. Algunos de ellos pueden desarrollar el síndrome de Kearns-Sayre (KSS) que cursa con oftalmoplejía, ataxia, retinitis pigmentaria, defectos de la conducción cardíaca y miopatía, que está originado también por delecciones en el ADNmt (10,8).

OBJETIVOS

En este trabajo se presentan dos casos sospechosos de padecer síndrome de Pearson cuyas muestras fueron enviadas al laboratorio del departamento de bioquímica, biología molecular y celular de la facultad de veterinaria de Zaragoza para su diagnóstico genético. Con la presentación de los casos y los métodos de diagnóstico se pretende:

- Profundizar sobre el conocimiento del síndrome de Pearson y otras enfermedades mitocondriales.
- Diagnóstico genético de paciente vivo, pues, si bien no hay un tratamiento específico, sí que puede hacerse un tratamiento sintomático orientado a esta enfermedad que mejore su calidad de vida.
- Diagnóstico genético de diferentes tejidos procedentes de cadáver, con el fin de conocer la extensión de la enfermedad.
- Incremento del número de casos publicados, que contribuyan a profundizar en la investigación de mecanismos fisiopatológicos.
- Conocimiento y análisis de las deleciones para compararlas con deleciones ya conocidas.
- Análisis de la secuencia de ADNmt que flanquea la delección con el objetivo de orientar su etiología.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y REACTIVOS.

MATERIAL BIOLÓGICO

El ADN humano se obtuvo a partir de distintas muestras biológicas: sangre, biopsias de músculo, hígado, riñón, cerebro, pulmón, bazo, páncreas, piel y grasa. Las biopsias se procesaron después de congelarse a -70°C a su llegada a nuestro laboratorio.

APARATOS

El agua utilizada fue purificada por ósmosis inversa en el sistema de purificación de agua Milli-Ro 4 de **Millipore** y posteriormente desionizada. Todos los materiales utilizados fueron previamente esterilizados.

Las reacciones de PCR tuvieron lugar en termocicladores **Biometra**, modelos T3 y Trio Termoblock y de la marca **Eppendorf** modelo Mastercycler personal.

Las electroforesis “horizontales” se realizaron en soportes 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 y escanearon en un aparato de UV modelo Gel Doc 1000 de **Bio-Rad** y se cuantificaron con el programa informático Molecular AnalysTM, versión 1.5 también de **Bio-Rad**.

Las transferencias de geles a membranas de nylon se hicieron con una unidad de Vacuum Blotting de **Pharmacia Biotech**.

Para fijar los ácidos nucleicos a las membranas se utilizó un UVcrosslinker **Hoefer**, modelo UVC500.

Las hibridaciones de las membranas se realizaron en un horno **Hybaid**, con los tubos del propio aparato, modelo HB-OV-BS y HB-OV-BL.

La exposición autorradiográfica de filtros conteniendo ácidos nucleicos marcados con digoxigenina o radiactividad se realizó con placas autorradiográficas de 18x24 cm de **Amersham** (RPN-6). Estas exposiciones se realizaron en casetes herméticas y con pantallas amplificadoras en caso necesario, ambas de la marca **Amersham**.

Los análisis densitométricos se llevaron a cabo con un densitómetro láser **LKB** (mod. Ultrascan XL), con software GelScan XL.

Para las incubaciones térmicas se utilizó un baño termostático marca **Grant**, modelo W 14 de 0 a 150°C. Las incubaciones en seco se realizaron en termoblocks marca **P-Selecta** modelo Multiplaces o en un Termomixer Compact de la marca **Eppendorf**.

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) y P 1.000 (1 ml. 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 lecturas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UVVisible UV 500 de **Unicam**, termostatzado mediante sistema Peltier también de Unicam. El registro de datos y manipulación de los mismos se realizó con el software Vision 32, versión 1.05 de Unicam.

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

Los magnetoagitadores y agitadores de tubos eran de las marcas SBS, Selecta y Heidolph.

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**.

REACTIVOS.

Las principales casas comerciales utilizadas en este trabajo para los productos químicos 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). Los oligonucleótidos empleados en dichas PCR fueron suministrados por IDTI.

El revelador G150 y el fijador G350 son de **AGFA.**

MÉTODOS.

EXTRACCIÓN DE ADN DE DIFERENTES TEJIDOS CON FENOL/CLOROFORMO/ALCOHOL ISOAMÍLICO

Con el fin de extraer ADN total del tejido se tomaron 100 mg de tejido fresco o congelado y se trituró de forma mecánica con una cuchilla estéril. El homogenado se recogió en un tubo eppendorf con tampón 1XRSB (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; NaCl 10 mM; EDTA 25 mM) y se añadió proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml y SDS al 1%. La mezcla se incubó a 37° C durante toda la noche en agitación.

Al día siguiente, los ácidos nucleicos se extrajeron realizando dos extracciones con fenol-IAC y una con cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1). Seguidamente se precipitó el DNA añadiendo dos volúmenes de etanol frío y recogiendo el ovillo o bien dejando las muestras a -20° C durante toda la noche y centrifugando después durante media hora a 13000 rpm. A continuación se eliminó completamente el etanol y el pellet se resuspendió en agua destilada libre de DNasas (volumen determinado en función del tamaño del ovillo de DNA).

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR CÉLULAS SANGUÍNEAS.

Para extraer el ADN de la sangre, se transfirió la muestra a un tubo de centrifuga, se enrasó con TE 20:5 (EDTA 0,5M, Tris-HCl 0,5M, pH8) y se mantuvo en la nevera durante 15min. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 5.000 rpm, se decantó y se resuspendió el sedimento con TE. Se volvió a centrifugar 15 min a 5.000 rpm y se decantó, resuspendió en TE y se le añadió SDS 25% y Proteinasa K. La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se añadió acetato amónico 7,5M y se pasó el pellet a un falcon de 50ml. A partir de ahí se extrajeron los ácidos nucleicos con fenol-IAC y cloroformo-álcohol isoamílico, de la misma forma que en la extracción de tejido, y se continuó desde entonces con el mismo método ya descrito.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos en nuestras preparaciones, se realizó la lectura de la absorbancia utilizando un NanoDrop®. 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 (A_{260}/A_{280}).

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.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Preparación de las muestras.

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de las muestras de ADN total disuelto en agua destilada.

Proceso de Amplificación.

Cada una de las zonas del ADN a amplificar tiene unas características peculiares, lo que obliga a adecuar las condiciones de PCR en cada uno de los casos.

Como norma general, y si no se especifica otra cosa, la reacción se llevó a cabo en tubos de 0,6 ml en un volumen final de 50 µl que contenía:

- 0,3- 0,5 µg de ADN total
- 5 µl del tampón 10X (500 mM KCl, 100 mM TRIS pH 9 y 1% TRITON X-100).
- 0,4 mM dNTPs (2 µl de una mezcla de dNTP, 10 mM de cada uno)
- 1 mM MgCl₂ (2µl de MgCl₂ 25 mM)
- 0,25 µM de cada uno de los oligonucleótidos (0,5 µl de oligonucleótidos disueltos a una concentración 25 µM)
- 1 unidad de la enzima Taq DNA Polimerasa (1µl de la enzima suministrada a 1U/µl)

Para la obtención de mejores resultados, y facilitar el trabajo, se realizó una mezcla previa que contenía todos los reactivos necesarios para todas las muestras excepto el ADN. En el 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. Los tubos con la mezcla final se mantuvieron en hielo, y se pusieron en el termociclador cuando éste alcanzó la temperatura del primer ciclo de desnaturalización.

En todas las reacciones se preparó, en paralelo, un tubo blanco, que no contenía ADN y que se utilizó como control de contaminación del proceso.

AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL MEDIANTE PCR-LARGO PARA LA DETERMINACIÓN DE DELECCIONES.

Para la amplificación del ADNmt se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- **Pareja de oligos 1:** Fragmento amplificado de 16.3 Kb
 - Long L Elena:
5'-ACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG-3'
(Posición 5': 1482)
 - Long H Elena:

5'-ACCGCCAGGTCCTTTGAGTTTTAAGCTGTGGCTCG-3'

(Posición 5': 1180)

- **Pareja de oligos 2:** Fragmento amplificado de 12 Kb
 - ND2-Long L:
5'-TTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTACTC-3'
(Posición 5': 4471)
 - Long H:
5'-CGGATACAGTTCACTTTAGCTACCCCCAAGTG-3'
(Posición 5': 16486)
- **Pareja de oligos 3:** Fragmento amplificado de 10.2 Kb
 - Long COX-F:
5'-TTAGCAGGGAAGTACTCCCA-3' (Posición 5': 6297)
 - Long H:
5'-CGGATACAGTTCACTTTAGCTACCCCCAAGTG-3'
(Posición 5': 16486)

La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl conteniendo los siguientes reactivos:

- 25 µl Master Mix
- 1 µl Long-L 1 µl Long-H
- 0,5 µg DNA
- H₂O hasta 50 µl.

El programa de amplificación utilizado en el termociclador en este caso es el siguiente:

Desnaturalización inicial:	98°C	30 seg	
Desnaturalización:	98°C	10 seg	} 30 ciclos
Extensión:	72°C	8 min 15seg	
Extensión final:	72°C	10min	
4°C			

La enzima que se emplea para realizar esta amplificación, Takara LA-Taq (Takara Shuzo Co), tiene la característica de amplificar fragmentos mayores de 14 Kpb.

DIGESTIÓN DE ADN MITOCONDRIAL CON ENZIMAS 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 a la temperatura optima y el tiempo necesario siguiendo las instrucciones de la casa comercial para cada caso.

En la siguiente tabla (tabla 1) se detallan las enzimas de restricción usadas, las condiciones de trabajo y el uso de cada una de ellas.

Tabla 1

Enzima de restricción	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Aplicación	Secuencia de reconocimiento
Ava I – fast digest	37°C	5 minutos	Mapeo de delección	5'CvYCGRG3'
Bgl I - fastdigest	37°C	5 minutos	Mapeo de delección	5'GCCNNNNvNGGC3'
PvuII	37°C	6 horas	Southern-blot	5'CAGvCTG3'

Las enzimas de restricción reconocen ciertas secuencias en el ADNmt, y es ahí donde cortan la molécula. De esta forma, como conocemos la secuencia de ADNmt completa, podemos conocer los fragmentos que nos vamos encontrar una vez digerido el ADN.

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: ELECTROFORESIS HORIZONTALES EN GELES DE AGAROSA CON BROMURO DE ETIDIO.

La agarosa se fundió en un horno microondas en el tampón TBE (50 mM Tris, 50 mM Ácido Bórico, 1mM EDTA-Na, pH 8,3), después se añadió el Bromuro de Etidio (1µg/ml) y se dejó que la solución gelificara en una bandeja cuyas dimensiones eran 10x7,6 cm.

Para comprobar las amplificaciones del ADN y analizar los diferentes fragmentos obtenidos al digerir los fragmentos de PCR con enzimas de restricción se prepararon geles entre 0.7 y 2 % de agarosa (según el tamaño de las bandas y la resolución necesaria),. La electroforesis se desarrolló a 80 voltios durante 1 hora, utilizando como marcadores de peso molecular el patrón de 1Kb de Roche. Las muestras se mezclaron con 2 µl de mezcla colorante (Ficoll 400 15%, Azul de Bromofenol 0.2%).

ANÁLISIS DE DELECCIONES POR SOUTHERN BLOT.

Para realizar el análisis del ADNmt mediante la técnica de Southern blot se necesita tener el ADN total linearizado. El enzima de restricción utilizado fue Pvu II, que produce un único corte en el ADNmt linearizándolo en la posición 2652. Las digestiones de ADN total se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl que contenían 5 µg de ADN, 1 µg de RNAsa libre de DNAsa, 5 µl del tampón de incubación 10x correspondiente al enzima, 2 µl de espermidina 50 mM y el enzima de restricción. La cantidad de enzima adicionada fue de 4 unidades/µg ADN. Se incubó a 37°C durante 6 horas. Una vez acabada la digestión se precipitó el ADN con 0,2M de NaCl y 100 µl de etanol frío. Se deja a -20°C toda la noche, o a -70°C durante 1 hora. A continuación se centrifuga a 13000 rpm en microfuga durante 30 minutos a 4°C y se resuspende en 10 µl de agua destilada.

A continuación se prepararon geles de Agarosa al 0,7% en tampón de electroforesis TBE con Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml). Las muestras de ADN total contenían 5 µg de ADN total digerido con PvuII en un volumen de 10 µl a los que se añadió 2 µl de mezcla colorante (Ficoll 400 15%, Azul de Bromofenol 0,2%).

Paralelamente se utilizó un patrón del fago λ digerido con Hind III y marcado con digoxigenina (Roche) como marcador de peso molecular. La electroforesis se desarrolló a 50 voltios durante 15 minutos para facilitar la entrada de las muestras. Seguidamente el voltaje se aumentó a 100 voltios hasta que transcurrió un tiempo total de 3-4 horas.

En todos los casos, una vez concluida la electroforesis, se procedió a la visualización del ADN, bajo una fuente de radiación UV y posterior escaneado de los geles.

Hibridación Southern.

Transferencia y fijación de ADN a membranas de Nylon.

La transferencia del ADN previamente digerido con el enzima de restricción PvuII, que lineariza el ADN mitocondrial y separado electroforéticamente por tamaño, a membranas de nylon se realizó siguiendo la técnica de Southern, utilizando un aparato de transferencia al vacío.

Antes de comenzar la transferencia se procedió a la preparación del aparato. Para ello, se humedeció en agua destilada el soporte poroso y la membrana de nylon. A continuación, se colocó la membrana entre el soporte del aparato y la máscara, en la ventana preparada para ello, asegurándose que no hubiera burbujas entre la membrana y la pantalla porosa (soporte). Después se colocó el gel sobre la ventana, encima de la membrana, y se conectó la bomba de vacío, hasta obtener 50 mbar. En este momento comenzó el tratamiento del gel y la transferencia del ADN. En primer lugar, se añadió sobre el gel la solución de despurinización (0,25 M HCl), hasta que se cubrió totalmente, durante 7 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se inclinó la unidad para eliminar el líquido residual. Seguidamente se añadió la solución de desnaturalización (1,5 M NaCl, 0,5M NaOH) hasta cubrir de nuevo el gel. Se dejó otros 7 minutos y se eliminó el líquido de la forma indicada anteriormente. A continuación, se añadió la solución de neutralización (1M TRIS, 1,5 M NaCl, pH=7,5) y se dejó otros 7 minutos.

Después, se realizó la transferencia por vacío. Para ello se añadió solución de transferencia 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Citrato Trisódico, pH=7-7,2) sobre el gel hasta cubrir toda la unidad para asegurarnos la completa transferencia a la membrana. Se dejó durante 30 minutos y se procedió a la eliminación del líquido de la misma forma que antes.

Concluida la transferencia, levantamos una esquina del gel y apagamos el vacío. La transferencia de los fragmentos de ADN del gel se comprobó mediante la visualización de éste bajo una fuente de radiación UV.

La membrana de nylon con los ácidos nucleicos transferidos se lavó en 2xSSC durante 5 minutos para eliminar posibles restos de agarosa. Se colocó en papel de filtro y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Finalmente, los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana mediante radiación ultravioleta en un UV Crosslinker con una energía de $120.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$.

Hibridación del DNA con sondas no radiactivas.

Las membranas de nylon que contenían los fragmentos de ADN fijados se colocaron en tubos de hibridación (Hybaid HB-OV-BS) con una solución de prehibridación cuya composición era 0,25M Na₂HPO₄ (pH=7,2), 1mM EDTA, 20% SDS y 0,5% de agente de bloqueo ("Blocking Reagent" de Roche). La proporción de solución de prehibridación utilizada fue de al menos 0,2 ml/cm² de membrana y se añadió precalentada a 68°C. La prehibridación se llevó a cabo por incubación a 68°C durante 2 horas en un horno giratorio. A continuación, se procedió a la hibridación, para lo cual se retiró la solución de prehibridación y se añadió la solución de hibridación, compuesta de 0,1 ml de solución de prehibridación/cm² de membrana a la que se le había añadido la sonda no radiactiva, previamente desnaturalizada en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y enfriada rápidamente (2,5 µg DNA marcado/ml solución). Se incubó a 68°C durante 16-18 horas (toda la noche).

Transcurrido el tiempo de incubación con la correspondiente sonda, se lavó la membrana tres veces durante 20 minutos en el mismo tubo y a 68°C en el horno giratorio con 50 ml de tampón de lavado (20 mM Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 1% SDS); las soluciones de lavado estaban precalentadas a 68°C.

Detección de los híbridos de ADN mediante inmunoensayo.

Los híbridos se detectaron mediante enzimoimmunoensayo. Para ello, se realizaron una serie de lavados de las membranas en bandejas pequeñas colocadas en un balancín a temperatura ambiente.

Las membranas que contenían los híbridos se trataron durante 5 minutos en tampón T1 (0,1 M ácido maléico, 3 M NaCl, 0,3% Tween 20, pH=8 con NaOH). Seguidamente, se incubó durante 60 minutos en tampón de bloqueo T2 (10 mM ácido maléico, 0,3 M NaCl, 0,03% Tween 20, pH=8, 0,5% agente bloqueante). Todos estos tratamientos se realizaron de forma que la membrana estuviera totalmente cubierta.

A continuación se añadió el tampón T3 (anticuerpo Anti-Dig-AP conjugado en tampón T2, dilución 1:15000). Conviene centrifugar antes el anticuerpo durante 5 minutos en microfuga a 10000 rpm y coger la cantidad necesaria de la superficie. Esta disolución se añadió sobre la membrana y se incubó durante 30 minutos. Después, se eliminó el exceso

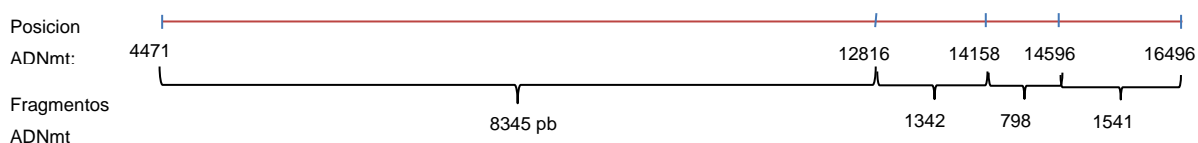
de anticuerpo lavando la membrana cuatro veces durante 10 minutos con 50 ml de T1. Posteriormente, se equilibró la membrana durante 20 minutos con tampón de detección T4 (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, 50 mM MgCl₂ pH=9,5) y seguidamente se incubó en 30 ml de solución con substrato fluorescente (CDP*-star de Roche). Esta dilución se preparó con tampón T4 (dilución 1:200) y se incubó con la membrana durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se escurrió la membrana, se puso en una bolsa de plástico sellada y seguidamente se expuso con placas de rayos X durante diferentes tiempos (3-20 minutos). La disolución de detección se recicló para utilizar de 4 a 6 veces.

ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE LA DELECCIÓN.

Para conocer la posición exacta de la mutación y con ello los genes afectados por la misma se procedió de la siguiente manera:

Mapeo de la delección con enzimas de restricción

En primer lugar se realizó el mapeo de la delección mediante el corte de uno de los amplificados de PCR larga con distintas enzimas de restricción. Estas enzimas cortan el ADNmt en posiciones ya conocidas, de tal forma que según los fragmentos de restricción que encontremos podremos deducir en que zona aproximada se encuentra la delección. Inicialmente, se utilizó la enzima Ava1, que sabemos que corta el ADN en 4 fragmentos siguiendo este esquema:



Posteriormente se utilizó la enzima Bgl1, que tiene los siguientes puntos de corte:



Amplificación por PCR de la región que flanquea a la delección.

El siguiente paso para encontrar los límites exactos de la delección fue la amplificación mediante PCR convencional. Para ello, se emplearon oligonucleótidos próximos a las regiones que previamente habíamos confirmado que se encontraban en la muestra del paciente mediante la digestión con enzimas de restricción. Se decidió utilizar dos parejas de oligos, la primera pareja fue HMTL-6563 y HMTH-14432 y la segunda HMTL-5828 y HMTH-13627.

Detección de los límites de la delección por secuenciación automática

Tras obtener los amplificados de PCR, se prepararon para enviarlos al servicio de secuenciación.

Para ello los amplificados de PCR se purificaron con el reactivo Exoshap siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. Posteriormente serían enviados a un servicio de secuenciación externo y analizadas usando el programa Sequencher 4.1.4.

RESULTADOS.

CASO 1: PACIENTE 3089

Lactante de 2 meses de edad que fue remitido al servicio de hemato-oncología pediátrica del Hospital Universitario La Paz de Madrid para el estudio de anemia y neutropenia.

Producto de una unión no consanguínea. Padre de 39 años de edad y madre de 33, ambos sanos. Embarazo controlado y sin complicaciones. Parto eutócico. Edad gestacional: 40+1, peso al nacer: 2650g, longitud al nacer: 47cm, Apgar:10/10. Se observa palidez mucocutánea.

Ingreso a las 50 horas de vida por anemia y a los 13 días por escasa ganancia de peso, lo que se le diagnostica de anemia crónica y neutropenia, requiriendo transfusiones en el ingreso. En sucesivas revisiones presenta gran deterioro del estado general y retraso en el desarrollo psicomotor secundario a debilidad.

Se realizaron varias analíticas sanguíneas que mostraron anemia en primer lugar microcítica, que con el tiempo evolucionó hacia la macrocitosis. También se observó neutropenia moderada, con el resto de la serie blanca dentro de los valores normales. El perfil hepático a los dos meses de vida mostró GOT:201, GPT:147 y GGT:160 .

Con el fin de conocer el origen de la anemia se le realizó estudio del hierro, que fue normal y test de Coombs, que fue negativo. El paciente falleció a los 5 años de edad, tras lo cual se tomaron biopsias de varios tejidos para su estudio molecular.

CASO 2: PACIENTE 2995

Lactante de 8 meses de edad que debutó con fiebre, palidez y petequias. Sin antecedentes personales ni familiares de interés. Además, presentó exantema de predominio en cara y deposiciones semilíquidas.

En las pruebas complementarias destacaba pancitopenia en el hemograma y serología positiva para *Mycoplasma pneumoniae*. Para estudio de la pancitopenia se le hizo un aspirado de médula ósea, la cual se vio muy hipocelular.

El paciente requiere transfusiones de concentrados de hematíes cada 21-28 días y plaquetas de forma intermitente. Además, está en tratamiento antibiótico profiláctico, ya que tiene múltiples infecciones de repetición, y con enzimas pancreáticas.

Dada la asociación de los síntomas y la experiencia del equipo médico con otro paciente se tomaron muestras para análisis de delección.

ANÁLISIS GENÉTICO-MOLECULAR DEL ADN MITOCONDRIAL.

Se obtuvieron muestras de tejido de sangre, músculo, hígado, riñón, cerebro, pulmón, bazo, páncreas, piel y grasa, de las cuales se extrajeron las muestras de ADN.

Con estas muestras, se realizó una amplificación mediante la técnica de PCR-larga con lo que se confirmó la presencia de delección en todos los tejidos disponibles (figuras 3 y 4). En ellas se observa que todas las muestras han migrado más (están más bajas) que el control negativo, lo que significa que son más cortas, y por lo tanto tienen delección. Cuando una molécula de DNA es más corta, tiene una mayor facilidad para migrar en la electroforesis.

Con esta técnica se puede detectar la presencia de una delección en contraste con un control negativo, sin embargo, dado que las cadenas más cortas, es decir, las portadoras de delección, tienen ventaja replicativa, y por lo tanto se amplificarán en mayor proporción que las copias sin deleccionar, es imposible conocer el grado de heteroplasmia.

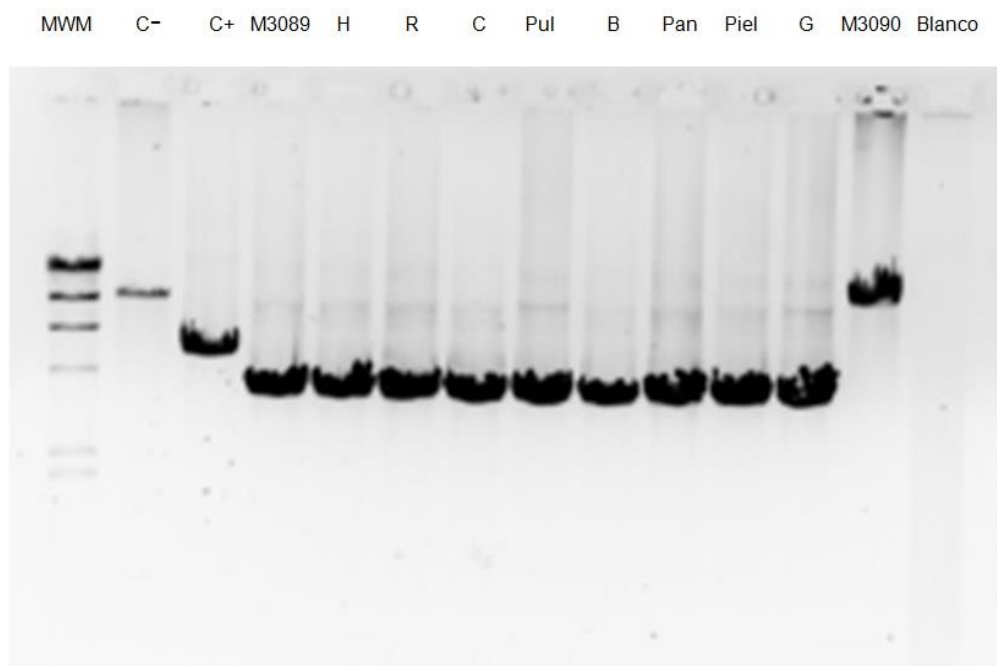


Figura 3: Amplificación con PCR larga de 3089 con oligos COX. MWM (marcador de peso molecular), C- (control negativo), C+ (control positivo), M3089 (músculo), H (hígado), R (riñón), C (cerebro), Pul (pulmón), B (bazo) Pan (páncreas) G (grasa), todos ellos de 3089.

C- C+ S2995

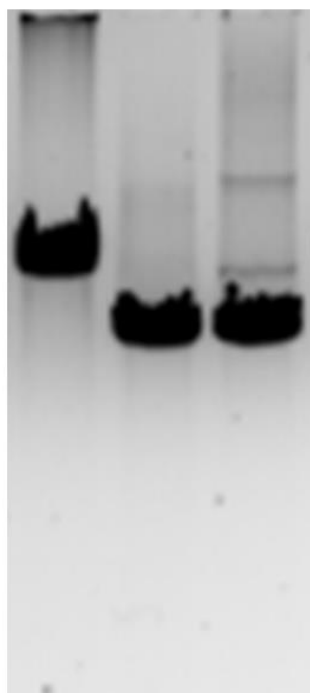


Figura 4: Amplificación por PCR larga de 2995 con oligos COX. C- (control negativo), C+ (control positivo), S2995 (sangre de 2995)

Para conocer el grado de heteroplasma se recurrió al análisis del ADN por hibridación Southern, que nos dio la siguiente imagen (figura 5).

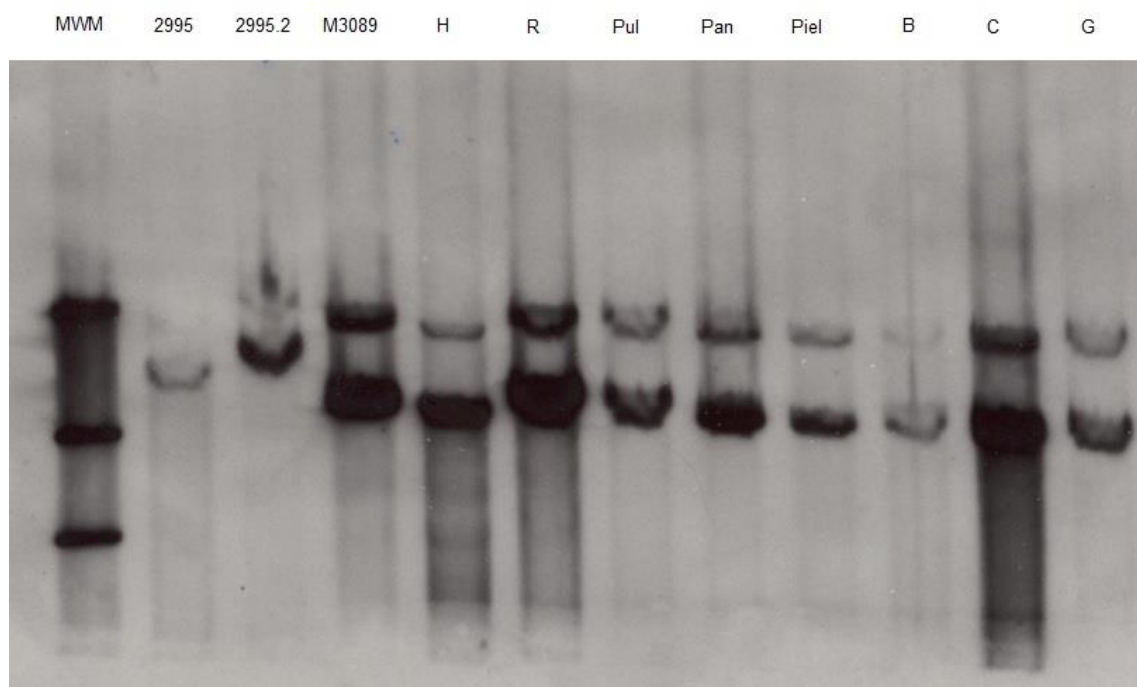


Figura 5: Autoradiografía Southern con una exposición de 15 minutos. MWM (marcador de peso molecular), M3089 (músculo 3089), H (hígado 3089), R (riñón 3089), Pul (pulmón 3089), Pan (páncreas 3089), B (bazo 3089), C (cerebro 3089), G (grasa 3089).

En esta imagen se observa que todas las muestras presentan dos bandas, lo que significa que tienen moléculas de ADNmt de tamaños distintos, es decir, que tienen heteroplasma. También se observa que las bandas que más han migrado (las que están más abajo) son más densas que las bandas que menos han migrado (las que están más arriba). Esto quiere decir que hay una mayor proporción de moléculas delecionadas que de moléculas normales. En esto nos basamos para una vez escaneada la imagen, analizarla densitométricamente, lo que nos mostró los siguientes porcentajes de heteroplasma en ambos pacientes (tabla 2)

Tabla 2

Muestra	% de moléculas delecionadas.
Músculo (3089)	80%
Hígado (3089)	90%
Riñón (3089)	85%
Pulmón (3089)	75%
Páncreas (3089)	75%
Piel (3089)	80%
Grasa (3089)	75%
Bazo (3089)	80%
Cerebro (3089)	85%
Sangre (2995)	75%

Finalmente, una vez conocidos los grados de heteroplasmia se procedió a la delimitación de la mutación, la cual solo se realizó en el caso 3089.

En primer lugar se realizó el mapeo de la delección mediante el corte de uno de los amplificadores de PCR larga con distintas enzimas de restricción. Inicialmente, se utilizó la enzima Ava1 (figura 6). En el caso de nuestra muestra, de los fragmentos de restricción esperados sólo aparecieron los correspondientes a los tamaños de 798 y 1541 pares de bases, pero no los de 8345 y 1342, por lo que de esto se dedujo que la posición 12816 no estaba presente en nuestra muestra (por estar delecionada), y sin embargo, si lo estaban las demás (figura 7).



Figura 6: Electroforesis de amplificado cortado con la enzima de restricción Ava1.

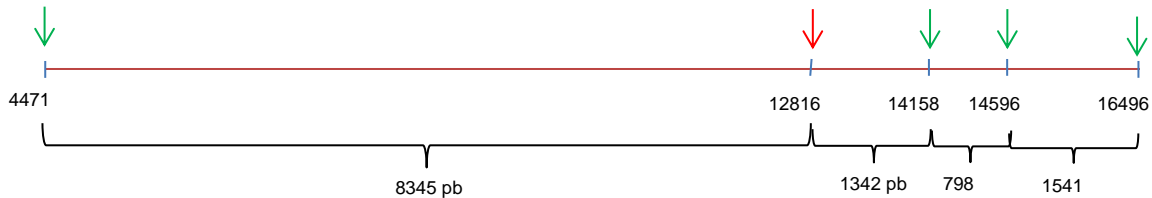


Figura 7: esquema de digestión con Ava 1. La primera fila de números son los puntos de corte de la enzima. La segunda fila son los fragmentos que esperaríamos encontrar en una muestra normal. Las flechas verdes representan los puntos de corte encontrados, la flecha roja representa el punto no encontrado.

Posteriormente se utilizó la enzima Bgl1, tras la cual el único fragmento esperado que encontramos fue el de 1564 pares de bases, por lo que se dedujo que la posición 6965 no estaba presente, y sí que lo estaba la posición 6035. Con estos resultados, pudimos mapear la zona aproximada dónde se encontraba la delección. Esta región se encontraba entre las posiciones 6035 y 14158 (figura 8).

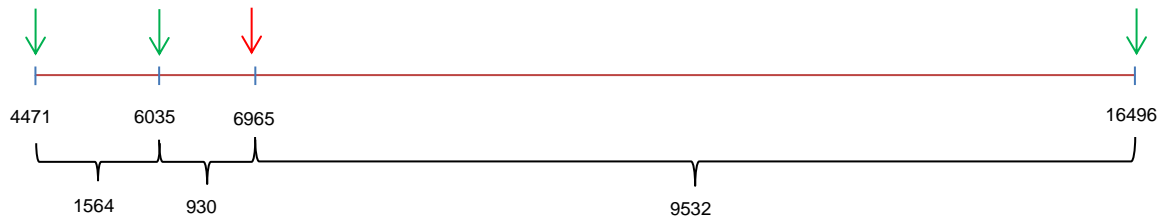


Figura 8: esquema de digestión con BglI.

El siguiente paso para encontrar los límites exactos de la delección fue la amplificación mediante PCR convencional. Para ello, se emplearon oligonucleótidos próximos a las regiones que previamente habíamos confirmado que se encontraban en la muestra del paciente mediante la digestión con enzimas de restricción. Se decidió utilizar dos parejas de oligos, la primera pareja fue HMTL-6563 y HMTH-14432 y la segunda HMTL-5828 y HMTH-13627 (figura 8).

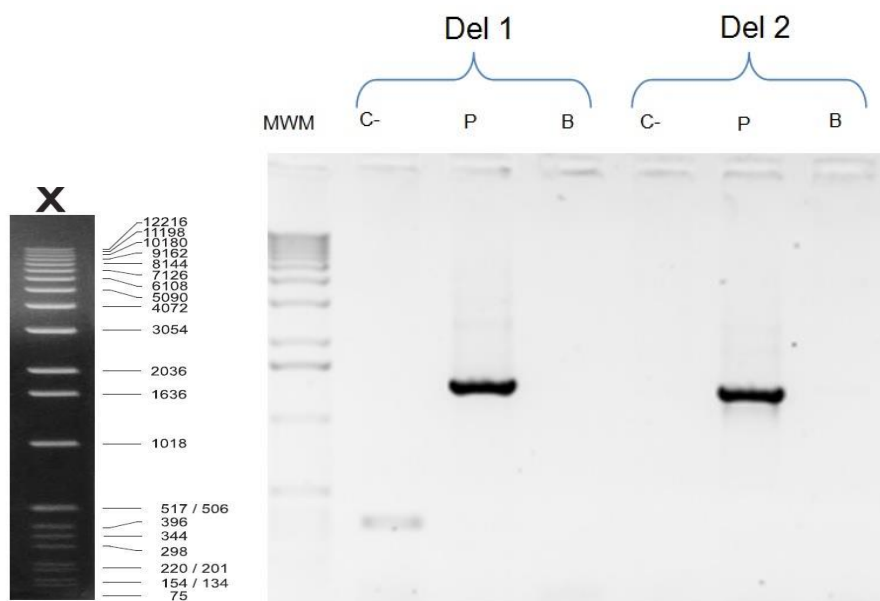


Figura 8: Amplificación de M3089 mediante PCR con las dos parejas de oligonucleótidos.

La imagen de la derecha muestra la leyenda del marcador de peso molecular (MWM). La de la izquierda muestra los amplificados con las dos parejas de oligonucleótidos: HMTL-6563 y HMTH-14432 (Del 1) y HMTL-5828 y HMTH-13627 (Del 2).

Ambas secuencias amplificaron, por lo que las posiciones 6563 y 13627, hasta ahora desconocidas estaban presentes en la muestra, y entre ellas se encontraba la deleción. El amplificado obtenido fue de aproximadamente 1500 pb, cuando debería ser de 7800 pb, por lo que se puede deducir que la deleción era de unas 6300 pb. Tras estos resultados, las muestras se mandaron para su secuenciación automática a un servicio externo.

Los resultados obtenidos de la secuenciación automática mostraron una deleción de 6516 pb, faltando el ADNmt situado entre la posición 6897 y 13414. La secuencia seguida era la siguiente, siendo las bases en rojo las que faltaban en nuestra muestra:

ACGGAAGCAATA [TGAAATGATCTG \longleftrightarrow ATTCGAAAAATA] GGAGGACTACTC

DISCUSIÓN

Se han presentado dos casos de síndrome de Pearson. En ambos, nos encontramos con dos lactantes de muy corta edad (2 y 8 meses) que debutan con citopenias una de las afectaciones más frecuentes de esta enfermedad. El caso 1 presenta gran deterioro del estado general, daño hepático en la analítica y retraso en el desarrollo psicomotor secundario a debilidad. El caso 2 se caracteriza por la disfunción del páncreas exocrino, petequias e infecciones de repetición.

En el primer caso cabría destacar también la ausencia de clínica pancreática, la cual es muy característica del síndrome de Pearson. Este hallazgo, aunque singular, ya ha sido descrito con anterioridad (4,10,12,11,6).

En ninguno de los casos se observan familiares con clínica, lo que nos lleva a pensar, aun a falta de una confirmación biológica-molecular, en la aparición de forma espontánea de la delección, como ocurre en la mayoría de los casos descritos de Pearson (1,2,6)

En el primer caso, al ser donante cadáver, hemos podido disponer de gran cantidad de muestras y todas ellas presentaban un alto porcentaje de heteroplasmia, muy por encima del 60% que se considera diagnóstico (1,2). Esta afectación multisistémica podría ser la causante del gran deterioro general que presentaba el paciente, ya que se ha observado que podría haber una relación entre el nivel de heteroplasmia y la afectación del órgano en el que se encuentra (8).

En el segundo caso, que todavía vive, solo hemos tenido acceso a una muestra sanguínea, pero la heteroplasmia era del 75%, por lo que también sería diagnóstica.

En el caso 1, la delección encontrada fue de 6516 pb, por lo que no coincide con ninguna de las delecciones comunes conocidas (1,2,4,12,11). Tampoco se encontraron en la secuenciación secuencias de repetición que pudieran orientar a la etiología de la delección.

Conociendo el segmento de ADNmt del caso 1 podemos saber qué genes le faltan, que serán los siguientes (tabla 3).

Tabla 3 (14)

Locus	Inicio	Final	Abreviatura	Descripción
MT-CO1	5904	7445	COI	Citocromo C oxidasa. Subunidad I
MT-TS1	7446	7514	S(UCN)	ARNt serina 1
MT-NC6	7515	7517	NC6	Nucleótidos sin codificación
MT-TD	7518	7585	D	ARNt ácido aspático
MT-CO2	7586	8269	COII	Citocromo C oxidasa, subunidad II
MT-NC7	8270	8294	NC7	Nucleótidos sin codificación
MT-TK	8295	8364	K	ARNt lisina
MT-NC8	8365	8365	NC8	Nucleótido sin codificación
MT-ATP8	8366	8572	ATPasa8	ATP sintetasa F0 subunidad 8
MT-ATP6	8527	9207	ATPasa6	ATP sintetasa F0 subunidad 6
MT-CO3	9207	9990	COIII	Citocromo C oxidasa subunidad III
MT-TG	9991	10058	G	ARNt glicina

MT-ND3	10059	10404	ND3	NADH deshidrogenasa subunidad 3
MT-TR	10405	10469	R	ARNt arginina
MT-ND4L	10470	10766	ND4L	NADH deshidrogenasa, subunidad 4L
MT-ND4	10760	12137	ND4	NADH deshidrogenasa subunidad 4
MT-TH	12138	12206	H	ARNt histidina
MT-TS2	12207	12265	S(AGY)	ARNt serina 2
MT-TL2	12266	12336	L(CUN)	ARNt leucina 2
MT-ND5	12337	14148	ND5	NADH deshidrogenasa subunidad 5

Observamos que la delección abarca múltiples locus, y que faltan varias secuencias de ARNt, y de subunidades de citocromo C oxidasa, ATP sintetasa y NADH deshidrogenasa. Si todas las moléculas de ADNmt tuvieran la delección, no se podrían sintetizar ciertas proteínas ni los complejos enzimáticos mencionados, por lo que se puede afirmar que las grandes delecciones se producen necesariamente en heteroplasmia, pues una homoplasmia sería incompatible con la vida (1,2,8).

En ambos casos vemos que la enfermedad se inició con signos poco específicos, pero que tras descartar otras etiologías y en asociación a otros, como debilidad muscular o disfunción pancreática, pueden ser sugestivos de enfermedad mitocondrial. El síndrome de Pearson es una enfermedad muy poco frecuente, que requiere estudio del ADNmt para su diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Montoya J, Emperador S, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E. Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial. In Sanjurjo P, Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Cuarta ed. Madrid: Ergon; 2014. p. 773-790.
2. Andreu A, Arenas J, Montoya J. Enfermedades del ADN mitocondrial. In Pascual Gómez J, editor. Tratado de Neurología.: Luzán 5; 2012. p. 1149-1162.
3. Alcaine MJ, Solano A, Playán A, Vilaseca MA, Martí M, López-Pérez MJ, et al. Síndrome de NARP producido por una mutación T-G de novo en la posición 8993 del DNA mitocondrial humano. *Química Clínica*. 2001; 20(2): p. 64-66.
4. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi G, et al. Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. *J Neurol*. 2015 Mayo; 262(5).
5. Garçon L. orphanet. [Online].; 2006 [cited 2015 Mayo 18. Available from: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=699.
6. Cammarata-Scalisi F, López-Gallardo E, Emperador S, Ruiz-Pesini E, Da Silva G, Camacho N, et al. Síndrome de Pearson. Reporte de un caso. *Invest Clin*. 2011; 52(3): p. 261-267.
7. Casademont J, Barrientos A, Cardellach F, Rötig A, Grau J, Montoya J, et al. Multiple deletions of mtDNA in two brothers with sideroblastic anemia and mitochondrial myopathy, and in their asymptomatic mother. *Hum. Mol. Genet*. 1994; 3: p. 1945-1949.
8. Guirado Giménez F, Montoya Villarroya J, Oliván del Cacho MJ, Playán Ariso A, Alcaine Villarroya MJ, Rábano Rodríguez A, et al. Paciente con síndrome de Pearson y de Kearns-Sayre y la delección común de 4,9Kb del ADN mitocondrial en sangre. *An Esp Pediatr*. 1998; 49(5): p. 510-512.
9. Chen X, Zhao S, Wang D, Dong C, Yang Y, Wang Z, et al. A novel mitochondrial DNA deletion in a patient with Pearson syndrome and neonatal diabetes mellitus provides insight into disease etiology, severity and progression. *Mitochondrial DNA*. 2015 Mayo 27;; p. 1-4.
10. Crippa B, Leon E, Calhoun A, Lowichik A, Pasquali M, Longo N. Biochemical abnormalities in Pearson syndrome. *Am J Med Genet A*. 2015 Marzo; 167(3).
11. Park J, Ryu H, Jang W, Chae H, Kim M, Kim Y, et al. Novel 5.712 kb mitochondrial DNA

deletion in a patient with Pearson Sundrome: a case report. Mol Med Rep. 2015 Mayo; 11(5).

12. Shapira A, Konopnicki M, Hammad-Saied M, Shabad E. Pearson disease in an infant presenting with severe hypoplastic anemia, normal pancreatic function, and progressive liver failure. J Pediatr Hematol Oncol. 2014 Julio; 36(5).
13. Pernik N. PathologyOutlines.com. [Online].; 2013 [cited 2015 Mayo 18. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowpearson.html>.
14. Mitomap. [Online].; 2015 [cited 2015 Mayo 25. Available from: <http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/GenomeLoci>.