



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HETEROPLASMA DE LA MUTACIÓN
m.3243A>G EN DIFERENTES TEJIDOS Y EL FENOTIPO EN FAMILIAS CON
DIABETES Y SORDERA DE HERENCIA MATERNA (MIDD) Y MELAS**

Jorge Luis Granadillo De Luque

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Genética Humana
Bogotá D.C., Colombia
2015**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HETEROPLASMA DE LA MUTACIÓN
m.3243A>G EN DIFERENTES TEJIDOS Y EL FENOTIPO EN FAMILIAS CON
DIABETES Y SORDERA DE HERENCIA MATERNA (MIDD) Y MELAS**

Jorge Luis Granadillo De Luque

Tesis como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Genética Humana

Director:

Dr. Juan Manuel Arteaga Díaz

Codirectora:

Dra. Clara Eugenia Arteaga Díaz

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Genética Humana
Bogotá D.C., Colombia**

2015

A Dios, origen de todo conocimiento, y a mi esposa, padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes y sus familias

Al director y a la codirectora de esta investigación, cuya guía, conocimiento y esmero hicieron posible este trabajo.

A los doctores Johanna Galvis, Manuel Luna, Leonardo Hernández y a MetabolicaMed Ltda., por su ayuda en la consecución de pacientes.

A Diana Mayorga y Tatiana Vinasco, por su ayuda en las actividades del laboratorio.

Al laboratorio de Genética Médica de Baylor College of Medicine, en especial a la Dra. Jin Wang, por su ayuda en la realización de las pruebas moleculares.

Al Dr. Fernando Scaglia, cuyo trabajo y guía fueron motivación para indagar aún más en el campo de las enfermedades mitocondriales.

Al cuerpo docente de la maestría en genética humana de la universidad nacional de Colombia por su formación.

Resumen

El MELAS y la Diabetes y Sordera de Herencia Materna (MIDD) son enfermedades mitocondriales producidas en la mayor parte de los casos por una misma mutación: la m.3243A>G, la cual afecta al gen *MT-TL1*. Esto muestra la gran variabilidad fenotípica de dicha mutación. Una de las posibles causas de esta variación puede ser el nivel de heteroplasmia de la mutación. Este trabajo se propuso evaluar si existe relación entre el nivel de heteroplasmia en tres tejidos y el fenotipo. Fueron incluidas 3 familias con diagnóstico clínico de MELAS y 2 con diagnóstico clínico de MIDD. Se evaluó la presencia de la mutación y el nivel de heteroplasmia mediante ARMS-qPCR EN sangre, orina y mucosa oral. Una familia con MELAS resultó positiva para la mutación m.3243A>G. Se evidenció una gran variabilidad fenotípica. El probando tenía una mayor heteroplasmia en los 3 tejidos en comparación con sus familiares oligosintomáticos. Se reporta el primer paciente en Colombia con MELAS y la mutación m.3271T>C y se realizó un análisis de estas familias.

Palabras clave: Mitocondria, Diabetes y Sordera de Herencia Materna, MELAS, Diabetes Mellitus, heteroplasmia.

Abstract

MELAS and Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD) are mitochondrial diseases produced in most cases by the same mutation: m.3243A>G, which affects the *MT-TL1* gene. This reveals the great phenotypic variability of this mutation. One of the possible causes of this could be the mutation's heteroplasmy level. This project aimed to assess if there is a relation between the heteroplasmy level in three tissues and the phenotype. 3 families with a clinical diagnosis of MELAS and 2 families with a clinical diagnosis of MIDD were included. The presence and heteroplasmy level of the mutation were assessed via ARMS-qPCR on blood, urine and oral mucosa. One family with MELAS rendered positive for the m.3243A>G mutation. A great phenotypic variation was found. The proposita had a greater heteroplasmy level in all 3 tissues compared to her oligosymptomatic relatives. The first Colombian patient with MELAS and the m.3271T>C mutation is reported. These families were further analyzed.

Keywords: Mitochondria, Maternally Inherited Diabetes and Deafness, MELAS, Diabetes Mellitus, heteroplasmy.

Tabla de contenido

Resumen.....	V
Tabla de contenido.....	VII
LISTADO DE FIGURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	3
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 ENFERMEDADES MITOCONDRIALES	5
4.2 DIABETES Y SORDERA DE HERENCIA MATERNA (MIDD)	7
4.2.1 Definición	7
4.2.2 Historia	7
4.2.3 Epidemiología	7
4.2.4 Descripción Clínica.....	7
4.2.5 Genética.....	9
4.2.6 Fisiopatogenia.....	10
4.2.7 Tratamiento	13
4.3 MELAS	15
4.3.1 Historia	15
4.3.2 Definición y Diagnóstico	15
4.3.3 Epidemiología	16
4.3.4 Descripción Clínica.....	16
4.3.5 Genética.....	19
4.3.6 Fisiopatología	19
4.3.7 Tratamiento	21
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1 Tipo de estudio	23

5.2	Tamaño de la muestra.....	23
5.3	Ingreso al estudio.....	23
5.3.1	Criterios de selección.....	24
5.4	FASE PRE ANALÍTICA.....	25
5.4.1	Muestras.....	25
5.4.2	Extracción de ADN.....	25
5.5	FASE ANALÍTICA.....	26
5.5.1	Detección de la mutación m.3243A>G.....	26
5.5.2	Exámenes Complementarios.....	38
6.	RESULTADOS.....	39
6.1	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	39
6.1.1	Familia MELAS 1.....	39
6.1.2	Familia MELAS 2.....	42
6.1.3	Familia MELAS 3.....	43
6.1.4	Familia MIDD 1.....	44
6.1.5	Familia MIDD 2.....	45
6.2	RESULTADOS DE LA ARMS-qPCR PARA LA MUTACIÓN m.3243A>G.....	46
6.3	Resultados de estudios complementarios.....	49
7.	DISCUSION.....	51
8.	CONCLUSIONES.....	59
9.	PERSPECTIVAS.....	61
10.	ANEXOS.....	63
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	70

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. Distrofia MACULAR EN PATRÓN. TOMADO DE GUILLAUSSEAU,P.J. <i>ET AL.</i> 2001	8
FIGURA 2. MODELO DE RELACIÓN ENTRE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y RESISTENCIA A LA INSULINA. TOMADO DE LOWELL BB. 2005	11
FIGURA 3. RELACIÓN ENTRE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS B. TOMADO DE LOWELL BB. 2005.	12
FIGURA 4. RNM DE PACIENTE DURANTE EPISODIO SIMILAR A APOPLEJÍA. TOMADO DE BAI,R.K. & WONG,L.J. 2004.	18
FIGURA 5. CRECIMIENTO DE COLONIAS TRANSFORMADAS.....	30
FIGURA 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE PRODUCTOS DE PCR DE CLONES. . L: MARCADOR DE PESO MOLECULAR. B: BLANCO. 1-5: CLONES POSITIVOS WILD TYPE. 6-9: CLONES POSITIVOS MUTANTES. 10: CLON NEGATIVO (CONTROL NEGATIVO).....	33
FIGURA 7. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS PLÁSMIDOS CON INSERTO WILD TYPE Y MUTANTE. WT: WILD TYPE; MUT: MUTANTE. POSICIÓN DE MUTACIÓN PUNTUAL RESALTADA CON UN CÍRCULO ROJO.....	34
FIGURA 8. CONDICIONES DE PCR EN TIEMPO REAL	37
FIGURA 9. ÁRBOL GENEALÓGICO FAMILIA MELAS 1.	41
FIGURA 10. ÁRBOL GENEALÓGICO FAMILIA MELAS 2.	42
FIGURA 11. ÁRBOL GENEALÓGICO FAMILIA MELAS 3.	44
FIGURA 12. ÁRBOL GENEALÓGICO FAMILIA MIDD1.	45
FIGURA 13. ÁRBOL GENEALÓGICO FAMILIA MIDD2.	46

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. RECOMENDACIONES DE MANEJO PARA PACIENTES CON MIDD.	14
TABLA 2. INSERTOS MUTANTE Y WILD TYPE (WT).....	27
TABLA 3. PRIMERS PARA GENERACIÓN DE INSERTOS WILD TYPE.	27
TABLA 4. PROTOCOLO DE PCR PARA GENERACIÓN DE INSERTO WILD TYPE.	28
TABLA 5. REACTIVO DE PCR PARA GENERACIÓN DE INSERTO WILD TYPE.....	28
TABLA 6. REACCIÓN DE ADICIÓN DE ADENINAS A EXTREMOS 3'.....	29
TABLA 7. REACTIVOS REACCIÓN DE CLONACIÓN.	29
TABLA 8. REACTIVOS PARA PCR DE COLONIA (POR REACCIÓN)	31
TABLA 9. PROTOCOLO DE PCR PARA ANÁLISIS DE COLONIAS.....	32
TABLA 10. DILUCIONES DEL PLÁSMIDO WT	36
TABLA 11. DILUCIONES DEL PLÁSMIDO MUTANTE.	36
TABLA 12. REACTIVOS PARA PCR EN TIEMPO REAL.....	37
TABLA 13. PRIMERS PARA LA PCR EN TIEMPO REAL.	37
TABLA 14. RESULTADOS DE ARMS-QPCR PARA LA MUTACIÓN M.3243A>G. MI: MUESTRA INSUFICIENTE. NA: NO APLICA.....	48
TABLA 15. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS EN FAMILIA MELAS 1.	49

1. INTRODUCCIÓN

La MIDD es una enfermedad producida por la mutación m.3243A>G, la cual afecta el gen del tRNA de leucina mitocondrial. Esta es una enfermedad clínicamente heterogénea, con pacientes que pueden presentar DM y sordera aisladas, de severidad variable, o incluso pueden estar acompañadas de otras manifestaciones, tales como cardiopatías, miopatías, talla baja, entre otras. De hecho, llama la atención que la misma mutación que produce MIDD puede no manifestarse clínicamente o generar cuadros clínicos tan severos como el MELAS o la enfermedad de Leigh¹. Las causas de dicha variabilidad no se comprenden del todo, pero pueden estar involucrados factores ambientales y/o genéticos. Debido a que la mutación responsable de estas enfermedades se encuentra en el genoma mitocondrial y a que cada célula tiene múltiples mitocondrias, es usual que no todas tengan dicha mutación y que la frecuencia de ésta varíe de célula a célula, de tejido a tejido y de paciente a paciente. Este fenómeno se denomina heteroplasmia y es uno de los factores genéticos que se ha postulado como responsable de la variabilidad clínica.

Diversos estudios han evaluado la relación entre heteroplasmia y las manifestaciones clínicas de MIDD, con diversos resultados. Un estudio encontró una correlación positiva entre el nivel de heteroplasmia de la mutación en sangre periférica y el nivel de HbA_{1c}, y una correlación negativa entre la heteroplasmia y el índice de masa corporal²; sin embargo, estas correlaciones fueron estadísticamente débiles. Igualmente, otros autores han encontrado correlación entre los niveles de heteroplasmia y otras variables clínicas, tales como edad de inicio de la sordera³, edad de diagnóstico de la DM³⁻⁶, afectación neuromuscular³ y función de las células β del páncreas⁷.

Estudios similares se han realizado con respecto a MELAS, evaluando el nivel de heteroplasmia en diversos tejidos y las manifestaciones clínicas en pacientes con MELAS y sus familiares, encontrando mayores niveles de heteroplasmia en

células de músculo esquelético, siguiéndole el de células de sedimento urinario. Mayores niveles se relacionaban con la presencia de ciertas características clínicas, como miopatía, convulsiones, episodios similares a apoplejía, cardiomiopatía, talla baja y bajo peso⁸.

Este proyecto busca encontrar una relación entre los niveles de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G y las manifestaciones clínicas, tanto en pacientes con MIDD como en pacientes con MELAS y sus familiares, evaluando también el comportamiento de la mutación en muestras de diferentes tejidos y su relación con el cuadro clínico.

2. JUSTIFICACIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad con una prevalencia global estimada para el 2008 del 10% de la población mayor de 25 años. Esta prevalencia es mayor en América (11%) y se calcula que los gastos en el manejo de la DM pueden comprometer hasta el 15% del rubro para salud de los presupuestos nacionales. Igualmente, la DM fue responsable de aproximadamente 1.3 millones de muertes a nivel mundial en el 2008, esto comprende el 4% de las muertes por enfermedades no transmisibles. Aproximadamente el 80% de éstas muertes ocurrieron en países de ingresos bajos y medios, dentro de los cuales se encuentra el nuestro⁹. En el caso de Colombia, la prevalencia media de Diabetes Mellitus en la población adulta urbana es de 8.2%¹⁰. Por otro lado, la prevalencia de MIDD entre pacientes diabéticos se encuentra entre el 0.5% al 3%, lo cual varía dependiendo del trasfondo étnico^{2, 11-13}.

Se sabe que la misma mutación está implicada como causa en más del 80% de los pacientes con MELAS; sugiriendo la posibilidad de que ambas hagan parte de la misma entidad con un muy variable espectro clínico. En cuanto a estudios realizados en Colombia, solo encontramos un estudio en el cual se realiza un análisis del comportamiento de la mutación m.3243A>G en las familias de dos pacientes con diagnóstico de MELAS¹⁴. Desconocemos la existencia de publicaciones que evalúen las características epidemiológicas y moleculares de pacientes con MIDD en Colombia, lo que evidencia el pobre conocimiento que se tiene de esta entidad en nuestro medio, a pesar de la prevalencia que potencialmente podría tener. Por lo tanto, en Colombia existe la necesidad de diagnosticar y caracterizar a los pacientes con MIDD y MELAS, y posteriormente determinar factores que incidan sobre la severidad de las manifestaciones clínicas, como el nivel de heteroplasmia de la mutación, así como aportar criterios para estimar la posible relación de la mutación con la DM aislada. El presente

proyecto busca determinar la presencia de la mutación en pacientes MIDD y MELAS y establecer la variabilidad clínica relacionada con la heteroplasmía.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre los niveles de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G en diversos tejidos y el fenotipo en familias con Diabetes y Sordera de Herencia Materna y MELAS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fenotípicamente a los pacientes con MIDD y pacientes con MELAS
2. Detectar la mutación m.3243A>G en un grupo de pacientes con sospecha de MIDD y MELAS.
3. Determinar niveles de heteroplasmia en pacientes con MIDD y MELAS en tres tejidos diferentes.
4. Determinar la presencia y el nivel de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G en los familiares por línea materna de los pacientes con MIDD y MELAS positivos para dicha mutación.
5. Relacionar los niveles de heteroplasmia y las diferentes variables fenotípicas de los pacientes con MIDD y MELAS y sus familiares por línea materna.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

La mitocondria es un organelo cuya función principal y más conocida es la producción de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa y llevando a cabo en su interior procesos fundamentales como el ciclo de Krebs y la β oxidación de ácidos grasos. Pero la mitocondria no es solamente la fábrica de energía de la célula, también ejerce papeles importantes en otros procesos celulares, tales como la regulación del metabolismo, el control del ciclo celular, el desarrollo, respuestas antivirales y muerte celular¹⁵.

Las mitocondrias tienen la característica de poseer su propio material genético. Las mitocondrias humanas poseen un genoma circular de 16569pb el cual posee 37 genes, 22 codifican para tRNAs, 2 para rRNA y 13 para proteínas que hacen parte de los complejos proteicos que forman la cadena respiratoria en su membrana interna. Las demás proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear¹⁶.

Las enfermedades mitocondriales son producto de la disfunción de estos organelos, y éstas pueden ser producto de mutaciones en proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo o en el genoma mitocondrial. El DNA mitocondrial (mtDNA) es de gran interés, pues tiene una alta tasa de mutaciones en comparación con el DNA nuclear, esto lleva a la producción de 3 tipos de mutaciones clínicamente relevantes: mutaciones deletéreas en la línea germinal que producen las enfermedades mitocondriales; variantes ancestrales regionales; y mutaciones somáticas que se acumulan con la edad y están probablemente

implicadas en diferentes enfermedades relacionadas con el envejecimiento ¹⁷. La mutación de nuestro interés se encuentra en la primera categoría.

Debido a que el defecto base de las enfermedades mitocondriales es una alteración en la fosforilación oxidativa y en la producción de energía, los tejidos más afectados suelen ser aquellos con alto gasto energético en condiciones normales, tales como cerebro, músculo, corazón y órganos endocrinos, aunque casi cualquier órgano puede estar afectado^{17, 18}. Por otro lado, hay que tener en cuenta que cada célula contiene múltiples mitocondrias, cuya cantidad varía entre tejidos, y cada mitocondria contiene entre 2 a 10 copias del genoma ¹⁹, este hecho hace que dentro de las enfermedades producidas por mutaciones del mtDNA se dé un fenómeno denominado **heteroplasmia**, la cual ocurre cuando una mutación mitocondrial se encuentra solamente en una porción y no en la totalidad del mtDNA de una célula y/o tejido. Entre cada división mitótica, una mutación mitocondrial pueden segregarse entre las células hijas en diferentes proporciones, haciendo que se formen poblaciones celulares con diferentes grados de heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia se entendería entonces como el porcentaje del mtDNA con cierta mutación. Esta variación que existe en el nivel de heteroplasmia es probablemente la gran responsable de la variabilidad en la expresión clínica de las enfermedades mitocondriales ²⁰.

Otro aspecto común a las enfermedades generadas por mutaciones en el mtDNA es la herencia materna. Esto se debe a que durante la concepción, todas las mitocondrias del cigoto provienen del óvulo. Consecuentemente, estas enfermedades tienen un patrón de herencia “mitocondrial” en el cual ambos sexos son afectados, las hembras transmiten la mutación a todos sus hijos e hijas, pero los hombres no le transmiten la mutación a su progenie ²⁰.

4.2 DIABETES Y SORDERA DE HERENCIA MATERNA (MIDD)

4.2.1 Definición

La Diabetes y Sordera de Herencia Materna (MIDD) es una enfermedad producida en la mayor parte de los casos por la mutación m.3243A>G, la cual afecta al gen del tRNA mitocondrial de Leucina. Sus características principales son la presencia de Diabetes Mellitus y sordera neurosensorial, asociado a un patrón de herencia mitocondrial ¹.

4.2.2 Historia

Ballinger *et al* describieron en 1992 una familia cuya madre y todos sus hijos tenían DM y sordera, asociado a una delección de 10.4Kb en el mtDNA ²¹. Ese mismo año, van den Ouweland *et al* descubrieron una familia en la cual la enfermedad se cosegregaba con la mutación m.3243A>G ²².

4.2.3 Epidemiología

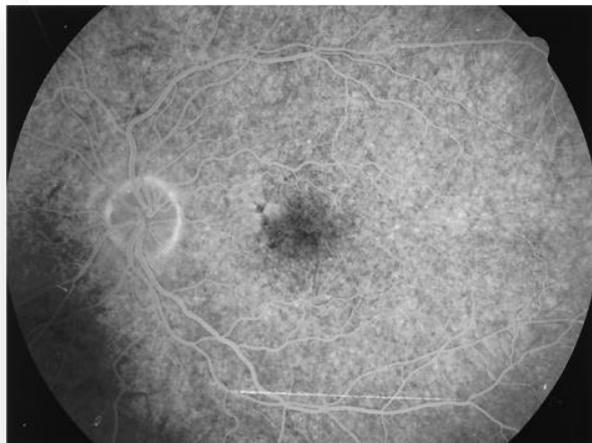
Se estima que aproximadamente el 0.5 al 3% de todos los diabéticos tienen MIDD. Estas frecuencias varían de acuerdo al trasfondo étnico ^{2, 11-13}. Un estudio en Finlandia estimó la frecuencia de la mutación m.3243A>G en sordos de 7.4% y una prevalencia poblacional de 16.3/100.000 ²³.

4.2.4 Descripción Clínica

Además de las características centrales del MIDD (DM, sordera neurosensorial y herencia materna), existen otras características asociadas, las cuales están presentes de manera muy variable. En un estudio realizado por Guillausseau *et al* con 52 pacientes encontraron las siguientes manifestaciones ²⁴, con resultados similares a otros estudios ⁶:

- Índice de masa corporal bajo o normal (100%)
- Distrofia macular en patrón (86%)
- Miopatía (43%)
- Cardiomiopatía (15%)
- Síntomas neuropsiquiátricos (9%)

Figura 1. Distrofia macular en patrón. Tomado de Guillausseau, P.J. et al. 2001



La DM suele iniciar en la edad media, con un promedio que se encuentra en la cuarta década de vida, pero con un rango amplio que va desde la pubertad temprana hasta la séptima década de vida. Puede ser tanto tipo 1 como tipo 2, aunque es más frecuente esta última. De todas maneras, aún cuando la mayoría inician con un cuadro de DM no insulino requiriente, se ha encontrado que luego muchos progresan a la insulino dependencia. Guillausseau *et al* encontraron en su cohorte que el 46% se tornaron insulino dependientes en 10 años de seguimiento^{6, 24, 25}.

La sordera suele iniciar en la adultez temprana. Guillausseau *et al* reportaron una edad media de inicio de 34.6 ± 13.9 años (rango de 2 a 61 años)²⁵.

Otro hallazgo particular en los pacientes con MIDD es que tienen menor incidencia de retinopatía diabética y mayor incidencia de nefropatía, en comparación con los pacientes con DM común. La protección contra la retinopatía podría deberse a la menor generación de radicales libres por parte de unas mitocondrias disfuncionales, disminuyendo así el daño que éstos pudieran generar. El mayor riesgo de nefropatía puede ser efecto directo de la disfunción mitocondrial, ya que los túbulos renales tienen una alta tasa metabólica y su umbral a la deficiencia de la fosforilación oxidativa puede ser bajo²⁶.

La sordera suele iniciar en la adultez temprana. Guillausseau *et al* reportaron una edad media de inicio de 34.6 ± 13.9 años (rango de 2 a 61 años)²⁵. Tiende a

preceder al diagnóstico de DM, pero no siempre es el caso. Suele ser más coclear que nerviosa. Los hombres son más afectados y tienen una pérdida progresiva más rápida. La disminución de la agudeza auditiva suele ser bilateral a una tasa de 1.5 a 7.9 dB al año (población general: 0.3-0.9dB al año), afectando inicialmente las frecuencias agudas, para luego afectar todas las frecuencias ¹.

4.2.5 Genética

La MIDD es una enfermedad de herencia mitocondrial, causada por la mutación m.3243 A>G en aproximadamente el 85% de los casos ²⁷. El resto está dado por otras mutaciones mitocondriales, muchas de ellas reportadas solamente en familias individuales. Ejemplos de éstas son las que afectan al tRNA de la leucina (m.3256C>T, m.3264T>G, m.3254C>G y m.3271T>C); lisina (m.8296A>G, m.8344A>G y m.8356T>C); arginina (m.10438A>G); serina (m.12258C>A) o glutamina (m.14709T>C) ¹.

La mutación m.3243 A>G se encuentra en el gen del tRNA de leucina (UUR) mitocondrial. Dicho cambio altera la estructura terciaria del tRNA, promoviendo la dimerización anormal de la molécula. Asociado a esto se dan los siguientes eventos:

- Defecto en la aminoacilación de tRNA^{Leu}(UUR)
- Bajos niveles de tRNA^{Leu}(UUR)
- Alteración en el procesamiento de los precursores de RNA mitocondrial.
- Defecto en la modificación postranscripcional de bases de tRNA^{Leu}(UUR).
- Defecto en la síntesis proteica mitocondrial.
- Respiración celular reducida.

Se ha postulado que el defecto en la aminoacilación del tRNA^{Leu}(UUR) es la deficiencia primaria que produce las demás alteraciones, con base en

experimentos que han demostrado que la sobreexpresión de la sintetasa de leucil-tRNA revierte parcialmente el fenotipo en células híbridas con la mutación m.3243 A>G. El resultado final es la disfunción mitocondrial y la respiración celular reducida, que afecta a los tejidos con menor umbral y de mayor gasto energético ^{1, 28, 29}.

Una teoría alterna propone que el defecto primario se encuentra en la falta de modificación de un uracilo en el anticodón del tRNA de Leucina, lo cual permite que dicho tRNA pueda reconocer también codones de fenilalanina. De esta manera, habría una incorrecta incorporación de leucina en sitios de fenilalanina ³⁰.

4.2.6 Fisiopatogenia

La disfunción mitocondrial en las células metabólicamente activas de los islotes pancreáticos lleva a un mal funcionamiento de las células β , pérdida de masa de células β y deficiencia de insulina. Usualmente la sensibilidad a la insulina es normal, aunque en algunos casos puede estar reducida. Igualmente se ha evidenciado afectación de la stria vascularis, una región altamente metabólica de la cóclea; dicho fenómeno está probablemente implicado en la fisiopatogenia de la sordera en pacientes con MIDD ¹.

Existen modelos que intentan explicar el vínculo entre la Diabetes Mellitus y la disfunción mitocondrial. Aún cuando estos modelos se basan en hallazgos en pacientes con DM común y no tenemos conocimiento de que se hayan evaluado en pacientes con MIDD, creemos que vale la pena mencionarlos.

Normalmente cuando existe un incremento en la concentración de glucosa en sangre, las células β del páncreas responden aumentando la secreción de insulina. Esto lo logra de la siguiente manera: cuando aumenta la glicemia, aumenta el ingreso de glucosa a la célula a través de los receptores GLUT2. La glucosa es metabolizada mediante la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Esto lleva al aumento en la producción de ATP, induciendo el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP, lo cual produce la despolarización de la célula, la activación de canales de calcio dependientes de voltaje, la entrada de calcio al citoplasma, lo cual induce la secreción de insulina. En el contexto de una disfunción mitocondrial, la producción de ATP disminuiría, por lo cual la secreción de insulina en respuesta al aumento en la concentración de glucosa también disminuiría (ver Figura 2) ³¹.

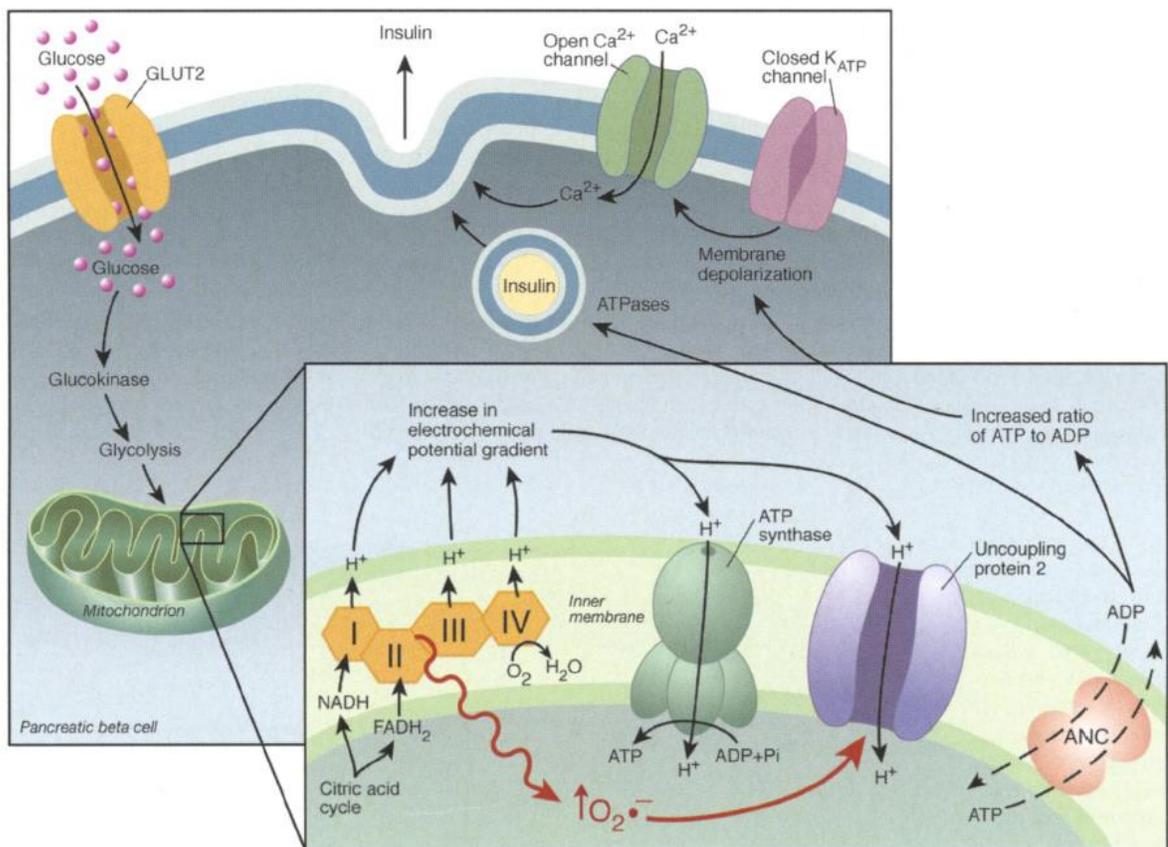


Figura 2. Modelo de relación entre disfunción mitocondrial y resistencia a la Insulina. Tomado de Lowell BB. 2005

Por otro lado, en músculo se postula el siguiente proceso: normalmente la insulina interactúa con su receptor, induciendo su actividad tirosina kinasa, autofosforilando sus residuos de tirosina y fosforilando los del IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1), dicho evento inicia una vía de señalización que termina en

la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana celular, permitiendo el ingreso de glucosa a la célula. Si existe una disfunción mitocondrial, ésta conlleva a un déficit de la β oxidación de los ácidos grasos, lo que hace que se acumulen a nivel del citoplasma del miocito, formando lípidos intramiocelulares (IMCL), un hallazgo común en biopsias musculares de pacientes insulinoresistentes. Los IMCL inducen la activación de kinasas de serina, las cuales fosforilan los residuos de serina del IRS-1, impidiendo la fosforilación de los residuos de serina por parte del receptor de insulina, con la consecuente inhibición de la vía de señalización corriente abajo, traduciéndose fenotípicamente como una resistencia a la insulina (ver figura 3) ^{31, 32}.

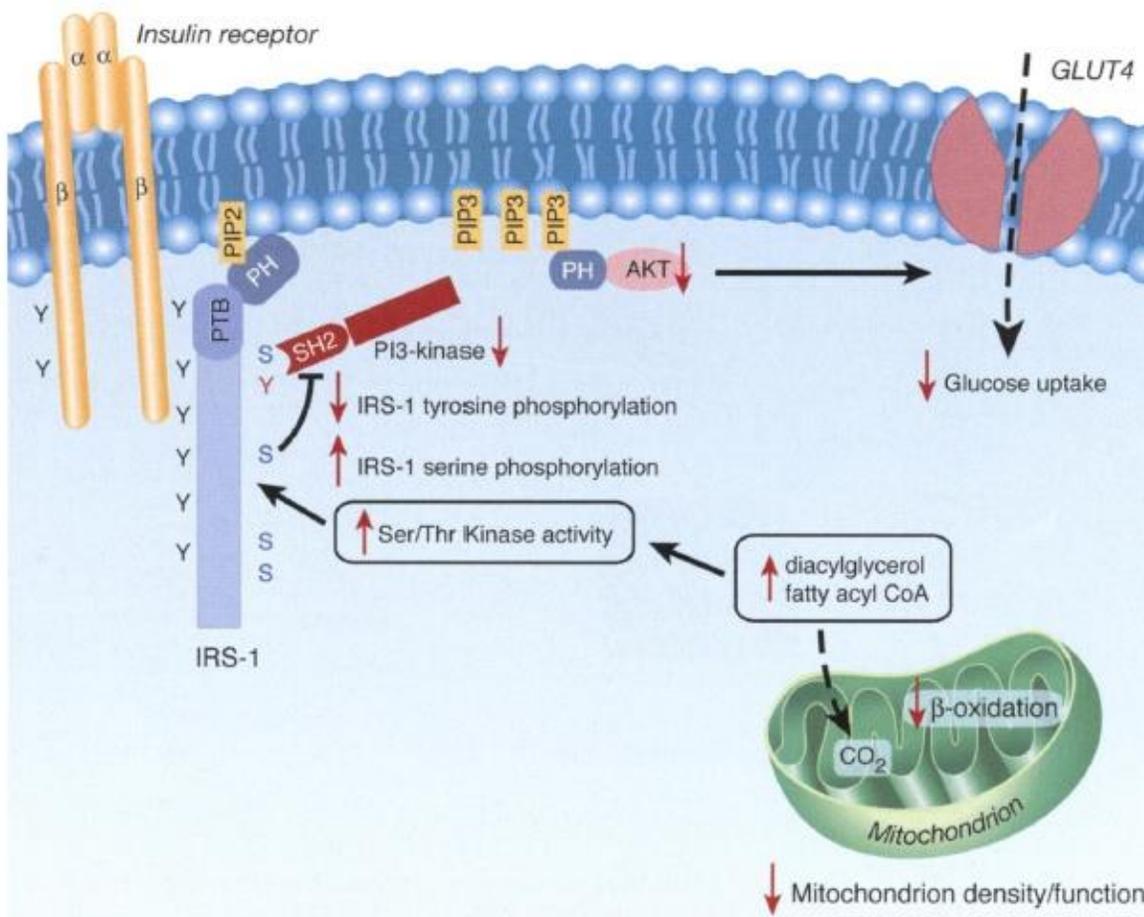


Figura 3. Relación entre disfunción mitocondrial y disfunción de las células β . Tomado de Lowell BB. 2005

Sin embargo, un hecho que no apoya esta teoría es que se ha demostrado que atletas jóvenes tienen también IMCL, a pesar de ser sensibles a la insulina y de tener una buena capacidad oxidativa ³³. Por lo tanto, este modelo requiere de mayor análisis y pruebas.

4.2.7 Tratamiento

En términos generales, el manejo de la diabetes en estos pacientes es similar al de la DM normal. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los pacientes con MIDD suelen progresar más rápidamente a la insulinodependencia, por lo cual es recomendable considerar el inicio de la insulinoterapia más tempranamente. Teóricamente no se les debería administrar Metformina, por el riesgo de acidosis láctica; sin embargo, no existen casos reportados con esta complicación.

Debido a la mayor predisposición de los pacientes con MIDD a presentar nefropatía, es recomendable el uso de inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina (IECAs) y un adecuado control de la tensión arterial. Debe haber un umbral bajo para la realización de biopsia renal con el fin de descartar una Glomerulosclerosis Focal Segmentaria, la cual es frecuente en los pacientes con MIDD. Murphy R. *et al* hacen las siguientes recomendaciones de manejo ¹:

Tabla 1. Recomendaciones de Manejo para pacientes con MIDD.

Procedimiento	En el momento del diagnóstico	Seguimiento	Intervención
Valoración neurológica y cardiovascular	Sí	Anual o según hallazgos	
Tamizaje para diabetes si se desconoce diagnóstico	Sí (Glicemia en ayunas)	Bianual desde los 12 años, luego anual desde la adultez	Sulfonilureas o Insulina.
Pruebas de audición	Sí	Anual o según hallazgos	Ayudas auditivas o implante coclear
Valoración oftalmológica	Sí	Anual o según hallazgos	
Ecocardiograma	A los 35 años o más temprano si existe evidencia de falla cardiaca o arritmias	3 a 5 anuales o más temprano, basado en los hallazgos clínicos y la historia familiar.	
Valoración renal	Sí (proteinuria)	Anual	IECAs, adecuado control de la tensión arterial
RNM cerebral	No	Bajo umbral para investigar síntomas neurológicos centrales	IECAs (Aspirina y estatinas si hay factores de riesgo tradicionales presentes)

Se ha evaluado como tratamiento específico del MIDD el uso de Coenzima Q, el cual actúa como un transportador de electrones en la cadena respiratoria y podría mejorar la disfunción mitocondrial. Un estudio aleatorizado abierto mostró una prevención en el desarrollo de la hipoacusia y un retraso en la progresión de la DM con el uso de Coenzima Q ³⁴. Otros reportes más anecdóticos han mostrado mejoría con el uso de Coenzima Q en manifestaciones clínicas específicas, como miopatía, neuropatía dolorosa, retención urinaria, edema inducido por la insulina, cefaleas, trastornos del sueño y control de la glicemia. Sin embargo se requieren de estudios aleatorizados doble ciegos para definir los beneficios del uso de este medicamento en pacientes con MIDD¹.

4.3 MELAS

4.3.1 Historia

La enfermedad de MELAS fue descrita por primera vez en el año 1984 por Pavlakis *et al*, presentando 2 pacientes que presentaban encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a apoplejía, de ahí su nombre (**M**itochondrial **E**ncephalomyopathy, **L**actic **A**cidosis, **S**troke-like episodes) ³⁵.

4.3.2 Definición y Diagnóstico

El MELAS es una enfermedad multisistémica caracterizada por la presencia de encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a apoplejía. Usualmente el desarrollo psicomotor inicial es normal, con inicio típicamente en la niñez. Es causada por una mutación del mtDNA, siendo la más frecuente la m.3243A>G.

El diagnóstico de MELAS se realiza mediante la combinación de hallazgos clínicos y moleculares. Para realizar el diagnóstico clínico se utilizan los criterios propuestos por Hirano *et al* en 1992 ³⁶. Debe presentar las siguientes características:

- Episodios similares a isquemia cerebral, típicamente antes de los 40 años.
- Encefalopatía con convulsiones y/o demencia.
- Miopatía mitocondrial, evidenciada por acidosis láctica y/o fibras rojas rasgadas en biopsia muscular.

Y al menos 2 de los siguientes:

- Desarrollo psicomotor inicial normal.
- Cefalea recurrente
- Vómito recurrente

Otros síntomas que pueden presentar son los siguientes:

- Ataxia, mioclonus, coma episódico, cardiomiopatía, retinopatía pigmentaria, oftalmoplejía, diabetes, hirsutismo, dismotilidad GI, nefropatía.

El diagnóstico molecular se realiza mediante la detección de la mutación, lo cual se detallará en la sección de Genética.

4.3.3 Epidemiología

En un estudio realizado por Yatsuga S, *et al* se estimó una prevalencia población de MELAS de 0.18/100.000 habitantes ³⁷. En cuanto a la prevalencia poblacional de la mutación m.3243A>G, en Finlandia se estimó en 16.3/100.000 ²³ y en Australia se encontró una prevalencia mucho mayor, de 236:100,000 ³⁸.

4.3.4 Descripción Clínica

MELAS es una enfermedad con una expresión clínica variable. Los casos típicos inician en la niñez, con un desarrollo psicomotor inicial normal, asociado a baja talla. Los síntomas suelen aparecer entre los 2 y 10 años, con el 70% de los casos iniciando entre los 2 a 20 años y el 91% entre los 2 a 40 años. Los síntomas iniciales más comunes son las convulsiones, cefaleas recurrentes, anorexia y vómito recurrente.

Las convulsiones se asocian frecuentemente a episodios similares a apoplejía caracterizados por hemiparesia transitoria o ceguera cortical. Estos episodios suelen ser recurrentes y aún cuando inicialmente los pacientes pueden presentar una recuperación total, el daño acumulativo gradualmente produce alteraciones en las habilidades motoras, en la visión y el estado mental. Es usual también la sordera neurosensorial progresiva. Son también frecuentes las migrañas.

Otros síntomas menos frecuentes son: mioclonus, ataxia, coma episódico, atrofia óptica, cardiomiopatía, retinopatía pigmentaria, oftalmoplegía, diabetes mellitus, hirsutismo, dismotilidad gastrointestinal y nefropatía^{36, 39}.

Los paraclínicos pueden presentar los siguientes hallazgos³⁹:

- Acidosis láctica en sangre y LCR
- Proteínas elevadas en LCR. Usualmente no más de 100mg/dL.
- EKG: puede evidenciar cardiomiopatía, bloqueo AV incompleto, preexcitación.
- EMG: proceso miopático, puede haber neuropatía.
- Biopsia Muscular: Fibras rojas rasgadas
- RNM cerebral en T2 muestra regiones hiperintensas que no se limitan a territorios vasculares, lentamente expansivas. En la figura 4 se muestra una imagen de una RNM tomada a un paciente con MELAS posterior a un episodio similar a apoplejía. Cada columna es un tiempo diferente; de izquierda a derecha: A: día1; B: día 8; C: día 17 y D: día 29⁴⁰.

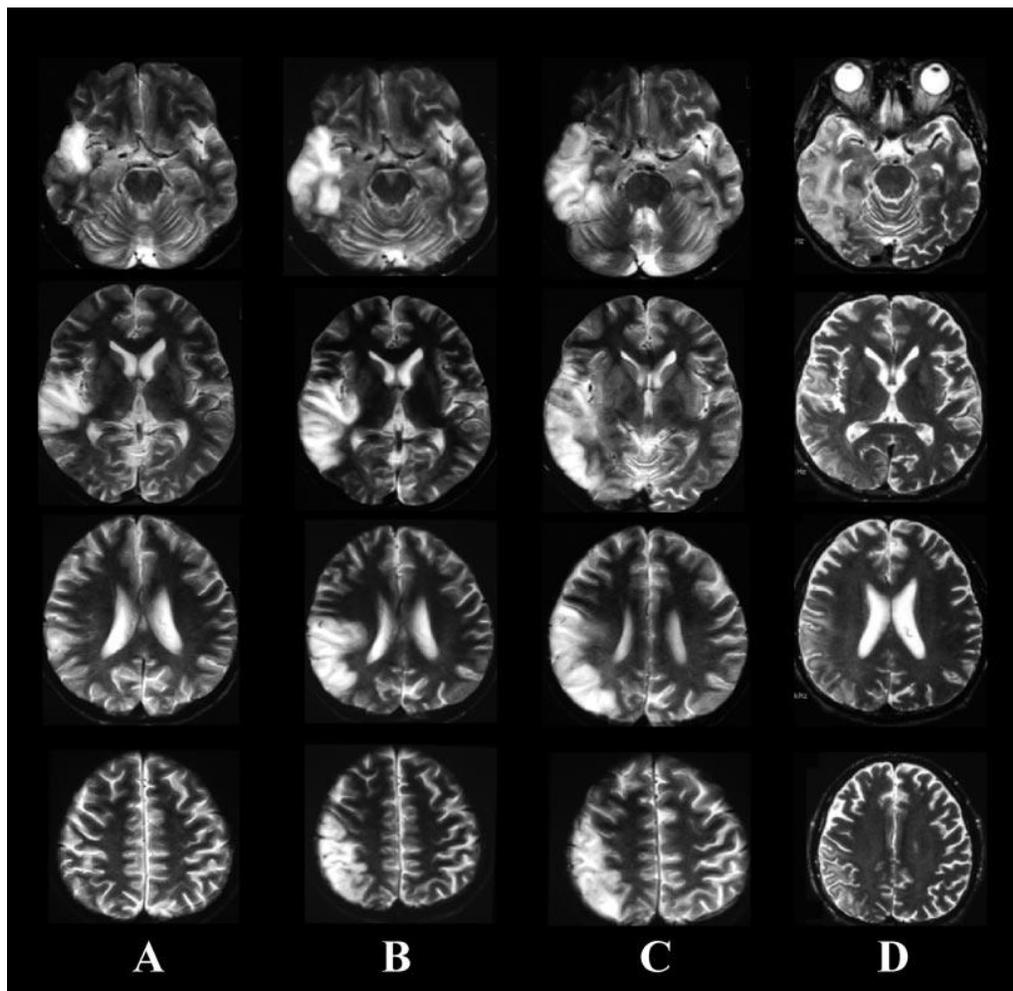


Figura 4. RNM de paciente durante episodio similar a apoplejía. Tomado de Bai,R.K. & Wong,L.J. 2004.

La historia natural de MELAS está caracterizada por el deterioro neurológico progresivo en el contexto de eventos similares a apoplejía. La edad de fallecimiento se encuentra entre los 10 a los 35 años, aunque algunos individuos logran vivir hasta la sexta década ⁴¹. Las infecciones y la obstrucción intestinal suelen ser eventos terminales ³⁶.

4.3.5 Genética

La mutación más común en pacientes con cuadro clínico de MELAS es la m.3243A>G, la cual se encuentra en aproximadamente el 80% de estos individuos. Esta mutación afecta al gen *MT-TL1*, el cual codifica para el gen del tRNA de leucina mitocondrial. Otras mutaciones que afectan a dicho gen y son frecuentes son: m.3271T>C (≈7.5%), m.3252A>G (<5%). El segundo gen más frecuentemente afectado es el MT-ND5, el cual codifica para la subunidad 5 de la NAD deshidrogenasa. La mutación más común en este gen es m.13513G>A (<15%). Los casos restantes están dados por mutaciones raras en esos mismos genes y en otros, sobre todo en aquellos que codifican para tRNAs mitocondriales. En la práctica clínica usualmente se inicia con la búsqueda directa de las mutaciones más frecuentes y en orden (m.3243A>G, m.3271T>C, m.13513G>A) y ya descartadas éstas, se procede a secuenciar en búsqueda de variantes raras³⁹.

Las implicaciones de la mutación m.3243A>G fueron discutidas en la sección de MIDD.

4.3.6 Fisiopatología

La patogénesis del MELAS no es muy clara, sobre todo en lo concerniente a los episodios similares a apoplejía. Unas teorías proponen que la base de dichos episodios es una neuronopatía mitocondrial, con la consecuente hiperexcitabilidad y vulnerabilidad neuronal, que serían las responsables de las convulsiones, la migraña y los episodios similares a apoplejía. Este modelo propone que en el contexto de una permeabilidad capilar incrementada y una vulnerabilidad neuronal puede generarse una hiperactividad, lo cual produciría las manifestaciones clínicas previamente descritas. Adicionalmente, la falla en el transporte transmembranal de iones dependiente de energía, secundario al defecto en la fosforilación oxidativa, lleva al incremento en la concentración

extracelular de potasio o de glutamato, lo cual conllevaría una hiperexcitabilidad neuronal y al desarrollo de las manifestaciones clínicas ⁴².

Una teoría alterna propone que los episodios similares a apoplejía son producto de la angiopatía que se observa en estos pacientes. Dicha angiopatía sería a su vez consecuencia de una alteración en la producción y el catabolismo del óxido nítrico. Esta propuesta se apoya primeramente en la hipocitrulinemia que se ha hallado en los pacientes con MELAS. La citrulina normalmente sirve de precursor a la arginina, de la cual proviene el óxido nítrico (NO). La síntesis de citrulina, en su mayor parte en el intestino, es dependiente de ATP, por lo cual la disfunción mitocondrial podría ser la explicación de la hipocitrulinemia. Sin embargo, hay otros hechos a considerar. En MELAS hay un hallazgo patológico particular y aparentemente paradójico, y es que la actividad de la Citocromo Oxidasa (COX), un componente de la cadena respiratoria codificado en el mtDNA, usualmente está presente en aquellos tejidos que típicamente están afectados en esta enfermedad (músculo, vasos sanguíneos), a diferencia de otras enfermedades mitocondriales, como la Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojas Rasgadas (MERRF), en la cual los músculo y vasos sanguíneos son negativos para COX. Se postula que este hallazgo se debe a una expansión de la masa mitocondrial compensatoria, con el consecuente aumento de la actividad de COX. Dicho incremento parece ser perjudicial para el organismo, principalmente porque el NO se puede unir a COX, desplazando al oxígeno. Esto llevaría a la disminución de la concentración de NO, produciendo un retardo en la vasodilatación y a una alteración de la autorregulación, responsables de la angiopatía. Ese trastorno en la vasodilatación podría ser la causa de los episodios similares a apoplejía. La hipocitrulinemia podría ser resultado de un aumento en la conversión a arginina, con el fin de compensar la baja concentración de NO. Se han realizado pequeños estudios sobre el tratamiento con L-arginina y con citrulina, con resultados prometedores; sin embargo, es necesario realizar más estudios con el fin de determinar los beneficios de dicha terapia ⁴²⁻⁴⁶.

4.3.7 Tratamiento

La evaluación inicial luego de realizar un diagnóstico de MELAS debe incluir lo siguiente:

- Medición de la altura y el peso para evaluar crecimiento.
- Valoración audiológica
- Valoración oftalmológica
- Evaluación de habilidades cognitivas
- Evaluación de terapia física
- Evaluación neurológica: resonancia nuclear magnética, espectroscopia de resonancia nuclear magnética. Electroencefalograma si se sospechan convulsiones.
- Valoración cardiovascular
- Tamizaje para diabetes mellitus mediante glicemia en ayunas y prueba de tolerancia a la glucosa.

El tratamiento del MELAS está enfocado al manejo específico de cada una de sus manifestaciones: uso de implantes cocleares para tratamiento de la sordera neurosensorial; analgésicos para las migrañas; manejo estándar de las manifestaciones cardíacas; manejo de la diabetes mellitus con modificaciones dietarias y/o hipoglicemiantes orales, aunque frecuentemente requieren insulino terapia; ejercicio aeróbico y terapia física, especialmente luego de los episodios similares a apoplejía. Las convulsiones pueden ser tratadas con terapia anticonvulsivante tradicional, aunque se debe evitar el Valproato, del cual se tiene evidencia que incrementa las convulsiones ^{39, 42}.

Como fue mencionado previamente, se ha postulado la suplementación con L-arginina y citrulina en el tratamiento y prevención de los episodios similares a apoplejía, con resultados prometedores ⁴⁴⁻⁴⁷. No existe un tratamiento específico para el MELAS. Existen reportes de beneficios en algunos pacientes con el uso de Coenzima Q y L-Carnitina, Coenzima Q con creatina y ácido lipoico, o con el

uso de idebenone, un análogo de la Coenzima Q10; sin embargo, se requieren más estudios ⁴².

5. METODOLOGÍA

5.1 *Tipo de estudio*

Descriptivo de corte transversal

5.2 *Tamaño de la muestra*

El muestreo se realizó a conveniencia, debido a que se desconocían las características epidemiológicas en nuestro medio de las entidades clínicas en estudio. Se realizó una búsqueda activa de los pacientes en diferentes centros asistenciales en la ciudad de Bogotá, contactando directamente a endocrinólogos, neuropediatras y genetistas. Se incluyeron un total de 11 individuos: 3 probandos con diagnóstico clínico de MELAS y 4 familiares maternos y 2 probandos con diagnóstico clínico de MIDD y 2 familiares maternos.

5.3 *Ingreso al estudio*

Una vez que el consentimiento informado fue leído, aceptado y firmado por los padres y/o el propio paciente, según fuera el caso, se procedió a completar el formato de historia clínica con los datos personales, los datos clínicos asociados al inicio y curso de la enfermedad, la historia familiar con elaboración de un árbol genealógico que incluyó por lo menos 3 generaciones. El consentimiento informado recibió su aprobación por el comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia – Facultad de Medicina.

5.3.1 Criterios de selección

- ***Criterios de Inclusión***

Pacientes con MIDD:

- Diagnóstico de Diabetes Mellitus según criterios de la American Diabetes Association de 2011 ⁴⁸.
- Sordera neurosensorial diagnosticada mediante audiometría, con inicio por debajo de los 60 años de edad

Pacientes con MELAS:

- Diagnóstico de MELAS según los criterios de Hirano *et al* ³⁶.

Parientes:

- Pariente en línea materna de paciente con MIDD o MELAS con la mutación m.3243A>G confirmada. Dichos parientes incluyen a la madre, hermanos, tíos maternos e hijos si el probando fuera una mujer.

- ***Criterios de Exclusión***

- Diabetes secundaria a otras causas definidas diferente a MIDD o MELAS.
- Sordera secundaria a otras causas definidas diferente a MIDD o MELAS.

5.4 FASE PRE ANALÍTICA

5.4.1 Muestras

Previa firma del consentimiento informado, se obtuvo las siguientes muestras de cada uno de los pacientes:

- Sangre venosa periférica: recolección de 5ml en tubo con EDTA
- Orina: 40-50mL, en un frasco de recolección de orina, preferiblemente de la primera orina de la mañana.
- Mucosa oral: frotis con un cepillo de citología estéril en mejilla y carrillos. Conservado luego en un tubo Eppendorf de 1.5ml con 500µL de solución de lisis celular.

Las muestras de sangre y mucosa oral se conservaron en refrigeración a -20°C hasta la extracción.

Las muestras de orina se centrifugaron por 5 minutos a 2000rpm, luego se descartó el sobrenadante, dejando aproximadamente 1mL de éste para resuspensión del sedimento. Se conservó luego en refrigeración a -20°C hasta la extracción.

5.4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN, dependiendo de la muestra, se realizó con los siguientes kits:

- Sangre venosa periférica: Se utilizó el kit Gentra Puregene para sangre total (Quiagen ®) siguiendo el protocolo del fabricante.
- Sedimento urinario: Se utilizó el kit Gentra Puregene para sangre total (Quiagen ®) siguiendo el protocolo del fabricante para fluidos corporales. Se utilizó Proteinasa K en el paso de lisis celular y una solución de glucógeno en el paso de precipitación del ADN.
- Mucosa Oral: Se utilizó el kit Gentra Puregene para células bucales (Quiagen ®) siguiendo el protocolo del fabricante.

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría en un equipo Nanodrop2000®, ThermoScientific®.

5.5 FASE ANALÍTICA

5.5.1 Detección de la mutación m.3243A>G.

La detección de la mutación y nivel de heteroplasma se realizó a través de la técnica conocida como Sistema de Mutación Refractario a la amplificación con PCR cuantitativa (ARMS-qPCR, por sus siglas en inglés), siguiendo el protocolo de Wang *et al*⁹. Brevemente, esta técnica se basa en la realización de dos reacciones de PCR en tiempo real en dos tubos diferentes, cada una de ellas específica para un alelo: una para el mutante y otra para el Wild type. Para esto se utilizan tres primers: un primer reverse que es común para ambos alelos y dos primers forward, cada uno específico para cada alelo y solo se añade uno en cada tubo, lo que asegura que solo se amplifique un alelo en cada reacción. El termociclador detecta la cantidad de DNA gracias al SYBR-Green, un reactivo que se une específicamente al DNA de doble cadena y al hacerlo, emite una señal luminosa, la cual es detectada. La cantidad de DNA se estima a partir de la intensidad de la señal luminosa a lo largo de la reacción, y la heteroplasma se determina mediante una fórmula que compara las cantidades estimadas en cada reacción.

Con el fin de desarrollar y estandarizar dicha técnica, fue necesario ejecutar primeramente los pasos que se describen en los ítems subsiguientes.

5.5.1.1 Generación de Plásmidos

Para estandarizar y ejecutar el ARMS-qPCR se requiere primeramente la generación de dos tipos de plásmidos cuyo inserto contenga la secuencia del gen

de interés: uno con la secuencia Wild type y el otro con la secuencia mutante (m.3243A>G) (Ver tabla 2)

Tabla 2. Insertos mutante y wild type (WT).

Nombre	Secuencia	Longitud (pb)
WT	CAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCGGTAATCGCATAAAACCTTAAA ACTTTACAGTCAGAGGTTCAATTCTTCTTCTTAACAACATACCCATGG CCA	98
Mutante	CAGGGTTTGTTAAGATGGCAGGGCCCGGTAATCGCATAAAACCTTAAA ACTTTACAGTCAGAGGTTCAATTCTTCTTCTTAACAACATACCCATGG CCA	98

Estos plásmidos deben ser finalmente cuantificados, mezclados en diferentes proporciones y servirán así para generar una curva de calibración que permita determinar los niveles de heteroplasma de la mutación en las muestras a estudio. Para este fin se utilizó el kit de clonación TOPO® TA de Invitrogen, el cual incluye el plásmido pCRTM2.1-TOPO® y se siguió el protocolo del fabricante. Cada uno de los pasos descritos a continuación se realizaron tanto para la generación del plásmido con el inserto mutante como para la generación del plásmido con el inserto wild type, a menos que se especificara lo contrario:

- **Generación de los insertos:** El inserto wild type se obtuvo mediante la realización de una PCR alelo-específica de una muestra de ADN obtenida de una muestra de sangre periférica de un donante sano. Dicha PCR se realizó en el termociclador MyCycler®(BIORAD), utilizando los primers descritos en la Tabla 3 y con los parámetros definidos en la Tabla 4 y Tabla 5.

Tabla 3. Primers para generación de insertos wild type.

Nombre	Secuencia	Tm de la reacción (°C)
Forward	CAGGGTTTGTTAAGATGGCAGA	59
Reverse	TGGCCATGGGTATGTTGTTA	

Tabla 4. Protocolo de PCR para generación de inserto wild type.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura (°C)	Duración
Inicio	1	95	04:00
Amplificación	35	95	00:20
		59	00:30
		72	00:20
Elongación	1	72	10:00
Conservación	1	4	∞

Tabla 5. Reactivo de PCR para generación de inserto wild type.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Agua			
Buffer	10x	1x	5
dNTP	4mM	0.128mM	1.6
MgCl ₂	50mM	1mM	1
Primer Forward	10mM	0.3mM	1.5
Primer Reverse	10mM	0.3mM	1.5
Taq Polimerasa	5 UI/µL	2UI	0.4
AND		≈70ng	
		Volumen total	50

Luego se comprobó la amplificación del fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 80mV por 40 minutos, utilizando el marcador de peso molecular Mass Ruler® DNA ladder Low Range. Se empleó el agente intercalante SYBR Safe® para la visualización del producto en el fotodocumentador SYNGENE®, Multi Genius, software Gene Snap (SynGene®). Por otro lado, el inserto mutante fue sintetizado por la empresa Invitrogen (ver Tabla 2). Posteriormente se le añadieron “extremos pegajosos” de adenina en los extremos 3', utilizando el protocolo para tal fin que se encuentra en el manual del kit de clonación TOPO® TA de Invitrogen. Este paso fue necesario porque los oligonucleótidos no contaban con estos extremos y esta reacción de clonación se basa en el hecho de que los productos de PCR con Taq

polimerasa tienen una adenina sobresaliente y no pareada en su extremo 3', lo cual permite que el fragmento de interés se inserte en el plásmido al parearse estas adeninas con las timinas sobresalientes en los extremos 3' del plásmido; el fragmento es luego unido covalentemente al plásmido gracias a la Topoisomerasa I.

Con este fin, en un tubo de PCR se mezclaron los reactivos detallados en la Tabla 6. Esta reacción se incubó luego por 15 minutos a 72°C en el termociclador MyClycler® (BIORAD). Con este procedimiento se espera que a

Tabla 6. Reacción de adición de adeninas a extremos 3'. una importante cantidad de

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
	59ng/µg	2pmol	2.0
dATP	10mM	0.2mM	1.0
Buffer	10X	1X	5.0
MgCl ₂	50mM	1.5mM	1,5
Taq Polimerasa	5 UI/µL	1UI	0.2
Agua			40.3

fragmentos se les haya adicionado las adeninas.

- **Clonación:** Con el fin de lograr la inserción de los fragmentos en el plásmido, se añadieron 4mL de los fragmentos a su respectivo tubo con los reactivos detallados en la tabla 7. Dicha reacción se mezcló gentilmente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se pasó a hielo por 1 minuto.

Tabla 7. Reactivos reacción de clonación.

Reactivo	Volumen(µL)
Producto de PCR	4
Solución de sal	1
Vector TOPO®	1
Volumen final	6

- **Transformación:** Este paso consiste en la transformación de las células competentes One Shot[®] Match1[™]-T1. Primero, se adicionaron 2 μ L de cada reacción de clonación a un vial de células químicamente competentes One Shot[®] y se mezcló suavemente. Esto se incubó en hielo por 30 minutos. Posterior a esto los tubos con las células se sometieron a un choque térmico por 30 segundos en baño maría a 42°C y luego se transfirieron a hielo. Se adicionaron 250 μ L de medio S.O.C a cada tubo y fueron colocados en un agitador. Se agitó horizontalmente a 200 rpm a 37°C por 1 hora. Luego de esto, se tomaron 40 μ L de cada reacción de transformación y se sembró cada una en un plato de cultivo con agar LB y ampicilina 50 μ g/mL, añadiendo igualmente 20 μ L de medio S.O.C para asegurar una mejor distribución de las células en la placa. A dichos platos se les había añadido previamente 80 μ L de una solución de X-Gal a 20mg/mL y precalentado a 37°C. Se incubaron los platos a 37°C por toda la noche. Al día siguiente se evidenció el crecimiento de múltiples colonias entre blancas, azul claras y azul oscuras (Ver Figura 5), probando así la eficiencia de la reacción de clonación.



Figura 5. Crecimiento de colonias transformadas.

- **Análisis de los clones positivos:** A continuación, las colonias positivas fueron analizadas, con el fin de determinar si hubo una correcta inserción del fragmento de interés en el plásmido. Esto se realizó utilizando dos metodologías: PCR y secuenciación.
- **PCR:** Mediante esta metodología se realiza una reacción de PCR de las colonias utilizando los primers M13 forward y M13 reverse (incluidos en el kit de clonación TOPO® TA) los cuales flanquean la región donde debe insertarse el fragmento, luego los amplificados son sometidos a electroforesis y se verifica si la migración de las bandas es compatible con el tamaño esperado del amplificado. A continuación se explica con más detalle: primero se escogieron 9 colonias blancas (positivas, 4 de los clones mutantes y 5 de los clones wild type) y una colonia azul oscura (control negativo). Dichas colonias fueron picadas con la punta de la micropipeta y mezcladas en los reactivos para PCR detallados en la Tabla 8. Luego la PCR convencional fue realizada bajo los parámetros que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8. Reactivos para PCR de colonia (por reacción)

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Agua			7.41
Buffer	10x	1x	1.0
dNTP	4mM	0.14mM	0.35
MgCl ₂	50mM	1mM	0.2
Primer Forward M13	10mM	0.5mM	0.5
Primer Reverse M13	10mM	0.5mM	0.5
Taq Polimerasa	5 UI/μL	0.2UI	0.04
		Volumen total	10

Tabla 9. Protocolo de PCR para análisis de colonias.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura (°C)	Duración
Inicio	1	94	10:00
Amplificación	35	94	00:30
		56	01:00
		72	01:45
Elongación	1	72	10:00
Conservación	1	12	∞

Estos amplificadores fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 80mV por 40 minutos, utilizando el marcador de peso molecular Mass Ruler® DNA ladder Low Range. Se empleó el agente intercalante SYBR Safe® para la visualización del producto en el fotodocumentador SYNGENE®, Multi Genius, software Gene Snap (SynGene®). Ver figura ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR DE CLONES. Nótese que todas las bandas positivas son de aproximadamente 300bp, compatible con el tamaño esperado del amplificado con el inserto; por el contrario, el control negativo tiene solo un tamaño aproximado de 200pb, compatible con el tamaño esperado del amplificado sin el inserto (202bp).

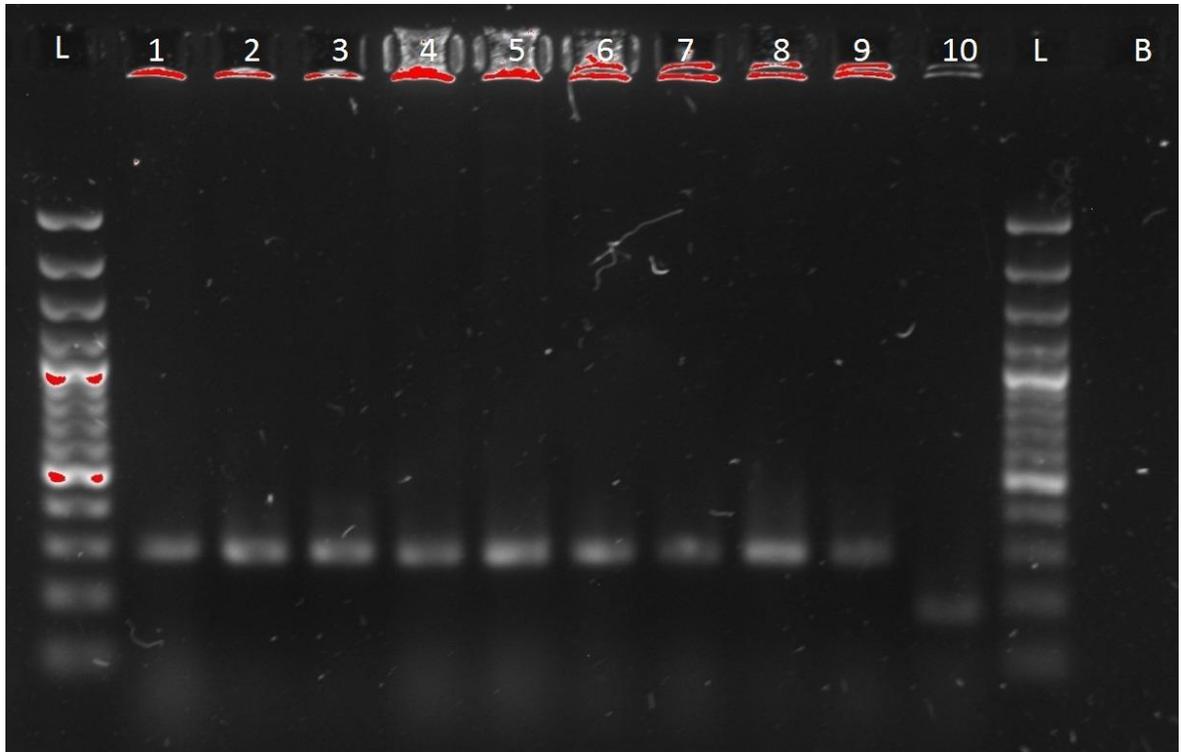


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de clones. . L: Marcador de peso molecular. B: blanco. 1-5: clones positivos wild type. 6-9: clones positivos mutantes. 10: clon negativo (control negativo).

- **Secuenciación:** mediante esta técnica se comprobó la correcta inserción del fragmento de interés. Primeramente se purificaron los plásmidos de los clones WT 2 y 3 y de los clones mutantes 3 y 4 con el kit PureLink[®] Quick Plasmid Midiprep, siguiendo el protocolo del fabricante, esto se realizó de la siguiente manera: primero se cultivaron las respectivos clones en medio LB por una noche; luego se centrifugaron 2mL de dicho medio a 12,000xg por 3 minutos, descartando luego el sobrenadante. Paso siguiente, se resuspendió el pellet en 250µL de buffer de resuspensión con RNasa A, para luego agregar 250 µL de buffer de lisis, el cual se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Para el paso de precipitación se añadieron 350 µL de buffer de precipitación, el cual se mezcló mediante inversión del tubo. Dicho lisado se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos. Luego el sobrenadante se transfirió a una columna de centrifugación colocada en un tubo de lavado y se centrifugó a 12,000x g por 1 minuto. Se descartó el

líquido que fluyó hacia tubo de lavado y se colocó el tubo de centrifugación nuevamente en este. A continuación, se procedió a lavar la columna con 700 μ L de buffer de lavado con etanol; se centrifugó la columna a 12,000 x g por 1 minuto; se descartó el fluido en el tubo de lavado, se colocó de nuevo la columna de centrifugación en este y se volvió a centrifugar con los mismos parámetros. Se descartó el tubo de lavado. Para eluir el ADN se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recolección de 1.5mL y se añadió 75 μ L de buffer TE precalentado en el centro de la columna y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó la columna a 12,000 x g por 2 minutos, fluyendo el líquido al tubo de recolección; en este líquido se encontraba el plásmido purificado, el cual habría de ser secuenciado.

Las muestras fueron enviadas para secuenciación al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular Instituto de Genética (SSiGMol) de la Universidad Nacional de Colombia. La secuenciación fue realizada empleando la química del BigDye Terminator de ABI (el método del dideoxi o Sanger) y corridas en un Analizador Genético Applied Biosystems 3500, utilizando los kits de *Applied Biosystems BigDye® Cycle Sequencing*. Se utilizó el primer M13 forward. Una vez obtenidos las secuencias, fueron analizadas mediante el programa *Chromas Lite 2.1.1*. (McCarthy 1996). De esta manera se comprobó la correcta inserción del fragmento, al igual que la presencia de la mutación puntual m.3243A>G (Ver Figura 7).

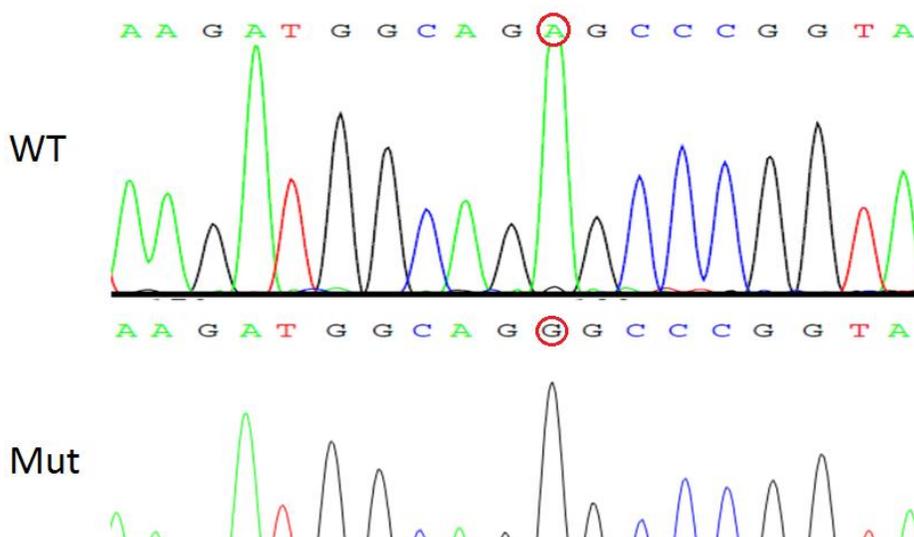


Figura 7. Comparación de las secuencias de los plásmidos con inserto wild type y mutante. WT: wild type; Mut: mutante. Posición de mutación puntual resaltada con un círculo rojo.

5.5.1.2 Generación de las curvas de calibración.

El siguiente paso consistió la generación de curvas de calibración lo cual se hizo siguiendo el protocolo sugerido por Applied Biosystems [50]. Primeramente, se hicieron diluciones seriadas de los plásmidos habiendo primero calculado el peso molecular de cada plásmido utilizando la siguiente fórmula:

$$m = \left[n \right] \left[1.096e-21 \frac{g}{bp} \right]$$

Donde n= Tamaño del genoma (pares de bases)
m= Masa
e-21= 10^{-21}

En nuestro caso, el plásmido debe tener 4029bp, resultando en una masa de 4,415784 e-18g por plásmido. Luego se calculó la masa total de los diferentes números de copias por reacción que se requiere, básicamente multiplicando la masa de un plásmido por el número de copias y luego se calculó la concentración requerida del plásmido para asegurar cierto número en un volumen determinado (en este caso, 2.5 mL, el volumen de ADN que se agregará a cada reacción de qPCR) y así, finalmente, realizar las diluciones respectivas, teniendo en cuenta la concentración inicial de los plásmidos, determinada con el equipo Nanodrop2000®, ThermoScientific® (Ver Tablas 10 y 11). Las diluciones que se utilizaron para la curva de calibración fueron la 2 a la 7.

Tabla 10. Diluciones del plásmido WT

Número de la dilución	Origen del ADN plasmídico a diluir	Concentración inicial (ng/mcrL)	Volumen del ADN plasmídico (mcrL)	Volumen del diluyente (mcrL)	Volumen Final (mcrL)	Concentración Final (ng/mcrL)	Número de copias en 2.5mcrL
1	Stock	4,01E+01	10	990	1000	4,01E-01	NA
2	1	4,01E-01	132,14	867,86	1000	5,30E-02	3000000
3	2	5,30E-02	10	90	100	5,30E-03	300000
4	3	5,30E-03	10	90	100	5,30E-04	30000
5	4	5,30E-04	10	90	100	5,30E-05	3000
6	5	5,30E-05	10	90	100	5,30E-06	300
7	6	5,30E-06	10	90	100	5,30E-07	30

Tabla 11. Diluciones del plásmido mutante.

Número de la dilución	Origen del ADN plasmídico a diluir	Concentración inicial (ng/mcrL)	Volumen del ADN plasmídico (mcrL)	Volumen del diluyente (mcrL)	Volumen Final (mcrL)	Concentración Final (ng/mcrL)	Número de copias en 2.5mcrL
1	Stock	4,78E+01	10	990	1000	4,78E-01	NA
2	1	4,78E-01	110,86	889,14	1000	5,30E-02	3000000
3	2	5,30E-02	10	90	100	5,30E-03	300000
4	3	5,30E-03	10	90	100	5,30E-04	30000
5	4	5,30E-04	10	90	100	5,30E-05	3000
6	5	5,30E-05	10	90	100	5,30E-06	300
7	6	5,30E-06	10	90	100	5,30E-07	30

Paso siguiente, se realizó la PCR en tiempo real utilizando el termociclador LightCycler®2.0 y el Master Mix Lightcycler® 480 SYBR Green I Master, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó cada reacción por duplicado, incluyendo una reacción blanco, la cual no tenía ADN plasmídico. Se utilizó inicialmente la temperatura de anillamiento (Tm) utilizada en el artículo original de Wang *et al*⁴⁹. (Ver tablas 12 y 13 y figura 8).

Tabla 12. Reactivos para PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen(μ L)
Plásmido	2.5
Master Mix 2x	5
Primer F	0.5
Primer R	0.5
Agua	1,5
Volumen final	10

Tabla 13. Primers para la PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia	Tm de la reacción (°C)
Forward WT	CAGGGTTTGTTAAGATGGCATA	63
Forward mutante	CAGGGTTTGTTAAGATGGCATG	
Reverse	TGGCCATGGGTATGTTGTTA	

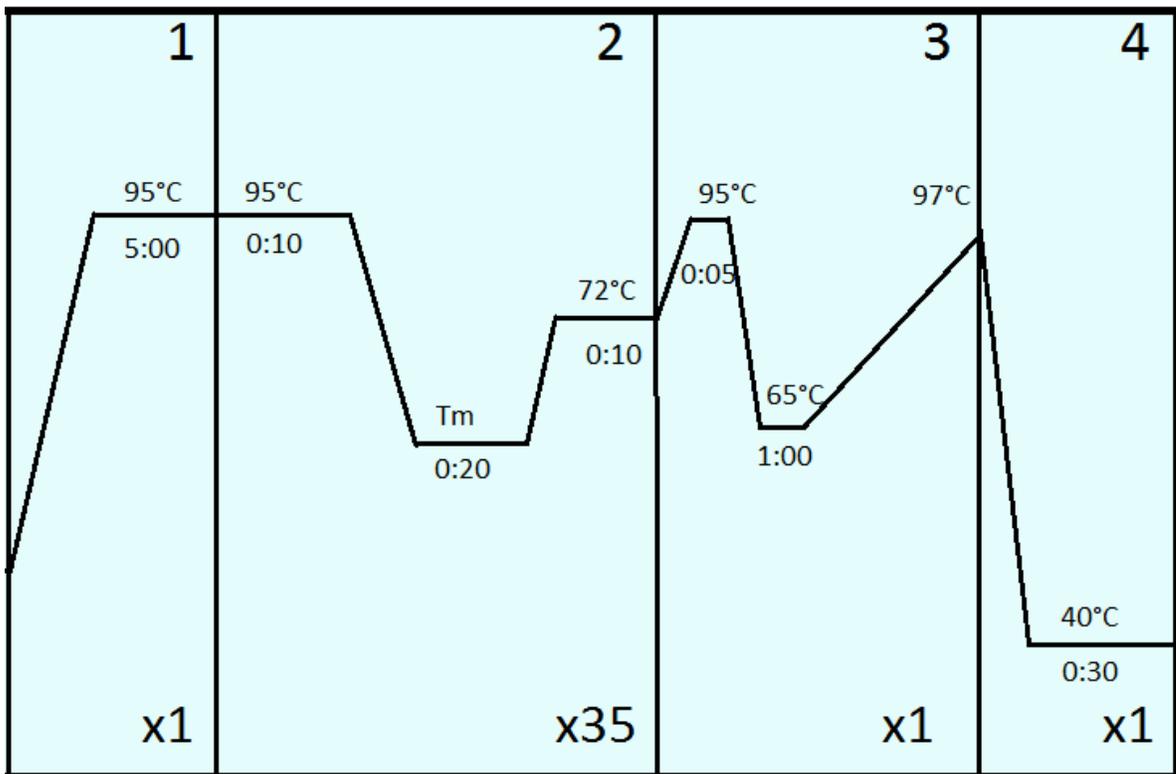


Figura 8. Condiciones de PCR en tiempo real

Desafortunadamente, en este punto no se obtuvieron los resultados esperados. No fue posible obtener una curva de calibración, pues los resultados de la PCR fueron erráticos, no correlacionados con las diferentes concentraciones de las diluciones e incluso obteniendo amplificados en el control negativo. Se realizaron múltiples cambios en los parámetros de la PCR, incluyendo el uso de diferentes temperaturas de anillamiento, disminución de los ciclos de amplificación, se prepararon nuevos reactivos para descartar contaminación e incluso se utilizó otro termociclador, pero los resultados fueron persistentemente erráticos. En este punto se decidió enviar las muestras al Laboratorio de Genética Médica de Baylor College of Medicina, en Houston, Texas. Allí las muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo de Wang *et al*⁴⁹.

5.5.2 Exámenes Complementarios

A los individuos que resultaron positivos para la mutación se les realizaron ciertos estudios complementarios en el laboratorio de Investigación Hormonal de la Universidad Nacional de Colombia, incluyendo una glicemia basal, creatinina en sangre y nitrógeno ureico en sangre. La tasa de filtración glomerular se calculó utilizando la fórmula CKD-EPI 2009 para individuos de 18 años de edad o mayores⁵⁰ y la fórmula modificada de Schwartz para pacientes menores de 18 años⁵¹. Igualmente se realizó una audiometría tonal y un electrocardiograma de 12 derivaciones en el Laboratorio CENDIATRA.

6. RESULTADOS

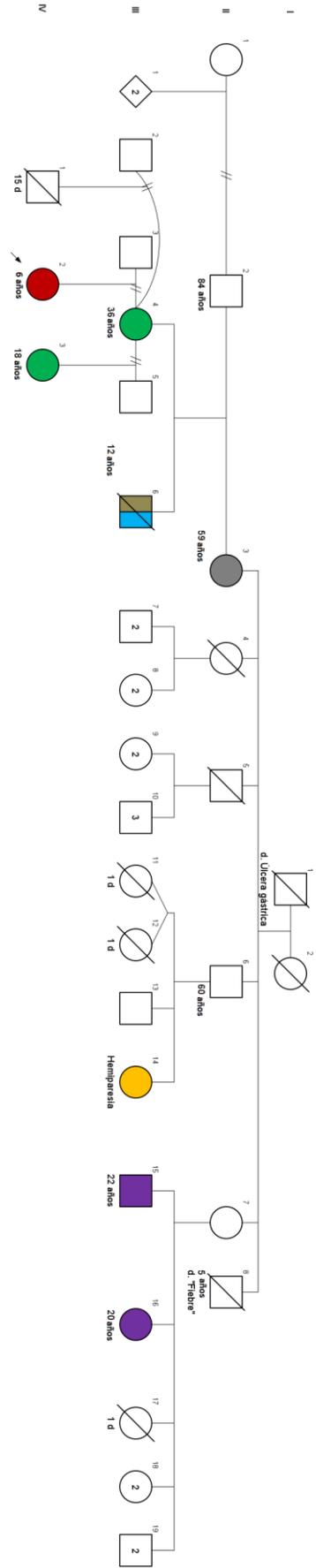
6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

En total se reclutaron 3 familias con diagnóstico clínico de MELAS y 2 familias con diagnóstico clínico de MIDD. A continuación se hace una descripción de dichas familias.

6.1.1 Familia MELAS 1

Dicha familia estaba constituida por el probando, madre y hermana media materna. El probando es una paciente de sexo femenino de 6 años de edad al momento de la primera consulta. Aproximadamente a los 3 años de edad la paciente comenzó a presentar marcha inestable y talla baja, pero con motricidad fina y lenguaje normal. A los 5 años de edad sufrió el primer **episodio convulsivo**, caracterizado por pérdida de conciencia, cianosis, movimientos clónicos de la cabeza y pérdida súbita del tono en el resto del cuerpo. Desde entonces la paciente ha presentado múltiples episodios similares. Seis meses después presentó su primer **episodio similar a isquemia cerebral**, caracterizado por crisis convulsiva asociada a pérdida de la visión. Dos meses después presentó un episodio similar. Desde entonces persiste con pérdida parcial de la visión y hemiparesia izquierda, con **cefalea** y **vómito recurrentes**. Actualmente se encuentra en tratamiento con Levetiracetam, Oxcarbacepina, carnitina y Clonazepam. Como antecedentes de importancia se encuentran los siguientes: la probando es tercer hijo de madre de 30 años, padres no consanguíneos, embarazo complicado solo por diabetes gestacional, parto a término por cesárea. La paciente presentó dificultad respiratoria del recién nacido, pero no requirió intubación ni estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Neurodesarrollo inicial aparentemente normal. Los aspectos relevantes de la historia familiar son los siguientes (Ver figura 9): Madre presentó diabetes

gestacional durante el embarazo; **migraña** en hermana media materna y posiblemente en la madre; tío materno presentó **epilepsia** a partir de los 11 años y falleció al parecer por una **enfermedad cerebrovascular** a los 12 años de edad; hija de un tío abuelo materno (individuo III-14) con **hemiparesia** desde el nacimiento; hijos de hermana de la abuela materna con discapacidad intelectual (individuos III-15 y III-16); abuela materna con historia de trastorno psiquiátrico no específico, de dos años de duración caracterizado por agresividad y psicosis, ya resuelto. No historia familiar de Diabetes Mellitus, cardiopatía, insuficiencia renal crónica o sordera. Al examen físico paciente delgada (IMC=12), normocefálica, pupilas isocóricas lentamente reactivas, movimientos oculares conservados. Presentaba hipotonía generalizada con hemiparesia izquierda. Pobre coordinación, con ataxia de predominio truncal. Reflejos rotulianos +++/++++. Los paraclínicos eran notables por un **lactato elevado** (2.24mmol/L), Lactato/piruvato elevado (35), creatinina, nitrógeno ureico y glicemia en ayunas dentro de rangos normales (0.38mg/dL). La resonancia nuclear magnética cerebral realizada durante el primer episodio similar a isquemia cerebral reveló un **infarto cerebral** temporo occipital derecho, con espectroscopia que reportó en el área cortical temporooccipital derecha una disminución de los picos de N-acetilaspártato, colina y creatina y un pico dominante de lactato. Un panel para condiciones protrombóticas (Factor VIII, factor C, proteína S, antitrombina III, resistencia a la proteína C, IgG e IgM) estuvo dentro de rangos normales. La madre tenía 36 años al momento de la primera consulta. Examen físico normal, índice de masa corporal normal (18.8). La media hermana materna tenía 18 años al momento de la primera consulta. Igualmente presentaba un IMC normal (17.9) y un examen físico normal.



- LEGENDA
- MELAS
 - Atrofia muscular
 - Trastorno psicótico
 - Epilepsia
 - Enfermedad Cerebrovascular
 - Hemiparesia
 - Discapacidad intelectual

Figura 9. Árbol genealógico familia MELAS 1.

6.1.2 Familia MELAS 2.

Dicha familia estaba constituida por el probando y la madre. El probando era un preescolar de sexo masculino de 30 meses de edad al momento de la primera consulta, único hijo de madre de 22 años. **Neurodesarrollo inicial normal** e historia de **epilepsia** con **episodio similar e isquemia cerebral** y una hemiparesia izquierda secundaria a este. El probando no tenía historia previa de Diabetes Mellitus, insuficiencia renal crónica o enfermedad vascular periférica. El paciente no había sido evaluado para descartar cardiopatía. No había historia de sordera, pero los potenciales evocados auditivos reportaron signos de alteración miélinica o hipomielinizante central muy leves, de predominio en área proximal al colículo inferior bilateral. En cuanto a la historia familiar, La madre del paciente tenía una historia de migraña, al igual que la abuela materna. Por otro lado, una tía abuela materna tenía diagnóstico de epilepsia (Ver figura 10).

Al examen físico el paciente presentaba retardo pondoestatural y el examen neurológico reveló una leve hemiparesia izquierda. Examen por lo demás normal.

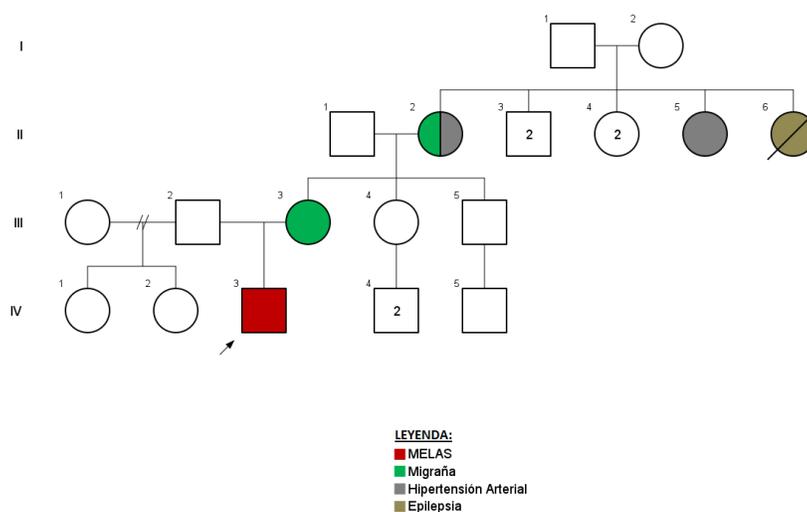


Figura 10. Árbol genealógico familia MELAS 2.

6.1.3 Familia MELAS 3.

Dicha familia estaba constituida por el probando y su madre. El probando es un hombre de 24 años al momento de la primera consulta, con una historia de múltiples **episodios similares a isquemia cerebral** desde los 18 años de edad, asociados a **epilepsia** focal, presentándose la primera vez con movimientos mioclónicos del miembro superior izquierdo. El paciente tenía igualmente una historia de **migrañas recurrentes** que incluso habían requerido hospitalización; disminución de la agudeza visual; **vómito recurrente** asociado a hernia hiatal, enfermedad por reflujo gastroesofágico e infección por H. pylori. Actualmente en tratamiento con Clonazepam, Levetiracetam, Coenzima Q10 y L-carnitina. Como antecedentes de importancia se encuentran los siguientes: el probando es segundo hijo de madre de 34 años, padres no consanguíneos. Embarazo y parto sin complicaciones. **Neurodesarrollo inicial normal**. La historia familiar es notable por la existencia de múltiples familiares maternos con Diabetes Mellitus, migraña y sordera (Ver figura 11). La madre del paciente tenía historia de enfermedad varicosa de miembros inferiores y carcinoma gástrico a los 50 años de edad. Al examen físico se encontró un paciente de constitución delgada, alerta y orientado, pero con leve bradipsiquia y ánimo tendiente a plano. Por lo demás el examen neurológico era normal, sin déficits motores o sensitivos notables. Paraclínicos notables fueron los siguientes: Glucosa en ayunas, creatinina y nitrógeno ureico en sangre normales; ecocardiograma transesofágico sin evidencia de cardiopatía; resonancias cerebrales evidenciaron múltiples **infartos cerebrales**, de predominio occipitotemporal basal y medial derecho; múltiples electroencefalogramas anormales que reportaron actividad lenta en hemisferio derecho y descargas polipunta y onda lenta generalizadas; **ácido láctico en sangre elevado** antes y después de la actividad física; potenciales evocados auditivos compatibles con **hipoacusia neurosensorial** periférica bilateral leve.

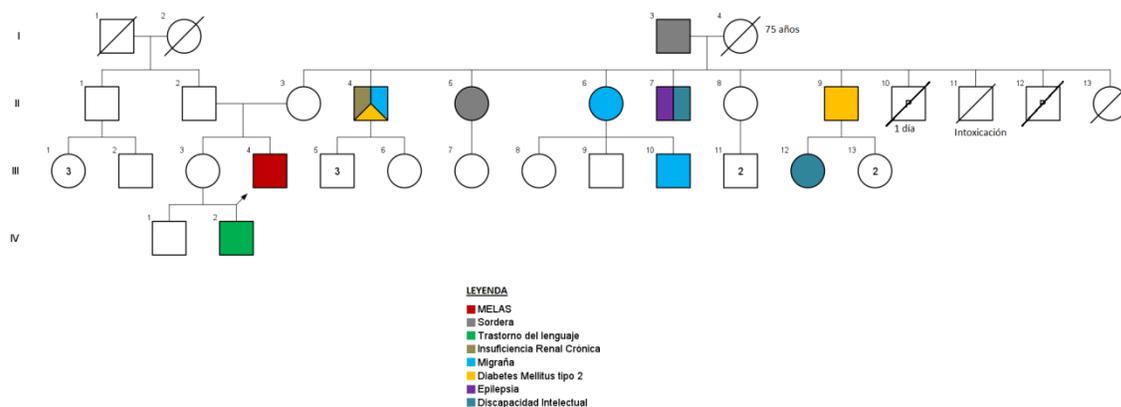


Figura 11. Árbol genealógico familia MELAS 3.

6.1.4 Familia MIDD 1

Esta familia estaba compuesta por el probando y su madre. El probando era una paciente de sexo femenino de 33 años de edad al momento de la primera consulta. Padres no consanguíneos. Primera hija de madre de 15 años, embarazo y parto vaginal sin complicaciones. Tenía una historia de **sordera congénita bilateral profunda** (confirmada mediante audiometría y potenciales evocados) y **Diabetes Mellitus tipo 1** diagnosticada a los 23 años de edad. Presentaba historia de **cefalea recurrente**. Neurodesarrollo normal, excepto por trastorno profundo del lenguaje. La paciente ha tenido historia de cetoacidosis diabética, no historia de retinopatía diabética, cardiopatía, insuficiencia renal crónica o enfermedad vascular periférica. Igualmente la paciente no tenía historia de episodios similares a isquemia cerebral, miopatía o vómito recurrente. La **madre tenía una historia de sordera** derecha, (Ver figura 12). Al examen físico se encontró a una paciente con signos vitales normales, índice de masa corporal en rango de sobrepeso (24.7), con una evidente sordera profunda, pero por lo demás normal.

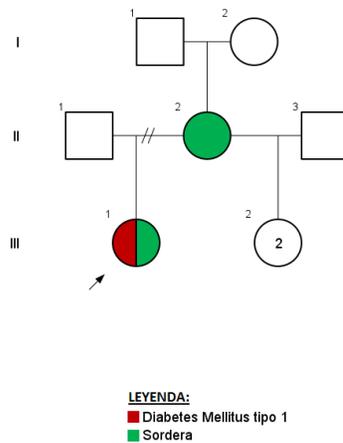


Figura 12. Árbol genealógico familia MIDD1.

6.1.5 Familia MIDD 2

Esta familia estaba compuesta por el probando y su madre. El probando era un paciente de sexo masculino de 33 años de edad al momento de la consulta, primer hijo de madre de 19 años, embarazo y parto vaginal sin complicaciones. Padres no consanguíneos. El paciente tiene historia de **sordera neurosensorial profunda bilateral** (confirmada con audiometría) detectada a los dos meses de edad y **Diabetes Mellitus tipo 1** diagnosticada a los 24 años de edad. Al parecer, el paciente tuvo una infección de vías urinarias a los 2 meses de edad, tratada con gentamicina; no existe claridad si la sordera que desarrolló está relacionada con este tratamiento. Adicionalmente, el paciente estuvo hospitalizado múltiples veces por bronconeumonías, última a los 12 años de edad. **Neurodesarrollo normal** excepto por ausencia de lenguaje verbal. El paciente se comunica mediante lenguaje de señas. No historia de cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar, cardiopatía, enfermedad vascular periférica, episodios similares a isquemia cerebral, miopatía, encefalopatía, cefaleas o vómito frecuente, o insuficiencia renal crónica. Al paciente le diagnosticaron una "retinitis" a los 5 años de edad, supuestamente asociada a la sordera, según le

fue informado. La historia familiar (Ver figura 13) incluye a un tío materno con historia de insuficiencia renal crónica diagnosticada a los 19 años, actualmente tratada mediante diálisis. No historia familiar de sordera, Diabetes Mellitus o migrañas. Al examen físico se encontró a un paciente delgado, con un índice de masa corporal de 19.5, con una notable sordera profunda, pero un examen por lo demás normal.

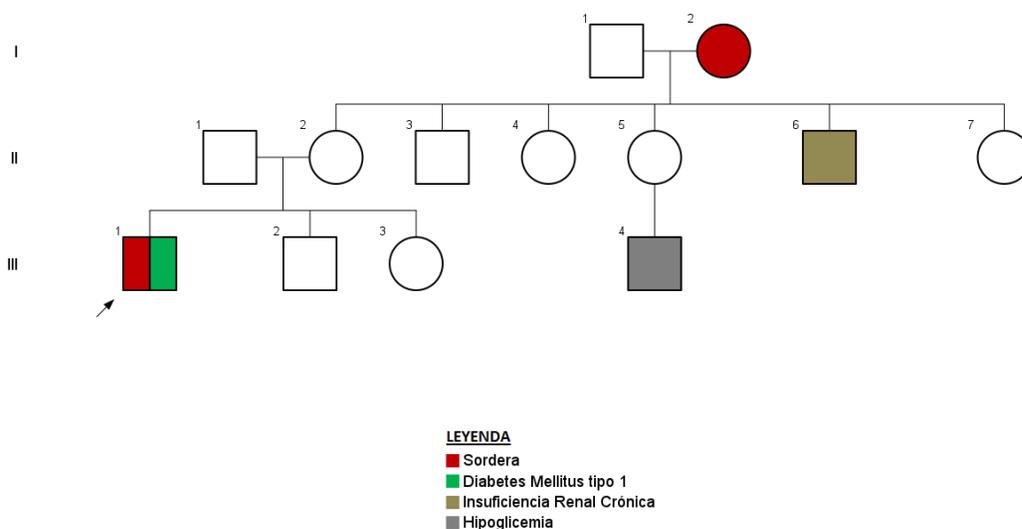


Figura 13. Árbol genealógico familia MIDD2.

6.2 RESULTADOS DE LA ARMS-qPCR PARA LA MUTACIÓN m.3243A>G

Los resultados de las pruebas y los respectivos valores de heteroplasmia en cada una de las muestras se pueden apreciar en la tabla 14. Se les realizaron las pruebas moleculares a las familias MELAS 1, MELAS 2, MIDD 1 y MIDD 2. De estas, solamente resultó positiva para la mutación en todos los individuos y todas

las muestras de la familia MELAS 1; las demás familias y sus muestras resultaron negativas, incluyendo algunas muestras que no tenían ADN suficiente para realizar la prueba (Familia MELAS 2, orina y mucosa oral del probando y mucosa oral de la madre).

Por otro lado, a la familia MELAS 3 no se le realizó la prueba, debido a que al probando se le había realizado un panel de mutaciones mitocondriales mediante RFLPs, reportando que el paciente presentaba la mutación m.3271T>C relacionada con MELAS y descartando la mutación m.3243A>G. Desafortunadamente esta técnica no brinda datos sobre la heteroplasmia de la mutación y las pruebas que están disponibles comercialmente para determinar la heteroplasmia de dicha mutación utilizan técnicas de secuenciación masiva cuyos costos excedían los recursos del presente estudio.

Tabla 14. Resultados de ARMS-qPCR para la mutación m.3243A>G. MI: muestra insuficiente. NA: no aplica.

FAMILIA	INDIVIDUO	MUESTRA	HETEROPLASMIA (%)	INTERPRETACIÓN
MELAS1	PROBANDO	SANGRE	80	+
		ORINA	97	+
		MUCOSA ORAL	90	+
	MADRE	SANGRE	16	+
		ORINA	68	+
		MUCOSA ORAL	15	+
	HERMANA	SANGRE	47	+
		ORINA	40	+
		MUCOSA ORAL	57	+
MELAS2	PROBANDO	SANGRE	0.07	-
		ORINA	MI	NA
		MUCOSA ORAL	MI	NA
	MADRE	SANGRE	0.18	-
		ORINA	0.16	-
		MUCOSA ORAL	MI	NA
MIDD1	PROBANDO	SANGRE	0.11	-
		ORINA	0.05	-
		MUCOSA ORAL	0.5	-
	MADRE	SANGRE	0.47	-
		ORINA	0.07	-
		MUCOSA ORAL	0.76	-
MIDD2	PROBANDO	SANGRE	0.2	-
		ORINA	0.03	-
		MUCOSA ORAL	0.14	-
	MADRE	SANGRE	0.24	-
		ORINA	0.23	-
		MUCOSA ORAL	0.22	-

6.3 Resultados de estudios complementarios

Se realizaron laboratorios complementarios a la familia MELAS 1, por ser la única positiva para la mutación m.3243A>G. Dichos resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Exámenes complementarios en familia MELAS 1.

Paciente	Glicemia basal (mg/dL)	Creatinina en sangre (mg/dL)	Nitrógeno Ureico (mg/dL)	Tasa de Filtración Glomerular (mL/min/1.73 m ²)	Audiometría Tonal	EKG
Probando MELAS 1	81	0.331	24.9	143.5	Normal	Normal
Madre MELAS 1	108	1.11	17.1	63	Hipoacusia bilateral leve	Normal
Hermana MELAS 1	88	0.91	19.6	92	Normal	Bloqueo de rama derecha

7. DISCUSION

En el presente estudio se reclutaron y analizaron a 5 familias; 3 con diagnóstico clínico de MELAS y 2 con diagnóstico clínico de MIDD. De dichas familias, 1 resultó positiva para la mutación m.3243A>G y otra era positiva para la mutación m.3271T>C.

En la familia MELAS 1 los tres individuos incluidos en el estudio resultaron positivos para la mutación m.3243A>G en los tres tejidos analizados. Un primer vistazo al árbol genealógico de esta familia evidencia la ya conocida gran heterogeneidad fenotípica de esta mutación, mostrando individuos con manifestaciones leves (madre y media hermana materna) y otros con MELAS, el cuadro clínico más severo (probando y muy probablemente un tío materno). Aun cuando el tamaño de la muestra es pequeño para determinar si existe una correlación entre el nivel de heteroplasmia y las manifestaciones clínicas, es evidente que en este caso el probando presenta un nivel de heteroplasmia en los tres tejidos analizados mucho mayor que sus familiares levemente afectados, lo cual apoyaría la hipótesis de que el nivel de heteroplasmia estaría relacionado con la cantidad y severidad de las manifestaciones clínicas. Tanto la madre como el probando presentaron niveles de heteroplasmia mayores en el sedimento urinario y menor en sangre, pero en la media hermana esto no ocurrió, es decir, en ella el tejido con mayor heteroplasmia fue la mucosa oral, siguiéndole la sangre y el sedimento urinario. Estudios previos han mostrado que de estos tejidos, es el sedimento urinario el que suele tener mayor heteroplasmia, siguiéndole la mucosa oral y la sangre periférica. La causa de esto no es totalmente conocida, pero se postula que se debe probablemente a dos factores: la tasa de división celular y el umbral mutacional del tejido, i.e., los tejidos con mayor gasto energético mostrarían alteraciones con menores cargas mutacionales. Los leucocitos periféricos tienen un alto gasto energético y

además se dividen rápidamente, por lo que aquellos con una alta carga mutacional serían particularmente sensibles a la disfunción mitocondrial secundaria a esta transición y estarían así sometidos a una fuerte selección negativa, lo cual resultaría en una menor heteroplasmia con el tiempo; por otro lado, el sedimento urinario está constituido por células transicionales de rápida división celular pero con menor requerimiento energético, lo cual les brinda mayor tolerancia a la disfunción mitocondrial y les permitiría así aumentar su carga mutacional⁵²⁻⁵⁴.

Diferentes estudios han abordado el tema de la existencia de un efecto umbral en las enfermedades secundarias a mutaciones mitocondriales; es decir, un nivel de heteroplasmia a partir del cual se desarrollan manifestaciones clínicas. Se ha propuesto que este fenómeno se da debido a que las mitocondrias en condiciones normales tienen más mARNs, tARNs y cadenas respiratorias activas de las que se necesitan para una respiración normal, lo que le permite a los tejidos tolerar una carga de mutaciones mitocondriales deletéreas hasta cierto porcentaje; dicho porcentaje es el umbral⁵⁵. El mejor ejemplo de esto es la mutación m.8993T>G, en la cual individuos con una heteroplasmia menor al 60% (en músculo) usualmente son asintomáticos o tienen solamente una retinopatía pigmentaria leve o migrañas; individuos con heteroplasmas entre 70%-90% desarrollan el síndrome NARP (Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa) e individuos con heteroplasmas mayores al 90% desarrollan la enfermedad de Leigh (una enfermedad neurodegenerativa y fatal)⁵⁶. En el caso del MELAS, MIDD y la mutación m.3243A>G la correlación no es tan clara y no existe un umbral preciso, pero diversos estudios han encontrado un umbral fenotípico para MELAS que se encuentra entre el 60 al 90% de heteroplasmia en músculo⁵⁵, lo que implica un amplio solapamiento entre individuos asintomáticos, oligosintomáticos, con MIDD y con MELAS. No se encontraron estudios que buscaran determinar el valor del umbral fenotípico de esta mutación en otros tejidos.

Por otro lado, es importante resaltar que las manifestaciones fenotípicas de la mutación en cuestión no son estáticas, por lo que pueden variar a lo largo del tiempo. En este orden de ideas, cabe analizar el caso de la madre, en quien el examen físico fue completamente normal pero se encontró una glucosa alterada en ayunas y una hipoacusia leve; la progresión de estas alteraciones podrían llevarla a una Diabetes y Sordera de Herencia Materna (MIDD, por sus siglas en inglés), cuadro que hace parte del espectro clínico de esta mutación. De hecho, dicha paciente presentó diabetes gestacional durante el embarazo de la probando, lo cual se ha reportado previamente: Laloi-Michelin *et al* reportaron un grupo de pacientes con MIDD en los que aproximadamente el 16% tuvo diabetes gestacional como la presentación inicial². Aun cuando la mutación m.3243A>G no parece ser una causa frecuente de diabetes gestacional⁵⁷, este hallazgo muestra que la disfunción mitocondrial podría jugar un papel en la fisiopatogenia de este tipo de diabetes, pues un estudio reciente mostró una reducción en la expresión de proteínas mitocondriales y una alteración en proteínas de señalización con calcio en el músculo esquelético de mujeres con diabetes gestacional⁵⁸. Por otro lado, un análisis más detallado de la audiometría de esta paciente revela que la hipoacusia que presenta compromete mayormente a las frecuencias más altas (6000 – 8000Hz), lo cual es un rasgo común de la sordera secundaria a esta mutación, la cual compromete inicialmente a las frecuencias altas para progresar luego a todas las frecuencias. En este sentido la hipoacusia en MIDD tiene un curso similar a la presbiacusia, con la excepción de que esta última empieza a una edad mucho más tardía. Sin embargo, la hipoacusia en pacientes con MIDD suele aparecer luego de la diabetes⁵⁹, lo cual no es el caso en esta paciente, corroborando así que la sordera no es secundaria a la hiperglicemia crónica sino probablemente a la disfunción mitocondrial subyacente.

Otro importante hallazgo fue la presencia de un bloqueo de rama derecha en la media hermana del probando, en quien el examen físico fue también completamente normal. Siendo el miocardio un tejido de alto gasto energético y

dependiente de la B-oxidación de ácidos grasos (la cual ocurre en la mitocondria) como fuente de energía, no es de extrañar que el corazón esté frecuentemente afectado en las enfermedades mitocondriales. Aun cuando la afectación más frecuente suele ser una miocardiopatía o incluso el síndrome de Wolf-Parkinson-White (WPW), un reporte de Hinaro *et al* registró una prevalencia del 6% de bloqueos de conducción cardiaca en pacientes con MELAS³⁶ y otro estudio japonés reveló una prevalencia del 10% de trastornos de conducción cardiaca en pacientes diabéticos con la mutación m.3243A>G⁶. Incluso, un estudio holandés obtuvo una prevalencia del 25% de anomalías electrocardiográficas en individuos asintomáticos portadores de esta mutación mitocondrial⁶⁰.

También se presentó el caso de la familia MELAS 3, cuyo probando presentó la mutación m.3271T>C, la cual es la segunda más frecuente, es responsable de aproximadamente el 7.5% de los casos de MELAS⁶¹ y también se ha reportado como causante de MIDD^{1, 27}. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer caso reportado en Colombia con esta mutación. En esta familia no se realizó la prueba molecular a los familiares maternos ni se determinó el nivel de heteroplasmia debido a que la metodología utilizada no brinda esa información, pero el árbol genealógico reporta múltiples individuos con Diabetes Mellitus, sordera y migraña, manifestaciones que muy probablemente están relacionadas con la mutación y reflejan igualmente la heterogeneidad fenotípica de las mutaciones en el gen *MT-TL1*. Es interesante el caso del individuo II-4, el cual presenta Diabetes Mellitus tipo 2, migraña e insuficiencia renal crónica. Existen reportes de individuos con la mutación m.3243A>G y patologías renales, incluidas la glomeruloesclerosis focal y segmentaria y la nefropatía tubulointersticial⁶²; de hecho, los individuos con MIDD tienen mayor riesgo de nefropatía diabética en comparación a aquellos con Diabetes Mellitus común, como se explicó previamente, probablemente porque las células de los túbulos renales tienen un alto gasto energético²⁶. Sería importante en futuros estudios determinar la presencia y nivel de heteroplasmia en los diferentes miembros de

esta familia, pues hasta el momento no pudimos encontrar algún estudio que evaluara la relación entre el nivel de heteroplasmia de la mutación m.3271T>C y sus manifestaciones clínicas.

Adicionalmente, vale resaltar que ambos probandos (MELAS 1 y MELAS 3) presentaron isquemias cerebrales que comprometían regiones posteriores de la corteza cerebral. Esto es clásico en el MELAS y la razón de esta distribución se desconoce actualmente. Betts *et al* realizaron un estudio molecular y neuropatológico en 2 individuos con MELAS, en los cuales encontraron evidencia de disfunción mitocondrial en los vasos sanguíneos de las leptomeninges y la corteza cerebral, pero dicha disfunción no se circunscribía a una región cerebral específica. Los autores en dicho trabajo proponen la hipótesis de que los episodios de isquemia cerebral están relacionados no solamente a la disfunción mitocondrial de los vasos sanguíneos, sino también a un fenómeno relacionado con las migrañas (común en pacientes con MELAS), denominado Depresión Cortical Propagada (DCP). La DCP es una onda de despolarización cortical que se origina en la región occipital y se distribuye luego anteriormente sobre la corteza cerebral, seguida inmediatamente de un periodo de inhibición de la actividad eléctrica. Este fenómeno se acompaña de cambios en el flujo vascular cortical, presentando inicialmente una hiperemia de aproximadamente 3 a 4 minutos de duración, seguido de una leve hipoperfusión por aproximadamente 1 a 2 horas. Esta hipoperfusión, en conjunto con la disfunción mitocondrial subyacente, predispondría a isquemias cerebrales en las regiones posteriores de la corteza cerebral⁶³.

En el presente estudio no se encontró la mutación m.3243A>G en los 2 individuos analizados con diagnóstico clínico de MIDD. Esto no descarta dicho diagnóstico, pues aproximadamente el 15% de los casos de MIDD están dados por otras mutaciones mitocondriales, las cuales en su mayoría son puntuales y afectan a genes de ARN de transferencia mitocondriales¹, tal como se explicó previamente. Estos 2 individuos presentaban, además de la sordera y la Diabetes Mellitus,

otras características que sugerían una mutación del ADN mitocondrial como etiología de su condición clínica:

- Historia de sordera en familiares maternos.
- Edad de diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 1 relativamente tardía (23 y 24 años). La edad de inicio de la Diabetes Mellitus tipo 1 tiene una distribución bimodal, con un pico entre los 4 y 6 años y otro entre los 10 y 14 años; la mayoría se presentan antes de los 18 años⁶⁴⁻⁶⁶. En cambio, la diabetes en pacientes con MIDD suele comenzar en la edad media, en promedio en la cuarta década de vida^{6, 24, 25}.
- El probando de la familia MIDD 2 tenía una historia no clara de “retinitis” a los 5 años, según lo descrito por su madre. Sería útil realizar un examen oftalmológico a este paciente, pues un hallazgo de una distrofia macular en patrón sugeriría aún más una etiología mitocondrial.

Por otro lado, ciertos aspectos de la historia de nuestros pacientes sugieren una etiología diferente:

- Edad de inicio de la sordera: en los pacientes con MIDD, la sordera suele ser poslingual; es decir, que suele comenzar después del desarrollo del lenguaje y además suele ser progresiva, iniciando en promedio durante la adultez temprana, pero con un rango amplio, pudiéndose presentar incluso a los 2 años de edad^{1, 24, 25}. Por el contrario, los pacientes con MIDD incluidos en este estudio presentaban una sordera prelingual acompañada de un trastorno severo del lenguaje.
- Síntomas asociados: como se mencionó previamente, los pacientes con MIDD pueden presentar otros trastornos asociados, tales como miopatía, cardiomiopatía, migrañas y síntomas neuropsiquiátricos^{1, 25}, ninguno de los cuales se encontró en los pacientes de las familias MIDD 1 y 2.

Cabe considerar igualmente que el cuadro clínico de estos dos pacientes podría ser secundario a otros síndromes. En la base de datos OMIM, la asociación de

diabetes y sordera se encuentra en diferentes síndromes tales como la forma mitocondrial del síndrome de Wolfram (MIM #222300), el síndrome de Woodhouse-Sakati (MIM #241080); el síndrome de anemia megaloblástica sensible a la tiamina (MIM #249270); el síndrome de fotomioclonia, diabetes mellitus, sordera, nefropatía y disfunción cerebral (MIM 172500), síndrome de Alstrom (MIM 203800); el síndrome de tubulopatía renal, diabetes mellitus y ataxia cerebelosa (MIM #560000); la enfermedad de Rosai-Dorfman (MIM #602782); entre otros⁶⁷, pero a diferencia del MIDD, todos estos síndromes se asocian a compromisos severos de otros órganos y sistemas.

Curiosamente, el probando de la familia MIDD 2 tenía una historia de exposición a gentamicina a los 2 meses de edad, así que valdría la pena evaluar específicamente la presencia de la mutación m.1555A>G, la cual compromete el gen MTRNR1 que codifica para el ARN ribosomal mitocondrial 12S y se encuentra asociado con sordera secundaria a una aumentada susceptibilidad a los aminoglicósidos⁶⁸.

8. CONCLUSIONES

- En la familia MELAS 1 el nivel de heteroplasmia en los tres tejidos fue mayor en el probando que en sus familiares mínimamente afectados. Esto apoyaría la hipótesis de que el nivel de heteroplasmia estaría relacionado con la cantidad y severidad de las manifestaciones clínicas.
- La expresión clínica de la mutación m.3243A>G es altamente variable. Esto ha sido evidente en estudios anteriores y es evidente en nuestra familia con dicha mutación, lo cual muestra que tanto el MIDD como el MELAS hacen parte del espectro de una misma enfermedad.
- Una vez encontrada la mutación en el probando, es necesario buscar la mutación m.3243A>G en sus familiares maternos, incluso en los asintomáticos. Esto con el propósito de hacer un seguimiento adecuado y un asesoramiento genético preciso.
- Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de que la mutación m.3243A>G puede estar implicada tanto en la MIDD como en algunos casos de diabetes gestacional.
- El presente estudio presenta el primer caso reportado en Colombia de un paciente con MELAS dado por la mutación m.3271T>C.

9. PERSPECTIVAS

- Es necesario realizar estudios con una muestra mayor que permitan determinar la frecuencia de la mutación m.3243A>G en nuestro medio. Desconocemos el impacto de esta mutación en Colombia, y cómo pudimos evidenciar, esta se manifiesta de manera variable, tanto así que puede pasar desapercibida en individuos asintomáticos u oligosintomáticos.
- Se requieren estudios que evalúen la efectividad de diferentes intervenciones clínicas en el manejo y tratamiento de los individuos asintomáticos y oligosintomáticos con la mutación m.3243A>G.
- Es de interés realizar estudios que evalúen la prevalencia e impacto de la mutación m.3271T>C en la diabetes gestacional.

10. ANEXOS

Anexo A. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Bogotá D.C.

Fecha: _____

Yo _____ Identificado(a) con ___ No _____ de _____, a nombre propio o en calidad de representante legal del paciente _____, autorizo (en cumplimiento de los artículos 11 y 15 de la resolución 008430 de 1993, expedida por la Dirección de Desarrollo científico y Tecnológico del Ministerio de Salud) participar en la investigación denominada **“RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HETEROPLASMA DE LA MUTACIÓN m.3243A>G EN DIFERENTES TEJIDOS Y EL FENOTIPO EN FAMILIAS CON DIABETES Y SORDERA DE HERENCIA MATERNA (MIDD) Y MELAS”**.

Comprendo que se trata de una investigación que tiene como propósito evaluar la presencia y nivel de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G, es decir el número de mitocondrias de las células que tienen esa mutación, en pacientes con sospecha de MELAS, una enfermedad caracterizada por episodios similares a isquemia cerebral (“trombosis”), aumento del ácido láctico, enfermedad muscular y deterioro neurológico; o MIDD, que es la asociación de diabetes con sordera en el paciente y los familiares por línea materna. Entiendo que se ha solicitado mi participación por el hecho de padecer esta enfermedad.

Para este efecto acepto que sea tomada una muestra de 5 cc de sangre venosa de mi antebrazo y una muestra de frotis bucal, además de aportar una muestra de 40-50cc de orina, por una única vez. Estas muestras serán tomadas y procesadas en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional para buscar mutaciones en el gen mencionado en cada uno de estos 3 tejidos (sangre, células de las vías urinarias provenientes de la orina y células de la mucosa oral). Estas muestras serán tomadas por personal calificado de dicho instituto, por lo cual se considera que el riesgo de este procedimiento es mínimo; para el caso de la muestra de sangre, consistente exclusivamente en dolor o leve inflamación local en muy pocos casos y mínimo para la muestra de frotis bucal que se tomará con un escobillón sin producir dolor ni lesión alguna. Posteriormente será buscada la mutación en el ADN de las mitocondrias en cada tejido.

En cuanto a los resultados de la investigación se me ha informado que se me entregarán personalmente; sin embargo, dada la importancia de esos resultados en el manejo de mi enfermedad, serán enviados al médico tratante quien me refirió con los investigadores, puesto que el encontrar o no una mutación y el porcentaje de ella en cada uno de los tejidos estudiados, podrá ser de utilidad para corroborar el diagnóstico o para establecer el riesgo de ocurrencia de esta enfermedad a corto plazo en otros miembros de la familia actualmente sanos. Adicionalmente con los resultados recibiré asesoramiento con el médico genetista. Igualmente se me ha notificado la garantía de confidencialidad y la reserva de mi identidad, puesto que el uso de la información será restringido a los investigadores principales y porque mis datos clínicos serán manejados a través de un código anónimo.

He comprendido que además de los beneficios para mi salud, no recibiré beneficios económicos, y que siendo mi participación voluntaria, puedo retirarme del estudio cuando lo desee, sin que esto tenga ninguna consecuencia sobre el manejo de mi enfermedad o la buena disposición de mi médico tratante.

Nombre del paciente
C.C.

Firma del testigo

Firma del Paciente o representante legal.
C.C

Adicionalmente acepto que una vez concluida esta investigación mis muestras puedan ser utilizadas para otras investigaciones dentro de la misma línea.

Firma del Paciente o representante legal.
C.C

Anexo B. Instrumento de recolección de información.



RELACION ENTRE EL NIVEL DE HETEROPLASMA DE LA MUTACIÓN m.3243A>G EN DIFERENTES
TEJIDOS Y EL FENOTIPO EN FAMILIAS CON DIABETES Y SORDERA DE HERENCIA MATERNA
(MIDD) Y MELAS

Formato de Recolección de Información



1. DATOS DE IDENTIFICACIÓN

Fecha: ___/___/___

Código: _____

NUIP	R.C	T.I	CC
------	-----	-----	----

Identificación: _____

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

Fecha de nacimiento: dd / mm / aaaa

Natural: _____

Procedencia: _____

Sexo: F ___ M ___

Dirección: _____

Teléfono: _____

Ciudad: _____

Correo electrónico: _____

Madre: _____

Edad actual: _____

Padre: _____

Edad actual: _____

2. ANTECEDENTES PERSONALES

Perinatales: Madre G__P__C__M__E__V__A

Patológicos: _____

Hospitalarios: _____ Quirúrgicos: _____

Otros: _____

Desarrollo psicomotor (meses)

Motor: Sostén cefálico___ Sedestación:___ Gateo:___ Marcha___

Lenguaje: Bisílabos:___ Actual:___ Escolaridad:___ Grado:___

Social: _____ Otros _____

3. ANTECEDENTES FAMILIARES (ver árbol genealógico adjunto)

Padres consanguíneos: Sí No

Diabetes: Sí No. ¿Quién? _____

Sordera: Sí No ¿Quién? _____

Migraña: Sí No ¿Quién? _____

Epilepsia: Sí No ¿Quién? _____

Miopatía: Sí No ¿Quién? _____

Miocardopatía: Sí No ¿Quién? _____

Insuficiencia renal: Sí No ¿Quién? _____

Enfermedad cerebrovascular: Sí No ¿Quién? ¿A qué edad? _____

Otros: _____

4. REVISIÓN POR SISTEMAS

- DIABETES MELLITUS: SÍ NO

- ▶ Edad de diagnóstico: _____
- ▶ Tipo
 - Tipo 1
 - Tipo 2
 - Otro ¿Cuál? _____
- ▶ Uso de insulina
 - No
 - Si Dosis: _____
- ▶ Historia de cetoacidosis
 - No
 - Si Edad primer episodio _____, Número total de episodios _____
- ▶ Historia de coma hiperosmolar
 - No
 - Si Edad primer episodio _____, Número total de episodios _____
- ▶ Historia de retinopatía diabética
 - No
 - Si Edad de diagnóstico: _____

- SORDERA

- Edad de diagnóstico: _____
- Tipo
 - Neurosensorial
 - Conductiva
 - Mixta
 - Desconoce
- Tipo de diagnóstico
 - Clínico
 - Potenciales evocados
 - Otoemisiones acústicas
 - Audiometría
 - Otro ¿Cuál? _____

- CARDIOPATÍA

- NO
- NO SABE
- Sí Descripción: _____

▪ ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA

- NO
- NO SABE

SI Descripción: _____

▪ INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

- NO
- SÍ
- NO SABE

▪ MELAS (Criterios diagnósticos según Hirano *et al*)

Al menos 1 de los siguientes:

- Episodios similares a isquemia cerebral
- Encefalopatía con convulsiones y/o demencia
- Miopatía mitocondrial, evidenciada por acidosis láctica y/o fibras rojas rasgadas en biopsia muscular

Al menos 2 de los siguientes

- Desarrollo psicomotor inicial normal
- Cefalea recurrente
- Vómito recurrente

5. EXAMEN FÍSICO

- General: _____
- Cabeza/Cuello: _____
- Tórax: _____
- Cardiopulmonar: _____
- Abdomen: _____
- Genitourinario: _____
- Extremidades: _____
- Neurológico:
 - Estado mental: _____
 - Nervios craneales: _____
 - Motor: _____
 - Sensitivo: _____
 - Coordinación: _____
 - Reflejos: _____

6. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS (Registrar última prueba)

PRUEBAS	SI	NO	FECHA	RESULTADO
Glicemia en ayunas				
HbA1c				
Creatinina en sangre				
Microalbuminuria				
Audiometría				
Biopsia Muscular				
EKG y/o Ecocardiograma				
Neuroimágenes				
Otros				

7. DIAGNÓSTICO

- DIABETES Y SORDERA DE HERENCIA MATERNA (MIDD)
- MELAS
- FAMILIAR DE PACIENTE CON MIDD Y/O MELAS
- OTROS: _____



ÁRBOL GENEALÓGICO

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Murphy,R., Turnbull,D.M., Walker,M., & Hattersley,A.T. Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet. Med.* **25**, 383-399 (2008).
2. Laloi-Michelin,M. *et al.* The Clinical Variability of Maternally Inherited Diabetes and Deafness Is Associated with the Degree of Heteroplasmy in Blood Leukocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94**, 3025-3030 (2009).
3. Olsson,C. *et al.* Level of heteroplasmy for the mitochondrial mutation A3243G correlates with age at onset of diabetes and deafness. *Hum. Mutat.* **12**, 52-58 (1998).
4. Hammans,S.R. *et al.* The mitochondrial DNA transfer RNA^{Leu}(UUR) A-->G(3243) mutation. A clinical and genetic study. *Brain* **118 (Pt 3)**, 721-734 (1995).
5. Ohkubo,K. *et al.* Mitochondrial Gene Mutations in the tRNA^{Leu}(UUR) Region and Diabetes: Prevalence and Clinical Phenotypes in Japan. *Clinical Chemistry* **47**, 1641-1648 (2001).
6. Suzuki,S. *et al.* Clinical features of diabetes mellitus with the mitochondrial DNA 3243 (A>G) mutation in Japanese: Maternal inheritance and mitochondria-related complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* **59**, 207-217 (2003).
7. Lindroos,M.M. *et al.* m.3243A>G Mutation in Mitochondrial DNA Leads to Decreased Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle and to Progressive Beta-Cell Dysfunction. *Diabetes* **58**, 543-549 (2009).
8. Ma,Y. *et al.* The study of mitochondrial A3243G mutation in different samples. *Mitochondrion* **9**, 139-143 (2009).
9. Alwan,A. & et al. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2010.

Ref Type: Report

10. Barcelo,A. & Rajpathak,S. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. *Revista Panamericana de Salud Publica* **10**, 300-308 (2001).
11. Saker,P.J. *et al.* UKPDS 21: Low Prevalence of the Mitochondrial Transfer RNA gene (tRNA^{Leu}(UUR)) Mutation at Position 3243bp in UK Caucasian Type 2 Diabetic Patients. *Diabet. Med.* **14**, 42-45 (1997).
12. Lehto,M. *et al.* High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia* **42**, 1131-1137 (1999).

13. Katulanda, P. *et al.* Prevalence and clinical characteristics of maternally inherited diabetes and deafness caused by the mt3243A->G mutation in young adult diabetic subjects in Sri Lanka. *Diabet. Med.* **25**, 370-374 (2008).
14. Parra Marín, M.V., Cornejo Ochoa, J.W., Duque Vélez, C.E., Ruiz Linares, A., & Bedoya Berrío, G. Comportamiento de la mutación mtDNA A3243G en dos familias antioqueñas de pacientes diagnosticados con el síndrome MELAS. *Iatreia* **23**, 21-33 (2010).
15. McBride, H.M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* **16**, R551-R560.
16. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465 (1981).
17. Wallace, D.C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**, 440-450 (2010).
18. Shutt, T.E. & Shadel, G.S. A compendium of human mitochondrial gene expression machinery with links to disease. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**, 360-379 (2010).
19. Wiesner, R.J., R++egg, J.C., & Morano, I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **183**, 553-559 (1992).
20. DiMauro, S. & Davidzon, G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* **37**, 222-232 (2005).
21. Ballinger, S.W. *et al.* Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet* **1**, 11-15 (1992).
22. van den Ouweland, J.M.W. *et al.* Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* **1**, 368-371 (1992).
23. Majamaa, K. *et al.* Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet* **63**, 447-454 (1998).
24. Guillausseau, P.J. *et al.* Heterogeneity of diabetes phenotype in patients with 3243 bp mutation of mitochondrial DNA (Maternally Inherited Diabetes and Deafness or MIDD). *Diabetes Metab* **30**, 181-186 (2004).
25. Guillausseau, P.J. *et al.* Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann. Intern. Med.* **134**, 721-728 (2001).
26. Massin, P. *et al.* Retinal and renal complications in patients with a mutation of mitochondrial DNA at position 3,243 (maternally inherited diabetes and deafness). A case-control study. *Diabetologia* **51**, 1664-1670 (2008).

27. Tsukuda, K. *et al.* Screening of patients with maternally transmitted diabetes for mitochondrial gene mutations in the tRNA^{Leu}(UUR) region. *Diabet. Med.* **14**, 1032-1037 (1997).
28. Karicheva, O.Z. *et al.* Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic Acids Research* **39**, 8173-8186 (2011).
29. Li, R. & Guan, M.X. Human Mitochondrial Leucyl-tRNA Synthetase Corrects Mitochondrial Dysfunctions Due to the tRNA^{Leu}(UUR) A3243G Mutation, Associated with Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Symptoms and Diabetes. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 2147-2154 (2010).
30. Yasukawa, T. *et al.* Modification Defect at Anticodon Wobble Nucleotide of Mitochondrial tRNAs^{Leu}(UUR) with Pathogenic Mutations of Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 4251-4257 (2000).
31. Lowell, B.B. & Shulman, G.I. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. *Science* **307**, 384-387 (2005).
32. Befroy, D.E. *et al.* Impaired Mitochondrial Substrate Oxidation in Muscle of Insulin-Resistant Offspring of Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* **56**, 1376-1381 (2007).
33. Goodpaster, B.H., He, J., Watkins, S., & Kelley, D.E. Skeletal Muscle Lipid Content and Insulin Resistance: Evidence for a Paradox in Endurance-Trained Athletes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**, 5755-5761 (2001).
34. Suzuki, S. *et al.* The effects of coenzyme Q10 treatment on maternally inherited diabetes mellitus and deafness, and mitochondrial DNA 3243 (A to G) mutation. *Diabetologia* **41**, 584-588 (1998).
35. Pavlakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., De Vivo, D.C., & Rowland, L.P. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.* **16**, 481-488 (1984).
36. Hirano, M. & Pavlakis, S.G. Topical Review: Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes (MELAS): Current Concepts. *Journal of Child Neurology* **9**, 4-13 (1994).
37. Yatsuga, S. *et al.* MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1820**, 619-624 (2012).
38. Manwaring, N. *et al.* Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion* **7**, 230-233 (2007).
39. DiMauro, S. & Hirano, M. MELAS in *GeneReviews* (eds. Pagon, R.A. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1 A.D.).

40. Iizuka, T., Sakai, F., Kan, S., & Suzuki, N. Slowly progressive spread of the stroke-like lesions in MELAS. *Neurology* **61**, 1238-1244 (2003).
41. Majamaa-Voltti, K.A. *et al.* A 3-year clinical follow-up of adult patients with 3243A>G in mitochondrial DNA. *Neurology* **66**, 1470-1475 (2006).
42. Sproule, D.M. & Kaufmann, P. Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1142**, 133-158 (2008).
43. Naini, A. *et al.* Hypocitrullinemia in patients with MELAS: an insight into the MELAS paradox. *Journal of the Neurological Sciences* **229**, 187-193 .
44. El-Hattab, A.W. *et al.* Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation. *Mol. Genet Metab* **105**, 607-614 (2012).
45. El-Hattab, A.W., Emrick, L.T., Craigen, W.J., & Scaglia, F. Citrulline and arginine utility in treating nitric oxide deficiency in mitochondrial disorders. *Mol. Genet Metab* **107**, 247-252 (2012).
46. El-Hattab, A.W., Emrick, L.T., Chanprasert, S., Craigen, W.J., & Scaglia, F. Mitochondria: role of citrulline and arginine supplementation in MELAS syndrome. *Int. J Biochem. Cell Biol.* **48**, 85-91 (2014).
47. Koga, Y. *et al.* MELAS and l-arginine therapy: pathophysiology of stroke-like episodes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1201**, 104-110 (2010).
48. American Diabetes Association Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **34**, S62-S69 (2011).
49. Wang, J., Venegas, V., Li, F., & Wong, L.J. Analysis of Mitochondrial DNA Point Mutation Heteroplasmy by ARMS Quantitative PCR in *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
50. Levey, A.S. *et al.* A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Annals of Internal Medicine* **150**, 604-612 (2009).
51. Schwartz, G.J. *et al.* New equations to estimate GFR in children with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 629-637 (2009).
52. de Laat, P. *et al.* Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. *J Inherit Metab Dis* **35**, 1059-1069 (2012).
53. Ma, Y. *et al.* The study of mitochondrial A3243G mutation in different samples. *Mitochondrion* **9**, 139-143 (2009).

54. Shanske,S. *et al.* Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: Implications for diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* **130A**, 134-137 (2004).
 55. Rossignol,R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* **370**, 751-762 (2003).
 56. Thorburn DR & Rahman S Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. in *GeneReviews* (eds. Pagon,R.A. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 2014).
 57. Malecki,M. *et al.* Search for mitochondrial A3243G tRNA(Leu) mutation in Polish patients with type 2 diabetes mellitus. *Med. Sci. Monit.* **7**, 246-250 (2001).
 58. Boyle,K.E. *et al.* Gestational diabetes is characterized by reduced mitochondrial protein expression and altered calcium signaling proteins in skeletal muscle. *PLoS. One.* **9**, e106872 (2014).
 59. Uimonen,S., Moilanen,J.S., Sorri,M., Hassinen,I.E., & Majamaa,K. Hearing impairment in patients with 3243A-->G mtDNA mutation: phenotype and rate of progression. *Hum. Genet.* **108**, 284-289 (2001).
 60. de,L.P. *et al.* Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. *J. Inherit. Metab Dis.* **35**, 1059-1069 (2012).
 61. DiMauro,S. & Hirano,M. MELAS in *GeneReviews* (eds. Pagon,R.A. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1 A.D.).
 62. Guery,B. *et al.* The spectrum of systemic involvement in adults presenting with renal lesion and mitochondrial tRNA(Leu) gene mutation. *J Am. Soc. Nephrol.* **14**, 2099-2108 (2003).
 63. Betts,J. *et al.* Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **32**, 359-373 (2006).
 64. Felner,E.I. *et al.* Genetic interaction among three genomic regions creates distinct contributions to early- and late-onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes* **6**, 213-220 (2005).
 65. Durruty,P., Ruiz,F., & Garcia de los,R.M. Age at diagnosis and seasonal variation in the onset of insulin-dependent diabetes in Chile (Southern hemisphere). *Diabetologia* **17**, 357-360 (1979).
 66. Elamin,A., Omer,M.I., Zein,K., & Tuvemo,T. Epidemiology of childhood type I diabetes in Sudan, 1987-1990. *Diabetes Care* **15**, 1556-1559 (1992).
 67. Johns Hopkins University. Online Mendelian Inheritance in Man. 2015.
- Ref Type: Online Source

68. Tang, X. *et al.* Very low penetrance of hearing loss in seven Han Chinese pedigrees carrying the deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation. *Gene* **393**, 11-19 (2007).