



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN PUNTUAL  
T16189C EN LA REGIÓN HIPERVARIABLE I  
(HV-I) DE DNA MITOCONDRIAL CON DIABETES  
MELLITUS II MEDIANTE SU AMPLIFICACIÓN,  
SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS  
BIOINFORMÁTICO**

**T E S I S**  
**P A R A O B T E N E R E L T Í T U L O D E :**  
**L I C E N C I A D A E N B I O Q U Í M I C A D I A G N Ó S T I C A**  
**P R E S E N T A**  
**P R I S C I L L A E L I Z A B E T H L Ó P E Z M O N T O Y A**

**ASESORES:**

**M. en C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS**  
**DRA. VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY**

**CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Asociación de la mutación puntual T16189C en la región hipervariable I (HV-I) de DNA mitocondrial con Diabetes Mellitus II mediante su amplificación, secuenciación y análisis bioinformático**

Que presenta la pasante: Priscilla Elizabeth López Montoya  
Con número de cuenta: 308178818 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Octubre de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
<b>VOCAL</b>	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis asesoras Maritere y Vicky, que además de haberme brindado la oportunidad de seguirme preparando profesionalmente, han sido un gran ejemplo para mí; gracias por todo el tiempo y conocimientos que compartieron conmigo, por la confianza depositada en mí, por los consejos, apoyo y amistad. Mil gracias.

A mis sinodales, tutores y todos los profesores que formaron parte de mi educación, ya que cada uno de ellos aportó una valiosa pieza en mi formación académica, por aconsejarme y guiarme a lo largo de 4 años, y por haber hecho bastante agradable esta etapa de mi vida.

A mi familia y amigos, por confiar en mí y apoyarme siempre, motivándome a seguir adelante, haciendo felices cada uno de mis días.

A mis amigos de la E MGS, por haber compartido conmigo sus experiencias y por haberme brindado su amistad; gracias por esos días tan amenos en el laboratorio.

A mi facultad, a mi querida UNAM, por ser mi segundo hogar; por darme la oportunidad de conseguir y proponerme nuevas metas; gracias por todas las vivencias que tuve.

“Sí se pudo. No fue fácil. Pero lo logré.”

## DEDICATORIAS.

A mi familia:

A ti Eli, que sin importar nada, me has tenido paciencia en los buenos y malos momentos, brindado tu amor incondicional y apoyo en todo momento; por todos tus esfuerzos y sacrificios, por cada desvelo, cuidado y consuelo cuando más lo necesité; por todos tus consejos pero también regaños, que sin ellos no sería quien soy ahora; gracias por haberme dado la vida. Te amo 'ma.

A ti Toñito, que has sido siempre mi guía, mi consejero, mi amigo; por enseñarme que puedo lograr todo aquello que me proponga y que el único límite es mi voluntad; por aguantarme en mis malos ratos pero también por compartir conmigo innumerables locuras; gracias por haberme dado esta familia tan maravillosa que es lo más importante en mi vida, es por ustedes que lucho día a día. Te amo 'pa.

A ti Payo, que pese a ser unos cuantos años menor que yo, me has demostrado siempre una gran fortaleza y temple para enfrentar los problemas; por enseñarme que en esta vida siempre hay una solución y no importa cuán grande sea el obstáculo; por los incontables momentos en que me hiciste reír cuando más lo necesitaba; por ser la c hispa de la familia; por tu cariño.

A ti Polito, que eres el pilar de esta maravillosa familia; gracias, por demostrarme día a día que rendirse no es una opción y no importa si el mundo entero se nos viene encima, siempre hay una salida y hay que hacer frente a la vida con la mejor actitud posible, ya que ésta termina hasta que nosotros nos hemos dado por vencidos; por todas las ocasiones en que me has sorprendido con tu inigualable memoria y sabiduría; por todo lo que me has enseñado desde pequeña, por hacerme feliz; gracias por todo tu apoyo y amor abuelito.

A mis abuelitas Chuy y Coco, así como mi Padrino Arturo, que siendo no tan largo el tiempo que estuve con ustedes como hubiese querido, desde donde se encuentren, siempre me han cuidado e iluminado mi camino, dándome la fortaleza para seguir adelante.

A mi madrina Rosy, a mi tía Lili y a mi tío Chucho, que han sido desde que nací un gran apoyo incondicional para mí, estando presentes en las buenas y en las malas; por brindarme su amor y orientación durante mi desarrollo como persona.

A mis tías, tíos y primos, que me han hecho sentir siempre querida y apoyada; por esas legendarias reuniones familiares en las que no hace falta un motivo para convivir, pero está de sobra para divertirnos.

A mis amigos:

A Ale y Beto, que se imaginaron se convirtieron en más que mis amigos, en mis hermanos; por motivarme a que no deje de superarme profesionalmente; por aguantarme y nunca abandonarme en mis peores momentos; por escucharme y decir las palabras justas cada que lo necesité; por fomentar y ser cómplices de mis locuras; gracias por todas esas peleas en las que terminábamos muriendo de risa; por todos los días que nos pasamos diciendo cosas cada vez más hilarantes; gracias, por estar en mi vida y hacer cada momento especial.

A Bris, mi muchachita, que no sólo has sido mi cómplice sino también mi guía durante esta etapa de nuestras vidas; por todos tus regaños y por todos tus consejos; por todas las veces que terminábamos llorando de risa hasta por la más mínima tontería; por incontables aventuras, gracias.

A Nancy, Danee, Mitzi, Gabys y Brenda, por estos 4 años de risas, lágrimas, aventuras, regaños; por todos los momentos de estrés que con su simple compañía se volvieron divertidos; por todo lo que compartimos dentro y fuera de la facultad.

À Iván, Alexis et Iván, "les Haïtiens", pour donner son amitié sincère, de croire en moi et m'avoir encouragé à obtenir plus en plus loin, pour égayer ma journée chaque fois que je les vois, pour être mes amis.

A Betty, Lillian, Chris y Adrián, por ser mis amigos, por escucharme cada que lo he necesitado, por todo lo que he compartido con ustedes; me siento afortunada de tenerlos en mi vida.



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, bajo la dirección de la Dra Virginia Sánchez Monroy y de la M. en C. Maritere Domínguez Rojas.

---

---

**ÍNDICE.**

1. Abreviaturas.....	3
2. Índice de figuras .....	8
3. Índice de tablas.....	10
4. Índice de gráficos.....	11
5. Resumen .....	12
6. Introducción .....	13
6.1 Mitocondria.....	13
6.1 Generalidades.....	13
6.2 Estructura y funciones.....	14
6.3 Metabolismo.....	16
6.3.1 Ciclo de Krebs .....	16
6.3.2 $\beta$ -oxidación .....	17
6.3.3 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa .....	17
6.2 DNA mitocondrial.....	19
6.2.1 Generalidades.....	19
6.2.2 Mecanismos hereditarios.....	21
6.2.3 Regiones hipervariables .....	23
6.2.4 Polimorfismos y haplogrupos .....	25
6.2.5 Alteraciones del mtDNA en enfermedades humanas .....	29

---

---

6.3 Diabetes Mellitus .....	31
6.3.1 Generalidades.....	31
6.3.2 Clasificación.....	32
6.3.2.1 DM tipo I .....	33
6.3.2.2 DM tipo II .....	33
6.3.3 Epidemiología .....	34
6.3.4 Etiología .....	39
6.3.4.1 Fisiopatología .....	40
6.3.5 Factores de riesgo y diagnóstico.....	41
6.4 Métodos de estudio .....	44
6.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
6.4.2 Secuenciación de Sanger.....	46
7. Justificación .....	51
8. Objetivos.....	53
9. Material y métodos.....	54
10. Diagrama de flujo experimental.....	60
11. Resultados.....	61
12. Discusión .....	72
13. Conclusiones .....	77
14. Referencias bibliográficas .....	78

**1. ABREVIATURAS.**

<b>°C</b>	grados centígrados
<b>A</b>	adenina
<b>aa</b>	aminoácido
<b>a.C.</b>	antes de Cristo
<b>ADA</b>	American Diabetes Association
<b>AGE</b>	productos terminales de glicación
<b>APE</b>	endonucleasaapurínica/apirimidínica
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato
<b>BER</b>	reparación por escisión de bases
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>C</b>	citosina
<b>C-3</b>	carbono 3
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	calcio
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>CoA</b>	acetilcoenzima A
<b>CSB</b>	secuencias altamente conservadas
<b>d.C.</b>	después de Cristo
<b>Da</b>	Daltons
<b>dATP</b>	desoxiadenina trifosfatada
<b>dCTP</b>	desoxicitosina trifosfatada
<b>ddNTP</b>	didesoxinucleótido trifosfatado
<b>dGTP</b>	desoxiguanina trifosfatada

---

---

<b>D-loop</b>	bucle de desplazamiento
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DM-I</b>	Diabetes Mellitus tipo 1
<b>DM-II</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	desoxinucleótido trifosfatado
<b>dTTP</b>	desoxitimina trifosfatada
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>ETF</b>	flavoproteína transferidora de electrones
<b>FAD</b>	flavín adenín dinucleótido oxidado
<b>FADH</b>	flavín adenín dinucleótido
<b>FADH<sub>2</sub></b>	flavín adenín dinucleótido reducido
<b>FID</b>	Federación Internacional de Diabetes
<b>G</b>	guanina
<b>g</b>	gramos
<b>GIP</b>	polipéptido insulínico dependiente de glucosa
<b>GLP-1</b>	péptido 1 tipo glucagón
<b>H<sub>2</sub>O</b>	agua
<b>HA1</b>	hemoglobina glucosilada
<b>HCONH<sub>2</sub></b>	formamida
<b>HDL</b>	lipoproteína de alta densidad
<b>HLA</b>	antígeno leucocitario humano
<b>hrs</b>	horas

---

---

<b>HV-I</b>	región hipervariable 1
<b>HV-II</b>	región hipervariable 2
<b>HV-III</b>	región hipervariable 3
<b>IAPP</b>	hormona polipeptídica del polipéptido amiloide del islote
<b>IDDM</b>	Diabetes Mellitus dependiente de insulina
<b>Indel</b>	inserción/delección
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>kg/m<sup>2</sup></b>	kilogramos por metro cuadrado
<b>lb</b>	libra
<b>LDL</b>	lipoproteína de baja densidad
<b>LHON</b>	neuropatía óptica hereditaria de Leber
<b>MAO</b>	fosfolipasa A <sub>2</sub> monoaminoxidasa
<b>MELAS</b>	encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular
<b>mg/dL</b>	miligramos por decilitro
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	magnesio ion divalente
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloruro de magnesio
<b>min:</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>MME</b>	membrana mitocondrial externa
<b>mmHg</b>	milímetros de mercurio
<b>MMI</b>	membrana mitocondrial interna
<b>mmol/L</b>	milimoles por litro

---

---

<b>mtDNA</b>	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADH+H<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NDDG</b>	National Diabetes Data Group
<b>nDNA</b>	ácido desoxirribonucleico nuclear
<b>NEFA</b>	ácidos grasos no esterificados
<b>NIDDM</b>	Diabetes Mellitus no dependiente de insulina
<b>nm</b>	nanometros
<b>NTH1</b>	proteína tipo endonucleasa III
<b>O<sub>2</sub></b>	oxígeno molecular
<b>OGG1</b>	8-oxoguanina DNA glucosilasa 1
<b>O<sub>H</sub></b>	cadena pesada
<b>O<sub>L</sub></b>	cadena ligera
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEO</b>	oftalmoplejía externa progresiva
<b>P<sub>H</sub></b>	promotor de la cadena pesada
<b>PHDC</b>	piruvato deshidrogenasa
<b>P<sub>i</sub></b>	grupo fosfato
<b>P<sub>L</sub></b>	promotor de la cadena ligera

<b>pmol</b>	picomol
<b>QH<sub>2</sub></b>	ubiquinona reducida
<b>rHV-I</b>	región hipervariable 1 redefinida
<b>RNA</b>	ácido ribonucleíco
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>rRNA</b>	ácido ribonucleico ribosomal
<b>seg</b>	segundo
<b>sHV-I</b>	región hipervariable 1 pequeña
<b>SNP</b>	polimorfismo de un sólo nucleótido
<b>TAG</b>	triacilglicérido
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris/Borato/EDTA
<b>tRNA</b>	ácido ribonucleico de transferencia
<b>μL</b>	microlitros

**2. ÍNDICE DE FIGURAS.**

Figura 1. Origen hipotético de la mitocondria de acuerdo a la teoría endosimbiótica de Lynn Margulis..... 13

Figura 2. Estructura de la mitocondria. a. Micrografía electrónica. b. Representación esquemática con sus componentes. .... 15

Figura 3. Funciones metabólicas de la mitocondria..... 18

Figura 4. Mapa genómico del DNA mitocondrial humano ..... 19

Figura 5. Mecanismo de eliminación de mtDNA en mamíferos..... 21

Figura 6. Región control de mtDNA y sus respectivas regiones hipervariables. .... 23

Figura 7. Mecanismos de mutación puntual en la región control no codificante mayor del mtDNA ..... 24

Figura 8. Tipos de polimorfismos. .... 26

Figura 9. Migración del mtDNA humano. .... 28

Figura 10. Polimorfismos del mtDNA asociados al riesgo de diferentes tipos de cáncer.. 29

Figura 11. Regiones de la FID y proyecciones globales para la diabetes epidémica en personas de 20 a 79 años: 2013-2035. .... 35

Figura 12. Incidencia en el 2011 de DM-II por entidad federativa según sexo, por cada 100 mil habitantes..... 37

Figura 13. Tasa de morbilidad hospitalaria por DM-II en población mayor de 20 años en el 2011 según grupo de edad y sexo, por cada 100 mil habitantes. .... 38

Figura 14. Tasa de mortalidad observada en la población por DM-II en el 2011 por entidad federativa, por cada 100 mil habitantes..... 38

Figura 15. Patogénesis de la Diabetes mellitus tipo 2..... 39

Figura 16. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	45
Figura 17. Secuenciación de Sanger. ....	46
Figura 18. Primera generación de secuenciación automatizada. ....	48
Figura 19. Mapa de la República Mexicana que indica la distribución de las regiones analizadas. ....	64
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 2 % en la que se visualizan los productos de amplificación (~400pb) de la PCR de la HV-I del mtDNA .....	65
Figuras 21 y 22. Electroferogramas resultado de la secuenciación de la HV-I .....	66
Figura 23. Alineamiento entre la secuencia consenso del mtDNA humano y algunas muestras representativas mostrando la región de interés .....	66
Figura 24. Linajes simplificados del mtDNA humano .....	75

---

---

**3. ÍNDICE DE TABLAS.**

Tabla 1. Complejos proteicos de la MMI .....	18
Tabla 2. Genoma del DNA mitocondrial.....	20
Tabla 3. Clasificación de la Diabetes Mellitus .....	33
Tabla 4. Factores de riesgo para DM-II.....	42
Tabla 5. Criterios para el diagnóstico de DM-II. ....	43
Tabla 6. Primers empleados para amplificar la HV-I del mtDNA .....	54
Tabla 7. Mezcla de reacción para la PCR punto final.....	55
Tabla 8. Condiciones de termociclado para la PCR punto final.....	55
Tabla 9. Condiciones de termociclado para limpieza. ....	56
Tabla 10. Mezcla de reacción para la secuenciación .....	57
Tabla 11. Condiciones de termociclado para secuenciación.....	57
Tabla 12. Datos bioquímico-antropométricos de la población estudiada .....	61
Tabla 13. Datos bioquímico-antropométricos de individuos con y sin la mutación. ....	68
Tabla 14. Comparación de la variante T16189C en lo reportado en la literatura .....	74

**4. ÍNDICE DE GRAFICOS.**

Gráficos 1 y 2. Distribución según género de los grupos de estudio. ....	61
Gráfico 3. Distribución de edades por grupo de estudio. ....	62
Gráfico 4. Valores de IMC. ....	62
Gráfico 5. Valores de HA1. ....	62
Gráfico 6. Parámetros bioquímicos. ....	63
Gráfico 7. Distribución según región de origen de los grupos de estudio. ....	63
Gráfico 8. Frecuencia de la mutación T16189C en individuos diabéticos y controles. ....	67
Gráfico 9. Valores de IMC en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. ....	68
Gráfico 10. Valores de HA1 en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. ....	68
Gráfico 11. Valores de glucosa en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. ....	69
Gráfico 12. Valores de colesterol en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. ....	69
Gráfico 13. Valores de TAG's en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. ....	70
Gráfico 14. Frecuencia de haplogrupos en individuos diabéticos y controles. ....	70
Gráfico 15. Frecuencia de haplogrupos en individuos diabéticos y controles, con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. ....	71

---

---

## 5. RESUMEN.

La Diabetes mellitus es un término bastante general empleado para describir un grupo de enfermedades metabólicas que conducen a una hiperglucemia prolongada, que está asociada a un daño a largo plazo de los órganos, su disfunción y subsecuente falla. La diferencia en los factores que determinan el desarrollo de ésta forma la base para su clasificación como DM -I y D M-II. El progreso de la diabetes tipo 2 está dado principalmente por dos mecanismos patogénicos: un progresivo deterioro de la función de las células pancreáticas productoras de insulina y, una resistencia de los tejidos periféricos a ésta, que da como resultado un descenso de la respuesta metabólica.

Este es un padecimiento metabólico multifactorial influenciado por un conjunto de factores genéticos, de determinantes metabólicos, características demográficas y factores de riesgo relacionados al estilo de vida y al ambiente que se ha convertido en la epidemia del siglo XXI, con un alarmante pronóstico de incremento en su incidencia en toda la población mundial a futuro.

Dentro de los factores genéticos causantes de un desorden metabólico se ha identificado el polimorfismo de mtDNA T 16189C como un “ hotspot” para la determinación de la resistencia a la insulina, obesidad y finalmente el desarrollo de la Diabetes mellitus tipo 2, establecido únicamente en los grupos étnicos europeo y asiático. Dado el hecho de que la población mexicana es una de las más afectadas por este padecimiento, en el presente estudio se llevó a cabo el análisis de la frecuencia de esta variación en el genoma mitocondrial, con la finalidad de conocer la posible asociación entre la presencia de esta mutación y la enfermedad, haciendo uso de las técnicas de PCR de punto final y la secuenciación de Sanger, determinando además el haplogrupo de cada muestra procesada y así poder resaltar la probable influencia de alguno en específico. A su vez, se llevó a cabo un análisis comparando datos bioquímico-antropométricos que pudiesen destacar estando asociados a la presencia del polimorfismo.

Los resultados obtenidos demostraron que existe una relación entre la presencia de la variación T16189C y el desarrollo de la enfermedad con respecto a los valores elevados de TAG's, además de una posible influencia de los demás analitos. También, se vio que los haplogrupos A y C predominaron ante la ausencia de la mutación, mas no en cambio los haplogrupos B y H.

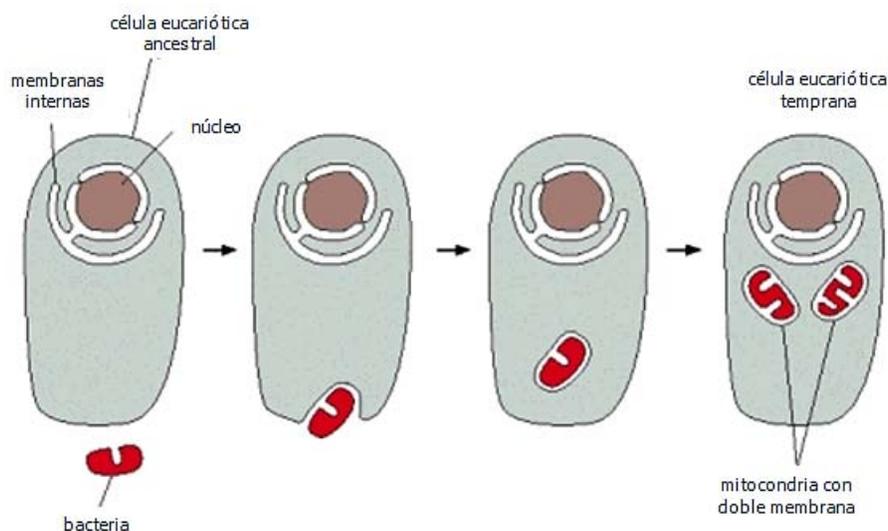
## 6. INTRODUCCIÓN.

### 6.1. Mitocondria

#### 6.1.1 Generalidades

Existen dos tipos distintos de células: las procariontes y las eucariontes. De acuerdo a sus características bioquímicas, actualmente se aceptan tres grandes dominios que agrupan a los seres vivos: Bacteria, Archaea y Eukarya; agrupando los dos primeros a procariontes unicelulares y coloniales y el último a todos los organismos constituidos por células eucariontes (Curtis, 2008). Las diferencias fundamentales entre estos dos tipos celulares, recaen en la presencia o ausencia de una envoltura nuclear que rodee al material genético, la conformación lineal o circular de éste, así como la participación de estructuras delimitadas por membranas dentro del citoplasma que realicen distintas funciones celulares especializadas, llamados organelos.

Para poder explicar el origen de algunos de estos organelos como los mitocondrias y los cloroplastos, y por ende, el surgimiento evolutivo de los eucariontes, la investigadora estadounidense Lynn Margulis propuso la teoría endosimbiótica, la cual parte de la idea que una célula anaeróbica fagocitó a otra más pequeña de características aeróbicas, sobreviviendo ésta dentro del citoplasma de la primera (Figura 1).



**Figura 1.** Origen hipotético de la mitocondria de acuerdo a la teoría endosimbiótica de Lynn Margulis. (Alberts, 2008)

Esta simbiosis internalizada surgió tras varias generaciones en las que la tasa de división de ambas células fue prácticamente la misma, tiene probablemente su justificación en que, al hallarse el anaerobio en condiciones óptimas para su desarrollo consumiendo la gran cantidad de metabolitos disponibles en el citoplasma además del oxígeno, éste generó a su vez grandes proporciones de energía las cuales beneficiaron enormemente a los procesos metabólicos de su hospedador anaeróbico.

Estudios posteriores sustentaron esta idea por el hecho de varias similitudes entre las mitocondrias y las células procariontes, como lo son su tamaño aproximado, que éstas contienen su propio cromosoma circular compuesto de DNA sin proteínas, la presencia de ribosomas, que éstas sintetizan sus propias proteínas, su capacidad de crecer, duplicar su genoma y reproducirse de forma independiente y que están delimitadas por dos membranas separadas a comparación de otros organelos que sólo poseen una (Audesirk, 2003).

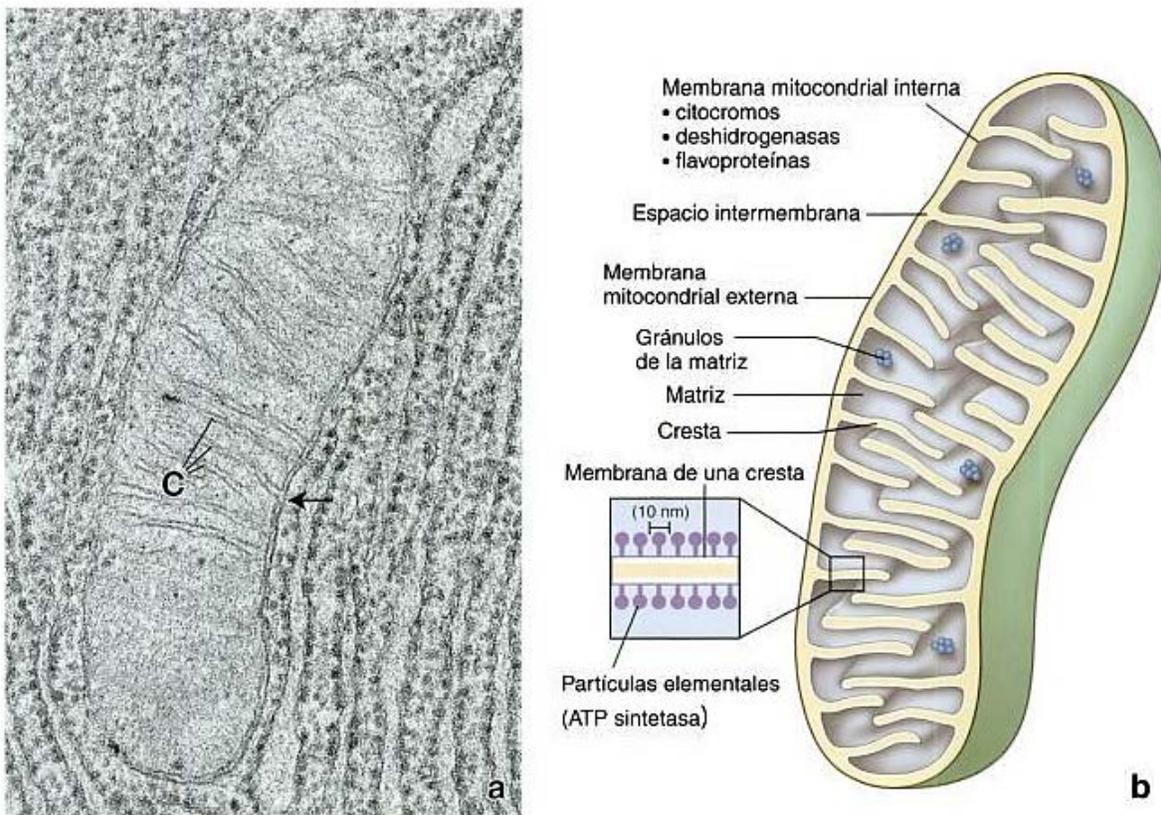
### 6.1.2 Estructura y funciones

La mitocondria, del griego *mitos* (filamento) y *chronos* (gránulo), es un organelo semiautónomo que se encuentra en el citoplasma de las células eucariontes y en el cual reside el metabolismo oxidativo de éstos. Generalmente, poseen una forma elipsoide con dimensiones de  $0.5 \times 1 \mu\text{m}$ , con la apariencia similar a la de una bacteria, aunque varían en forma y tamaño, en función de su origen y estado metabólico (Voet, 2007).

Éstas están limitadas por una membrana exterior uniforme, junto con otra interior invaginada extensamente. Estas invaginaciones conocidas como crestas (del latín *cristae*), reflejan el grado de actividad respiratoria de la célula. La membrana interna rodea el espacio llamado matriz, mientras que la externa está en contacto estrecho con el citoplasma y entre ambas membranas, se encuentra el espacio intermembranal (Ross, 2008), como se puede apreciar en la figura 2.

La membrana mitocondrial externa (MME), que tiene de 6 a 7 nm de grosor, contiene muchos canales aniónicos dependientes del voltaje, también llamados porinas mitocondriales, los cuales son permeables a moléculas sin carga de hasta 5000 Da. A

su vez, posee receptores para proteínas y polipéptidos que se traslocan hacia el espacio intermembranal. También contiene varias enzimas, como lo son la fosfolipasa  $A_2$ , monoaminoxidasa (MAO) y acetilcoenzima A (CoA) sintetasa. Por su parte, la membrana mitocondrial interna (MMI) es más delgada aunque debido a sus múltiples crestas aumenta de forma significativa su superficie. En ella, abunda el fosfolípido cardiolipina, que le confiere la propiedad de ser impermeable a los iones. Además de ésta, están contenidas proteínas con tres diferentes funciones principales: producir reacciones de oxidación de la cadena respiratoria del transporte de los electrones, sintetizar ATP y, regular el transporte de metabolitos dentro y fuera de la matriz. En esta misma membrana, se encuentran unidas las enzimas ATP sintetasa, denominadas partículas elementales, cuya estructura es rígida hacia la matriz llevándose en éstas la fosforilación oxidativa.



**Figura 2.** Estructura de la mitocondria. **a.** Micrografía electrónica. **b.** Representación esquemática con sus componentes. (Ross, 2008)

Como ya se indicó, el espacio intermembranal se halla entre ambas membranas mitocondriales. Éste contiene enzimas específicas que emplean el ATP generado en la interna. Otras enzimas que destacan son la creatinasa, la adenilatoquinasa y el citocromo C, teniendo éste último papel importante en el inicio de la apoptosis. Finalmente, la matriz mitocondrial contiene las enzimas solubles del ciclo de Krebs y aquellas que participan en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Dentro de los productos principales se tienen el  $\text{CO}_2$  y NADH reducido, que es la fuente de electrones para la cadena de transporte electrónico. Los gránulos matriciales, son cuerpos densos que almacenan  $\text{Ca}^{2+}$  y otros cationes divalentes y trivalentes, confiriéndole así la capacidad a la mitocondria de regular la concentración iónica en la matriz citoplasmática, debido a que éstas los acumulan en contra de un gradiente de concentración (Ross, 2008). Asimismo, la matriz contiene al DNA mitocondrial, ribosomas y tRNA.

Para que las funciones previamente mencionadas se lleven a cabo, la mitocondria debe contar con sistemas de transporte específicos que permiten dichos procesos. Dentro de estos, se tienen a la traslocación de ADP-ATP, exportación de oxalacetato y acetil-CoA, movilización de  $\text{P}_i$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , transporte de electrones, así como las lanzaderas para NADH.

### 6.1.3 Metabolismo

#### 6.1.3.1 Ciclo de Krebs

También conocido como el ciclo del ácido cítrico, es una vía metabólica cíclica que tiene lugar en la matriz mitocondrial y en la cual se oxidan los restos acetilo hasta dióxido de carbono, teniendo cualidades anfipáticas, es decir, con funciones tanto catabólicas como anabólicas. Éste, convierte en acetil-CoA al piruvato que es transportado desde el citosol hacia el interior de la mitocondria gracias a la intervención catabólica del complejo piruvato deshidrogenasa (PHDC). Éste a su vez sufre cambios estructurales tras una serie de reacciones, pasando por el oxalacetato, citrato, isocitrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato y finalmente malato, con el cual se completa el ciclo. Así como hay la participación de una serie de enzimas que intervienen en reacciones de deshidrogenación, descarboxilación y

oxidación, por mencionar algunas, también tiene lugar la obtención de equivalentes reductores, o dicho de otra forma, intermediarios de alta energía (NAD, NADH y FAD, FADH<sub>2</sub>) que son empleados para generar ATP, así como la liberación de productos metabólicos, como lo es el CO<sub>2</sub>.

### 6.1.3.2 β-Oxidación

Ésta ocurre principalmente en la matriz mitocondrial, tras la conversión en el citoplasma de los ácidos grasos en acil-CoA, que es la forma activada de éstos. El primer paso, consiste en la deshidratación de los ácidos grasos activados en los carbonos 2 y 3, con la consecuente formación de un derivado insaturado. Seguido de esto, se adiciona una molécula de agua para posteriormente sufrir una deshidrogenación en el C-3 para formar la β-cetoacil-CoA. Finalmente, esta molécula es hidrolizada generando acetyl-CoA y acil-CoA acortada. La degradación completa de los ácidos grasos con cadenas largas, requiere la repetición de este ciclo varias veces, transfiriéndose los equivalentes reductores en este caso a una flavoproteína transferidora de electrones (ETF) o a la ubiquinona (coenzima Q), los cuales son componentes de la cadena respiratoria. Por otra parte, al ser éstas moléculas grandes requieren de un sistema de transporte específico de grupo. La lanzadera de carnitina consiste en la transferencia por parte de la carnitina-acil-transferasa a la carnitina, la cual a su vez los transporta en la MMI. De ésta, a su vez se obtienen ciertas cantidades de NADH y FADH<sub>2</sub>.

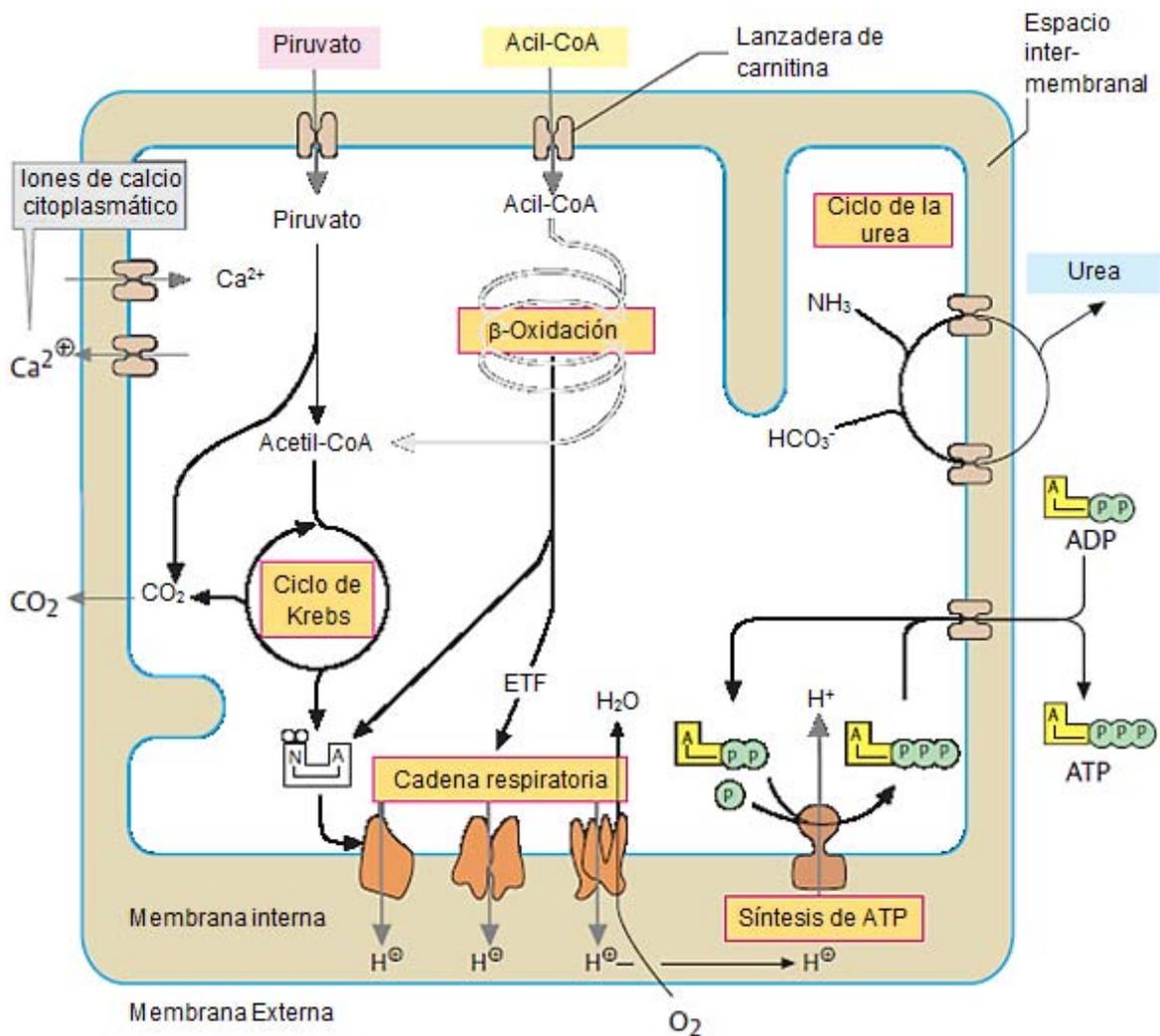
### 6.1.3.3 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

La cadena respiratoria forma una parte de la fosforilación oxidativa, catalizando el transporte de electrones desde el NADH+H<sup>+</sup> o desde la ubiquinona reducida (QH<sub>2</sub>) hasta el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), siendo esta reacción altamente exergónica debido a la diferencia de potenciales de oxidación-reducción. Esta cadena está formada por 5 complejos proteicos localizados en la MMI (tabla 1), en donde los primeros cuatro reciben los electrones del catabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, generando un gradiente de protones a través de esta membrana. Los complejos I y II, recolectan estos electrones, transfiriéndolos a los III y IV. Asimismo, los complejos I, III y IV utilizan la energía en la transferencia de los electrones para bombear protones a través de ésta misma, produciendo el gradiente el cual es

aprovechado por el complejo V para la producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Finalmente, éste ATP es trasladado desde la mitocondria al citoplasma.

**Tabla 1.** Complejos proteicos de la MMI

Complejo	Enzimas
I	NADH deshidrogenasa Ubiquinona oxidasa
II	Succinato deshidrogenasa Ubiquinona oxidoreductasa
III	Ubiquinona citocromo C oxidoreductasa
IV	Citocromo C oxidasa
V	ATP sintasa

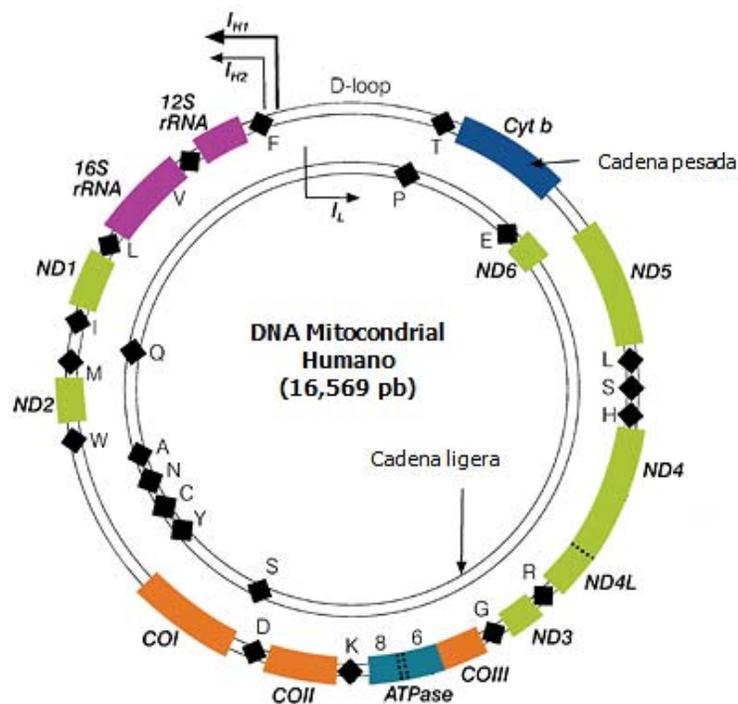


**Figura 3.** Funciones metabólicas de la mitocondria. (Koolman, 2002)

## 6.2 DNA Mitocondrial

### 6.2.1 Generalidades

La mitocondria es el único organelo en mamíferos que posee su propio genoma. Sin embargo, las funciones mitocondriales requieren de proteínas complementarias por parte del núcleo celular. Como se planteó en el capítulo anterior, ésta tuvo su origen a partir de una  $\alpha$ -proteobacteria, y al establecerse la relación simbiótica con la célula eucariótica primitiva, tuvo lugar una reorganización de los dos genomas con funciones definidas (Dakubo, 2010). Una gran variedad de los genes de la  $\alpha$ -proteobacteria fueron transmitidos a los cromosomas nucleares, de tal modo que actualmente ~1500 de las proteínas mitocondriales funcionales son codificadas nuclearmente, translocadas al citosol y subsecuentemente internalizadas en la mitocondria. El genoma mitocondrial restante (Figura 4) contiene 37 genes, 24 ácidos ribonucleicos (2 ribosomales y 22 RNA's de transferencia) que participan en la síntesis de proteínas mitocondriales, y 13 genes polipeptídicos que complementan los productos codificados en el núcleo necesarios para la actividad de la cadena respiratoria, los cuales se detallan en la tabla 2.



**Figura 4.** Mapa genómico del DNA mitocondrial humano. (Adaptación de Kyriakouli, 2008; [www.nature.com](http://www.nature.com))

El mtDNA es una molécula circular compacta de DNA de doble cadena compuesta de 16,569bp. Las dos cadenas tienen diferente contenido de G-C lo que les permite ser separadas en dos densidades por un gradiente de desnaturalización; una pesada y rica en purinas o cadena H, y una ligera y rica en pirimidinas o cadena L. Con la excepción de ND6, la cadena H codifica para todos los polipéptidos, los dos rRNA's y 14 tRNA's, mientras que la cadena L contiene los genes para ND6 y los 8 rRNA's restantes.

**Tabla 2.** Genoma del DNA mitocondrial

Genes estructurales	<i>ND1 - ND6 y ND4L</i>	Codifican las 7 subunidades del complejo I
	<i>Cyt b</i>	Codifica para una subunidad del complejo III
	<i>COI - COIII</i>	Codifican para tres subunidades del complejo IV
	<i>ATP6 y ATP8</i>	Codifican para dos subunidades del complejo V
rRNA's	12S y 16S	Forman parte de los ribosomas mitocondriales
tRNA's	F, V, L, I, M, W, D, K, G, R, H, S, T	Cadena H (nomenclatura de aa)
	P, E, S, Y, C, N, A, Q	Cadena L (nomenclatura de aa)

Esta molécula también posee dos regiones no codificadoras. Abarcando desde la posición 16,024 a la 576 de nucleótidos y flanqueada por el tRNA<sup>Phe</sup> y tRNA<sup>Pro</sup>, es una región control no codificadora de 1, 121pb o bucle de desplazamiento (D-loop), la cual es bastante variable en algunas regiones y alberga importantes elementos regulatorios para la replicación, transcripción y conservación del mtDNA. Éstos, incluyen los promotores de las cadenas pesada y ligera ( $P_H$  y  $P_L$ ), el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) y los sitios de unión de factores de transcripción, tres bloques de secuencias altamente conservadas (CSB I, II y III) importantes en la generación de oligonucleótidos para la replicación de la cadena pesada, así como las secuencias asociadas a la terminación (TAS's) que detienen prematuramente la replicación para producir un DNA 7S en el D-loop (Walberg, 1981).

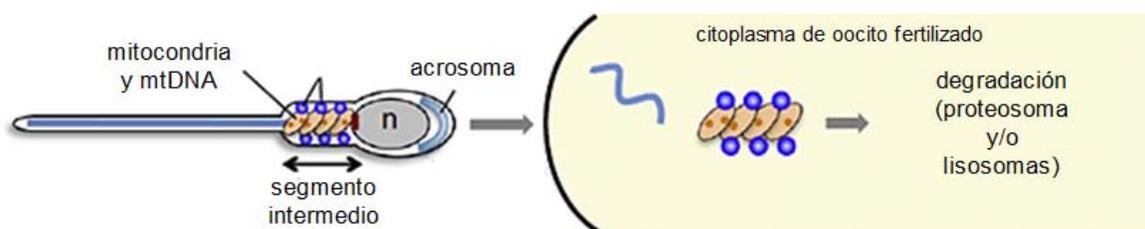
Así mismo, dentro del D-loop se encuentran regiones altamente polimórficas mejor conocidas como regiones hipervariables I (HV-I), II (HV-II) y III (HV-III). A su vez, en la HV-II se halla una región homopolimérica de citocina conocida como D310. El segundo

segmento no codificador del genoma mitocondrial es de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, localizado a dos tercios del  $O_H$ . Esta región contiene el origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ).

### 6.2.2 Mecanismos hereditarios

El DNA de este organelo citoplasmático es heredado de forma no mendeliana, directa y exclusivamente por línea materna (Giles, 1980), es decir, por parte de las mitocondrias propias del oocito a partir del cual todo mamífero se desarrolla. Este patrón de herencia se denomina generalmente como “herencia uniparental”, particularmente de tipo materno. Pese a que en mamíferos las mitocondrias paternas derivadas del espermatozoide normalmente entran al citoplasma del oocito después de la fertilización y coexisten temporalmente en el cigoto junto a un exceso de mitocondrias maternas, aquellas de origen paterno y su DNA son eliminadas selectivamente y por ende, nunca transmitidas a la descendencia, mediante dos probables mecanismos (Sato, 2013).

Una de las teorías plantea de acuerdo al modelo de “dilución simple”, que el mtDNA paterno, al presentarse en una cantidad de copias bastante menor, es diluido por el exceso de DNA del oocito y consecuentemente es muy difícil de detectar por parte de la descendencia. Por otro lado, en el modelo de “degradación activa”, el mtDNA paterno o las propias mitocondrias son selectivamente degradados, ya sea antes o después de la fertilización, para prevenir su transmisión a la siguiente generación.



**Figura 5.** Mecanismo de eliminación de mtDNA en mamíferos. (Sato, 2013)

En mamíferos, la degradación de las mitocondrias paternas parece estar regulada por múltiples mecanismos dentro de los cuales se incluye el marcaje de éstas por

ubiquitinación teniendo a su vez este proceso como blanco una proteína de la membrana mitocondrial interna llamada porohibitina, llevando esto a la degradación selectiva por proteosomas y/o lisosomas (Schwartz, 2003), como puede observarse en la figura 5.

Cada célula humana diploide contiene miles de copias clonales de mtDNA. En estados de salud o en la ausencia de mutaciones somáticas, todas estas son iguales tal y como fueron heredadas por la madre. Este estado de genomas mitocondriales poliploides en una célula en particular o tejido se refiere como homoplasmia (población clonal de mtDNA). Con el envejecimiento normal o en estados de enfermedad, algunos genomas mitocondriales sufren mutaciones, lo que al azar o selectivamente incrementa las variadas proporciones en tejidos afectados. La coexistencia de moléculas de mtDNA tanto mutantes o de tipo salvaje en las células o tejidos es llamada heteroplasmia, la cual se asocia a enfermedades mitocondriales.

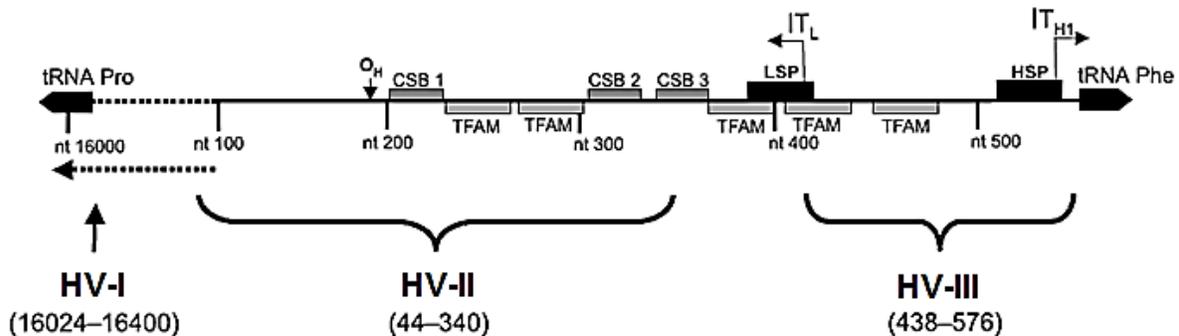
Dos mecanismos pueden llevar a cambios en la carga mutacional en células humanas (Bandelt, 2006). A diferencia del DNA nuclear, el mtDNA es destruido y replicado continuamente, siendo su replicación considerada como “relajada” debido a que ocurre de forma independiente del ciclo celular mientras que la cantidad total de éste se mantiene constante. Esto, junto con la repartición inequitativa del mtDNA mutado y de tipo salvaje por la segregación vegetativa que ocurre en cada división celular lleva a cambios en los niveles de heteroplasmia, en tejidos postmitóticos (nervioso y muscular) y en aquellos proliferativos (sanguíneo), respectivamente.

Se podría pensar que todas las mutaciones en el mtDNA acumuladas a lo largo de la vida de un individuo como resultado de las agresiones a las cuales está expuesto el material genético por el metabolismo dentro de la mitocondria tendrían que heredarse y transmitirse a las siguientes generaciones. Sin embargo, esto no sucede ya que se ha demostrado que los gametos femeninos (oocitos) contienen mitocondrias inusualmente pequeñas y simples que es tan suprimidas para la transcripción, transporte de electrones y producción de radicales libres, a diferencia de los gametos masculinos (espermatozoides) y las células somáticas de ambos sexos, que contienen mitocondrias que sí realizan todas estas funciones de forma normal (de Paula, 2013), indicando ésto que las mitocondrias del oocito sirven principalmente como plantillas

genéticas y este mecanismo tiene el propósito de aumentar la fidelidad en la herencia del mtDNA materno.

### 6.2.3 Regiones hipervariables

Como ya se mencionó anteriormente, el D-loop contiene tres regiones cortas (Figura 6) las cuales, a comparación del resto del genoma, poseen en la población un nivel altamente variable en sus secuencias. Éstas, fueron descritas y nombradas como regiones hipervariables por primera vez por Greenberg en 1983, tras realizar la clonación de esta región control no codificadora del mtDNA a partir de tejido placentario y su posterior comparación con secuencias previamente reportadas (Anderson, 1981; Walberg, 1981), estableciéndola como una región altamente divergente y la menos conservada entre especies con respecto a su longitud y secuencia propiamente. Posteriormente, Lu tz ( 1998) y Vigilant ( 1998) comprobaron que la mayoría de las mutaciones del mtDNA se concentraban en los tres segmentos hipervariables, con la densidad de posiciones polimórficas más alta en HV-I y HV-II.

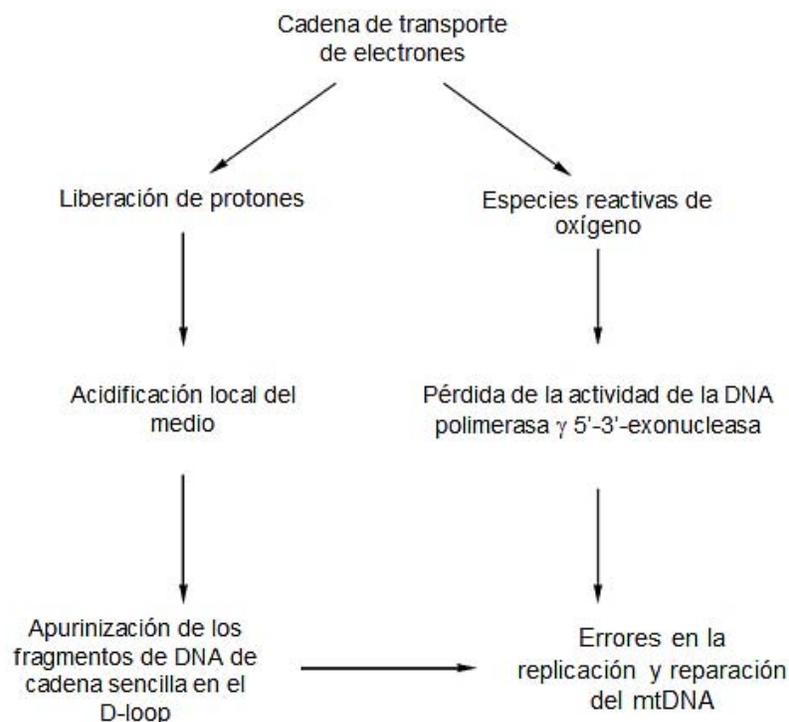


**Figura 6.** Región control de mtDNA y sus respectivas regiones hipervariables. (Bandelt, 2006)

La función completa de las regiones hipervariables aún es desconocida (Bandelt, 2006), pero parecen ser importantes en la replicación del genoma y la transcripción, además de contener o encontrarse cerca de los orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera del mtDNA. Las posiciones precisas para las diferentes secuencias hipervariables varían de acuerdo al contexto, ya que recientemente en estudios sobre genética de poblaciones se manejan rangos más amplios, particularmente de la HV-I

con la finalidad de capturar ciertas posiciones filogenéticamente importantes (Brandstätter, 2004a), a diferencia de como se había manejado tradicionalmente por parte de la comunidad forense (Brandstätter, 2004b). Inclusive, se ha llegado a redefinir la longitud de la región hipervariable 1 (Tzen, 2008), describiéndose dos secuencias: una de 237pb (rHV-I) con diversidad global de 0.9905 posiblemente reflejada por una evolución neutral y otra de 154pb (sHV-I) con diversidad de 0.9735, adicionalmente influenciada por la adaptación.

La variación en la secuencia de nucleótidos de la región control no codificadora mayor del mtDNA, en donde se encuentran los segmentos hipervariables previamente descritos, se cree está dada por tres mecanismos mutagénicos (Kornienko, 2005).



**Figura 7.** Mecanismos de mutación puntual en la región control no codificante mayor del mtDNA. (Kornienko, 2005)

Éstos, como se muestra en la figura 7, consisten en la desaminación de las bases nitrogenadas del DNA causada por agentes desaminantes, en la migración tautomérica de protones en las bases nitrogenadas, o bien por la hidrólisis del enlace glucosídico entre la base nitrogenada y el carbohidrato de los nucleótidos como consecuencia del

daño provocado por parte de los radicales libres a la DNA polimerasa  $\gamma$ , siendo éste mecanismo el más probable y predominando especialmente en la cadena pesada debido a que ésta permanece libre durante la replicación del mtDNA por un periodo de tiempo relativamente largo.

Aunado a esto, dado que la mitocondria consume más del 90% del oxígeno disponible en la célula, la generación de radicales libres en ésta se da en grandes cantidades como resultado de su actividad metabólica, junto con el hecho de que el mtDNA no presenta histonas protectoras, lo que resulta en un efecto mutagénico sinérgico. Dichas mutaciones están caracterizadas por una predominancia considerable de transiciones sobre las transversiones, así como un mayor número de transiciones entre pirimidinas a comparación de las que se dan entre purinas.

Aunque el mtDNA está expuesto a un mayor daño que el nDNA, éste también cuenta con mecanismos de reparación (Zapico, 2013). El mecanismo principal consiste en una reparación por escisión de bases (BER), que aunque es codificado por DNA nuclear éste se encuentra también en la mitocondria pero en muy bajos niveles. El BER consiste en una cascada de reacciones que comienza con el reconocimiento del daño, seguido de los pasos de procesamiento enzimático que llevan a la remoción de la lesión y la restauración de la integridad genómica.

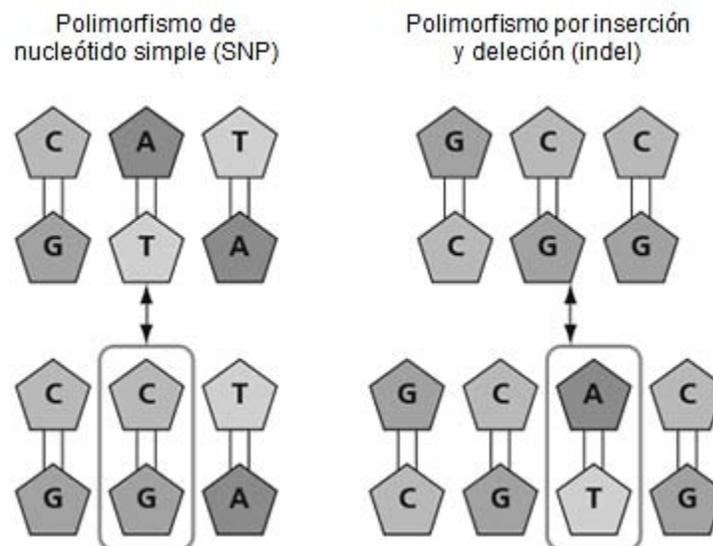
Dentro de las enzimas reparadoras de DNA en la mitocondria se tienen DNA glucosilasas específicas de daño, tales como la 8-oxoguanina DNA glucosilasa 1 (OGG1), una proteína tipo endonucleasa I II (NTH1), endonucleasaapurínica/apirimidínica (APE), y la DNA ligasa I II $\beta$ . Asimismo, la DNA pol  $\gamma$  está implicada en el mtDNA BER y existe evidencia de que la mitocondria posee también actividad de reparación por mismatch (Druzhyina, 2008).

#### **6.2.4 Polimorfismos y haplogrupos**

Toda una variedad de métodos han sido desarrollados para la caracterización de mtDNA, inicialmente como un intento para asociar algunas enfermedades a defectos mitocondriales específicos y posteriormente para trazar la historia filogenética de la población humana y examinar su estructuración, tras haberse descrito su herencia

materna. Pero también, la identificación genética se ha visto involucrada con un gran desarrollo de la biología forense (Piersy, 1993; Isenberg, 1999; Tsutsumi, 2006). Esto debido a que se pueden hallar cantidades significativas de mtDNA en las pocas muestras disponibles de huesos, dientes, sangre o cabello. Y es precisamente el análisis de estas regiones hipervariables lo que permite diferenciar individuos ya que son secuencias polimórficas.

El término polimorfismo se refiere a la variación genética observada en una población, es decir, la presencia de dos o más formas alélicas discretas. Para que un locus se defina como polimorfo, el alelo más común para éste debe tener una frecuencia inferior al 99%. Éstos pueden ser de varios tipos, de entre los cuales se pueden destacar los SNP's e in del's ( Figura 8) para el DNA mitocondrial. Los primeros se refieren a cambios simples de nucleótidos en el genoma, mientras que los últimos representan una variación resultado de la inserción o deleción de nucleótidos.



**Figura 8.** Tipos de polimorfismos. (Dudley, 2013)

El mtDNA se caracteriza por tener secuencias homopoliméricas de una o más bases nucleotídicas, localizadas en las posiciones 16184 -16188 / 16190 -16193, 303 -309 / 311-315 y 568 -573 de la región control, en las cuales son bastante frecuentes las

inserciones y deleciones. Por su parte, los SNP's presentan mayor frecuencia tanto en DNA nuclear como en el mitocondrial.

Estos polimorfismos son el resultado de mutaciones puntuales que perduraron y se esparcieron en la población. Previamente, se dijo que la HV-I es una de las partes de la región control en donde mayormente se presentan los cambios de nucleótidos. Es así que Richards en 1998 sugirió que dicha secuencia se divide en tres clases, dependiendo de si su tasa de sustitución en determinadas posiciones de nucleótidos es rápida, intermedia o baja. En base a su variabilidad, diversos estudios han demostrado la existencia de "hotspots" o secuencias dentro de las regiones hipervariables en donde es más probable que se presente una mutación, al igual que los "coldspots", en donde el número de mutaciones independientes es muy bajo (Malyarchuk, 2002; Malyarchuk, 2008). La razón por la cual ciertas posiciones en la región control tienen mayor índice mutagénico es porque la mutación puntual de un nucleótido está influenciada por otros sitios circundantes en el mtDNA (Bendall, 1995), como por ejemplo la variación heteroplásmica en la longitud del tracto poli-C comprendido entre las posiciones 16184 y 16193 de la HV-I que sufre una inestabilidad molecular tras la transición T-C en la posición 16189 (Howell, 2000).

Como ya se describió anteriormente, el genoma mitocondrial sufre variadas mutaciones y se sabe que la tasa mutacional del mtDNA es mucho mayor que en el DNA nuclear de 5 a 10 veces más que en los genes nucleares (Brown, 1980), sobre todo en la región control no codificante para la cual se estima un número promedio de  $0.47 \times 10^{-6}$  sustituciones por posición por año (Pakendorf, 2005), con una preferencia en las regiones hipervariables. Sin embargo, también se llegó a proponer que en lugar de esto, dichos sitios eran resultado de antiguas mutaciones que fueron redistribuidas a través de los distintos linajes del mtDNA mediante un proceso de recombinación (Eyre-Walker, 1999). Actualmente se sabe que este fenómeno no tiene lugar en el genoma mitocondrial de los mamíferos (Hagström, 2014), por lo cual dicha hipótesis queda descartada, además de que nuevas mutaciones en el mtDNA han sido observadas tanto en líneas germinales como somáticas (Stoneking, 2000).

Dadas las características únicas del mtDNA, esta ha sido una molécula de gran interés para esclarecer relaciones filogenéticas y evolutivas. Fue precisamente a partir de estudios de evolución molecular que se han establecido haplogrupos, que son

conjuntos de haplotipos, los cuales a su vez son series de alelos en posiciones particulares del genoma, en este caso mitocondrial, para caracterizar la historia de las poblaciones humanas mediante análisis de parsimonia en diferentes grupos que comparten las mismas mutaciones puntuales. En 1987, Cann formuló la hipótesis de la “Eva mitocondrial”, de la cual se puede deducir que todos los tipos de mtDNA actuales se remontan a un único ancestro en común proveniente de África de hace aproximadamente 200,000 años atrás. El estudio del mtDNA ha contribuido además al conocimiento de las migraciones humanas al resto del mundo, como se representa en la figura 9, y a que las mutaciones surgidas es tán acumuladas en todos los movimientos poblacionales por las distintas regiones geográficas, por lo que se puede decir que los haplogrupos mitocondriales son continente-específicos.

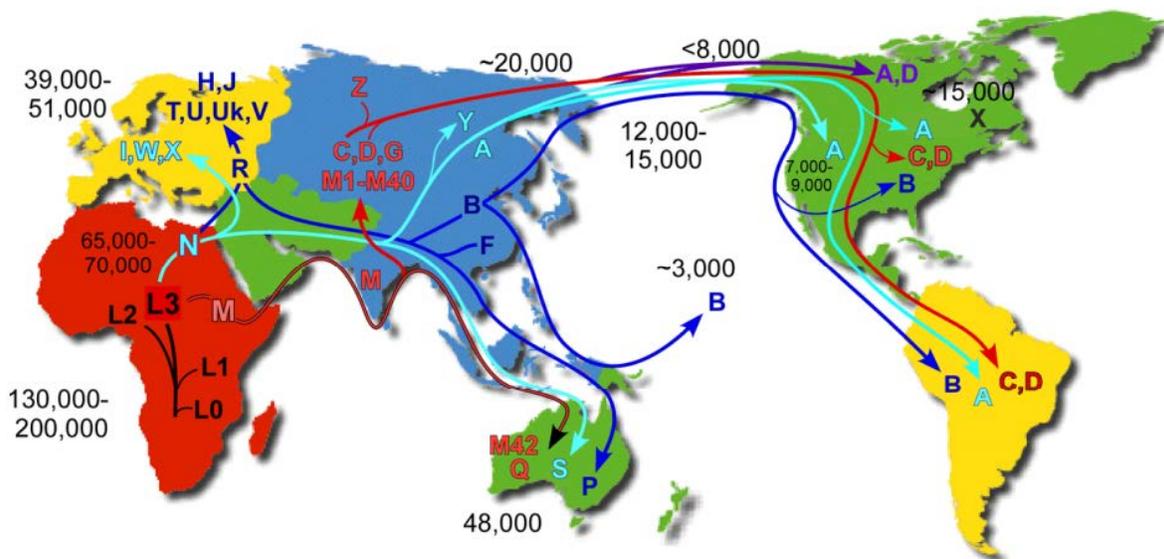
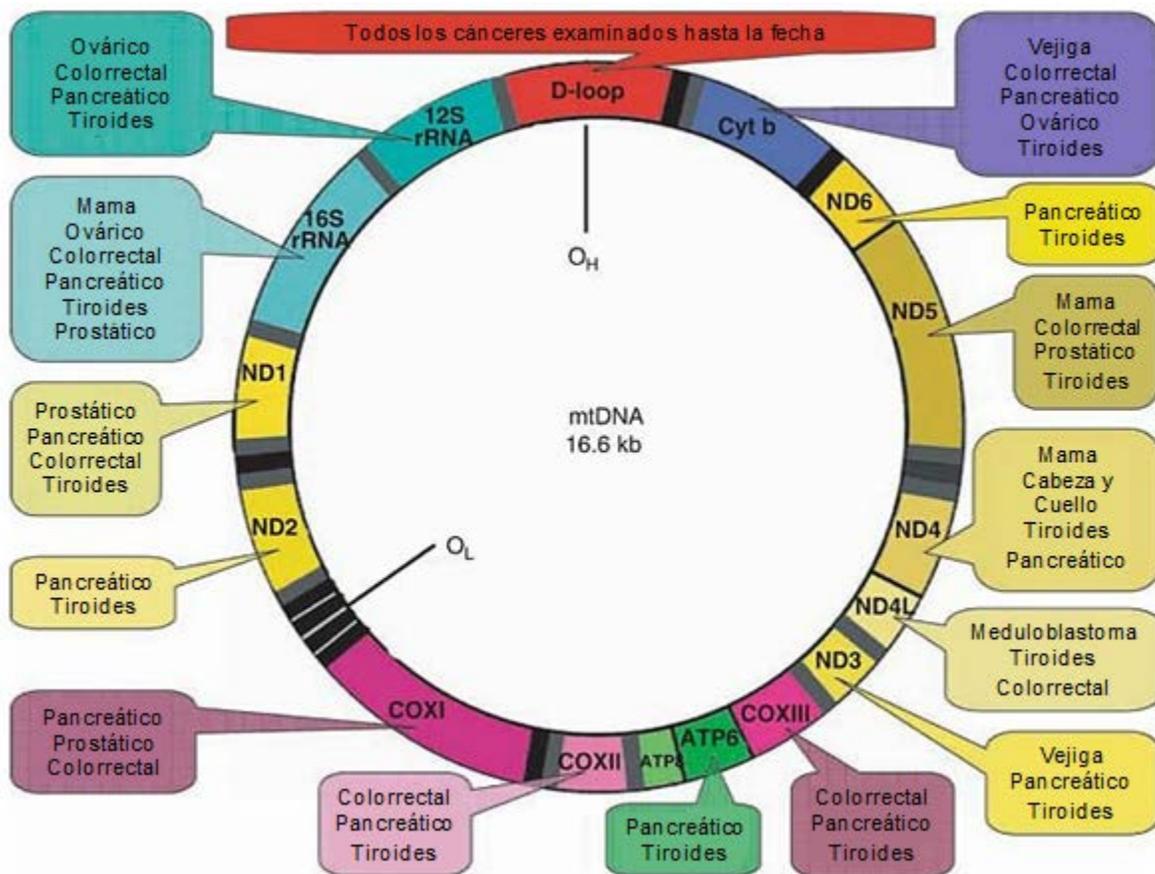


Figura 9. Migración del mtDNA humano. (<http://www.mitomap.org/>)

El haplogrupo L0 con sus subgrupos L1, L2 y L3 son característicos de poblaciones africanas, mientras que los haplogrupos M y N surgidos a partir del L3 en el este de África se esparcieron en Eurasia y América. Los haplogrupos H, I, J, T, U, V y W son característicos de poblaciones caucásicas, los haplogrupos A, B, C y D se originaron en Asia y América, y los haplogrupos G, Y y Z predominan en Siberia.

### 6.2.5 Alteraciones del mtDNA en enfermedades humanas

No sólo la disfunción en el metabolismo mitocondrial puede dar lugar al desarrollo de padecimientos y perturbaciones en la salud de un individuo. Como se mencionó anteriormente, se ha relacionado al mtDNA con varias enfermedades por modificaciones específicas en éste. Dentro de éstas, pueden destacarse las metabólicas, neurodegenerativas y el cáncer. Como puede apreciarse en la figura 10, diversos tipos de cáncer se han asociado a múltiples polimorfismos en todo el genoma mitocondrial, principalmente en el D-loop, ya que aumentan el riesgo para su desarrollo. Por su parte, en los trastornos neurodegenerativos que se ha visto la participación de rearrreglos en el DNA mitocondrial se incluyen los síndromes de Pearson, de Kearns-Sayre y de Leigh, la miopatía hereditaria de Leber y algunas cardiomiopatías con efectos asociados a falla renal, alteraciones oftálmicas (PEO y LHON), epilepsia mioclónica, acidosis láctica por encefalopatía mitocondrial (MELAS) y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Zapico, 2013).



**Figura 10.** Polimorfismos del mtDNA asociados al riesgo de diferentes tipos de cáncer. (Singh, 2009)

Dichas modificaciones pueden ser heredadas, transmitidas de la madre a la descendencia o ser espontáneas, ya sea por mutaciones puntuales que afecten a los tRNA's o rRNA's, por mutaciones puntuales que afecten los genes codificantes de proteínas, o bien por rearrreglos de mutaciones. Ejemplo de éstas y con afectación metabólica, se tiene a la Diabetes mellitus tipo 2, ya que variaciones en el mtDNA y sobre todo en las regiones hipervariables se han asociado a un mayor riesgo para su desarrollo, al igual que para un estado de diabetes (Guo, 2005). Por este hecho, se puede sospechar que determinadas poblaciones dados sus haplogrupos se hallan más propensas a padecer esta enfermedad, como se ha demostrado en algunos estudios en donde los haplogrupos F y A exhiben mayores factores de riesgo a diferencia del N9a que es protector para la diabetes especialmente en mujeres (Zapico, 2013). Particularmente, retomando el ejemplo que se describió previamente sobre la variación heteroplásmica debida a una inestabilidad molecular en el tracto pol i-C comprendido entre las posiciones 16184 y 16193 en la HV-I tras la transición T-C en la posición 16189, se ha asociado esta mutación con un aumentado riesgo para el desarrollo de la DM-II (Poulton, 1998; Poulton, 2002).

---

## 6.3. Diabetes Mellitus

### 6.3.1 Generalidades

La diabetes fue documentada por primera vez por los egipcios en el año 1500 a. C., siendo caracterizada por la pérdida de peso y poliuria. Sin embargo, fue el médico griego Apollonius de Memphis quien acuñó el término “diabetes” en el año 230 a. C. (Poretski, 2010). En griego, diabetes (διαβητης) significa “pasar a través”, refiriendo a una enfermedad que involucra la descarga de cantidades excesivas de orina.

La primera descripción clínica completa de la diabetes aparentemente fue hecha por Aulus Cornelius Celsus (30-50 d.C.) y fue hasta el segundo siglo d.C. que otro médico griego, Aretaeus de Cappadocia, distinguió por primera vez entre la llamada diabetes dulce y la diabetes insípida (Ahmad, 2013). En el siglo 5 d. C., los médicos hindúes Sushruta y Charaka también describieron una diferenciación entre los dos tipos de diabetes pero en base al momento de su desarrollo, ya que no todos los individuos la presentaban en edades tempranas y otros en etapas adultas.

Durante el Renacimiento, el primer registro que se tiene sobre esta enfermedad y el término diabetes data de un texto médico escrito en 1425, por el médico suizo Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, mejor conocido como Paracelso. En 1675, Thomas Willis adiciona la palabra “mellitus” que en latín significa miel, tras el redescubrimiento de la dulzura en la orina y sangre de los pacientes afectados, que ya había sido observada por los antiguos hindúes. Mathew Dobson, en 1776, confirma que el sabor dulce se debía al exceso de un tipo de azúcar en estos fluidos corporales (Ahmed, 2002).

En el cuerpo humano cierto número de sistemas y rutas metabólicas funcionan en sincronía para llevar y mantener un estado fisiológico sano. En el centro de estos procesos recae la habilidad del organismo de mantener un estado estable constante u homeostasis. Una aberración de ésta conduce al desarrollo de una lesión o estado patológico en varios órganos. La DM reduce la habilidad de un individuo de regular el nivel de glucosa en el flujo sanguíneo resultando en un número de complicaciones mayores y algunas menores (Poretski, 2010). Un hito importante en la historia de la diabetes es el establecimiento de la función del hígado en la glucogénesis, por Claude

Bernard en 1857, y el concepto de que la diabetes se debe a un exceso de producción de glucosa.

La DM es un término bastante general que es empleado a un grupo de enfermedades que conducen a una hiperglucemia prolongada. La hiperglucemia crónica en la DM está asociada a un daño a largo plazo de los órganos, su disfunción y subsecuente falla, especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos, conocidos como complicaciones micro y macrovasculares. Estos daños resultan, en parte, de la glicación de las proteínas tisulares, mejor conocidas como productos terminales de glicación (AGE's), la incrementada actividad de la vía de los polioles y probablemente de otros mecanismos aún no reconocidos.

### 6.3.2 Clasificación

La diferencia en los mecanismos para el desarrollo de los diferentes tipos de diabetes forma la base de sus clasificaciones. En 1936, Sir Harold Percival (Harry) Himsworth hace una distinción entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. La primera clasificación fue publicada en 1979 por el National Diabetes Data Group (NDDG), la cual estaba basada en la terapia farmacológica aplicada, dividiéndola en dos grandes grupos: diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), ésta última subclasificada a su vez en diabetes gestacional, diabetes mellitus relacionada a desnutrición y algunos otros tipos. Estos términos fueron populares durante los años 80's y 90's, sin embargo cayeron en desuso debido a la problemática surgida a partir del conocimiento cada vez mayor sobre la patogénesis de la diabetes, lo cual la volvió una clasificación redundante.

La clasificación actual para la diabetes fue acuñada y publicada en 1997 por el panel experto de la ADA (American Diabetes Association), refrendada por la OMS en 1998, modificada nuevamente por la ADA en 2003, y finalmente por la OMS en 2006. Esta nueva clasificación está basada en la patogénesis de la enfermedad y no en su tratamiento (Maraschin, 2010). Cuatro grandes categorías fueron propuestas: diabetes mellitus tipo I (DM-I), diabetes mellitus tipo II (DM-II), diabetes gestacional y otros tipos específicos de diabetes, como se detalla en la tabla 3.

**Tabla 3.** Clasificación de la Diabetes Mellitus (ADA, 2013)

- 
1. Diabetes tipo I
    - A. Mediada inmune
    - B. Idiopática
  2. Diabetes tipo II
  3. Otros tipos
    - Defectos genéticos de la función de células  $\beta$
    - Defectos genéticos en la acción de la insulina
    - Enfermedades de páncreas exócrino
    - Endocrinopatologías
    - Inducida por drogas o químicos
    - Formas no comunes de diabetes mediada inmune
    - Otros síndromes genéticos (Down, Turner, etc)
  4. Diabetes gestacional
- 

#### 6.3.2.1 DM tipo I

Previamente conocida como diabetes dependiente de insulina o diabetes de inicio juvenil es un desorden autoinmune que involucra la destrucción de las células  $\beta$  por activación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y de la infiltración de macrófagos en los islotes pancreáticos. Su comienzo usualmente ocurre en la infancia o la adultez temprana (<35 años). Se sabe que factores genéticos así como ambientales contribuyen a la susceptibilidad de esta diabetes. Por ejemplo, se ha demostrado que el gen HLA (antígeno leucocitario humano) en el cromosoma 6 está estrechamente asociado a la DM-I. A su vez, existe evidencia que sugiere que ciertos virus podrían ser los responsables de desencadenarla (Ahmad, 2013).

#### 6.3.2.2 DM tipo II

Ésta está caracterizada por la síntesis insuficiente de insulina y su secreción, secundaria a una resistencia a insulina. Es normalmente diagnosticada después de la 4ta década de vida, su incidencia y prevalencia incrementa con la edad, y equivale aproximadamente al 90% de todos los casos de diabetes a nivel mundial. La DM-II se divide en dos subgrupos, diabetes con obesidad y sin obesidad. En el primer caso, los pacientes usualmente desarrollan resistencia a la insulina endógena debido a alteraciones en los receptores celulares y esto se asocia a la distribución de la grasa

abdominal, mientras que en el segundo, existe cierta resistencia a la insulina en niveles post-receptores en adición a la deficiencia de producción de insulina y su liberación (Ahmad, 2013).

### 6.3.3 Epidemiología

En los últimos 50 años, los cambios en el estilo de vida han guiado a un incremento dramático en la prevalencia de la DM-II en prácticamente todas las sociedades alrededor del mundo (Feinglos, 2008). La reducción en la actividad física, incrementos en la ingesta dietética y el envejecimiento de la población son factores clave en el logro de este cambio tan rápido, aunado al descubrimiento de más diferencias genéticas en la susceptibilidad de diferentes grupos étnicos a la DM-II.

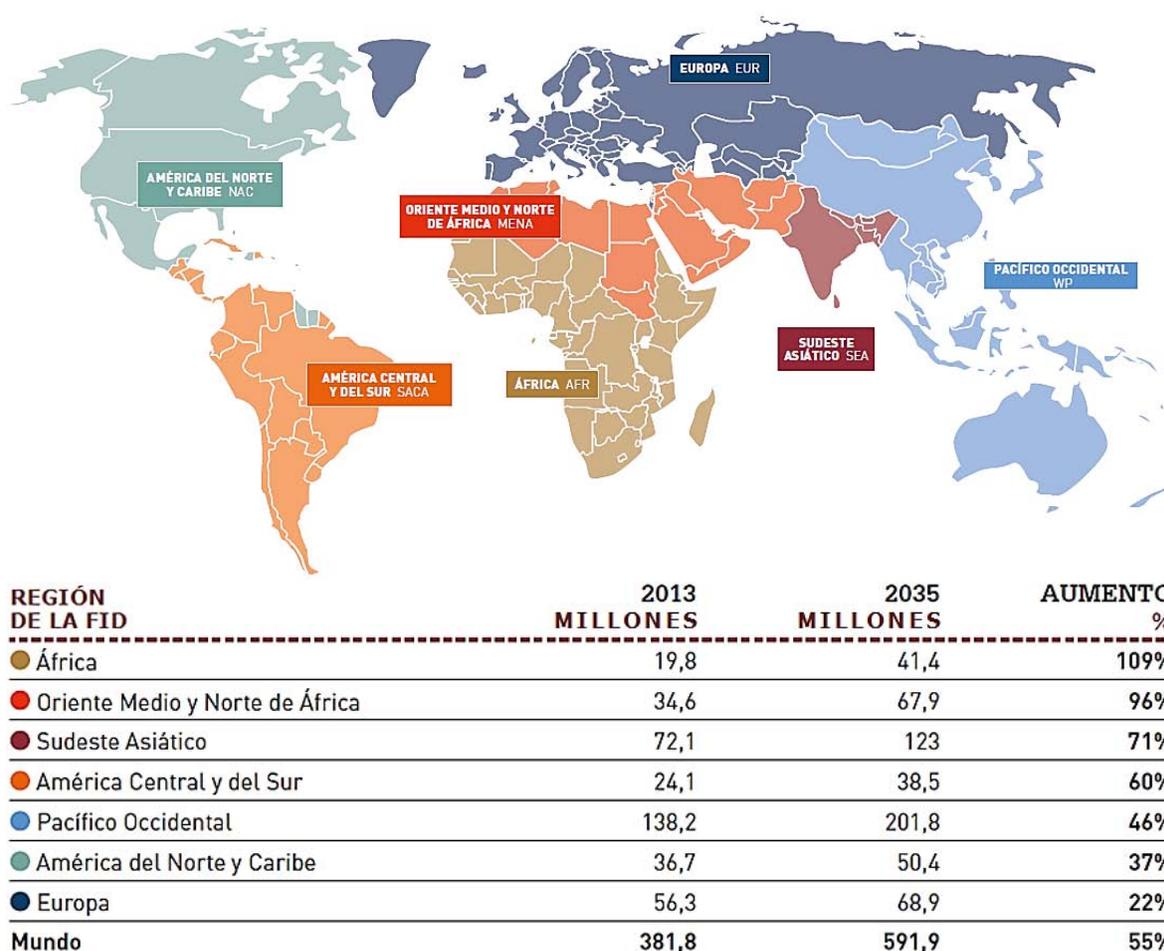
Recientes publicaciones de la OMS y de la Federación Internacional de Diabetes (FID) han proporcionado información sobre los números actuales de personas con diabetes, así como las proyecciones en las próximas 2 décadas. En el 2000, la prevalencia estimada de diabetes entre adultos fue de 2.8% o bien, de 171 millones de personas. Esta prevalencia, se esperaba que incrementara a un 4.4% o 366 millones de personas para el 2030, sin embargo, de acuerdo a datos recientes de la FID se sabe que actualmente 382 millones de personas en el mundo tienen diabetes, aproximadamente el 8.3% de los adultos. Cerca del 80% vive en países de ingresos medios y bajos.

Para el año 2035, se espera 592 millones de personas estarán afectadas, es decir, un adulto de cada 10 con esta enfermedad, lo que equivaldría a tres casos nuevos cada 10 segundos. Dicha estimación se basa en los cambios demográficos de la población y asumiendo que la obesidad y actividad física se mantengan constantes con el tiempo.

Los mayores incrementos en la prevalencia de diabetes se darán en países donde las economías estén en desarrollo con mayor proporción en individuos de entre 40 y 69 años de edad, presentándose la diabetes en personas cada vez más jóvenes. Se espera a su vez, que China sea el país con mayor número de individuos que vivan con diabetes, es tando ubicado México en el 5to lugar de acuerdo al listado de los 10 principales territorios con diabetes publicado por la FID. Y aunque en su totalidad esta enfermedad afecta en mayor grado a los hombres, por el hecho de su prevalencia en

edades avanzadas se espera haya más mujeres afectadas que hombres, ya que éstas son más longevas, teniendo una diferencia de hasta 15 millones.

Como se observa en la figura 11, el Pacífico Occidental tiene más personas con diabetes que cualquier otra región. Actualmente, África es la población más pequeña con diabetes, no obstante en el año 2035 será del doble lo cual resulta alarmante para la capacidad de desarrollo de este continente. El panorama en América Central y del Sur es igualmente preocupante, donde se prevé que la población afectada aumente en un 60% dentro de las próximas 2 décadas. Por su parte, el sudeste Asiático representa cerca de la quinta parte del total de los casos en el mundo.



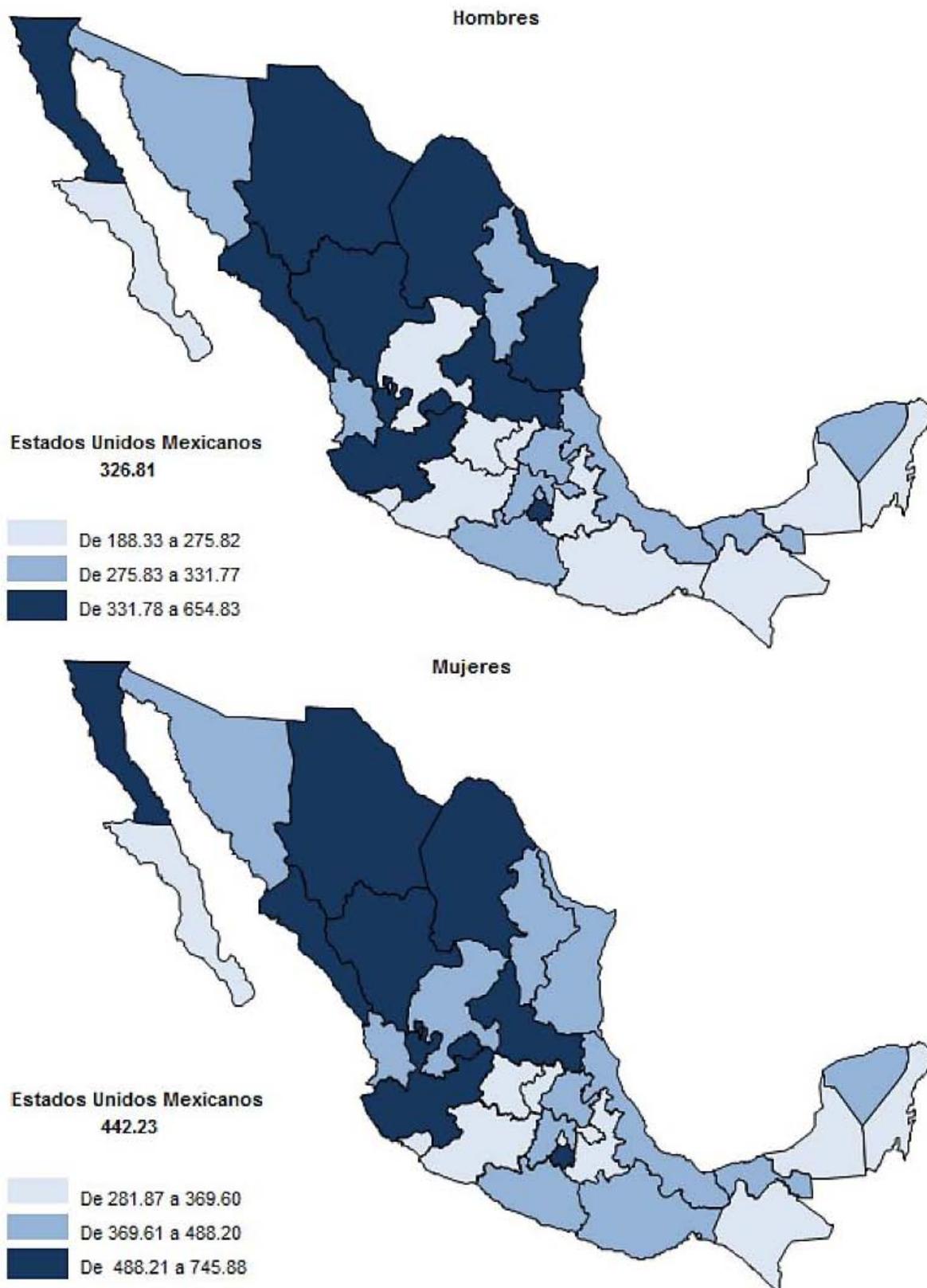
**Figura 11.** Regiones de la FID y proyecciones globales para la diabetes epidémica en personas de 20 a 79 años: 2013-2035 (Federación Internacional de Diabetes, 2013)

La diabetes representa un reto para la sociedad, no sólo por los recursos económicos y de infraestructura que requieren los prestadores de servicios de salud para brindar una

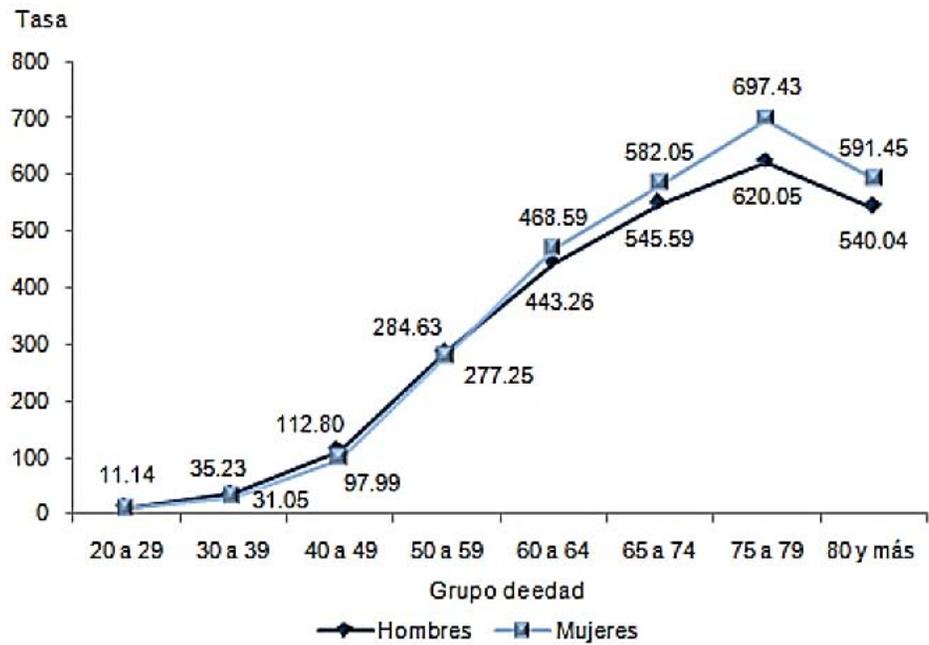
atención adecuada, sino también por el costo económico y emocional para las personas que la padecen. Se estima que esta enfermedad reduce de 5 a 10 años la esperanza de vida de la población, de acuerdo a la Secretaría de Salud. Según la FID, en el 2013 América del Norte y Caribe gastaron unos 263,000 millones de dólares, lo que equivale a casi la mitad de los gastos de salud en diabetes del mundo, mientras que Europa 147,000 millones de dólares. A pesar de sus crecientes poblaciones con diabetes, el Sudeste Asiático y África asignan menos del 1% de su gasto total sanitario a esta enfermedad.

Refiriéndose específicamente al comportamiento de esta enfermedad en México, de 1998 al 2012, se ha observado una tendencia hacia el incremento en un 4.7%, pasando de una tasa de morbilidad de 342.1 a 358.2 casos por cada 100 mil habitantes, siendo el grupo etario de 50-59 años de edad el más afectado y con una mayor incidencia de casos en el sexo femenino. En la figura 12, puede apreciarse esta diferencia al igual que en los demás países, en donde las entidades con mayor número de casos nuevos se registran en Morelos y Sinaloa, en tanto que Querétaro y Quintana Roo presentan las incidencias más bajas.

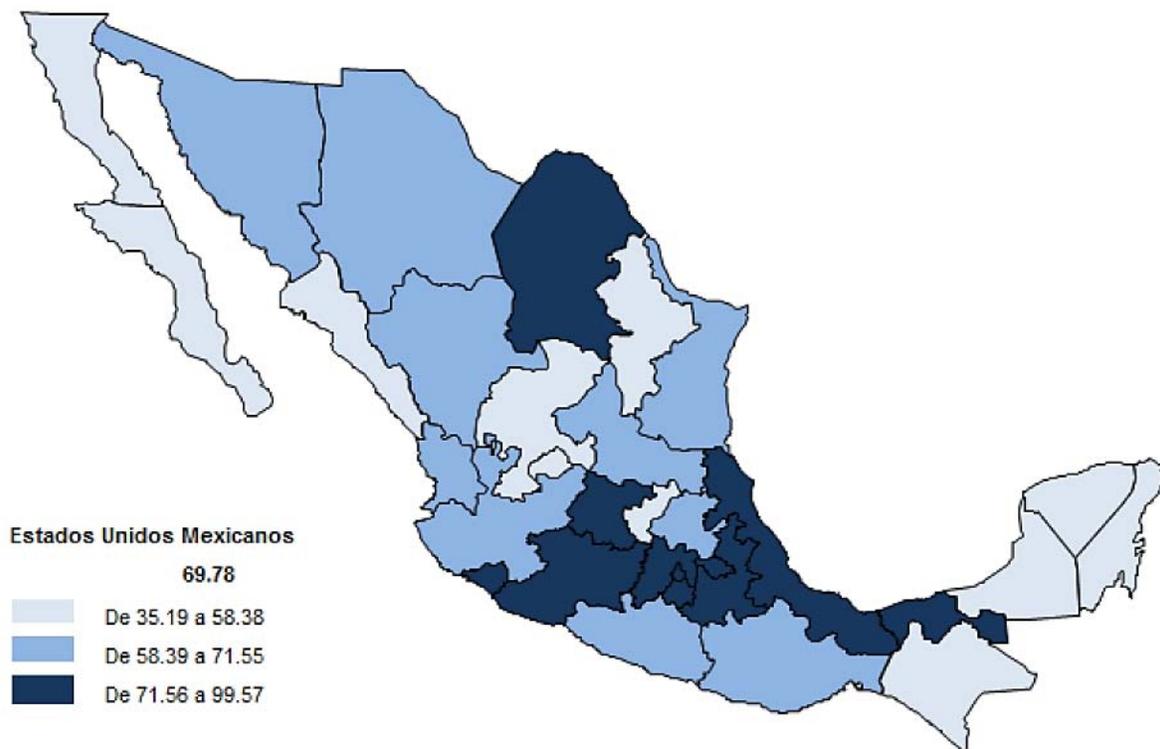
Igualmente como en el resto del mundo, dado el comportamiento que presenta esta patología hacia el incremento, se espera un aumento del 37.8% en el número de casos y 23.9% en la tasa de morbilidad, manteniéndose la tendencia para el año 2030 (Dirección General de Epidemiología, 2013). Al ser ésta una enfermedad que requiere de atención hospitalaria en muchas ocasiones, se sabe que el número de egresos hospitalarios por esta causa tiende a aumentar siendo similar en tre a ambos sexos, según la figura 13, hasta una edad de entre 75 y 79 años, en donde predominan las mujeres. Por entidad federativa, Coahuila tiene la morbilidad hospitalaria más alta, y Querétaro y Jalisco las más bajas. Por su parte, el INEGI estableció a la diabetes en el 2012 como la segunda causa de muerte en la población mexicana, con una tasa de mortalidad de 75 defunciones por cada 100 mil habitantes, siendo que en 1998 ésta era de 42.5 defunciones por cada 100 mil habitantes, lo que demuestra su acelerado incremento en los últimos 15 años. De acuerdo a la imagen 14, las tasas de mortalidad más altas se ubican en el distrito Federal, Veracruz y Puebla, mientras que Quintana Roo, Chiapas y Baja California Sur tienen el menor número de defunciones por esta causa.



**Figura 12.** Incidencia en el 2011 de DM-II por entidad federativa según sexo, por cada 100 mil habitantes. (Dirección General de Epidemiología, 2013)



**Figura 13.** Tasa de morbilidad hospitalaria por DM-II en población mayor de 20 años en el 2011 según grupo de edad y sexo, por cada 100 mil habitantes. (Dirección General de Epidemiología, 2013)

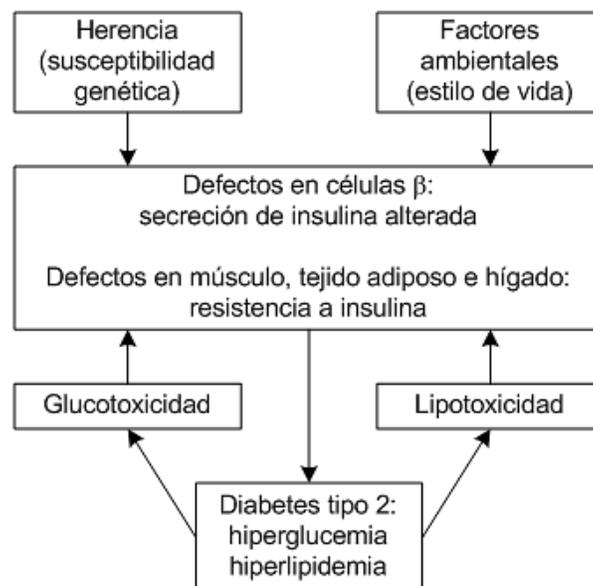


**Figura 14.** Tasa de mortalidad observada en la población por DM-II en el 2011 por entidad federativa, por cada 100 mil habitantes. (Dirección General de Epidemiología, 2013)

### 6.3.4 Etiología

La diabetes, considerada como la epidemia del siglo XXI, es un padecimiento multifactorial ( figura 15), influenciado por un conjunto de factores genéticos, determinantes metabólicos, características demográficas y factores de riesgo relacionados al estilo de vida y al ambiente (Fritsche, 2007). Dentro de estos últimos, se sabe que el consumo de carnes rojas, granos enteros, grasas saturadas, café y tabaco están asociados al riesgo de padecer diabetes, mientras que la actividad física, el consumo moderado de alcohol e incluir grasas insaturadas en la dieta pueden prevenir este estado de riesgo (Schulze, 2007).

De igual forma, la urbanización y el estado socioeconómico es tan íntimamente relacionados con la diabetes (Feinglos, 2008). Esto debido al cambio en los estilos de vida tradicionales a los modernos, en donde se ven alterados los hábitos alimentarios, con una marcada reducción en la actividad física realizada y por la contrapuesta situación en la que se puede consumir una dieta más equilibrada pero no se tiene acceso a buenos servicios de salud en las partes del mundo subdesarrolladas, a diferencia de aquellas desarrolladas en las que surge el efecto contrario. Junto con esto, la “occidentalización” en el ritmo de vida actual genera un incremento notable en el nivel de estrés que aqueja a todas las personas, fomentando además el sedentarismo lo que altera aún más sus funciones biológicas normales (Zimmet, 2001).



**Figura 15.** Patogénesis de la Diabetes mellitus tipo 2. (Östenson, 2001)

### 6.3.4 1 Fisiopatología

El papel del páncreas en la patogénesis de la diabetes fue descubierta por Mering y Minkowski en 1889. Posteriormente, este descubrimiento constituye la base para el aislamiento de la insulina y su uso clínico, por Banting y Best en 1921. El desarrollo de la DM-II está dado principalmente por dos mecanismos patogénicos: un progresivo deterioro de la función de las células de los islotes pancreáticos que genera la disminución en la síntesis de insulina y, una resistencia de los tejidos periféricos a la insulina que da como resultado un descenso de la respuesta metabólica a ésta (Carrera, 2013). Esta interacción entre la secreción y resistencia a la insulina es esencial para la conservación de una tolerancia normal a la glucosa, por lo que la diabetes engloba toda una serie de alteraciones celulares y metabólicas que afectan y deterioran la homeostasis de la glucosa. Este desorden metabólico se caracteriza por la presencia de una hiperglucemia crónica, no sólo dada por la resistencia a la insulina y su inadecuada secreción, sino también por la supresión alterada en la secreción de glucógeno, en respuesta a la ingesta de glucosa (Östenson, 2001).

Por su parte, la alteración en la población celular que compone los islotes de Langerhans del páncreas está provocada principalmente por la acumulación de fibras de amilina en estas células, procedentes de la hormona polipeptídica del polipéptido amiloide del islote (IAPP), que junto con el  $\beta$  es generado en el retículo endoplásmico por el exceso de carga de trabajo debido a la sobreproducción de insulina e IAPP dan como resultado la apoptosis de las células  $\beta$  (Cao, 2013). Aunado a esto, se tiene la participación de perfiles de incretinas en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, siendo dos los péptidos que potencian la secreción de insulina estimulada por la glucosa en una forma aditiva.

El péptido 1 tipo glucagón (GLP-1), es una hormona intestinal que además estimula la expresión del gen proinsulina así como las vías para la proliferación celular y antiapoptótica, e inhibe la liberación de glucagón, el vaciamiento gástrico y la ingesta de alimentos. El polipéptido insulínico de pendiente de glucosa (GIP) es un péptido simple de 42 aminoácidos secretado de forma bioactiva por las células K del duodeno y el yeyuno como respuesta a la ingesta de carbohidratos y lípidos, y el cual regula el metabolismo de grasas en los adipocitos, gracias a la incorporación insulinoestimulada de ácidos grasos a triacilglicéridos, la estimulación de la actividad

de la lipoproteína lipasa y la síntesis de ácidos grasos, así como la promoción en la proliferación de las células  $\beta$ . Mientras que la primera tiene una expresión deficiente en pacientes con DM-II, la segunda se halla en concentraciones normales o ligeramente elevadas, pero con actividad disminuida (Opinto, 2013).

### 6.3.5 Factores de riesgo y diagnóstico

Diversos estudios indican a la herencia como el mayor determinante para la resistencia a la insulina y la DM-II (Brunetti, 2014), ya que se ha demostrado que se tiene un 40% de riesgo de padecer esta enfermedad para aquellos que sólo uno de los padres se encuentra afectado (mayormente si es la madre) y un 70% si ambos padres son diabéticos. Durante los últimos años, se han estudiado e identificado varios genes que predisponen al desarrollo de la diabetes. Es así, que tras la genotipificación de marcadores genéticos se han asociado varios genes cuyas proteínas codificadas tienen importantes implicaciones para la homeostasis de la glucosa en su mayoría, ya sea por estar involucrados en la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  o bien por su participación en la resistencia a la insulina. Hasta la fecha, se tienen registrados 68 genes nucleares y 2 mitocondriales como de susceptibilidad para la DM-II (Brunetti, 2014), dentro de los cuales se pueden destacar CAPN10, TCF7L2, FTO y PPAR $\gamma$ .

Pero no se puede dejar de lado la influencia del ambiente y su interacción con la genética. Mientras que la hipótesis del “genotipo ahorrador” plantea que hay un desajuste entre los genes ancestrales y el ambiente moderno, la teoría del “fenotipo ahorrador” postula también un desajuste pero entre los ambientes intrauterino y de vida adulta de un individuo (Hu, 2011). El resultado de ambas, cambios metabólicos y estructurales (masa celular  $\beta$  disminuida y resistencia a la insulina incrementada) que son benéficos para la posterior supervivencia del individuo a un estado de hambruna y desnutrición, pero que tras hallarse en un ambiente nutricionalmente abundante puede verse incrementado el riesgo a enfermedades crónicas, como lo es la diabetes.

Por otra parte, en este padecimiento y desde un punto de vista inmunológico, el sobrepeso y la obesidad con particular acumulación de grasa abdominal resultado del sedentarismo y la sobreingesta calórica, están asociados a un bajo grado sistemático

de inflamación, el cual es típicamente caracterizado por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias circulantes y ácidos grasos. Éstos pueden interferir en la función normal de la insulina y por lo tanto inducir un estado de resistencia a la insulina, que a su vez tiene un impacto en la disfunción de las células  $\beta$  (Greevenbroek, 2013). El tejido adiposo normalmente modula el metabolismo mediante la liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFA's), glicerol y hormonas (leptina y adiponectina), junto con las citoquinas inflamatorias, pero en un estado de obesidad estos productos son producidos en grandes cantidades (Kahn, 2006), por lo cual la indica como otro factor crítico para el desarrollo de enfermedades metabólicas.

Al encontrarse los NEFA's intracelularmente aumentados, surge una competencia con la glucosa por la oxidación de sustrato lo cual lleva a la inhibición de la actividad de varias enzimas que participan en la glucólisis. A su vez, su metabolismo intracelular disminuido resulta en la elevación de estos metabolitos que activan otras cascadas, las cuales fosforilan los receptores para insulina, inhabilitando sus funciones (Kahn, 2006), llevando esto, a una probable hiperglucemia e hiperinsulinemia.

**Tabla 4.** Factores de riesgo para DM-II (Poretski, 2010)

---

Edad $\geq 45$ años
Obesidad (IMC $\geq 25 \text{kg/m}^2$ )
Historia familiar de diabetes (padres o hermanos con diabetes)
Inactividad física habitual
Raza/etnicidad (ej. Africano-Americanos, Hispano-Americanos, Americanos nativos, Asiático-Americanos, Islas del Pacífico)
Glucemia basal alterada o tolerancia alterada a glucosa previamente identificados
Historia de diabetes gestacional o parto de bebé con peso $> 9 \text{lb}$
Hipertensión ( $\geq 140/90 \text{mmHg}$ en adultos)
Colesterol HDL $\leq 35 \text{mg/dL}$ ( $0.90 \text{mmol/L}$ ) y/o nivel de TAG's $\geq 250 \text{mg/dL}$ ( $2.82 \text{mmol/L}$ )
Síndrome de Ovario Poliquístico
Historial de enfermedad vascular

---

Englobando todas las variables descritas anteriormente que se han hallado relacionadas a la diabetes, se enlista en la tabla 4 una serie de factores biológicos, desde la parte genética, metabólica o bioquímica, hasta el estilo de vida de una persona que son considerados como de riesgo para su desarrollo. Por décadas, el diagnóstico de diabetes se ha basado en criterios de glucosa, y a sea glucosa

plasmática en ayuno o con la prueba de tolerancia a ésta. Sin embargo, en 1997 el Primer Comité Experto en el diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus asoció estos niveles usados con la presencia de retinopatía como factor clave para identificar el umbral de glucosa y poder detectar a los individuos con mayor riesgo antes del desarrollo de un estado crónico (ADA, 2013). Fue así que actualmente se emplea la hemoglobina glucosilada (HA1) como marcador crónico de glucemia, reflejando los niveles de glucosa promedio en los últimos 2-3 meses, manteniéndose aún válidos los otros criterios de glucosa junto con la sintomatología clásica para este padecimiento, como se enlista en la tabla 5.

**Tabla 5.** Criterios para el diagnóstico de DM-II (Riethof, 2012)

---

Síntomas de diabetes:
Poliuria
Polidipsia
Pérdida de peso inexplicable
Hambre excesiva
Fatiga
Heridas que tardan en sanar
Infecciones frecuentes en piel
Concentraciones oscilantes de glucosa plasmática $\geq 200\text{mg/dL}$ ( $11.1\text{mmol/L}$ )
Glucosa plasmática en ayuno $\geq 126\text{mg/dL}$ ( $7.0\text{mmol/L}$ )
Glucosa plasmática $\geq 200\text{mg/dL}$ ( $11.1\text{mmol/L}$ ) durante 2hrs tras la prueba oral de tolerancia con 75g de glucosa

---

Dado el impacto mundial que tiene la diabetes actualmente y su inminente incremento exponencial en los próximos años, el diagnóstico oportuno no es suficiente para hacerle frente a esta enfermedad, por lo que se han desarrollado varias metodologías, enfocadas sobre todo en el estudio de los factores genéticos que puedan estar íntimamente relacionados con la patología y representen un factor de predisposición en los individuos.

## 6.4. Métodos de estudio

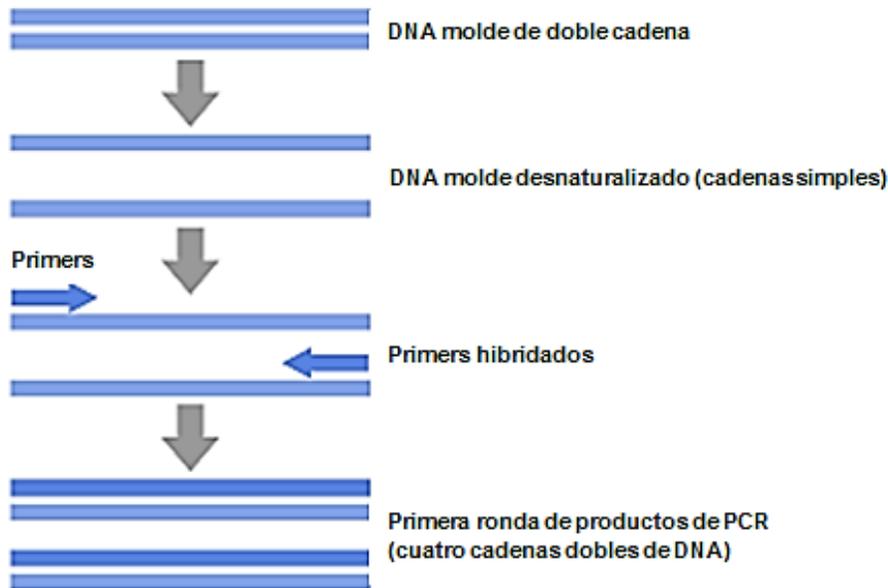
### 6.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se trata de un método *in vitro* para la amplificación del DNA. Desde la introducción de la PCR en 1985 (Saiki, 1985), se ha convertido en una técnica indispensable para varias aplicaciones en la investigación científica, clínica y forense. Ésta debe ser considerada como una versión simplificada del proceso de replicación del DNA que ocurre durante la división celular. Básicamente, la PCR consiste en tres pasos: la desnaturalización del DNA blanco, su hibridación con oligonucleótidos sintéticos o primers, y la extensión de éstos mediante una DNA polimerasa termoestable. La PCR convencional es usualmente realizada en un volumen de 10 a 100  $\mu$ L, con la participación de los desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en concentraciones de 200  $\mu$ M cada uno, de 10 a 100 pmol de cada primer y la DNA polimerasa, junto con las apropiadas sales y buffers, que usualmente contienen  $Mg^{2+}$ .

Los primers son diseñados para flanquear la secuencia de interés, siendo oligonucleótidos de entre 18 y 30 bases de longitud complementarios a los dos extremos 3' del DNA blanco, los cuales deben estar posicionados generalmente con 100 a 1000pb de diferencia. Otras características con las que deben cumplir es un contenido del 50% de GC, no tener más de tres C's o G's en su extremo 3' ya que esto podría generar hibridación inespecífica con sitios ricos en GC, y evitar la complementariedad entre primers que pueda dar lugar a dímeros.

Actualmente, esta técnica es automatizada y se realiza en termocicladores programados para calentar y enfriar a diferentes temperaturas por variados periodos de tiempo. Como ya se mencionó, cada ciclo involucra los pasos de desnaturalización, hibridación y extensión, como se resume en la figura 16, y es repetido de 20 a 40 veces, en donde por cada ciclo se dobla aproximadamente el número de moléculas producto. Durante la desnaturalización, el DNA molde es calentado (94-96°C) para separar sus dos cadenas. Después en el paso de la hibridación la temperatura es enfriada (50-65°C) para permitir que los primers específicos hibriden con los extremos 3' de las cadenas separadas del DNA. La temperatura de hibridación es dependiente de la longitud y composición de los primers. Finalmente, durante la

extensión ( $72^{\circ}\text{C}$ ), la *Taq* DNA polimerasa termoestable (Saiki, 1988) cataliza la elongación de los primers mediante la incorporación de los dNTP's complementarios que se unen al DNA molde. Estos primers extendidos forman dos nuevas cadenas de DNA molde para el siguiente ciclo de PCR.



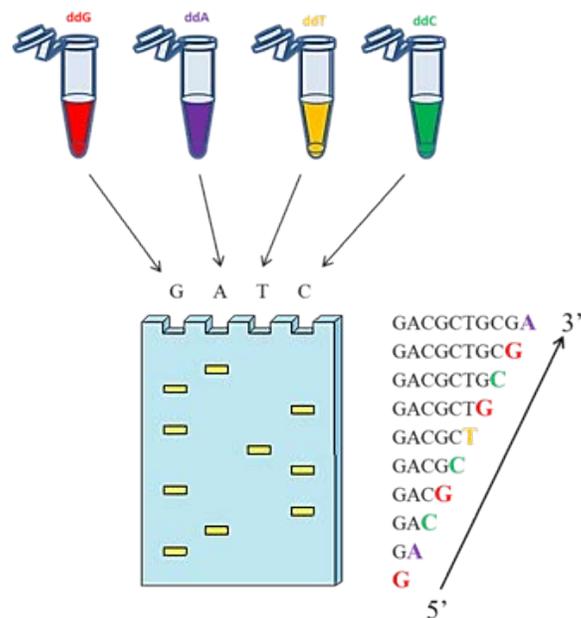
**Figura 16.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (<http://genome.wellcome.ac.uk/>)

Su considerable sensibilidad analítica y especificidad comparada con otras técnicas convencionales le confiere a la PCR grandes ventajas sin embargo, también tiene algunas limitantes. Cada ensayo de PCR requiere una cuidadosa optimización de sus reactivos y condiciones de amplificación. Asimismo, el diseño de primers es extremadamente importante para evitar que reacciones cruzadas con DNA no diana pueda resultar en productos inespecíficos. Adicionalmente, se deben emplear espacios de laboratorio, material y equipos "libres de DNA", lo cual es esencial para minimizar la contaminación con subsiguientes especímenes de amplicones de PCR que pueda llevar a resultados falsos positivos.

**6.4.2** Secuenciación de Sanger

En 1975, Sanger introdujo el método “más y menos” para la secuenciación de DNA (Sanger, 1975), el cual se basaba en el uso de la DNA polimerasa I para extender el oligonucleotido cebador y copiar el DNA blanco en presencia de cuatro desoxiribonucleotidos trifosfatados (dNTP's), estando uno de éstos marcados con <sup>32</sup>P (Sanger, 1973). La mezcla resultante era luego purificada en columnas de agarosa para remover el exceso de trifosfatos y las muestras eran sometidas a otros tratamientos. En el sistema “menos”, el DNA molde era reincubado con la DNA polimerasa I y tres dNTP's; la síntesis procedería hasta donde se pudiera en cada cadena, terminando con el residuo en el extremo 3' una posición previa al trifosfato faltante. Por su parte, en el sistema “más”, el DNA molde era reincubado únicamente con un sólo dNTP y por acción de la DNA polimerasa I, la cadena sería sintetizada terminando con un residuo de dicho dNTP.

Para ambos sistemas, muestras separadas eran incubadas con cada uno de los trifosfatos, ya sea faltante o presente. Finalmente, todas las mezclas de incubación eran desnaturalizadas para separar las nuevas cadenas sintetizadas a partir de la plantilla original, las cuales eran entonces sometidas a una electroforesis en gel de acrilamida en donde los fragmentos con extremos 5' en común se ordenarían de acuerdo a su tamaño.



**Figura 17.** Secuenciación de Sanger. (<https://cm.jefferson.edu/>)

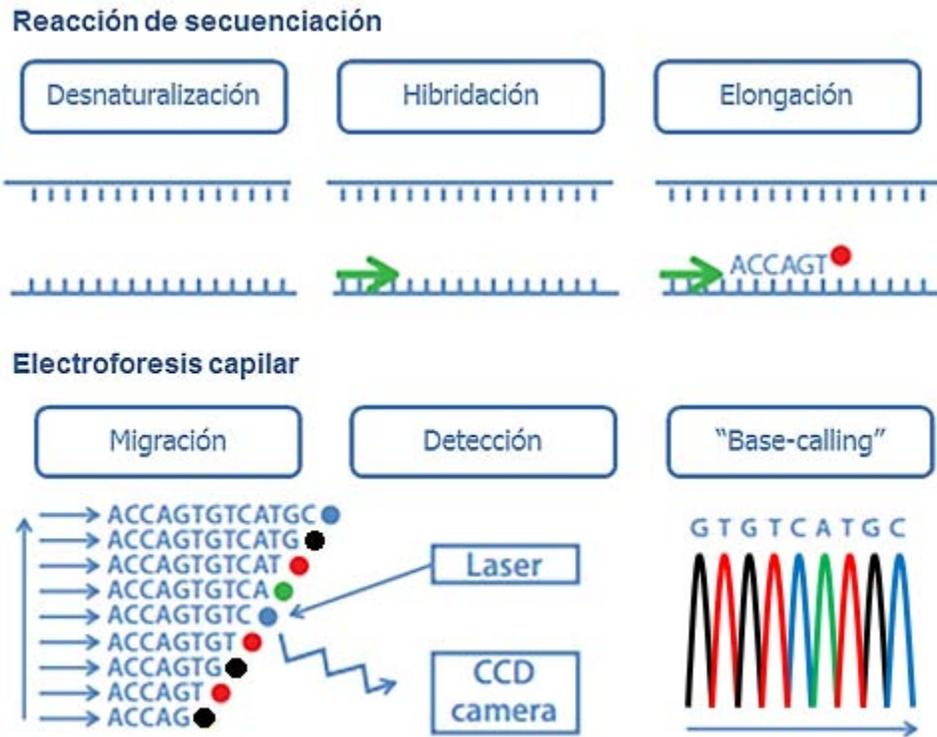
Estos resultados se revelaban con una autoradiografía en la cual se podían apreciar bandas correspondientes a las posiciones en que terminaran las cadenas con cada uno de los residuos de dNTP's, estando presentes o ausentes éstos (figura 17). Años después, la introducción de los didesoxinucleótidos trifosfatados (ddNTP's) como terminadores análogos de dichos nucleótidos hizo que esta técnica fuera aún más rápida y con gran fidelidad de lectura (Sanger, 1977).

En 1986, la primera generación de "secuenciadores automatizados" promovida por Applied Biosystems, a hora parte de Life Technologies, apareció incluyendo la automatización de los pasos de la electroforesis en gel, la detección de patrones de bandas de DNA y el análisis de estas bandas, basándose en las reacciones de didesoxisecuenciación de DNA; método de Sanger descrito anteriormente que fue la técnica de elección para proyectos de secuenciación a gran escala. Para esto, el reemplazamiento de la radioactividad por ddNTP's marcados fluorescentemente y el desarrollo de polimerasas que pudieran incorporar efectivamente estos colorantes fueron esenciales.

Idealmente, los fluoróforos usados para la secuenciación de DNA a cuatro colores debían tener una alta absorbancia molar similar bajo longitudes de onda excitadoras comunes a sí como rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados, exhibir emisiones fluorescentes fuertes y bien separadas entre sí, y poseer el mismo cambio de movilidad relativo (Slatko, 2011). Estos criterios no podían ser cubiertos por las propiedades espectrofotométricas de moléculas simples, por lo que surgieron los colorantes con un espectro de emisión generado por la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), conformados por dos fluoróforos separados entre sí y acoplados a los ddNTP's. La energía de excitación que es captada por aquel que absorbe a una longitud de onda menor (donador), es transferida al cromóforo (aceptor) que absorbe a una longitud de onda mayor y está localizado a cierta distancia. Esta transferencia resulta en la pérdida de fluorescencia por parte del donador y la aparición de una emisión potenciada de fluorescencia por el aceptor.

Los colorantes que actualmente se utilizan pertenecen a la familia de Rhodamina (dR<sub>110</sub>: azul; dR<sub>6G</sub>: verde; dTAMRA: negro; dROX: rojo) y ya que florecen a diferente longitud de onda, los cuatro productos de reacción pueden ser detectados de forma simultánea pero individual tras su excitación con un láser, captados además por una cámara con

tecnología CCD. Hoy en día, la secuenciación automatizada de DNA hace uso también de la electroforesis capilar que puede comúnmente analizar de 8 a 96 reacciones de secuenciación al mismo tiempo. Por su parte, la matriz lineal de separación de poli(acrilamida) (LPA) que es donde son separados y transportados los productos de reacción de secuenciación, proporciona la mejor resolución y capacidad de lectura más larga.



**Figura 18.** Primera generación de secuenciación automatizada.  
(Adaptación de [www3.appliedbiosystems.com](http://www3.appliedbiosystems.com))

Una vez que la corrida de secuenciación es completada, la información es asimilada por una computadora usando el software provisto por el secuenciador de DNA. La característica básica de éste es su capacidad para interpretar las fluorescencias de los ddNTP's y producir la información de la secuencia de nucleótidos en bruto como un despliegue de picos, también llamado electroferograma. Un electroferograma por su parte, es el gráfico que mide la intensidad de las longitudes de onda correspondientes a los cuatro colores fluorescentes en cada posición de nucleótidos. La intensidad es registrada como un pico colorido, al cual se le asigna el nucleótido que corresponda al

color de cada pico, como se aprecia en la figura 18. Comúnmente, los colores asignados para cada nucleótido son rojo para timina (T), azul para citosina (C), verde para adenina (A) y negro para guanina (G). Adicionalmente al trazado cromatográfico, los secuenciadores de DNA automatizados generan un archivo de texto de los datos de la secuencia. A este proceso se le conoce como “base-calling”, que en pocas palabras es la asignación de nucleobases a cada uno de los picos captados por el equipo mediante algoritmos informáticos.

La secuencia puede ser leída a partir del electroferograma como el orden definitivo de nucleótidos, sin embargo, si el software fuese incapaz de interpretar un pico fluorescente en particular se asigna una letra “N” para la posición de esa base. Esto, puede ser causado por dos bases que estén presentes en una misma posición (heterocigosidad) o por una débil altitud en un pico. Por tal razón, es importante revisar manualmente los electroferogramas contra la base predicha, para evitar errores que normalmente ocurren al principio o al final de cualquier corrida de secuenciación. Además de examinar la adecuada asignación de bases, debe verificarse la limpieza de la secuencia en cuanto a que ésta esté bien definida con picos de un solo color bien espaciados y un ruido de fondo casi ausente.

Para el estudio e interpretación de la información arrojada por una secuenciación, normalmente se recurre al archivo de texto en el cual la secuencia puede utilizarse como formato .FASTA y a partir de éste realizar un análisis bioinformático más profundo. En primera instancia, si es que se está procesando un mismo tipo de muestra a partir de la cual se esperan secuencias muy parecidas o idénticas entre sí, éstas deber ser sometidas a un alineamiento para detectar posibles variaciones de longitud y/o asignación de bases. Junto con esto, su procesamiento con la herramienta BLAST permite comparar los resultados obtenidos con lo que ya está reportado internacionalmente, y así tener un parámetro de referencia sobre la calidad de las secuencias que se estén trabajando de acuerdo a una homología significativa calculada estadísticamente en base a la igualdad que presente con la secuencia consenso que le corresponda, o bien, tener el conocimiento de que se trata de una nueva secuencia de nucleótidos.

La información recopilada en forma de secuencias, puede procesarse individualmente para detectar mutaciones o variaciones en el genoma, por ejemplo SNP's y

asociarlas con predisposición a enfermedades, pero también ser analizada en conjunto y realizar entonces un estudio de poblaciones. Por lo general, esto está enfocado hacia la indagación evolutiva. Haciendo uso del grado de homología entre secuencias del genoma de una especie en específico o comparándola con algunas otras, y aplicando una serie de algoritmos informáticos, es posible la construcción de árboles filogenéticos, que no son más que patrones de relación evolutiva que representan su divergencia a través del tiempo, desde su posible origen hasta como actualmente se expresan.

---

---

## 7. JUSTIFICACIÓN.

La diabetes fue documentada por primera vez por los egipcios, siendo caracterizada por la pérdida de peso y poliuria (Ahmad, 2013), aunque el término es bastante general y aplicado a un grupo de enfermedades que conducen a una hiperglucemia prolongada. La diferencia en los mecanismos para el desarrollo de los diferentes tipos de diabetes forma la base de su clasificación, constituyendo la Diabetes Mellitus tipo 2 una de las agrupaciones en la patogénesis de esta enfermedad, la cual está dada por la síntesis insuficiente de insulina y su secreción, secundaria a una resistencia a insulina (Poretsky, 2010). Ésta equivale aproximadamente al 90% de todos los casos de diabetes a nivel mundial y puede estar o no asociada a la obesidad.

En los últimos 50 años, los cambios en el estilo de vida han guiado a un incremento dramático en la prevalencia de la DM-II en prácticamente todas las sociedades alrededor del mundo (Feinglos, 2008). Refiriéndose específicamente al comportamiento de esta enfermedad en México, se ha observado una tendencia hacia el incremento en un 4.7%, pasando de una tasa de morbilidad de 342.1 a 358.2 casos por cada 100 mil habitantes, siendo el grupo etario de 50-59 años de edad el más afectado y con una mayor incidencia de casos en el sexo femenino, de 1998 al 2012 (Dirección General de Epidemiología, 2013).

En las últimas décadas, se ha hallado que mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) tienen gran importancia en la patofisiología de la diabetes no dependiente de insulina, siendo varios los mecanismos potenciales mediante los cuales la disfunción mitocondrial puede causar diabetes. Partiendo de que el mtDNA codifica las enzimas de la cadena respiratoria, mutaciones en éste pueden perjudicar la producción de ATP, la cual juega un papel central en la liberación de insulina, lo que impide el desarrollo de las células  $\beta$ . Por otra parte, defectos en la fosforilación oxidativa en tejidos sensibles a insulina pueden alterar su acción (Poulton, 1998).

En particular, la variante 16189 del mtDNA ha sido confirmada en población caucásica al estar asociada con la resistencia a la insulina y la DM-II (Poulton, 2002), y a que ésta puede alterar la flexión del DNA y por lo tanto influir en las interacciones entre las proteínas de unión que controlan y aseguran la replicación o transcripción del DNA mitocondrial. Otros estudios sobre esta misma alteración se han realizado sobre todo en

la población asintomática, sin embargo no hay estudios previos referidos al continente americano. Dado que en México esta enfermedad constituye la segunda causa de mortalidad (INEGI, 2012), el desarrollo de este estudio fue factible usando la variación 16189 del mtDNA como marcador para su asociación con la DM-II en la población mexicana, gracias a la aplicación de técnicas moleculares como lo son la PCR y la secuenciación.

## 8. OBJETIVOS.

- » Realizar la amplificación de la región hipervariable 1 (HV-I) de DNA mitocondrial mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de muestras de DNA extraídas de carrillo bucal para el posterior análisis de esta región de interés.
- » Corroborar la presencia de los amplicones de la HV-I de cada muestra a través de la demostración de bandas correspondientes al peso molecular de los fragmentos de DNA en el corrimiento de electroforesis en geles de agarosa.
- » Llevar a cabo la purificación de los fragmentos de DNA amplificados con el uso de un kit comercial con la finalidad de someter dichos amplicones a un proceso de secuenciación.
- » Aplicar el método químico de Sanger para la secuenciación de los amplicones de la HV-I previamente tratados con didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos específicos.
- » Efectuar el análisis de los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación complementando con alineamientos comparados con el genoma de DNA mitocondrial reportado internacionalmente, con el propósito de detectar la mutación puntual T16189C.
- » Llevar a cabo un análisis estadístico con el propósito de establecer una posible relación entre la presencia de dicho polimorfismo y el desarrollo de la Diabetes mellitus tipo 2, tomando en cuenta datos bioquímico-antropométricos y haplogrupos que definan cada una de las muestras empleadas.

## 9. MATERIAL Y MÉTODOS.

### » Población de estudio y muestras empleadas.

En el presente proyecto de investigación, se consideraron dos grupos de estudio; uno positivo, compuesto por individuos con Diabetes Mellitus tipo 2 (n=42) y uno negativo, con individuos sin Diabetes Mellitus tipo 2 (n=82), bajo los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA). Dichos individuos para los dos grupos, fueron de ambos sexos, de edades entre 37 y 89 años, de origen mexicano, con madres y abuelas igualmente mexicanas, y de los cuales se obtuvieron datos clínicos de algunas pruebas de laboratorio que incluyen glucosa en ayuno, perfil de lípidos (colesterol y TAG's) así como una hemoglobina glucosilada menor de 3 meses. Las muestras de DNA de estos grupos, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad (EMGS).

### » Amplificación de la Región Hipervariable 1 (HV-I) de mtDNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR punto final)

Haciendo uso de las condiciones previamente estandarizadas en el Laboratorio de Biología Molecular para la amplificación de la Región Hipervariable 1 del DNA mitocondrial (HV-I mtDNA), se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR, por sus siglas en inglés), empleando los oligonucleótidos sentido (Forward) y antisentido (Reverse) previamente publicados por Butler (2005):

**Tabla 6.** Primers empleados para amplificar la HV-I del mtDNA

Sentido L 15997	CACCATTAGCACCCAAAGCT	Tm 64.96°C / GC 50%
Antisentido H 16391	GAGGATGGTGGTCAAGGGAC	Tm 66.92°C / GC 60%

y las condiciones de reacción sobre un volumen final de 25  $\mu$ L:

**Tabla 7.** Mezcla de reacción para la PCR punto final

REACTIVO	[ ] STOCK	VOLUMEN	[ ] FINAL
Buffer de reacción (Invitrogen®)	10 x	2.5 µL	1 x
dNTP's	2 µM	2.5 µL	0.2 mM
Primer Forward	10 µL	2.5 µL	1 µL
Primer Reverse	10 µL	2.5 µL	1 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3 µL	6 mM
<i>Taq</i> DNA Polimerasa Platinum (Invitrogen®)	5 U/µL	0.05 µL	0.01 U/µL
Muestra DNA	---	5 µL	---
Agua inyectable	---	6.95 µL	---

Dichas PCR's para cada una de las muestras se realizaron en el equipo GeneAmp PCR System 9700 de la marca Applied Biosystems, usando las siguientes características para cada una de las etapas de la reacción:

**Tabla 8.** Condiciones de termociclado para la PCR punto final

1 ciclo	5 min.	96°C	Desnaturalización
30 ciclos	30 seg.	96°C	Desnaturalización
	30 seg.	69°C	Alineamiento
	30 seg.	72°C	Extensión
1 ciclo	5 min.	72°C	Extensión

» Comprobación del producto de PCR.

Para evidenciar la presencia de fragmentos amplificados de la HV-I y por ende el éxito de la PCR, se realizaron electroforesis sobre geles de agarosa preparados al 2 % con UltraPure™ Agarose-1000 (Invitrogen®) teñidos además con 0.8 µL de bromuro de etidio,

empleando como solución amortiguadora TBE al 0.5 X (Tris 54 g, Ácido bórico 27.5 g, 20 mL EDTA 0.5 M pH 8.0) preparada a partir de TBE Ultrapure 10 X Buffer. El corrimiento electroforético se llevó a cabo utilizando una cámara de electroforesis Whatman Horizon 58, y una vez cargadas las muestras en cada uno de los pozos con un buffer de carga, los geles fueron sometidos a un voltaje de 80 -90 V durante aproximadamente 20 minutos, usando además como referencia 2 µL de un marcador de peso molecular preparado en una relación 1:10 a partir del 123 bp DNA Ladder 1.0 µg/µL (Invitrogen®). El revelado del gel se hizo en un transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) de la marca DNR Bio-Imaging Systems y con ayuda del programa KODAK Molecular Imaging Software (KODAK MI Software) se tomó una fotografía de la electroforesis con la finalidad de respaldar y llevar un registro de los resultados obtenidos.

» Limpieza de productos de PCR.

Debido a que se proseguiría con una reacción de secuenciación, fue necesaria la limpieza de cada uno de los productos amplificados con la PCR, para evitar así que los remanentes de los desoxirribonucleótidos trifosfatados y demás reactivos utilizados interfirieran en esta etapa, por lo que se empleó 1µL del reactivo ExoSAP-IT® USB, el cual se basa en la función de dos enzimas hidrolíticas: una exonucleasa I que degrada los primers y una fosfatasa alcalina que hidroliza los dNTP's. Esta mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones de termociclado:

**Tabla 9.** Condiciones de termociclado para limpieza

1 ciclo	15 min.	37°C
1 ciclo	15 min.	80°C
2 ciclos	1 seg.	4°C

» Reacción de secuenciación.

Fundamentada en el método enzimático de Sanger, se realizó la preparación de una reacción para la secuenciación de los productos de amplificación previamente limpiados, utilizando como reactivos BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems), el cual contiene análogos de dNTP's marcados con fluoróforos de la familia dRodamina que poseen diversos espectros de emisión y los cuales se incorporan en el extremo 3' de la hebra de DNA recién sintetizada, generando fragmentos de diferente longitud y marcaje de acuerdo al análogo de base incorporado. A su vez, incluye una mezcla de buffer y AmpliTaq® DNA polimerasa, requeridos para esta reacción. Las cantidades empleadas para la mezcla de reacción fueron las siguientes:

**Tabla 10.** Mezcla de reacción para la secuenciación

Primer Forward (10µL)	1 µL
BigDye® Terminator	1 µL
Buffer BigDye®	2 µL
Producto de PCR limpiado con ExoSAP-IT®	2 µL
Agua inyectable	2 µL

sometida bajo las siguientes condiciones de temperaturas y tiempos en el equipo Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems):

**Tabla 11.** Condiciones de termociclado para secuenciación

1 ciclo	1 min.	96°C
25 ciclos	30 seg.	96°C
	15 seg.	50°C
	3 min.	60°C
1 ciclo	3 min.	60°C

» Limpieza de producto de reacción de secuenciación.

Tras la preparación de los amplicones con el marcaje a partir de la reacción de secuencia, estos fueron sometidos a una limpieza usando un sistema de columnas CENTRI-SEP™ (Princeton Separations) las cuales contenían un gel dextrano Sephadex® (Sigma Aldrich) hidratado, a través del cual se filtraron los productos de la reacción de secuencia suspendidos en 10 µL de H<sub>2</sub>O inyectable, centrifugando a 2800 rpm por 2 minutos en el

equipo Centrifuge 5418 Eppendorf® y recuperando el filtrado en tubos de recolección de 2 mL (QUIAGEN®). Posteriormente, se realizó un secado de la muestra para concentrar la cantidad de fragmentos amplificados marcados presentes, centrifugando al vacío (HETO™) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo y obtenido un botón al fondo del tubo, se resuspendió el contenido en 20  $\mu$ L de formamida ( $\text{HCONH}_2$ ) con agitación constante para asegurar la recuperación de toda la muestra.

### » Secuenciación.

Una vez resuspendidos los fragmentos marcados, se colocó cada una de estas muestras en una placa de 96 pozos, las cuales se sometieron a un proceso de desnaturalización en el termociclador a una temperatura de 96° C durante 5 minutos, seguida de 2 minutos en hielo. La placa fue colocada en el equipo 3130 Genetic Analyzer ABIPRISM® (Applied Biosystems) tras su correcta programación, en el cual cada una de las muestras fue pasada por capilares para su secuenciación mediante la detección de la señal particular de cada fluoróforo, obteniendo resultados en forma de electroferogramas y asignación de determinado nucleótido en cada posición de la secuencia.

### » Análisis bioinformático.

Sobre los electroferogramas obtenidos, se revisó la calidad de resolución de la secuenciación verificando la adecuada asignación de nucleótidos con el programa Chromas, en relación a la amplitud y longitud de los picos en cada uno de los gráficos. Seguido de esto, se convirtieron dichas secuencias al formato .FASTA, empleando ahora el software BioEdit, con el cual se llevó a cabo una alineación entre todos los resultados y la secuencia NC\_012920 reportada en GenBank, correspondiente al genoma completo del DNA mitocondrial en el *Homo sapiens*, detectando aquellas muestras que presentaban la mutación puntual T16189C. Además de esto, se efectuó una doble confirmación de homología entre cada una de las secuencias y el mtDNA haciendo un alineamiento en línea a través del apartado BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI. Esto, sin especificar ningún dato sobre el tipo de DNA que se estaba

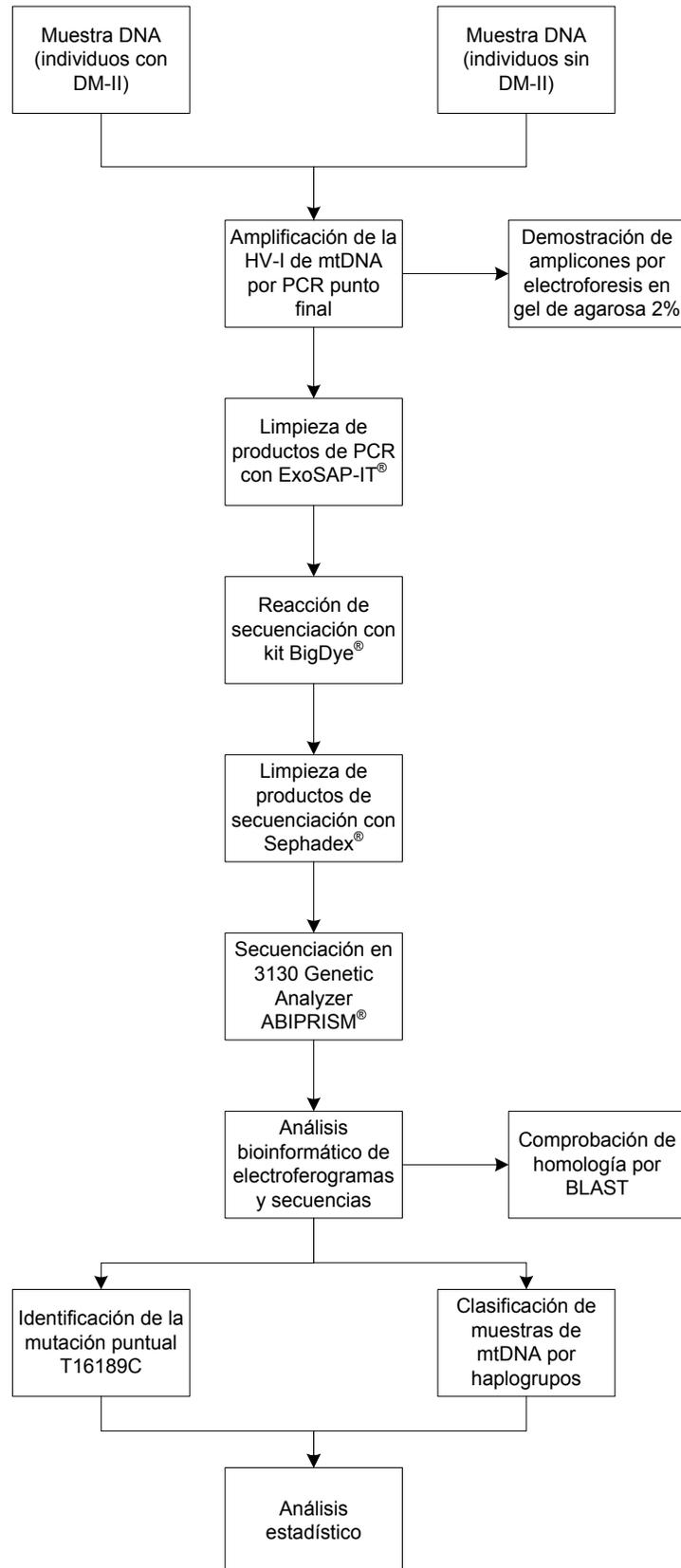
trabajando, con el propósito de obtener resultados confiables sobre la alineación exclusiva con el genoma humano, demostrándose una homología de entre el 85 y el 99 %.

Posteriormente, se procesaron en línea todas las secuencias obtenidas en el apartado MITOMASTER (<http://www.mitomap.org/MITOMASTER/WebHome>) de la base de datos correspondiente al genoma mitocondrial MITOWEB, y así poder establecer los haplogrupos a los cuales pertenecen cada uno de los individuos estudiados.

### » Análisis estadístico.

Con ayuda del software GraphPad Prism 6, se calcularon las medias y respectivas desviaciones estándar para los datos bioquímico-antropométricos de ambos grupos de estudio. Para la edad, región de origen y haplogrupos correspondientes se obtuvieron las frecuencias y distribuciones. Junto con esto, se realizó un análisis con t de student comparando los grupos problema y control para cada uno de los parámetros clínicos, además de la aplicación de una prueba de Fisher con la finalidad de establecer una posible asociación entre dichos parámetros y la mutación T16189C. Finalmente, se realizó una tabla ANOVA para analizar la presencia y ausencia de la mutación en los grupos de diabéticos y controles ante cada haplogrupo.

10. DIAGRAMA DE FLUJO.

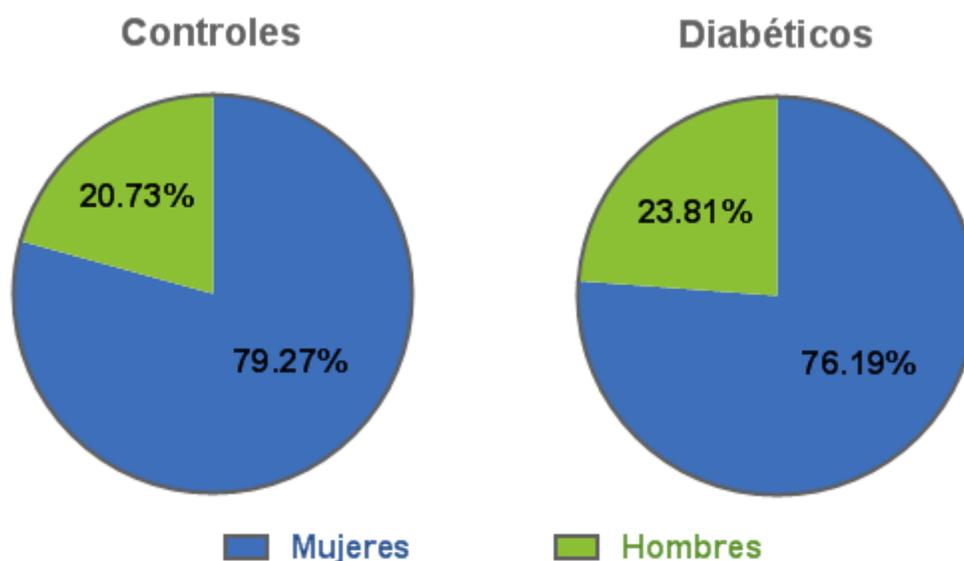


## 11. RESULTADOS.

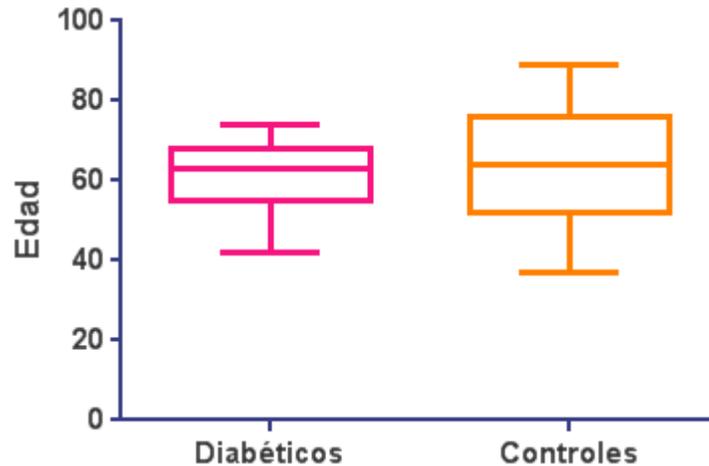
Como se mencionó anteriormente, se manejaron dos grupos de estudio, teniendo un total de 124 individuos entre pacientes diabéticos y personas no diabéticas o controles. En la tabla 12, se resumen los datos bioquímico-antropométricos de dichos individuos.

**Tabla 12.** Datos bioquímico-antropométricos de la población estudiada.

	Controles	Diabéticos	<i>p</i>
<i>n</i>	82	42	
<b>Mujeres</b>	65	32	
<b>Hombres</b>	17	10	
<b>Edad (años)</b>	63.81 ± 13.57	61.07 ± 8.24	0.2322
<b>IMC</b>	28.62 ± 0.49	28.17 ± 0.87	0.6306
<b>HA1 (%)</b>	4.88 ± 0.03	7.77 ± 0.30	< 0.0001
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	92.50 ± 0.87	153.5 ± 13.14	< 0.0001
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	197.1 ± 4.69	195.2 ± 6.55	0.8193
<b>TAG's (mg/dL)</b>	186.7 ± 15.84	215.0 ± 15.70	0.2562

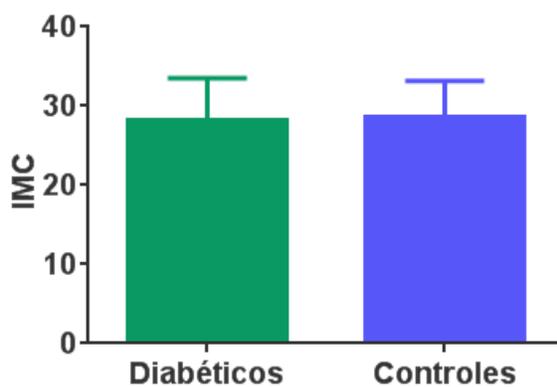


**Gráficos 1 y 2.** Distribución según género de los grupos de estudio.

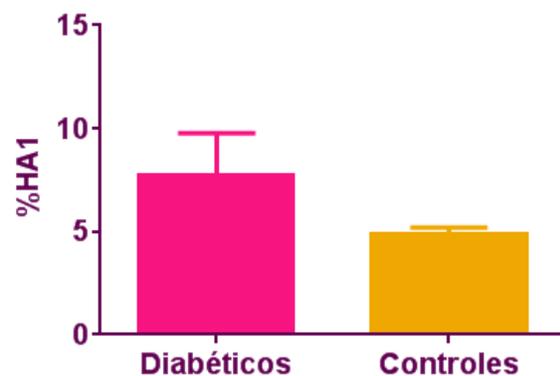


**Gráfico 3.** Distribución de edades por grupo de estudio.

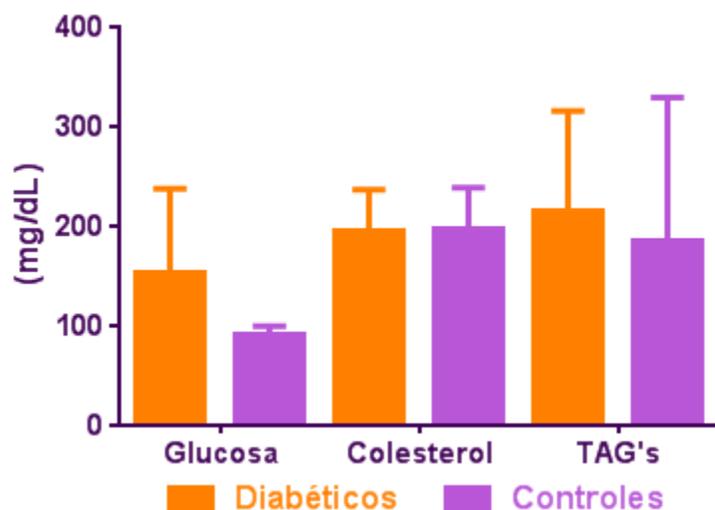
Como se observa en los gráficos 1 y 2, en ambos grupos predominan los pacientes de sexo femenino, siendo además éstos homogéneos respecto a la edad (gráfico 3). En cuanto al índice de masa corporal (IMC) como dato antropométrico, éste tiene un comportamiento bastante similar en los dos tipos de pacientes (gráfico 4). Por su parte, los valores de la glucosa muestran una diferencia entre diabéticos y controles lo cual se puede visualizar en el gráfico 5, al igual que los valores de la hemoglobina glicosilada (HA1), los cuales son concordantes para cada grupo de estudio así como lo indica la caracterización por parte de la ADA, estando ésta más elevada en aquellos individuos diabéticos, como se aprecia en el gráfico 6. Los demás parámetros bioquímicos, colesterol y TAG's, aparecen ser bastante similares para los dos tipos de individuos (gráfico 5).



**Gráfico 4.** Valores de IMC.

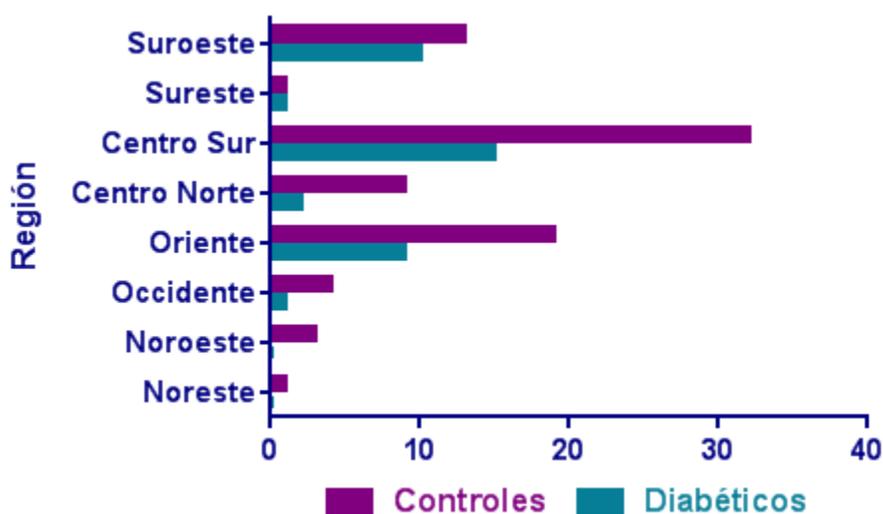


**Gráfico 5.** Valores de HA1.



**Gráfico 6.** Parámetros bioquímicos.

Los individuos incluidos en el estudio, provenían de 23 estados de la república mexicana, con madres y abuelas igualmente mexicanas, predominando aquellos nacidos en la región Centro Sur de acuerdo al gráfico 7. Dentro de ésta, sobresalen los originarios del Estado de México y el Distrito Federal. La distribución de cada una de las regiones se ilustra en la imagen 19.

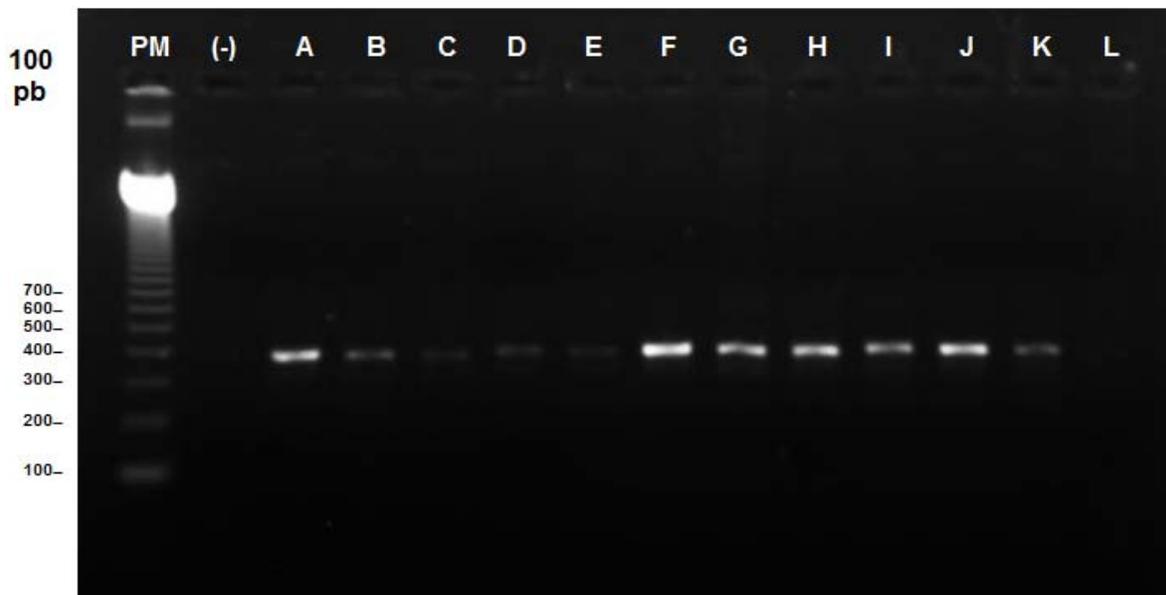


**Gráfico 7.** Distribución según región de origen de los grupos de estudio.



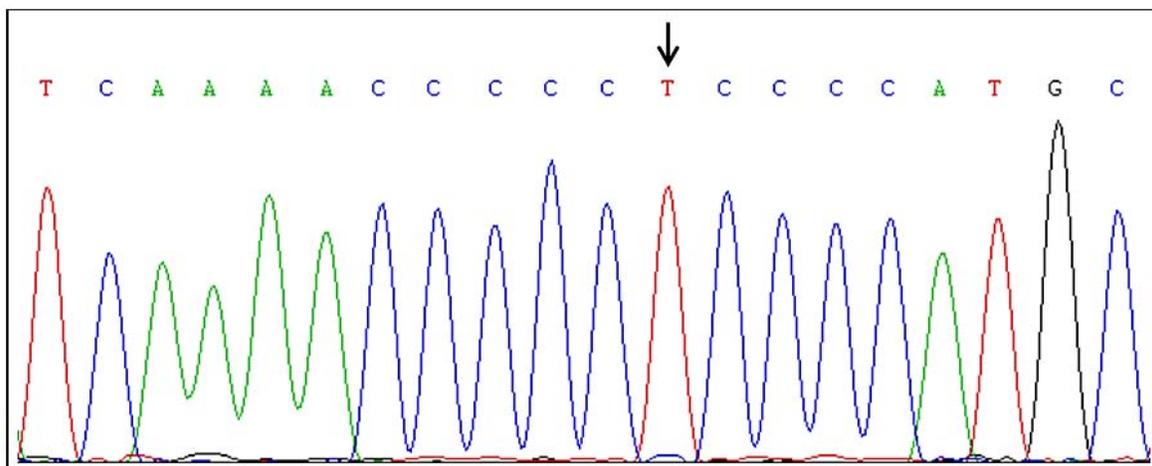
**Figura 19.** Mapa de la República Mexicana que indica la distribución de las regiones analizadas.

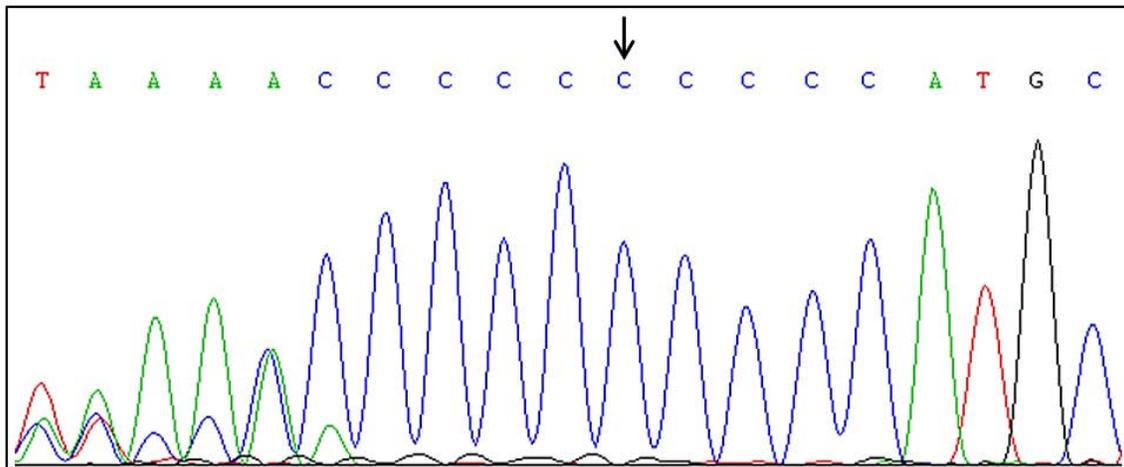
Tras la amplificación de la HV-I de mtDNA de cada una de las muestras de DNA bajo las condiciones de PCR previamente descritas, se llevó a cabo un corrimiento electroforético en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para evidenciar la presencia de los fragmentos obtenidos como bandas bien definidas aunque de diferentes intensidades en los distintos carriles, según la carga de amplicones surgida de cada muestra, lo cual se aprecia de forma representativa en la figura 20 correspondiente a dicho gel de corrimiento en donde los productos poseen un peso molecular de aproximadamente 400pb, lo cual concuerda con la longitud esperada de la región amplificada. Cabe resaltar, que la presencia de bandas únicas en cada uno de los carriles y la ausencia de un barrido a lo largo de éstas mismas, indica que la amplificación fue hecha correctamente, al obtener productos de PCR íntegros, es decir sin degradación del material genético, únicamente sobre la región de interés sin el surgimiento de fragmentos inespecíficos de diferentes tamaños. Por su parte, el no tener ninguna banda en el control negativo aseguró que todo el proceso careciera de algún tipo de contaminación con material genético ajeno al usado.



**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa 2 % en la que se visualizan los productos de amplificación (~400pb) de la PCR de la HV-I del mtDNA. PM: marcador de peso molecular de 100pb; (-): control negativo de la PCR; A-L: muestras representativas de la población de estudio analizada.

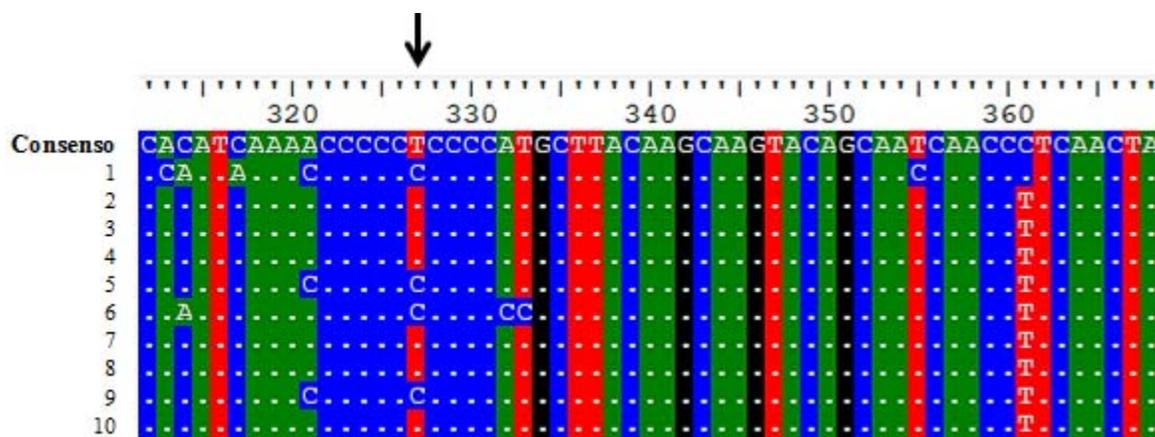
Una vez concluidas las limpiezas necesarias de las muestras amplificadas para llevar a cabo el proceso de secuenciación y a su vez finalizado éste, se obtuvieron una serie de resultados en forma de electroferogramas, correspondientes a cada una de las muestras procesadas, en donde el software empleado efectuó la asignación de nucleótidos en las correspondientes posiciones de las secuencias. Esto, se visualiza en las figuras 21 y 22, que contiene dos electroferogramas representativos para una secuencia normal y otra poseedora de la mutación puntual T16189C de interés.





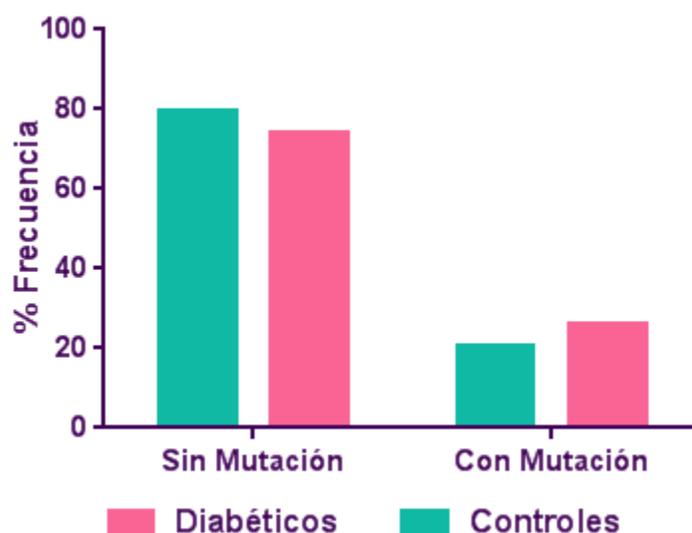
**Figuras 21 y 22.** Electroferogramas resultado de la secuenciación de la HV-I, en donde a cada nucleótido le correspondiente un diferente color (G= guanina: negro; C= citocina: azul; A= adenina: verde; T= timina: rojo). La flecha indica la posición de la mutación puntual T16189C.

Teniendo las secuencias en formato .FASTA, se realizó la alineación de todas éstas con la secuencia consenso NC\_012920 para el DNA mitocondrial de *Homo sapiens*, con lo que además de corroborar una adecuada secuenciación de cada una de las muestras, se pudo identificar más fácilmente la presencia o ausencia de la mutación T16189C. Como se observa de forma representativa en la figura 23, la primer secuencia corresponde a la reportada en GenBank, teniendo seguida a ésta algunas de los resultados obtenidos, en donde por la diferente coloración propia de la codificación para los nucleótidos junto con la asignación de puntos que sustituyen a la letra que identifica a estos mismos, se expresa su homología en cada posición.



**Figura 23.** Alineamiento entre la secuencia consenso del mtDNA humano y algunas muestras representativas, mostrando la región de interés haciendo uso del software BioEdit.

Los resultados obtenidos de esta alineación con respecto a frecuencia de esta mutación fueron del 26.19% para el grupo de diabéticos y del 20.73% para el grupo de controles, siendo dichos porcentajes diferentes entre los dos grupos aunque en muy baja proporción. Se realizó el análisis estadístico comparando esta frecuencia de las secuencias que presentaron la mutación T16189C en cada grupo de estudio mediante la aplicación de una *t* de student y prueba de Fisher, hallando que no existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.5036$ ;  $OR=1.357$ ) entre su presencia y la DM-II, ya que pese a ser ésta más frecuente en individuos diabéticos su variación entre grupos es mínima, como puede observarse en el gráfico 8.

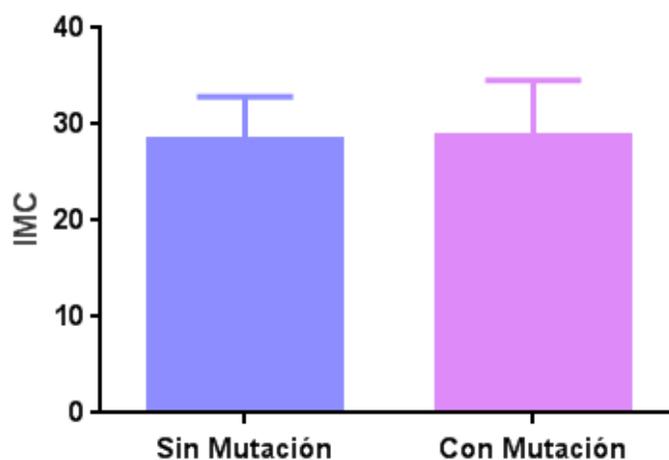
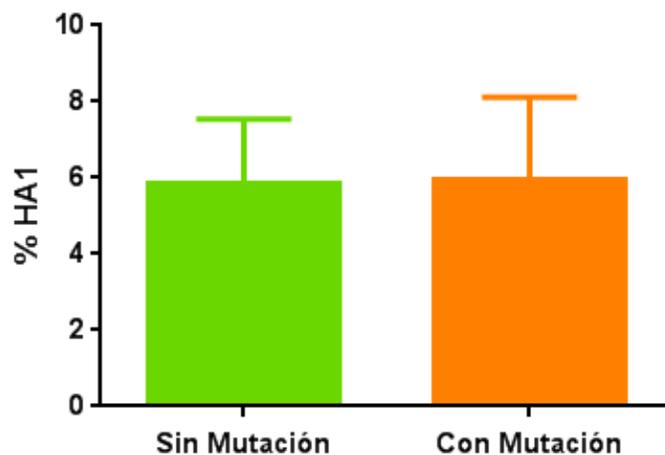


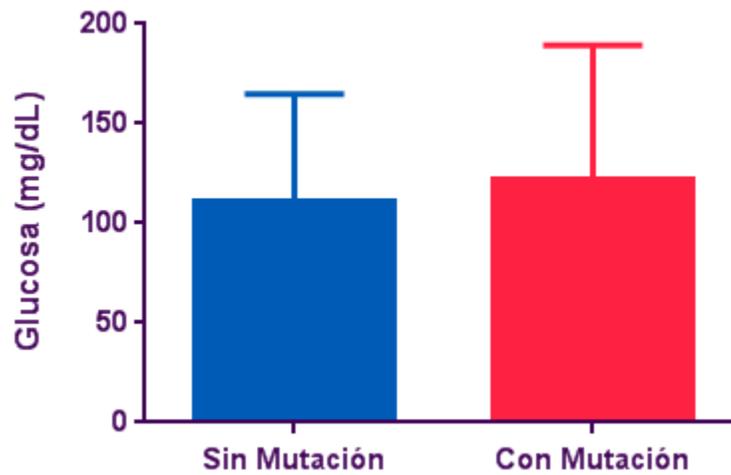
**Gráfico 8.** Frecuencia de la mutación T16189C en individuos diabéticos y controles.  
( $p = 0.5036$ ;  $OR = 1.357$ )

Junto a esto, se llevó a cabo un análisis de los datos bioquímico-antropométricos reorganizando a los grupos de estudio en aquellos poseedores de la mutación y aquellos que carecían de ésta, para establecer su posible relación. Nuevamente, se aplicó un test de Fisher con el cual todos estos parámetros mostraron una tendencia baja entre ambos grupos aunque sin llegar a ser esta diferencia estadísticamente significativa, a excepción de los TAG's cuya  $p$  resultó ser de  $<0.0001$  como se indica en la tabla 13, pudiendo estar éstos asociados a la mutación T16189C.

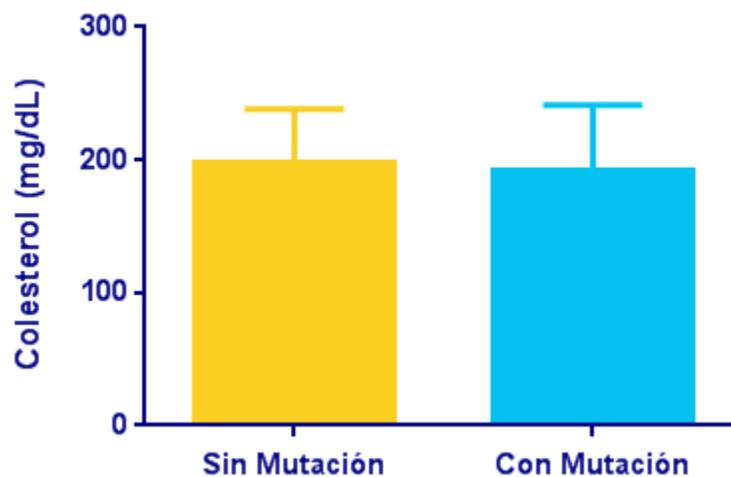
**Tabla 13.** Datos bioquímico-antropométricos de individuos con y sin la mutación.

	Sin Mutación	Con Mutación	<i>p</i>
<i>n</i>	96	28	
<b>IMC</b>	28.42 ± 0.46	28.72 ± 1.14	0.0759
<b>HA1 (%)</b>	5.83 ± 0.17	5.97 ± 0.40	0.1227
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	110.5 ± 5.55	122.3 ± 12.67	0.1471
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	197.8 ± 4.10	191.8 ± 9.34	0.1517
<b>TAG's (mg/dL)</b>	190.8 ± 9.48	214.9 ± 41.17	<0.0001

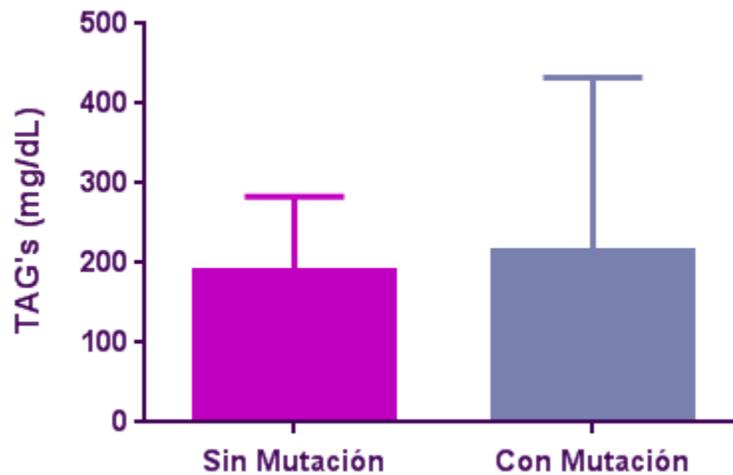
**Gráfico 9.** Valores de IMC en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. (prueba de Fisher; sin diferencia estadísticamente significativa)**Gráfico 10.** Valores de HA1 en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. (prueba de Fisher; sin diferencia estadísticamente significativa)



**Gráfico 11.** Valores de glucosa en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. (prueba de Fisher; sin diferencia estadísticamente significativa)

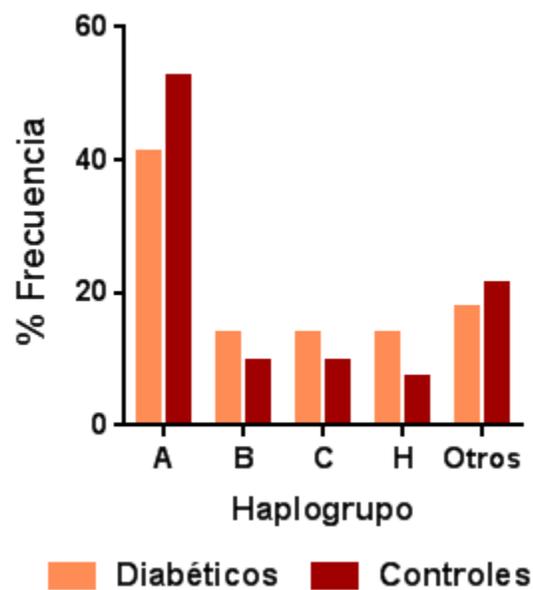


**Gráfico 12.** Valores de colesterol en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. (prueba de Fisher; sin diferencia estadísticamente significativa)



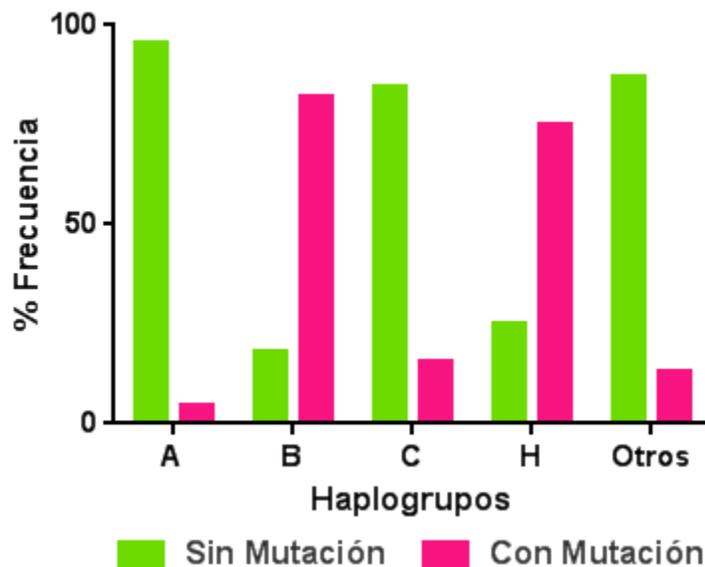
**Gráfico 13.** Valores de TAG's en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. (prueba de Fisher; con diferencia estadísticamente significativa;  $p < 0.0001$ )

De igual forma y al tratarse de material genético mitocondrial, como se describió anteriormente cada una de las secuencias se sometió a una perfilación para poder establecer su haplogrupo característico. Los haplogrupos predominantes para ambos grupos de estudio son los A, B, C y H, teniendo también la presencia de otros como lo son D, G, J, K, L, M, O, R, U y X, pero en menor proporción como se aprecia en el gráfico 14.



**Gráfico 14.** Frecuencia de haplogrupos en individuos diabéticos y controles.

Por último, estableciendo una relación entre la presencia de la mutación T16189C en cada grupo de estudio y el haplogrupo determinado, se tiene que los haplogrupos A y C se muestran predominantes en los casos no mutados mientras que los haplogrupos B y H tienen mayor presencia en aquellos con la transición T-C, tal y como se visualiza en el gráfico 15.



**Gráfico 15.** Frecuencia de haplogrupos en individuos con la presencia o ausencia de la mutación T16189C. ( $\chi^2$ ; con diferencia estadísticamente significativa;  $p < 0.0001$ )

---

---

## 12. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se incluyeron 124 pacientes mexicanos adultos, distribuidos en dos grupos homogéneos respecto a la edad teniendo en mayor proporción mujeres, de forma similar en ambos. Dicha agrupación, se hizo en base a una adecuada definición de la Diabetes mellitus 2, patología que representó al grupo problema como lo muestran los datos de glicemia y H A1 que definen a esta enfermedad, junto con un grupo control conformado por individuos clínicamente sanos. Se debe resaltar que pese a esta distinción entre pacientes diabéticos y aquellos que no padecen la enfermedad, ambos grupos presentaron una condición de sobrepeso e inclusive cierto grado de obesidad, lo cual es un problema actual que aqueja a la población mexicana en general (Rtveladze, 2014).

Aunado a esto, otros datos bioquímicos analizados en los dos grupos como lo son el colesterol y TAG's se hallaron elevados, sobrepasando los límites normales altos para estos analitos, que deben ser menores a 200mg/dL y 150mg/dL respectivamente (NOM-037-SSA2-2002). Esto se ve reflejado en los valores de IMC, que de igual forma se encuentran incrementados y como se mencionó previamente, demuestran un problema de salud pública en la población. Como lo indica la OMS, un IMC igual o superior a 25 determina un estado de sobrepeso mientras que si éste es igual o superior a 30, se está hablando de un caso de obesidad (OMS, 2014). Ambas situaciones tuvieron presencia en los dos grupos de estudio. En conjunto, todos estos parámetros bioquímico-antropométricos pueden llegar a caracterizar una alteración en el metabolismo de cada individuo, dado el hecho de que la adiposidad abdominal (visceral) es metabólicamente activa y es responsable en gran medida de una dislipidemia aterogénica e hiperinsulinemia, entre otros riesgos vasculares, además de la común ingesta de alimentos altos en lípidos por parte de los pacientes con obesidad (Miller, 2005).

Dentro de los factores genéticos causantes de un desorden metabólico se ha identificado el polimorfismo de mtDNA T 16189C como un "hotspot" para la determinación de la resistencia a la insulina, obesidad y desarrollo de la Diabetes mellitus tipo 2. Esta región está cercana al origen de replicación del mtDNA por lo que juega esta posición un importante papel en el mantenimiento del número de copias de este material genético por cada célula gracias a la transcripción. Junto con esto, se ha demostrado que la proteína de unión al DNA de cadena sencilla (mtSSB) se une con baja afinidad a dicha variante lo

que resulta en una elevada resistencia a la insulina y una disfunción de las células  $\beta$  (Park, 2008).

Para la realización de este estudio, fue necesaria la aplicación de técnicas moleculares con las cuales las muestras de DNA obtenidas de cada paciente fueron procesadas para obtener así resultados en cuanto a la región de interés del genoma mitocondrial. Tanto la PCR como la secuenciación son métodos finos para el análisis del mtDNA, ya que no sólo se pueden obtener de esta forma una cantidad considerable de copias del material genético a partir de las cuales se define la secuencia específica de dicha región, sino que los resultados son a su vez claros y específicos, estableciendo gráficamente el posicionamiento y orden de cada uno de los nucleótidos que conforman la secuencia. En cambio, el uso de enzimas de restricción como es el caso de algunos autores puede acarrear ciertos inconvenientes en cuanto a la correcta caracterización de la secuencia del mtDNA que se desea analizar, ya que comúnmente el uso de éstas se recomienda ante la manipulación de DNA pequeño como lo es el bacteriano y viral, mas no es adecuado para plantas y animales superiores (Breslow, 2005). Otro ejemplo de esto, y al tratarse es este estudio de una mutación puntual, es la posibilidad de degradación del mtDNA mutado y conservación del de tipo silvestre, dada la poca especificidad de bases que poseen pese a su alta selectividad (Fahy, 2010).

La asociación de la variante mitocondrial T16189 con la Diabetes mellitus tipo 2 ya ha sido previamente establecida en población europea y asiática (Poulton, 1998; Poulton 2002; Weng, 2005; Park, 2008; Aral; 2011) sugiriendo a esta mutación puntual como un factor de riesgo aumentado para que tenga presencia dicha enfermedad metabólica. Sin embargo, únicamente se han desarrollado estudios sobre estas poblaciones sin tomar en cuenta a otros grupos étnicos en donde tiene mayor índice de afección la diabetes, como lo es la población mexicana.

En la mayoría de los estudios reportados en la literatura se habla de una diferencia estadísticamente significativa entre individuos diabéticos y controles ante la presencia de la variante T16189C. En el presente estudio, los resultados arrojan que no existe dicha significancia en los grupos analizados ya que la frecuencia de esta mutación es bastante similar en ambos. Sin embargo, cabe destacar que los porcentajes obtenidos tanto en diabéticos como en controles son en su mayoría mayores a lo descrito en las otras poblaciones. Ejemplo de esto, puede verse en la tabla 14.

**Tabla 14.** Comparación de la variante T16189C en lo reportado en la literatura

Referencia	Diabéticos	Controles	p	OR
	11/42 (26.2%)	17/82 (19.5%)	0.5036	1.357
Poulton, 1998 <sup>a</sup>	9/59 (15.6%)	19/192 (9.9%)	0.2463	0.610
Poulton, 2002 <sup>b</sup>	46/463 (9.9%)	30/469 (6.4%)	0.0480	1.610
Park, 2007 <sup>c</sup>	872/2469 (35.3%)	373/1205 (31.0%)	0.003	1.256
Aral, 2011 <sup>d</sup>	7/39 (15.2%)	11/31 (26.2%)	0.2904	1.977

<sup>a</sup> Primer estudio en donde se reporta la asociación de la variante con la resistencia a insulina

<sup>b</sup> Estudio en donde se demuestra una asociación significativa entre la variante y la DM-II

<sup>c</sup> Estudio en donde se demuestra una asociación significativa entre la variante y la DM-II sobre una población más grande y con mayor frecuencia de la variante T16189C

<sup>d</sup> Último estudio reportado en donde no se halla asociación significativa entre la variante y la DM-II

A su vez, en estos grupos previamente estudiados se ha demostrado una prevalencia alta de la mutación en pacientes con Síndrome Metabólico (Weng, 2008), lo cual involucra una variación en los parámetros bioquímico-antropométricos como son el IMC, hemoglobina glicosilada, glucosa, colesterol y perfil de lípidos, al igual que en este estudio. Ahora bien, buscando una asociación entre los datos bioquímico-antropométricos y la presencia y/o ausencia de la mutación puntual, se tiene que el único parámetro que muestra una diferencia estadísticamente significativa son los TAG's, pese a que los otros datos resultan con una tendencia baja que sugiere pudiera estar asociada mas no de forma significativa.

Aral (2008) menciona que existen una serie de proteínas que también son afines a unirse a la posición de este polimorfismo dentro de las que destaca la DC50, involucrada en el metabolismo de lípidos y energético, por lo que puede verse repercutida su acción con una unión débil. Respecto a esto, debe también de considerarse que se trata de poblaciones distintas con costumbres alimenticias propias, aunado a un ambiente y factores socioeconómicos diferentes que influyen en el estado nutricional de un individuo.

Como se describió anteriormente, el mtDNA tiene su origen materno y es gracias a un análisis de sus polimorfismos por parsimonia que puede establecerse su origen y divergencia en la población a través de las generaciones. En la figura 24, se muestra de forma simplificada el surgimiento y variación de los principales haplogrupos por regiones

mundiales. Dicha caracterización en forma de haplogrupos, se realizó para cada una de las secuencias obtenidas en donde se obtuvo que los haplogrupos A y C tienen mayor frecuencia en individuos carentes de la variante T16189C, a diferencia de aquellos con la mutación presente, en donde predominan los haplogrupos B y H.

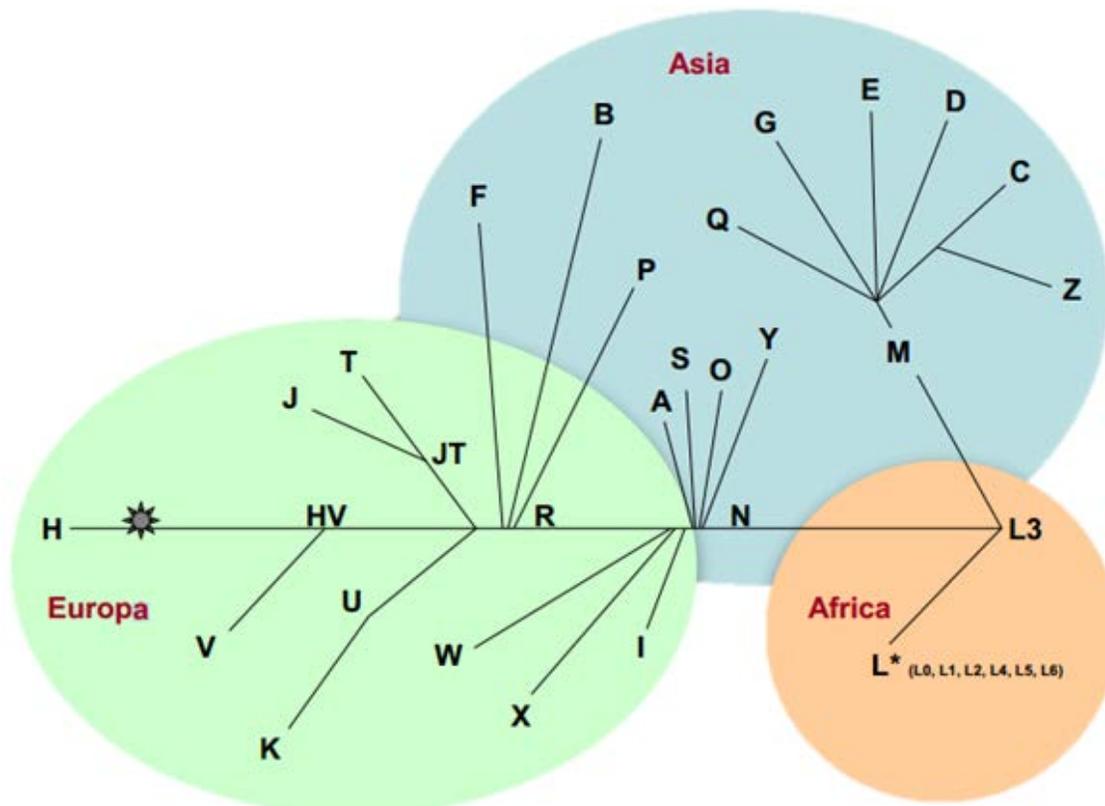


Figura 24. Linajes simplificados del mtDNA humano ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org))

Evolutivamente, se tiene que el haplogrupo A es característico de la población nativa americana (Martínez-Cortés, 2013) siendo además el que predomina en toda la República Mexicana ( Guardado-Estrada, 2009 ), seguido del haplogrupo C . Por su parte, el haplogrupo H pertenece a la región europea (Richards, 1998). Esta podría ser una posible asociación entre la incidencia de la variante T16189C y la diabetes así como entre grupos étnicos, y a que se ha visto que el haplogrupo H es uno de los que tiene más casos

asociados con la mutación identificada (Poulton, 2002). Sin embargo, publicaciones más recientes han rechazado tal propuesta al incluir en sus estudios poblaciones más grandes. También se ha demostrado que el haplogrupo B de orígenes asiáticos, tiene asociación significativa con la diabetes con grupos igualmente numerosos ( Liou, 2012) , lo cual concuerda con lo hallado en las muestras poseedoras de la mutación. Respalda este hecho, se tiene que específicamente la variación T 16189C es considerada como una transición característica del haplogrupo B (Horai, 1990; Tamm, 2007).

Finalmente, debe destacarse que el número de individuos analizados es bajo a comparación de lo que se ha reportado últimamente en la literatura, por lo que el incluir a una población más grande puede brindar un panorama más amplio respecto a la influencia de los diferentes haplogrupos. Lo que se rescata de todo este estudio es que se comprueba la asociación de la mutación en cuanto a los valores de TAG's que a fin de cuentas llevan a un probable estado de obesidad en los pacientes, y éste a su vez una predisposición al desarrollo y complicación de la Diabetes mellitus 2.

### **13. CONCLUSIONES.**

La frecuencia de la mutación puntual T16189C en la población mexicana analizada está asociada con niveles elevados de TAG's séricos, que pueden conducir a un estado diabético influenciado a su vez por el sobrepeso u obesidad, junto a una posible influencia de valores altos de glicemia, hemoglobina glicosilada y colesterol.

Los haplogrupos B y H del mtDNA muestran ser característicos ante la presencia de dicho polimorfismo. En cambio, los haplogrupos A y C no indican susceptibilidad genética para dicha variación en el genoma mitocondrial en la población mexicana.

El uso de las técnicas moleculares de PCR punto final y secuenciación de Sanger resultó ser de gran utilidad para un correcto establecimiento de los nucleótidos que componen una región de interés del material genético, permitiendo así el estudio de las secuencias de forma más sencilla y certera.

**14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

- Ahmad, S. (2013). *Diabetes. An old disease, a new insight*. EUA: Springer.
- Ahmed, AM. (2002). *History of diabetes mellitus*. Saudi Medical Journal; 23(4): 373-378.
- Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell*. EUA: Garland Science.
- American Diabetes Association. (2012). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care; 36(S1): S67-S74.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. & Young, I.G. (1981). *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature; 290: 457- 465.
- Aral, C., Akkiprik, M., Caglayan, S., Atabey, Z., Ozisik, G., Bekiroglu, N. & Ozer, A. (2011). *Investigation of relationship of the mitochondrial DNA 16189 T>C polymorphism with metabolic síndrome and its associated clinical parameters in Turkish patients*. Hormones; 10(4): 298-303.
- Audesirk, T. (2003). *Biología, la vida en la tierra*. México: Pearson Educación.
- Bandelt, H-J. (2006). *Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo sapiens*. Alemania: Springer.
- Bendall, K E. & Sykes, BC. (1995). *Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region*. American Journal of Human Genetics; 57(2): 248-256.
- Brandstätter, A., Neiderstätter, H. & Parson, W. (2004a). *Monitoring the inheritance of heteroplasmy by computer-assisted detection of mixed basecalls in the entire human mitochondrial DNA control region*. International Journal of Legal Medicine; 118: 47-54.
- Brandstätter, A., Peterson, C.T., Irwin, J.A., Mpoke, S., Koech, D.K., Parson, W. & Parsons, T.J. (2004b). *Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenetic parameters for the establishment of a forensic database*. International Journal of Legal Medicine; 118: 294-306.
- Breslow, R. (2005). *Artificial Enzymes*. Alemania: Wiley-VCH.
- Brown, T. (2008). *Genomas*. México: Médica Panamericana.
- Brown, WM. (1980). *Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA; 77(6):3605-3609.

- Brunetti, A., Chiefari, E. & Foti, D. (2014). *Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus*. World Journal of Diabetes; 5(2): 128-140.
- Cao, P., Abedini, A., Wang, H., Tu, L.H., Zhang, X., Schmidt, A.M. & Raleigh, D.P. (2013). *Islet amyloid polypeptide toxicity and membrane interactions*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA; 110(48): 19279-19284.
- Carrera-Boada, CA. & Martínez-Moreno, JM. (2013). *Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo "insulin resistance-secretion deficit"*. Nutrición Hospitalaria; 28(S2): 78-87.
- Codario, R. (2005). *Type 2 Diabetes, Pre-Diabetes, and the Metabolic Syndrome*. EUA: Human Press.
- Curtis, H., Bolaños, P., A ráoz, J. & Behrens, V. (2008). *Biología*. México: Médica Panamericana.
- Dabuko, G. (2010). *Mitochondrial genetics and cancer*. Alemania: Springer.
- Dennis Lo, YM., Chiu, R.WK., & Allen Chan, KC. (2006). *Clinical applications of PCR*. EUA: Humana Press.
- de Paula, W.B.M., Agip, A.N.A., Missirlis, F., Ashworth, R., Vizcay-Barrena, G., Lucas, C.H. & Allen, J.F. (2013). *Female and male gamete mitochondria are distinct and complementary in transcription, structure and genome function*. Genome biology and evolution; 5(10): 1969-1977.
- Dirección General de Epidemiología. (2013). *Boletín epidemiológico. Diabetes mellitus tipo 2. Primer trimestre 2013*. México: Secretaria de Salud.
- Dudley, J. & Karczewski, K.J. (2013). *Exploring personal genomics*. Reino Unido: Oxford University Press.
- Eyre-Walker, A., Smith, N.H. & Smith, J.M. (1999). *How clonal are human mitochondria?*. Proceedings of the Royal Society/Biological Sciences; 266(1418): 477-483.
- Fahy, G.M., West, M.D. & Harris, S.B. (2010). *The future of aging: pathways to human life extension*. EUA: Springer.
- Feinglos, M. (2008). *Type 2 Diabetes Mellitus. An evidence-based approach to practical management*. EUA: Human Press.
- Fritsche, A., Thamer, C., Stefan, N. & Häring, H.U. (2007). *Gen-Umwelt-Interaktion in Pathogenese und Prävention des Diabetes mellitus Typ 2*. Der Internist; 48: 669-675.

- Giles, R. , B lanc, H. , C ann, H. M. & Wallace, D.C. (1980). *Maternal inheritance of human mitochondrial DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA; 77(11): 6715-6719.
- Graham, C. & Hill, A. (2001). *DNA sequencing protocols*. EUA: Humana Press.
- Greenberg, B.D., Newbold, J.E. & Sugio, A. (1983). *Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA*. Gene; 21: 33-49.
- Guardado-Estrada, M., Juarez-Torres, E., Medina-Martinez, I., Wegier, A., Gomez, G., Cruz-Talonia, F., Roman-Bassaure, E., Piñero, D., Kofman-Alfaro, S. & Berumen, J. (2009). *A great diversity of amerindian mitochondrial DNA ancestry is present in the Mexican mestizo population*. Journal of Human Genetics; 54: 695-705.
- Guo, L.J., Oshida, Y., Fuku, N., Takeyasu, T., Fujita, Y., Kurata, M., Sato, Y., Ito, M. & Tanaka, M. (2005). *Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity*. Mitochondrion; 5: 15-33.
- Gvozdjáková, A. (2008). *Mitochondrial Medicine. Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy*. EUA: Springer.
- Hagström, E., Freyer, C., Battersby, B.J., Stewart, J.B. & Larsson, N.G. (2014). *No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline*. Nucleic Acids Research; 42(2): 1111-1116.
- Howell, N. & Smejkal, CB. (2000). *Persistent heteroplasmy of mutation in the human mtDNA control región: hypermutation as an apparent consequence of simple-repeat expansión/contraction*. American Journal of Human Genetics; 66(5): 1589-1598.
- Horai, S. & Hayasaka, K. (1990). *Intraespecific nucleotide sequence differences in the major noncoding región of human mitochondrial DNA*. American Journal of Human Genetics; 46: 828-842.
- Hu, F. (2011). *Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes*. Diabetes Care; 34: 1249-1257.
- Isenberg, A. (1999). *Mitochondrial DNA analysis at the FBI laboratory*. Forensic Science Communications; 1(2).
- Kahn, S.E., Hull, R.L. & Utzschneider, K.M. (2006). *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature; 444: 840-846.
- Koolman, J. (2004). *Bioquímica. Texto y atlas*. España: Médica Panamericana.
- Kornienko, I.V. & Malyarcchuk, B.A. (2005). *Analysis of mutation mechanisms in human mitochondrial DNA*. Molecular Biology; 39(5): 761-768.

- Kyriakouli, D.S., Boesch, P., Taylor, R.W., & Lightowers, R.N. (2008). *Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease*. Gene Therapy; 15: 1017-1023.
- Liou, C.W., Chen, J.B., Tiao, M.M., Weng, S.W., Huang, T.L., Chuang, J.H., Chen, S.D., Chuang, Y.C., Lee, W.C., Lin, T.K. & Wang, P.W. (2012). *Mitochondrial DNA coding and control region variants as genetic risk factors for type 2 diabetes*. Diabetes; 61(10): 2642-2651.
- Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. Argentina: Médica Panamericana.
- Luque, J. (2001). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. España: Elsevier.
- Lutz, S., Weisser, H.J., Heizmann, J. & Pollak, S. (1998). *Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany*. International Journal of Legal Medicine; 111: 67-77.
- Malyarchuk, B.A., Rogozin, I.B., Berikov, V.B. & Derenko, M.V. (2002). *Analysis of the phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region*. Human Genetics; 111(1): 46-53.
- Malyarchuk, B A. (2008). *Cold spots of human mitochondrial DNA hypervariable segment 1*. Molekulyarnaya Biologiya; 42(3):454-458.
- Maraschin, J., Murussi, N., Witter, V. & Silverio, S.P. (2010). *Diabetes Mellitus Classification*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 95(2): e40-e47.
- Martínez-Cortés, G., Salazar-Flores, J., Haro-Guerrero, J., Rubi-Castellanos, R., Velarde-Félix, J.S., Muñoz-Valle, J.F., López-Casamichana, M., Carrillo-Tapia, E., Canseco-Avila, L.M., Bravi, C.M., López-Armenta, M. & Rangel-Villalobos, H. (2013). *Maternal admixture and population structure in mexican-mestizos based on mtDNA haplogroups*. American Journal of Physical Anthropology; 151: 526-537.
- Miller, W.M., Nori-Janosz, K.E., Lillystone, M., Yanez, J. & McCullough, P.A. (2005). *Obesity and lipids*. Current cardiology reports; 7(6): 465-470.
- NOM-037-SSA2-2002. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.
- Opinto, G., Natalicchio, A. & Marchetti, P. (2013). *Physiology of incretins and loss of incretin effect in type 2 diabetes and obesity*. Archives of physiology and biochemistry; 119(4): 170-178.
- Östenson, CG. (2001). *The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview*. Acta Physiologica Scandinavica; 171: 241-247.
- Park, K.S., Chan, J.C., Chuang, L.M., Suzuki, S., Araki, E., Nanjo, K., Ji, L., Ng, M., Nishi, M., Furuta, H., Shirota, T., Ahn, B.Y., Chung, S.S., Min, H.K., Lee, S.W., Kim,

- J.H., Cho, Y.M. & Lee, H.K. (2008). *A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians*. *Diabetologia*; 51(4):602-608.
- Passarge, E. (2007). *Genética: texto y atlas*. España: Médica Panamericana.
  - Piersy, R., Sullivan, K.M., Benson, N. & Gill, P. (1993). *The application of mitochondrial DNA typing to the study of White Caucasian genetic identification*. *International Journal of Legal Medicine*; 106: 85-90.
  - Poretzky, L. (2010). *Principles of Diabetes Mellitus*. EUA: Springer.
  - Poulton, J., Brown, M.S., Cooper, A., Marchington, D.R. & Phillips, D.I. (1998). *A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life*. *Diabetologia*; 41:54-58.
  - Poulton, J., Luan, J., Macaulay, V., Hennings, S., Mitchell, J. & Wareham, N.J. (2002). *Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study*. *Human Molecular Genetics*; 11(13):1581-1583.
  - Richards, M.B., Macaulay, V.A., Bandelt, H.J. & Sykes, B.C. (1998). *Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe*. *Annals of Human Genetics*; 62(Pt3):241-260.
  - Riethof, M., Flavin, P.L., Lindvall, B., Michels, R., O'Connor, P., Redmon, P., Retzer, K., Roberts, J., Smith, S. & Sperl-Hillen, J. (2012). *Health Care Guideline: Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes Mellitus in Adults*. EUA: ICSI.
  - Ross, M. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Argentina: Médica Panamericana.
  - Rtveldze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sanchez-Romero, L.M., Levy, D., Melendez, G., Webber, L., Kilpi, F., McPherson, K. & Brown, M. (2014). *Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden*. *Public Health Nutrition*; 17(1): 233-239.
  - Sanger, F., Donelson, J.E., Coulson, A.R., Kössel, H. & Fischer, D. (1973). *Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in Phage f1 DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 70(4): 1209-1213.
  - Sanger, F. & Coulson, AR. (1975). *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. *Journal of Molecular Biology*; 94: 441-448.
  - Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 74(12): 5463-5467.

- Sato, M. (2013). *Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA*. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1833:1979-1984.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985). *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*; 230(4732): 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. Mullis, K.B. & Erlich, H. A. (1988). *Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*; 239(4839): 481-491.
- Schuller, M., Sloots, T.P., James, G.S., Halliday, C.L. & Carter, I.W.J. (2010). *PCR for clinical microbiology*. Australia: Springer.
- Schulze, M., Hoffmann, K., Boeing, H., Linseisen, J., Rohrmann, S., Möhling, M., Pfeiffer, A.F., Spranger, J., Thamer, C., Häring, H.U., Fritsche, A. & Joost, H.G. (2007). *An accurate risk score based on anthropometric, dietary and lifestyle factors to predict the development of type 2 diabetes*. *Diabetes Care*; 30: 510-515.
- Schwartz, M. (2003). *New patterns of inheritance in mitochondrial disease*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 310:247-251.
- Singh, K.K. & Kulawiec, M. (2009). *Mitochondrial DNA polymorphism and risk of cancer*. *Methods of Molecular Biology*; 471: 291-303.
- Skyler, J. (2012). *Atlas of Diabetes*. EUA: Springer.
- Slatko, B.E., Kieleczawa, J., Ju, J., Gardner, A.F., Hendrickson, C.I. & Ausubel, F.M. (2011). *"First Generation" automated DNA sequencing technology*. *Current Protocols in Molecular Biology*; S96: 7.2.1-7.2.28
- Stoneking, M. (2000). *Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots*. *American Journal of Human Genetics*; 67:1029-1032.
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D.G., Mulligan, C.J., Bravi, C.M., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Kusnudinova, E.K., Fedorova, S.A., Golubenko, M.V., Stepanov, V.A., Gubina, M.A., Zhadanov, S.I., Ossipova, L.P., Damba, L., Voevoda, M.I., DiPierri, J.E., Villems, R., & Malhi, R.S. (2007). *Beringian standstill and spread of native american founders*. *Plos ONE*; 9(e829): 1-6.
- Tsutsumi, H., Komuro, T., Mukoyama, R. & Nogami, H. (2006). *Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and a family analysis*. *Journal of Oral Science*; 48(3):145-152.

- Tzen, J.M., Hsu, H.J. & Wang, M.N. (2008). *Redefinition of hypervariable región I in mitochondrial DNA control región and comparing its diversity among various ethnic groups*. Mitochondrion; 8: 146-154.
- Valencia, C.A., Pervaiz, M.A., Husami, A., Qian, Y. & Zhang, K. (2013). *Next generation sequencing technologies in medical genetics*. EUA: Springer.
- van G reevenbroek, M .M., S chalkwijk, C .G. & S tehouwer, C .D. (2013). *Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences*. The Netherlands Journal of Medicine; 71(4): 174-187.
- Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K. & Wilson, A.C. (1991). *African populations and the evolution of human mitochondrial DNA*. Science; 253(5027): 1503-1507.
- Voet, D. & Voet, J. (2007). *Principios de Bioquímica*. México: Médica Panamericana.
- Walberg, M. & Clayton, D. (1981). *Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA*. Nucleic Acids Research; 9(20): 5411-5421.
- Weng, S.W., Liou, C.W., Lin, T.K., Wei, Y.H., Lee, C.F., Eng, H.L., Chen, S.D., Liu, R.T., C hen, J .F., C hen, I.Y ., C hen, M .H. & Wang, P .W. (2005). *Association of mitochondrial deoxyribonucleic acid 16189 variant (T->C transition) with metabolic síndrome in chinese adults*. The Journal of clinical endocrinology & Metabolism; 90(9): 5037-5040.
- Wong, L.J. (2013). *Next generation sequencing:translation to clinical diagnostics*. EUA: Springer.
- Zabala, J . ( 2005). *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. M éxico: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Zapico, S C. & Ubelaker, D H. ( 2013). *mtDNA mutations and their role in aging, diseases and forensic sciences*. Aging and Disease; 4(6): 364-380.
- Zimmet, P . & S haw, J . ( 2001). *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature; 414: 782-787.