



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Enfermedades causadas por mutaciones del ADN mitocondrial presentes en la línea germinal y sus posibles tratamientos.

Ana Fuster Olmo

Grau de Biologia

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Bernhard Oliver Vögler
*Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Enfermedades mitocondriales, trastorno primario, ADN mitocondrial, terapia de reemplazo mitocondrial, pronucleos, huso materno, cuerpo polar, mutaciones.

Índice

Resumen	4
Introducción	5
Hipótesis y objetivos	9
Material y métodos	10
Resultados y discusión	12
Conclusión	30
Bibliografía	31

Resumen

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos originados por deficiencias en la síntesis de ATP. En consecuencia, las manifestaciones clínicas son heterogéneas y afectan a distintos órganos y tejidos. Dado el papel que tiene la mitocondria en el funcionamiento de las células estas enfermedades son de gran importancia, debido a la poca esperanza de vida que tienen las personas que padecen estas patologías. Además, las mitocondrias se consideran indicadores de calidad de ovocitos y también tienen un papel importante en la fertilización. El origen de las enfermedades mitocondriales puede estar causado por una mutación en el ADN mitocondrial que se hereda de una forma diferente al ADN genómico. Por la falta de un tratamiento eficaz que pueda mejorar la calidad y esperanza de vida de estas personas, investigaciones recientes idearon unas técnicas de reemplazo mitocondrial: la transferencia pronuclear, la transferencia del huso materno y la transferencia del cuerpo polar. En este trabajo se ha hecho una búsqueda en *MITOMAP* para reunir en una tabla todas aquellas mutaciones del ADN mitocondrial que con estas terapias se podría evitar la transmisión. Se ha comprobado que estas técnicas permiten tener una descendencia sana pero con una serie de complicaciones, debido a que con los tres métodos hay arrastre de ADN mitocondrial mutado. Dado que estas terapias de reemplazo mitocondrial son muy recientes, no hay estudios que informen de las consecuencias de este arrastre de ADN mitocondrial materno, ni de cómo va a interactuar el ADN nuclear de la madre con el ADN mitocondrial de la donante a lo largo del tiempo.

Introducción

Las mitocondrias son orgánulos presentes en el citoplasma de prácticamente todas las células eucariotas donde desempeñan diferentes funciones, entre ellas la producción de energía celular en forma de adenosín trifosfato (ATP), mediante un sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).

El proceso de fosforilación oxidativa implica el acoplamiento de reacciones redox y de fosforilación en la membrana interna de las mitocondrias, lo que da como resultado la síntesis efectiva de ATP. Durante este proceso, los electrones del dinucleótido de adenina de nicotinamida (NADH) o Dinucleótido de flavina y adenina (FADH_2) se transportan a través de la cadena de transporte de electrones (ETC), que comprende los complejos I-IV, para crear un gradiente de protones. El movimiento consecutivo de los protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana crea un gradiente electroquímico. Este gradiente electroquímico consiste en un gradiente de pH (ΔpH) y un gradiente eléctrico ($\Delta\psi$) que impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP (adenosín difosfato) a través de la enzima ATP sintasa (complejo V) (Subramaniam *et al.*, 2013).

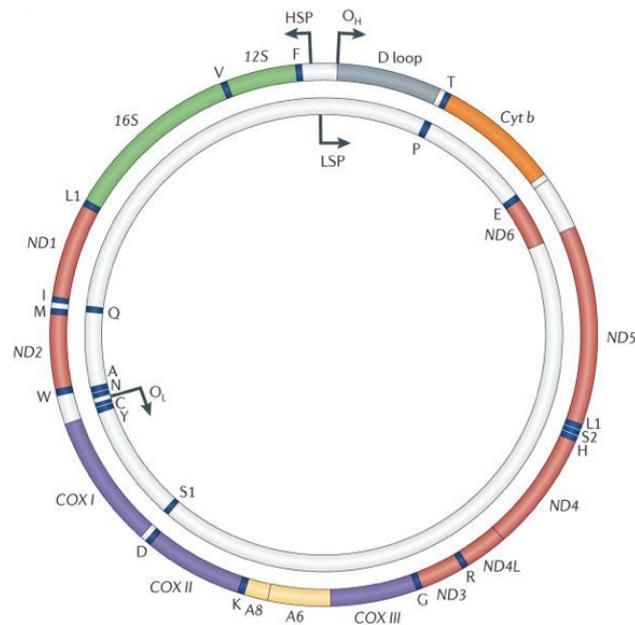


Figura 1. ADN mitocondrial humano. Los 37 genes incluyen siete subunidades del complejo I (ND1,2,3,4,4L,5 y 6), una subunidad del complejo III (citocromo b (Cyt b)), tres subunidades del complejo IV (Cyt c oxidasa (COX) I, II y III), dos subunidades del complejo V (ATPasa 6 (A6) y ATPasa (A8)), 22 ARNts (código de una letra) y dos ARNr (12 S y 16 S). También se muestran los orígenes de la replicación de la cadena pesada (O_H) y la cadena ligera (O_L), y los promotores de la transcripción de la cadena pesada (HSP) y de la cadena ligera (LSP) (imagen adaptada de Schon *et al.*, 2012).

Estos orgánulos contienen su propio ADN, llamado ADN mitocondrial (ADNmt) que es circular de doble hebra, con 16 569 pares de bases y que representa menos de 1% del ADN total de una célula (Francis *et al.*, 2013). El ADNmt contiene 37 genes, 13 de los cuales codifican subunidades OXPHOS, 22 genes ARN de transferencia (ARNt) y 2 genes ARN ribosómicos (ARNr) (figura 1) (Bianco *et al.*, 2016).

Los complejos I, II, III, IV y V están formados tanto por productos genéticos derivados de genomas mitocondriales, como de nucleares (figura 2) (Soneto *et al.*, 2013).

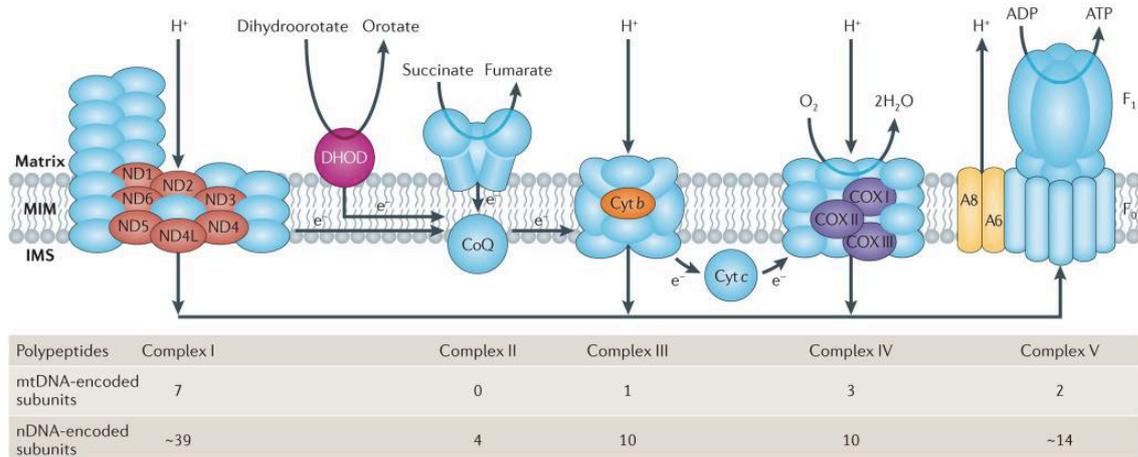


Figura 2. Cadena respiratoria humana / sistema de fosforilación oxidativa. Está compuesto por los cinco complejos y dos transportadores de electrones, coenzima Q (CoQ) y citocromo C (Cyt c). Los complejos I, III, IV y V contienen subunidades codificadas tanto por ADNmt (color rojo, naranja, morado y amarillo) como ADN nuclear (ADNn) (color azul). Mientras que el complejo II está codificado solo por ADNn, al igual que la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD) que participa en la síntesis de pirimidina. Las proteínas de ensamblaje están codificadas por el ADNn. IMS, espacio intermembrana; MIM, membrana mitocondrial interna (imagen adaptada de Schon *et al.*, 2012).

El número de mitocondrias en una célula puede variar y depende del tipo celular y de sus necesidades energéticas, por lo cual el cerebro, corazón, hígado, páncreas y los músculos son más dependientes de la función mitocondrial (Mitalipov *et al.*, 2014). Alteraciones en el sistema de fosforilación oxidativa pueden disminuir los niveles de ATP y cuando esto sucede, se compromete la función de la célula llegando a producir una disfunción celular que como consecuencia induce apoptosis (Saneto *et al.*, 2013).

Los trastornos mitocondriales representan un grupo heterogéneo de enfermedades con características clínicas variables, que muestran manifestaciones tisulares específicas y afectan a múltiples órganos.

Las enfermedades mitocondriales suelen estar provocados por una de las siguientes causas (Felczak *et al.*, 2017):

- 1) mutaciones en los genes mitocondriales (trastornos primarios)
- 2) mutaciones en los genes nucleares codificantes para proteínas mitocondriales
- 3) acumulación de daños mitocondriales a lo largo del tiempo (implica con frecuencia patologías neurodegenerativas)

En el caso de las mutaciones del ADNn se heredan según las clásicas leyes de Mendel, mientras que las mutaciones del ADNmt se heredan solo por vía materna. También puede presentarse de forma esporádica, como mutaciones *de novo* (Greaves *et al.*, 2006). La naturaleza poliploide del genoma mitocondrial (hasta miles de copias por célula) da lugar a una característica importante de la genética mitocondrial, la homoplasmia y heteroplasmia. La homoplasmia describe la existencia de copias de ADNmt idénticas dentro de una célula y la heteroplasmia hace referencia a una mezcla de dos o más genotipos mitocondriales. Algunas mutaciones afectan a todas las copias del genoma mitocondrial (mutación homoplásmica), mientras que otras solo están presentes en algunas copias del genoma mitocondrial (mutación heteroplásmica) (Taylor *et al.*, 2007). Las enfermedades causadas por mutaciones en los genes mitocondriales que provocan defectos en la cadena respiratoria, afectan a uno de cada 10 000 adultos. Se estima que la transmisión de las mutaciones del ADNmt que potencialmente pueden causar enfermedad es tan alta como uno de cada 200 recién nacidos (Greggains *et al.*, 2014).

La tasa de mutación en el ADNmt es de 10 a 17 veces mayor que en el ADNn debido a la generación de especies de reactivas de oxígeno (ROS) en la cadena respiratoria que se produce cerca del ADNmt (Tuppen H *et al.*, 2010). En general, las ROS son moléculas químicamente muy reactivas y suelen causar efectos mutagénicos y citotóxicos del ADNmt porque no posee histonas que lo protejan y presenta muy pocos sistemas de reparación. Estos daños oxidativos son directamente responsable de la mayor inestabilidad de los nucleótidos del ADNmt en comparación con el ADNn (Francis *et al.*, 2013). Por lo tanto, los cambios moleculares debidos a las mutaciones pueden ser detectables con más probabilidad en el ADN mitocondrial que en el nuclear (Parr *et al.*, 2012).

Las mitocondrias juegan papeles vitales en las funciones de los ovocitos, que contienen más copias de ADNmt que las células somáticas (Greggains *et al.*, 2014), y son indicadores críticos de la calidad de estos. Se sabe relativamente poco sobre la función de las mitocondrias en ovocitos y en el embrión preimplantatorio, pero es bien sabido que la disfunción mitocondrial en el ovocito y el embrión juega un papel importante en la infertilidad y en anormalidades del desarrollo.

De hecho, los trastornos de la fertilidad se han convertido en un problema creciente en todo el mundo, y la disfunción mitocondrial asociada a la infertilidad se ha demostrado claramente en mujeres afectadas por enfermedades o trastornos metabólicos, como la diabetes y la obesidad, así como cambios en el metabolismo resultado del envejecimiento de los ovocitos. Otras disfunciones mitocondriales aún no se han relacionado con mutaciones mitocondriales concretas, pero han dado lugar a un mayor número de mujeres que requieren la fertilización in vitro (FIV) u otras tecnologías de reproducción asistida (ART) (Schatten *et al.*, 2014).

Los efectos de las disfunciones mitocondriales así como las funciones mitocondriales subóptimas se correlacionan con anomalías del huso meiótico porque son importantes para su formación y para el mantenimiento del huso meiótico II (MII) antes de la fertilización. Como consecuencia la reducción en la producción de ATP dará como resultado aneuploidía, provocado por errores de segregación cromosómica, y su frecuencia aumenta significativamente en ovocitos de mujeres obesas o diabéticas y en ovocitos envejecidos (Schatten *et al.*, 2014).

Este trabajo se enfoca en las patologías causadas por mutaciones de ADNmt (trastornos mitocondriales primarios) y no en las patologías mitocondriales en general, dado que estas últimas se refieren a trastornos que pueden estar causados por mutaciones tanto en ADNmt como en ADNn. Las enfermedades hereditarias causadas por las mutaciones de ADNmt se describieron por primera vez en 1988 y hasta la fecha se han identificado más de 250 mutaciones puntuales o grandes deleciones como causantes. La gravedad del fenotipo de la enfermedad depende del tipo específico de mutación y nivel de heteroplasmia, es decir, la proporción de moléculas de ADNmt mutadas respecto a las sanas presentes en cada célula (Mitalipov *et al.*, 2014).

En la actualidad no existe una cura para las enfermedades mitocondriales sino solo tratamientos sintomáticos de patologías relacionadas. En este sentido este trabajo fin de grado estudia cómo las mujeres afectadas por enfermedades mitocondriales podrían tener hijos genéticamente relacionados (no adoptados) y que además no hereden estas enfermedades.

Hipótesis

Existe una terapia génica preimplantacional basada en un reemplazo mitocondrial, en el que se intercambian mitocondrias defectuosas por las de donantes sanos. Esta novedosa técnica permite a progenitores con mutaciones en el ADN mitocondrial concebir hijos sanos.

Objetivos

- 1) Se evaluará las ventajas y desventajas de la técnica terapia génica preimplantacional para el tratamiento de estas enfermedades.
- 2) Se elaborará mediante búsqueda bibliográfica, un listado de las enfermedades causadas por el ADN mitocondrial y los posibles tratamientos farmacológicos.

Material y métodos

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en la base de datos *PubMed* que gestiona el número más grande de artículos científicos del ámbito clínico. Para ello se han utilizado varias palabras clave (tabla 1) para poder recopilar los artículos relacionados con el tema y acceder de forma amplia al conocimiento del área. Debido a que las técnicas de reemplazo mitocondrial son muy recientes, la mayoría de artículos encontrados son de los últimos años y esto ha permitido poder tener un enfoque actual de las técnicas. Se han añadido comillas a un conjunto de palabras para encontrar aquellos artículos que contienen en el orden establecido los términos indicados. En el caso de no emplear comillas, aparecen aquellas publicaciones que incluyen el grupo de palabras clave pero que podrían estar sin el orden dictado.

Primera palabra	Segunda palabra	Tercera palabra	Cuarta palabra
Mitochondrial	Transfer	-	-
“Mitochondrial	DNA	mutations”	humans
“Mitochondrial	DNA	segregation	transmission”
Mitochondrial	DNA	rearrangements	-
Mitochondrial	replacement	-	-
Maternal	inherited	“DNA	mitochondrial”
Ovogenesis	mitochondrial	-	-
Mitochondria	replacement	therapy	-
Polar	body	transfer	-
Primary	disorders	mitochondrial	DNA
Obesity	reproduction	-	-

Tabla 1. Palabras utilizadas para la búsqueda bibliográfica.

También se ha utilizado la base de datos de ADNmt humano *MITOMAP* (<https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/WebHome>) para recopilar todas las mutaciones patológicas de la línea germinal materna. Se lanzó por primera vez como una base de datos en 1996 y desde entonces ha sido una herramienta esencial para los investigadores de genética y médicos. Presenta un conjunto de datos bien documentado y se va actualizando a medida que investigadores van publicando artículos científicos nuevas mutaciones del ADNmt.

Otra web a la que se ha recurrido es *United Mitochondrial Disease Foundation* (UMDF) (<http://www.umdff.org>). Es una fundación patrocinada por *GuideStar*, que es un servicio de información que se especializa en notificar sobre compañías sin fines de lucro de EE. UU. Hay incorporado un consejo asesor de médicos y científicos, con el objetivo de promover la búsqueda y educación para el diagnóstico, tratamiento y cura de las enfermedades mitocondriales y da soporte a los individuos y familias afectadas.

Resultados y discusión

Hasta día de hoy, las mujeres con enfermedades de ADNmt que desean tener hijos genéticamente relacionados han tenido que elegir entre la procreación natural o el diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Esta última opción solo es una solución para mujeres heteroplásmicas. La idea del uso de DGP es que los médicos puedan seleccionar un embrión que no posee carga mutante, o uno que posee una carga mutante tan pequeña que una manifestación clínica de la enfermedad en principio no ocurrirá. Una limitación de este enfoque es que no funciona con mujeres homoplásmicas y que en el caso de mujeres heteroplásmicas, solo funciona cuando hay suficientes datos sobre la mutación específica de ADNmt que causa el fenotipo patológico. Existen otras opciones reproductivas para las mujeres afectadas por estas enfermedades: la donación de óvulos y embriones. Sin embargo, esto supone renunciar al vínculo genético materno que es de suma importancia para algunos. Investigaciones recientes, han ideado tres técnicas diferentes que evitan aparentemente que las mutaciones del ADNmt de la línea germinal se transmitan a la descendencia y al mismo tiempo se mantenga un vínculo genético directo entre la madre y el hijo. Estas técnicas de reemplazo mitocondrial son la transferencia pronuclear (PNT), transferencia del huso materno (ST) y la más reciente, transferencia del cuerpo polar (PBT). Parece ser que estas terapias tienen sus limitaciones debido a que no son aplicables a todas las enfermedades mitocondriales, sino que son efectivas para un subconjunto en el que el fenotipo patológico origina de mutaciones de los genes de las mitocondrias mismas (Palacios-González, 2016). Generalmente la enfermedad se detecta cuando algún miembro de la familia desarrolla la patología. Sin embargo, los síntomas pueden aparecer a cualquier edad, por lo que prevenir la enfermedad en estos casos puede resultar complicado. Estas pruebas son inapropiadas para condiciones homoplásmicas en las que la carga mutada del paciente es 100%, y sólo parecen ser útiles para condiciones donde la heteroplásmia es baja (Wolf *et al.*, 2015).

Estas técnicas están destinadas a eliminar el ADNmt materno en las células del individuo, aunque siempre hay algo de arrastre de ADNmt mutado, por lo que existe la posibilidad de que los niveles reducidos de ADNmt mutante aumenten otra vez durante el desarrollo posterior (inestabilidad genética). Un estudio reciente calculó que para un umbral clínico del 60%, la reducción del ADNmt mutante transferido a menos del 5% erradicaría la enfermedad para siempre. Mientras que si se excede esta cifra la probabilidad de que la enfermedad reaparezca en las siguientes generaciones es alta, por lo que es importante limitar la transmisión del ADNmt mutante a niveles por debajo del 3%. Estos bajos niveles ya se han logrado con las técnicas de reemplazo mitocondrial en primates (Gómez *et al.*, 2017). Sin

embargo estos cálculos son probabilísticos, por lo que no garantizan un éxito terapéutico de las técnicas con total certeza.

La PNT comienza con dos óvulos: uno de la madre, que contiene las mitocondrias enfermas, y un óvulo donado con mitocondrias sanas. Ambos están fertilizados y el cigoto presenta dos pronúcleos, cada uno claramente visible y que contiene la mitad del número de cromosomas de ADNn de espermatozoide y oocito. Se extraen los dos pronúcleos del cigoto formado por los padres y el cigoto enucleado se descarta. Los pronucleos que se crean usando el óvulo del donante y el espermato del padre también se descartan. A continuación, los dos pronúcleos tomados del embrión de los padres se inyectan en el embrión enucleado del donante. Al final del procedimiento, el embrión producido contiene el ADNn de los padres y las mitocondrias sanas de la donante (figura 3) (Wrigley *et al.*, 2015). La viabilidad de esta técnica se informó en 2010 con cigotos anormales con uno o más de 2 pronucleos que normalmente se descartan durante la fertilización in vitro de rutina. Se informó de que el aislamiento del pronucleo puede dar como resultado la transferencia conjunta de cantidades inaceptables de mitocondrias. Además, el pronucleo masculino y femenino en el cigoto humano no se puede diferenciar fácilmente mediante observación visual, solo la mitad de los cigotos reconstruidos contendrían un pronucleo tanto masculino como otro femenino. Los cigotos reconstruidos (n=36) se colocaron en cultivo y 8 se desarrollaron más allá de la etapa de 8 células. El 3-8 % de estos embriones se desarrollaron en la etapa de blastocito con bajo arrastre de ADNmt (<2%).

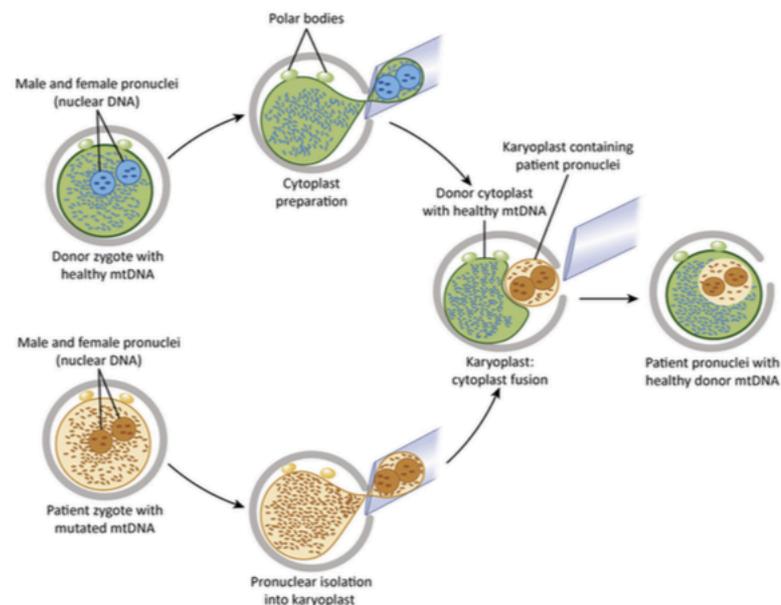


Figura 3. Representación esquemática del procedimiento de PNT. Representados a la izquierda los cigotos de la madre portadora de mutación y la donante. El pronucleo de los padres se transfiere en el carioplasma del cigoto del donante (Wolf *et al.*, 2015).

Los autores de PNT en cigotos humanos normales concluyeron que aunque inevitablemente se transfería ADNmt con el genoma nuclear durante el procedimiento, la PNT tiene potencial para prevenir la transmisión de la enfermedad de ADNmt en humanos (Wolf *et al.*, 2015). Sin embargo, en una línea de células madre embrionarias derivadas de un blastocito de PNT tuvo un 4% de ADN transferido de la madre y exhibió un aumento progresivo en la heteroplasmia (Gómez *et al.*, 2017). Esto sugiere que la PNT puede reducir el riesgo de enfermedad mitocondrial, pero puede no garantizar la prevención. Actualmente es imposible evaluar la seguridad y eficacia del método.

La ST consiste en extraer los cromosomas en metafase II del óvulo de la madre cuyo ADNmt tiene alguna mutación, para luego transferirlos a un óvulo de la donante sana en el que se han eliminado los cromosomas. El óvulo híbrido se fertiliza *in vitro* y luego se transfiere al útero de la madre (figura 4). La ST se realizó en primates en 2009 y nacieron cuatro monos sanos, en los que no se detectó la presencia de mitocondrias maternas originales. Estos fueron los primeros animales nacidos después de un procedimiento ST. Se documentaron curvas de crecimiento normales en los monos ST y niveles de arrastre de ADNmt relativamente constantes y por debajo del 2% (Wolf *et al.*, 2015). La técnica luego se probó en óvulos humanos y aunque el 52% de los cigotos se fertilizaron anormalmente, el resto pudo desarrollarse en blastocitos de manera similar a los controles. Hasta ahora la eficacia de la técnica ha mejorado para alcanzar un arrastre inferior al 1%. Sin embargo, se observó que a pesar de los bajos niveles de ADNmt transferidos, a veces había pérdida gradual del ADNmt del donante y el restablecimiento del haplotipo materno. En abril de 2016, nació el primer niño en México resultante de esta técnica. La madre era portadora asintomática de una mutación mitocondrial que causaba el síndrome de Leigh, un trastorno neurológico fatal. A pesar de que ella no tenía el síndrome, la enfermedad podía transmitirse a sus hijos. De hecho había tenido 4 abortos espontáneos y tenía dos hijos con enfermedad que murieron a la edad de 6 y 8 meses. El niño que tiene el 1% del ADNmt de su madre, estaba sano a los tres meses, aunque no se sabe si podría aparecer alguna anomalía en el futuro (Gómez *et al.*, 2017).

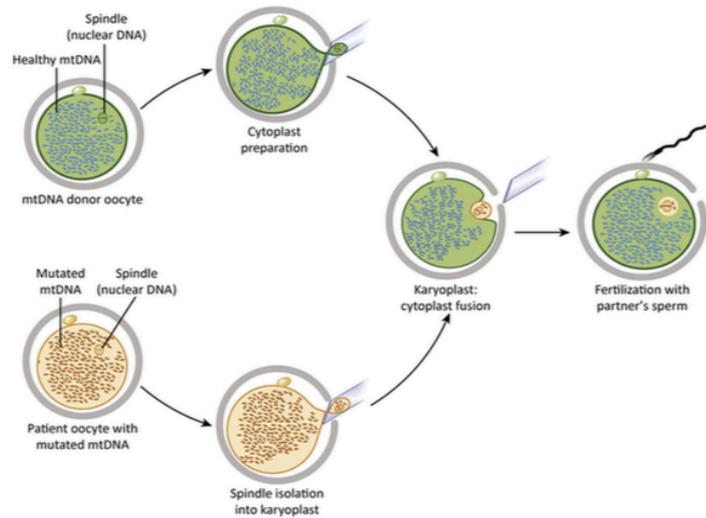


Figura 4. Representación de la técnica de transferencia del huso materno. Los ovocitos no fertilizados de la madre portadora de enfermedad mitocondrial y la donante señalados a la izquierda. Ambos husos se extraen en el carioplasma y el citoplasma de la madre se fusiona con el carioplasma de la donante. Posteriormente se fecunda el óvulo híbrido mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Wolf *et al.*, 2015).

La PBT se describió en una publicación de 2014. El primer cuerpo polar (PB1) se forma durante la maduración del oocito. En este proceso, el ADNn se duplica de modo que el ovocito primario contiene 4 conjuntos de cromosomas. El ovocito primario se divide y da lugar al ovocito secundario ($2n$) y el primer cuerpo polar diploide (PB1) con un citoplasma más pequeño. Después de la fertilización, el ovocito emite un PB2 haploide y el cigoto contiene un pronúcleo femenino haploide y un pronúcleo masculino. Un estudio reciente mostró que el PB1 y PB2 poseen el mismo genoma que los ovocitos (Wang *et al.*, 2014). Los cuerpos polares contienen muy pocas mitocondrias, lo que es una ventaja para evitar el arrastre mitocondrial. El PBT consiste en transferir el PB1 a un óvulo donado enucleado no fertilizado (PB1T) o el PB2 a un cigoto enucleado (PB2T) (Figura 4). En ratones la transferencia del PB1 o PB2 al citoplasma del ovocito o cigoto adecuado finalizó con éxito la meiosis y el desarrollo del embrión (Wolf *et al.*, 2015).

Un estudio reciente en ratones comparó los efectos de los cuatro tipos de transferencia de genoma en ratones: transferencia del PB1, PB2, transferencia de huso-cromosoma y PNT. Todos los tipos de embriones reconstruidos tuvieron un desarrollo normal y producción de crías vivas. La transferencia del PB1 generó niveles indetectables de heteroplasmia de ADNmt en todas las crías. La fácil visualización del PB1 sugiere una viabilidad de la transferencia del PB1 como un enfoque efectivo. De hecho, la manipulación de la transferencia del PB1 es más similar a la inyección intracitoplásmica de espermatozoides, que requiere solo un paso. De forma similar, la transferencia del PB2 también generó una

descendencia con niveles pequeños o incluso indetectables de heteroplasmia de ADNmt. Sin embargo, la desventaja de la transferencia del PB2 es que del óvulo receptor se debe extraer el pronúcleo femenino de la donante y esto plantea desafíos técnicos. La transferencia huso-cromosoma produjo descendencia con niveles bajos de ADNmt. Debido a que el huso humano es más pequeño que el del ratón, se espera que la transferencia del huso-cromosoma de cómo resultado un menor arrastre. La descendencia derivada de PNT tuvo el nivel más elevado (23,7%) de transferencia de ADNmt mutado. Esto puede ser causado principalmente por la amplificación de ADNmt alrededor del pronúcleo del cigoto. Estos datos sugieren que la transferencia del cuerpo polar da como resultado un mínimo de transferencia de ADNmt mutado en comparación con otros métodos. Es importante destacar que la generación F2 derivada de la transferencia del cuerpo polar todavía mantenía las variantes mínimas de ADNmt mutado (Wei *et al.*, 2015).

Sin embargo, la PBT no se ha replicado con éxito en otros mamíferos (incluidos primates) a pesar de los esfuerzos considerables. En la mayoría de especies, los cuerpos polares experimentan una vida breve debido a las presiones apoptóticas que conducen a la fragmentación y degradación del ADN (Wolf *et al.*, 2015).

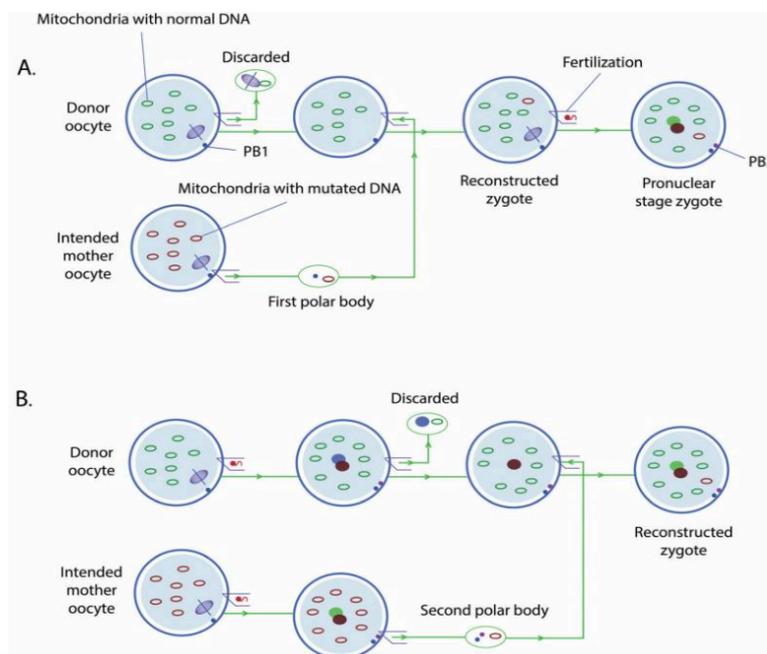


Figura 5. Transferencia del primer y segundo cuerpo polar. PBT1 (A): El procedimiento se inicia extrayendo el PB1 de ovocitos en metafase II del paciente y va seguido de una fusión con el citoplasma MII de la donante del cual se extraído el núcleo y el PB1. PBT2 (B): Se fecundan los ovocitos de la madre y la donante, y se extraen los PB2. El PB2 de la madre se fusiona con el cigoto de un solo núcleo (el del padre). (Gómez *et al.*, 2017).

Aunque la ST y PNT fueron autorizadas para uso clínico en el Reino Unido en 2015, la Autoridad de Fertilización y Embriología Humana (HFEA; del inglés Human Fertilisation and

Embryology Authority) anunció en 2016 que la seguridad y eficacia de estas técnicas debían confirmarse antes de que cualquier centro médico pudiera solicitar una licencia para ofrecer la donación mitocondrial. Se convocó a un grupo de científicos para revisar los últimos avances en este sentido. La revisión de los expertos se publicó a finales del 2016 y recomienda que en circunstancias específicas, la MST y la PNT se adopten cautelosamente en la práctica clínica, donde la herencia de la enfermedad probablemente cause la muerte o una enfermedad grave y no como una alternativa. Después de esto la HFEA aprobó el uso de la donación mitocondrial en ciertos casos específicos (Gómez *et al.*, 2017). En marzo de 2017, la HFEA otorgó la primera licencia clínica de donación mitocondrial al “Newcastle Fertility Centre” en Reino Unido.

En los EE.UU la administración de alimentos y medicamentos (FDA; del inglés Food and Drug Administration), reunió a un comité de científicos para revisar las técnicas de reemplazo mitocondrial. Es importante destacar que el comité en su informe final de la valoración de estas técnicas, afirmó que existe una preocupación sobre la manipulación genética y que se deberían considerar casos específicos en vez de prohibir las técnicas, para prevenir la transmisión de la enfermedad grave de ADNmt. A pesar de esta posición, se ha impedido que la FDA siga evaluando las aplicaciones clínicas de las técnicas de reemplazo mitocondrial por una ley de congreso en 2016, que prohíbe a la agencia evaluar ensayos clínicos que involucren modificaciones genéticas que afecten a la próxima generación (UMDF).

Hasta la fecha, ha habido dos informes de la modificación de embriones a través de la técnica de reemplazo mitocondrial y posteriormente transferencia del embrión a la madre. Se describió el uso de PNT para establecer un embarazo a una mujer de treinta años con infertilidad inexplicada. Después de la transferencia de 5 embriones se implantaron correctamente 3 que se redujo quirúrgicamente a gemelos. Los dos fetos restantes sobrevivieron solo hasta la mitad de la gestación, probablemente debido a las complicaciones obstétricas del embarazo múltiple, más que por la PNT. Ninguno de los fetos tenía niveles detectables del ADNmt de la madre. El otro caso es el ya mencionado anteriormente de ST que se realizó en México, dando lugar al primer bebé nacido en el mundo con tres ADN (el ADNn paterno, materno y el ADNmt de la donante). El doctor que llevó a cabo esta práctica, expuso que la reproducción asistida en México está muy poco regulada y que no hay leyes que rijan las técnicas de transferencia mitocondrial y reproducción asistida (Palacios *et al.*, 2017).

Estas técnicas han sido muy debatidas en los últimos años y se ha planteado cuando serán realmente necesarias. Para ello, previamente se tienen que evaluar cuales son las enfermedades causadas por estas mutaciones (tabla 1), los tratamientos existentes y el pronóstico.

Enfermedad	Inicio de la enfermedad	Síntomas	Herencia
LHON	Puede aparecer a cualquier edad. Más común alrededor de los 20 años.	Degeneración del nervio óptico por la falta de energía. Pérdida de la visión central.	Herencia materna.
Síndrome de Leigh	Generalmente en la infancia.	Se caracteriza por presentar lesiones necrotizantes visibles en el cerebro (mesencéfalo y el tronco encefálico). Pérdida de habilidades básicas (succión, control de la cabeza, caminar y hablar). Convulsiones, complicaciones cardíacas.	Herencia dominante ligado al cromosoma X, autosómico recesivo y materna.
KSS	Inicio típico antes de los 20 años, aunque puede ocurrir en la infancia o la edad adulta.	Parálisis de los músculos oculares específicos (oftalmoplejía externa progresiva crónica- CPEO), degeneración de la retina, defectos en las señales eléctricas del corazón, ataxia, sordera, demencia, disfunción renal y debilidad muscular. Anormalidades endocrinas, retraso del crecimiento o la diabetes.	Grandes deleciones normalmente espontáneas, rara vez la madre transmite la mutación.
CPEO	Inicio temprano.	Similares a los de KSS: miopatía visual, retinitis pigmentosa y disfunción del sistema nervioso central.	Grandes deleciones espontáneas y herencia materna (m.3243A>G).
MELAS	Inicio típico entre los 2 y 15 años. Aunque puede ocurrir en adultos.	Convulsiones, accidentes cerebrovasculares, dolores de cabeza recurrentes, regresión cognitiva, fibras rojas irregulares, acidosis láctica. Diabetes y pérdida de la audición, problemas renales y digestivos.	Herencia materna.
MERF	Generalmente en la infancia, pero puede aparecer en edad adulta.	Mioclono, epilepsia, ataxia, fibras rojas rasgadas, pérdida de audición, acidosis láctica, defectos cardíacos, demencia, anomalías oculares.	Algunos casos esporádicos y la mayoría se heredan por vía materna.
Síndrome de Pearson	Infancia.	Disfunción de la médula ósea y páncreas.	Deleciones únicas generalmente esporádicas.

Tabla 2. Enfermedades típicas del ADNmt. MERF= epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas. MELAS= encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular. LHON= Neuropatía óptica hereditaria de Leber. CPEO= Oftalmoplejía externa progresiva. KSS= síndrome de Kearns-Sayre. Fuente: "United Mitochondrial Disease Foundation".

Aunque parezca haber un vínculo lógico entre valorar el hecho de que las personas puedan tener sus propios hijos genéticos y aprobar o no solo las investigaciones destinadas a desarrollar técnicas de reemplazo mitocondrial, esto parece no ser tan sencillo. Realmente

estas personas afectadas tienen otras alternativas como la adopción o la donación de óvulos, por lo que sí pueden tener hijos sanos aunque no estén relacionados genéticamente. Se puede apreciar que los síntomas de algunas de estas enfermedades son devastadores para las personas que padecen estas patologías, por lo que se podría tener a pensar que estarían en el derecho de poder emplear estas técnicas en el caso de que quieran tener un hijo biológico. El problema viene cuando se habla de la seguridad de estas técnicas, debido a que deberían ser seguras para cualquier persona antes de su implementación. Estas terapias genéticas no solo consisten en modificar una mutación y por lo tanto evitar la sintomatología de la enfermedad. Con estos métodos estamos modificando todo el ADNmt, que aunque solo represente el 1% del ADN total, se ha visto que tiene una relación muy estrecha con el ADNn. Por lo que cambiando las mitocondrias de la madre por mitocondrias de donantes, estaríamos alterando esta interacción sin que haya estudios que demuestran las consecuencias de esta alteración. Aún se desconoce, si posteriormente podría haber una disfunción de las mitocondrias del niño y por lo tanto ocasionar consecuencias negativas. Otra de las cosas que hay que tener en cuenta, es que aunque sea en menor o mayor porcentaje, existe un arrastre de ADNmt mutado por lo que no se puede asegurar con certeza (debido a que no se han realizado estudios que lo confirmen) que no se incrementen los niveles de mutación con el paso del tiempo y por lo tanto los descendientes finalmente desarrollen la enfermedad. Otra limitación, es que no se detectan estas enfermedades (en el caso de mujeres asintomáticas) y se puede transmitir la mutación a la descendencia de forma silenciosa, por lo que estas terapias en estos casos solo podrían utilizarse para un hipotético segundo hijo. Como a día de hoy aun queda un largo recorrido de investigación para demostrar la seguridad de estas técnicas, la pregunta sería. ¿Qué tratamientos prescriben los médicos a las personas que padecen estas enfermedades mitocondriales?

Con los años, los médicos han utilizado una variedad de vitaminas y otros suplementos dietéticos para intentar tratar a los pacientes. Los suplementos dietéticos utilizados pueden aumentar la disponibilidad de sustrato (L-carnitina), aumentar el flujo de transferencia de electrones (ubiquinona (coenzima Q10) y riboflavina) o actúan como antioxidantes (vitaminas C y E, idebenona, coenzima Q10 y ácido lipoico)(Tabla 2). Además, se han usado compuestos como la L-arginina para aumentar la producción de óxido nítrico, lo que puede mejorar o prevenir las apoplejías mitocondriales atribuidas a la vasoconstricción (Karaa *et al.*, 2017).

Las mutaciones en el ADNmt pueden ocasionar un mal funcionamiento de la cadena respiratoria, provocando un cúmulo de electrones en los complejos que se pueden ceder al O₂ transformándolo así en anión superóxido, lo que conlleva a una disminución de O₂ en las mitocondrias. Esta disminución favorecerá la formación de lactato a partir del piruvato

obtenido de la glucólisis. Como consecuencia se puede producir una acidosis láctica como en el caso de MELAS. En condiciones normales mediante una fosfatasa, se activa la piruvato deshidrogenasa que va a formar acetil-CoA a partir del piruvato. Cuando disminuyen los niveles de O_2 , aumenta la presión parcial de CO_2 (hipercapnia) y disminuye el pH produciendo una acidosis respiratoria. Para solventar esto, se produce una hiperventilación para poder aumentar los niveles de O_2 .

A partir de los ácidos grasos también se puede obtener ATP. La activación de los ácidos grasos consiste en la unión en el citoplasma con la coenzima A (CoA) y forman un acil-CoA. Los ácidos grasos de cadena corta entran directamente en la mitocondria, pero los de cadena larga necesitan la lanzadera de carnitina. Para ello en el espacio intermembrana, el acil-CoA mediante la carnitina aciltransferasa I se desprende del CoA y el grupo acil se une a una carnitina para formar la acilcarnitina que ya puede pasar a través de la carnitina-acilcarnitina translocasa a la matriz mitocondrial. La carnitina aciltransferasa II, provoca que el acil se desprenda de la carnitina para así poder unirse al CoA. Mediante la β -oxidación se obtiene acetil-CoA a partir del acil-CoA. El acetil-CoA entraría en el ciclo de Krebs para posteriormente obtener energía.

Se han probado dietas cetogénicas para pacientes con enfermedades mitocondriales. Estas dietas consisten en disminuir la ingesta de glúcidos. Como consecuencia nuestro metabolismo sintetizaría glucosa a partir de oxalacetato. Esto conlleva a una disminución de los niveles de oxalacetato y a la vez se inhibiría el ciclo de Krebs. Se acumularía el acetil-CoA de la β -oxidación y por cetogénesis se formarían los cuerpos cetónicos en el hígado. Estos cuerpos cetónicos pasarían al torrente sanguíneo y llegarían al cerebro para proporcionarle energía. A simple vista puede parecer una solución eficaz, pero un exceso de cuerpos cetónicos disminuye el pH sanguíneo produciendo acidosis, pérdida de cationes y agua.

En el caso de presentar diabetes los pacientes se inyectan insulina. Si se presentan problemas cardíacos también se puede poner un marcapasos cardíaco. En el caso de KSS y CPEO se puede hacer una intervención quirúrgica para los párpados caídos.

Terapia farmacológica específica		
Acción sobre la síntesis de ADN (fármacos que modifican la función de la cadena respiratoria)	Ubiquinona (Coenzima Q10)	Mejora el transporte de electrones. Potente antioxidante.
	Idebenona	Efecto similar a ubiquinona pero es hidrosoluble y atraviesa la barrera hematoencefálica.
	Vitamina C y Vitamina K3	Aceptor de electrones y antioxidante.
	Tiamina- B1	Reduce concentraciones de lactato.
	Citocromo C	Aceptor de electrones.
Mejoras funcionales	Carnitina	Regula la concentración de coenzima A libre intramitocondrial
	Dicloroacetato	Análogo del piruvato. Estimula la piruvato deshidrogenasa. Disminuye la acidosis láctica
	Bicarbonato	Mejora la hiperventilación producida por la acidosis láctica
Prevención de estrés oxidativo (antioxidantes)	Vitamina E, A, C , K3, Ubiquinona 10, idebenona y ácido lipoico.	
Tratamiento de mantenimiento		
Medidas generales	<ul style="list-style-type: none"> • Ingesta calórica adecuada: evitar ayuno prolongado y situaciones de alta demanda energética. • Ejercicio físico aeróbico controlado. • Las dietas cetogénicas no han sido eficaces. 	

Tabla 3. Terapia farmacológica y tratamiento de mantenimiento. Tabla adaptada de Medicina de Familia.

En una encuesta de 162 personas, se determinaron los síntomas más comunes de enfermedad mitocondrial: fatiga (61%) y debilidad subjetiva (50%), seguido de: inestabilidad de la temperatura (48%), intolerancia al ejercicio (43%) y mialgia (38%). Cuando se preguntó acerca de los cinco síntomas más molestos, al menos el 57% de los pacientes describió una

combinación de trastornos musculoesqueléticos, neurológicos y gastrointestinales. Se observó que la mayoría de pacientes con enfermedad mitocondrial están o han estado tomando suplementos dietéticos que contienen principalmente coenzima Q10, L-carnitina, riboflavina y vitamina D. Más de la mitad de los pacientes informaron de un beneficio a los tres meses de haber ingerido estos suplementos. El 28% de los pacientes experimentaron efectos secundarios, aunque los pacientes no fueron seguidos para poder documentar con precisión los beneficios y efectos secundarios (Karaa *et al.*, 2017).

El pronóstico para la enfermedad de Leigh es pobre. Según el defecto, las personas suelen vivir desde unos pocos años hasta mediados de la adolescencia. Las personas diagnosticadas con síndrome de Leigh que no mostraron síntomas hasta la edad adulta tienden a vivir más tiempo. La KSS es lenta y progresiva, y el pronóstico varía según la gravedad. La muerte es común en la tercera o cuarta década y puede deberse a fallos en los órganos. Los enfermos de MELAS por lo general, la edad de muerte es entre los 10 y 35 años, aunque algunos pacientes pueden vivir más tiempo. La muerte puede ser el resultado de una debilidad muscular progresiva o complicaciones de los órganos afectados, como el corazón y riñones. El pronóstico para MERRF varía ampliamente según la edad de inicio, el tipo y la gravedad de síntomas, los órganos implicados y otros factores. Los que tienen el síndrome de Pearson y consiguen sobrevivir generalmente desarrollan KSS.

Hay que tener en cuenta que el ADN mitocondrial sigue diferentes reglas genéticas que lo diferencian de la genética mendeliana y que dictan las consecuencias funcionales de las mutaciones del ADNmt:

En la fecundación, todas las mitocondrias (y todo el ADNmt) del cigoto se derivan del ovocito. Por lo tanto, una madre portadora de una mutación en el ADNmt puede transmitirla a todos sus hijos de ambos sexos, pero solo sus hijas la transmitirán a las siguientes generaciones (DiMauro *et al.*, 2005). La herencia paterna del ADNmt en humanos es un evento extremadamente raro. La digestión del ADNmt paterno en el ooplasma por proteosomas o lisosomas, conlleva a la destrucción completa de la estructura mitocondrial, lo que garantiza la ausencia de la herencia paterna (Panloup *et al.*, 2016). Se ha descrito un único caso de transmisión paterna de una mutación de ADNmt en un paciente con miopatía y no se ha observado en ningún otro caso a pesar de la investigación sistemática llevado a cabo por Saneto y colaboradores (Saneto *et al.*, 2013). Seguramente este fenómeno está vinculado con una mala calidad de los ovocitos.

En presencia de heteroplasmia, la proporción de ADNmt normal y mutado determina la aparición de los síntomas clínicos. Es necesaria una proporción mínima de ADNmt mutado

para que aparezcan defectos bioquímicos y disfunción tisular. Este nivel de umbral varía para cada mutación y difiere entre los tejidos, siendo más bajo en los tejidos altamente dependientes del sistema OXPHOS que en los tejidos que pueden cubrir sus necesidades energéticas mediante glucólisis anaeróbica (Tuppen *et al.*, 2010). En los pacientes que heredan ADNmt patógeno de sus madres, por lo general los niveles no son suficientemente altos como para causar una deficiencia inmediata en la cadena respiratoria. A medida que el individuo envejece, la deriva genética durante la proliferación celular da como resultado una variabilidad en los niveles de ADNmt patógeno entre las células. El umbral para esta degradación bioenergética es bastante alto: la mayoría de mutaciones del ADNmt deben acumularse a más del 60-90% del ADNmt total en la célula antes de que la actividad OXPHOS se vea comprometida (Mishra *et al.*, 2014). Aunque el nivel de umbral puede explicar en parte los genotipos de la enfermedad observados en los pacientes, se debe mencionar que este nivel es bastante arbitrario, y la correlación entre el nivel de síntomas y el nivel de heteroplasmia depende de cada persona (Patrushev *et al.* 2014). Sin embargo, cargas mutantes inferiores al 18% no se consideran causantes sintomáticos en aproximadamente un 95% de los casos (Sallevelt *et al.*, 2017).

Cuando las células se dividen, las mitocondrias se transmiten a las células hijas al azar, fenómeno conocido como segregación mitótica. Si la carga del mutante excede el umbral patogénico para ese tejido, puede ocurrir la expresión clínica de la enfermedad (Tuppen H *et al.*, 2010). Las mutaciones en el ADNmt homoplásmicas en la línea germinal materna, se transmiten a toda la descendencia. Sin embargo, existen factores adicionales que hacen que la expresión del defecto mitocondrial pueda ser diferente entre los portadores de dicha mutación. Por ejemplo, muchos de los pacientes con la enfermedad de LHON tienen mutaciones homoplásmicas en el ADNmt. Aunque todos los descendientes heredan la mutación, aproximadamente el 50% de los hombres y el 10% de las mujeres desarrollan problemas de visión, indicando que existen factores de origen nuclear modulando la expresión fenotípica de estas mutaciones. La transmisión de mutaciones puntuales de ADNmt heteroplásmicas es aún más compleja. Estudios clínicos indican que una madre heteroplásmica puede tener descendencia cuyo contenido de ADNmt mutado varía sustancialmente del suyo. Estas observaciones apoyan la aparición de un cuello de botella genético durante la ovogénesis, por eso la cantidad de ADNmt mutado que se transmite a la descendencia es variable. Debido a que muchas de las características clínicas dependen de las proporciones relativas de ADNmt mutado y ADNmt normal, el resultado de cada embarazo sigue siendo difícil de predecir (Taylor *et al.*, 2007).

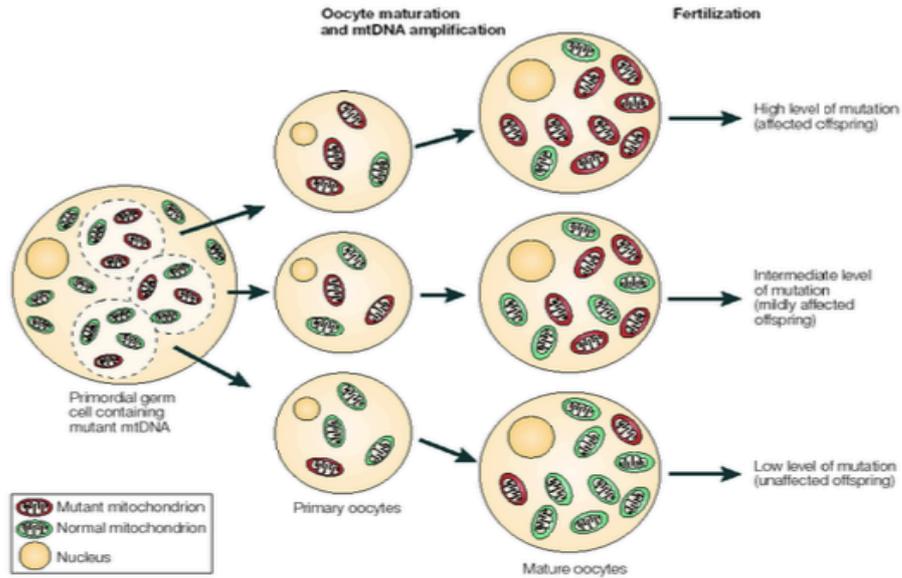


Figura 6. Cuello de botella. Durante la producción de ovocitos primarios, se transfiere una cantidad determinada de moléculas de ADNmt a cada ovocito. La maduración de los ovocitos está asociada con la rápida replicación del ADNmt. Este evento de amplificación, puede conducir a un cambio aleatorio de la carga mutacional de ADNmt entre generaciones y es responsable de los niveles variables de ADNmt mutado. Las mutaciones que contienen ADNmt mutado se muestran en rojo y las que tienen ADNmt normal se muestran en verde (Taylor *et al.*, 2007).

Hay pocos estudios que informan sobre la herencia de mutaciones heteroplásmicas de ADNmt y parece que mutaciones como la m.8363G>A, m.3460G>A y m.8993T>C en general se transmiten al azar a la descendencia, aunque en algunos casos se puede observar un sesgo a favor de la mutación. La transmisión de las mutaciones m.8344A>G, m.3243A>G y m.8993T>G/C, posiblemente no sean completamente aleatorias cuando se comparan los niveles sanguíneos entre la madre y los hijos. El porcentaje de la mutación m.8344A>G es menor en la descendencia. Mientras que para las mutaciones m.3243A>G y m.8993T>G/C más altas de lo esperado. Para la mayoría de mutaciones existe una relación entre la carga de mutación materna y la carga de mutación en la descendencia, por eso se puede hacer una estimación de la probabilidad de padecer la enfermedad. Los portadores de la mutación m.8344A>G tienen el riesgo de que la descendencia se vea afectada si la carga de mutación en sangre es >40%. Este riesgo varía de 12% (carga de la mutación 40-59%) a 78% (carga de la mutación >80%). Para la mutación m.3243A>G este riesgo es de 25% (carga de la mutación <20% en sangre) hasta 57% (carga de la mutación 40-60%). Finalmente para las mutaciones m.8993T>G/C, el riesgo de descendencia afectada aumenta de 0% (carga de la mutación <20%) a >75% (carga de la mutación 61-80%). Las reordenaciones que pueden afectar a la transmisión no se han tenido en consideración

debido a que el riesgo de recurrencia global de las enfermedades causadas por eliminaciones únicas es del 4,11% (Jacobs *et al.*, 2006).

Se piensa que las ROS son más prevalentes en las mitocondrias que en el núcleo porque la mayoría de las ROS celulares son producidas por los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial en forma de anión superóxido (O_2^-). Sin embargo, se requiere una serie de eventos para convertir el superóxido en una potente molécula que puede dañar al ADN. El superóxido en realidad no reacciona con el ADN y no puede atravesar las membranas mitocondriales. Para viajar y dañar el ADNmt, el superóxido se debe convertir en H_2O_2 , con la ayuda de la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 es capaz de salir de las mitocondrias y causar daño a la célula completa. Sin embargo, sigue siendo un agente que no provoca daño en el ADN y normalmente es neutralizado por enzimas antioxidantes. El problema ocurre cuando el H_2O_2 reacciona con metales de transición como el hierro (muchas proteínas mitocondriales poseen grupos hierro-azufre) y se convierte en el ROS más reactivo, el radical hidroxilo (OH^*). El estrés oxidativo se produce cuando se perturba el equilibrio entre los sistemas antioxidantes y la producción de ROS. Un radical hidroxilo es capaz de reaccionar con el ADN causando roturas monocatenarias, sitios abásicos, modificación de las bases (adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U)) y subsiguientes mutaciones puntuales o deleciones (Kauppila *et al.*, 2015). La modificación de guanina más común que resulta de la oxidación es 8-oxo-7,8-dihidroxi-8-oxoG. La timina también sufre lesiones tales como 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina. Otras modificaciones incluyen alquilación y desaminación dentro del ADNmt (Saki *et al.*, 2017).

El envejecimiento se define como una disminución multifactorial en la función fisiológica de un organismo, acompañada con una disminución de la fertilidad y un aumento de riesgo de muerte. Dado el papel esencial para la función fisiológica normal de la célula, la teoría mitocondrial del envejecimiento predice una acumulación progresiva de mutaciones en el ADNmt inducidas por ROS a lo largo de la vida, que conduce a una disminución inevitable de la función mitocondrial (Greaves *et al.*, 2006).

La diabetes y la obesidad son dos de las causas principales de la disfunción mitocondrial que tienen implicaciones significativas para la calidad de los ovocitos. La obesidad está directamente asociada con la resistencia a la insulina y la hiperglucemia. La sobrecarga de glucosa intracelular aumenta la vía glucolítica y el ciclo del ácido tricarboxílico, lo que lleva a la producción excesiva de NADH y $FADH_2$ causando un aumento de electrones en los complejos de la cadena respiratoria, lo que conduce a la producción del anión superóxido (Manna *et al.*, 2015).

Además, las mutaciones pueden aparecer por errores de lectura durante la replicación del ADNmt, debido al gran número de copias del ADNmt por célula. Por lo tanto, cada base se replica con más frecuencia que las nucleares, lo que aumenta la probabilidad de que se produzca un error (Kauppila *et al.*, 2015).

Estudios han correlacionado un incremento de estrés oxidativo con una defensa de antioxidantes y/o una maquinaria de reparación del ADNmt menos eficiente. El deterioro del ADNmt pertenece a un ciclo destructivo en el que la disfunción mitocondrial aumenta aún más la carga oxidativa, lo que conlleva a la pérdida de funciones celulares y finalmente la apoptosis y necrosis (Mikhed *et al.*, 2015). Las enfermedades mitocondriales debidas a la fosforilación oxidativa defectuosa son los errores congénitos más comunes del metabolismo, entre el 15% y el 25% de los casos causados por mutaciones en el ADNmt patógeno (Sallevelt *et al.*, 2017). Se sabe que muchas de las enfermedades mitocondriales también están causadas por el ADNn, por lo que estas terapias de reemplazo mitocondrial sólo servirán para los trastornos primarios que están causados exclusivamente por mutaciones en el ADNmt. Entonces, ¿Qué enfermedades mitocondriales graves se podrían prevenir?

Las mutaciones mitocondriales pueden causar errores de codificación en los 13 polipéptidos implicados en la generación de ATP a través de la cadena transportadora de electrones y en las 22 moléculas de ARNt codificadas por el genoma mitocondrial Saki *et al.*, 2017). En raras ocasiones las mutaciones patológicas ocurren en genes rRNA. Estas mutaciones se pueden clasificar en tres tipos: mutaciones puntuales en genes que codifican proteínas, mutaciones puntuales en genes implicados en la síntesis de proteínas (genes tRNA o rRNA) y reordenamientos de ADNmt, incluidas deleciones e inserciones de ADN mitocondrial.

La mayoría de las mutaciones causantes de enfermedad son mutaciones puntuales heteroplásmicas que se presentan con una amplia variedad de manifestaciones clínicas y que se suelen heredar por vía materna. Las mutaciones homoplásmicas a menudo se manifiestan solo en tejidos aislados con penetrancia incompleta (Tuppen *et al.*, 2010).

A menudo no es posible decir de manera inmediata en que hebra ha surgido la mutación. Para no implicar la base causal de la mutación, es común referirse al par de bases limitando el perfil mutacional a dos tipos de mutaciones de transición (C:G que mutan a T:A, o T:A a C:G) y cuatro clases de transversión (C:G a A:T, C:G a G:C, T:A a A:T y T:A a G:C). La mutación más común en el ADNmt (C:G a T:A) puede surgir por diversos mecanismos. La desaminación hidrolítica de cisteína es bastante frecuente en la célula, y el uracilo resultante se usa como plantilla para una adición de A en la cadena opuesta. También puede ocurrir por la desaminación oxidativa de la cisteína, para crear 5-hidroxiuracilo, que también sirve

como plantilla para añadir una A. Sin embargo, el mismo perfil mutacional también puede ocurrir debido a errores en la replicación. Un estudio de errores de pol y durante la replicación in vitro mostró que más del 84% de las mutaciones observadas eran transiciones (C:G a T:A) (Kauppila *et al.*, 2015).

La mayoría de mutaciones de reordenación en el ADNmt son deleciones a gran escala, que varían en tamaño de 1,3 a 8 kb y abarcan varios genes. En comparación con las mutaciones puntuales de ADNmt, las deleciones únicas de ADNmt a gran escala generalmente aparecen por mutaciones *de novo*. Si una deleción en el ADNmt aparece esporádicamente durante el desarrollo embrionario, la probabilidad de transmitirla a la siguiente generación es extremadamente baja, excepto en los casos de mosaicismo en los ovocitos de la línea germinal. Es improbable que una madre clínicamente no afectada tenga más de un hijo afectado. Igualmente, en una madre afectada el riesgo de tener un hijo clínicamente afectado es extremadamente bajo (1 de 24). Las deleciones de ADNmt únicas a gran escala (como por ejemplo la deleción común: m.8470_13447del4977) tienen un amplio espectro fenotípico que va desde la oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO) aislada hasta el síndrome de Kearns-Sayre más grave (KSS) o el síndrome de Pearson (PS) (Poulton *et al.*, 2017).

La ocurrencia de deleciones múltiples en el ADNmt de longitudes variables de tejidos afectados puede deberse a mutaciones heredadas de genes nucleares, cuyos productos están implicados en el mantenimiento y la replicación de ADNmt. Las deleciones múltiples de ADNmt tienen un tipo de herencia autosómica dominante o recesiva. A pesar de los diferentes orígenes, la mayoría de las eliminaciones de ADNmt comparten características comunes, se producen principalmente entre los orígenes de replicación O_H y O_L. También se cree que el mecanismo de generación es idéntico, independiendo del fenotipo clínico, aunque el método exacto mediante el cual se forman las deleciones se encuentra actualmente en debate. Mientras que la mayoría de investigadores consideran que la replicación es el mecanismo más probable a la hora de formarse una deleción (Tuppen *et al.*, 2010).

Inserciones, duplicaciones y triplicaciones apenas se han registrado como mutaciones causantes de enfermedad mitocondrial heredada por la madre. La secuenciación de un caso particular de un paciente con diabetes y sordera heredada por la madre, y deficiencia del complejo I en fibroblastos, reveló una inserción heteroplasmática de uno o dos residuos de citosina en la región codificante del gen MT-ND6 (m.14535_14536insC o CC), lo que conduce a un codón de parada prematuro. En "Mitomap" se han identificado dos inserciones, una que produce sordera y otra encefalomiopatía (Tabla 3). Se detectó una triplicación de 9 pb en el gen MT-CYTB en un paciente africano con miopatía mitocondrial.

También se detectó un paciente con miopatía que presentaba una duplicación de 15 pb en el gen tRNA^{Pro} (Poulton *et al.*, 2017).

Síndrome	Locus	Mutación	Gen afectado	Ho/He
Cardiomiopatía	MTL1	m.3303C>T	tRNA Leu (UUR)	+/+
	MTTI	m.4300A>G	tRNA Ile	+/+
	MTTI	m.4295A>G	tRNA Ile	-/+
	MTTH	m.12192G>A	tRNA His	+/-
Sordera/ Pérdida auditiva neurosensorial	MTRNR1	m.1494C>T	12S rRNA	+/-
	MTRNR1	m.1555A>G	12S rRNA	+/-
	MTTS1	m.7445A>G	tRNA Ser (UCN)	+/+
	MTTS1	m.7510T>C	tRNA Ser (UCN)	-/+
Diabetes Mellitus	MTTS1	m.7511T>C	tRNA Ser (UCN)	+/+
	MTTL1	m.3264T>C	tRNA Leu (UUR)	-/+
	MTTL1	m.3271T>C	tRNA Leu (UUR)	-/+
Encefalomiopatía	MTTI	m.4291T>C	tRNA Ile	+/-
	MTTL1	m.3287C>A	tRNA Leu (UUR)	-/+
	MTTI	m.4290T>C	tRNA Ile	+/+
	MTTK	m.8332A>G	tRNA Lys	+/-
Síndrome de Leigh	MTTS1	C7472insC C7471CC	tRNA Ser (UCN)	+/+
	MTTW	A5537insT	tRNA Trp	-/+
	MTTV	m.1624C>T	tRNA Val	+/-
	MTTV	m.1644G>T	tRNA Val	-/+
MERRF	MTATP6	m.9176T>C	A6	+/+
	MTTK	m.8361G>A	tRNA Lys	-/+
	MTTK	m.8344A>G	tRNA Lys	-/+
	MTTK	m.8356T>C	tRNA Lys	-/+
MELAS	MTTK	m.8363G>A	tRNA Lys	-/+
	MT-TV	m.1644G>A	tRNA Val	-/+
	MTTL1	m.3271T>C	tRNA Leu (UUR)	-/+
Miopatía mitocondrial	MTTL1	m.3251A>G	tRNA Leu (UUR)	-/+
	MTTL1	m.3254C>G	tRNA Leu (UUR)	-/+
	MTTL1	m.3288A>G	tRNA Leu (UUR)	-/+
	MTTW	m.5543T>C	tRNA Trp	-/+
LHON	MTND1	m.3460 G>A m.3700 G>A m.3733 G>A m.4171 C>A m.3376 G>A m.3635 G>A m.3697 G>A	ND1	+/+
	MTND4	m.11778 G>A m.10663 T>C	ND4	
	MTND5	m.13051 G>A	ND5	
	MTND6	m.14484 T>C m.14482C>G/A m.14495 A>G m.14502 T>C m.14568 C>T	ND6	
Miopatía mitocondrial/ miocardiopatía/ MELAS	MTTL1	m.3260A>G	tRNA Leu (UUR)	-/+
Sordera, Miopatía	MTTC	m.5783G>A	tRNA Cys	-/+
Sordera; disfunción cerebral	MTTS1	7472insC	tRNA Ser (UCN)	-/+
Sordera, Retinitis pigmentosa		m.12183G>A	tRNA His	-/+
Sordera, Retraso mental, Disfunción cerebral, Ataxia	MTTE	m.14709T>C	tRNA Glu	-/+
DM/ DMD/ MIDD/SNHL/ FSGS/ Disfunción cardíaca+ multiorgánica/	MTTL1	m.3243A>G	tRNA Leu (UUR)	-/+

MELAS, Encefalomiopatía, CPEO				
AMDF	MTTV	m.1606G>A	tRNA Val	-/+
Enfermedad multisistémica, presentación familiar variada	MTTI	m.4284G>A	tRNA Ile	-/+
Encefalomiopatía, GER/ SIDS	MTTG	m.10044A>G	tRNA Gly	-/+
Miopatía y cardiomiopatía	MTTL1	m.3303C>T	tRNA Leu (UUR)	+/+
Citopatía Miocítica Mitocondrial/ FSGS	MTTY	m.5843A>G	tRNA Tyr	+/-
Síndrome de Leigh, debilidad muscular neurogénica, NARP	MTATP6	m.8993T>C/G	A6	-/+
Síndrome de Leigh, LHON	MTND3	m.10191T>C	ND3	+/+
Síndrome de Leigh, LHON	NTND6	m.14459G>A	ND6	+/+

Tabla 4. Enfermedades mitocondriales primarias que afectan a la línea germinal. Fuente Mitomap. MERF= epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas. MELAS= encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular. LHON= Neuropatía óptica hereditaria de Leber. DM= Diabetes Mellitus. DMDF= Diabetes Mellitus y sordera. MIDD= Herencia materna Diabetes y sordera. SNHL= pérdida auditiva neurosensorial. FSGS= Glomeruloesclerosis focal y segmentaria. AMDF= ataxia, miopatía y sordera. GER= reflujo gastrointestinal. SIDS= Síndrome de muerte súbita infantil. CPEO= Oftalmoplejía externa progresiva. NARP= Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa. Fuente " Mitomap".

El 90% de los casos que presentan síndrome de LHON en todo el mundo presenta las mutaciones m.3460 G>A, m.11778 G>A y m.14484 T>C. La mutación más común (80%) del síndrome de MELAS es una transición de A-G en la posición del nucleótido 3243. En el síndrome de MERRF la mutación más comúnmente observada es una transición de A-C en la posición de nucleótido 8344 dentro del gen tRNA-Lys. Se observaron mutaciones adicionales en MERRF, más notablemente en la posición 3243 que se observa principalmente en MELAS. Curiosamente, también se ha descrito el síndrome de superposición MERRF/PEO asociado a la mutación 3243. NARP se asocia con una mutación puntual en el gen ATPasa 6 en la posición 8993 del nucleótido. La mutación NARP produce un fenotipo clínicamente diferente (encefalopatía de Leigh) cuando la proporción de ADN mutado es muy alta (90-95%). La MIDD puede ser causada por una mutación en los genes de ARN de transferencia de mtDNA (tRNA), la más común es la mutación m.3243 A>G comúnmente asociada con MELAS. Los fenotipos MIDD y MELAS se ven típicamente dentro de la misma familia (Graeber *et al.*, 1998).

Conclusión

El estudio bibliográfico de las enfermedades mitocondriales y de sus tratamientos farmacológicos ha revelado que estos carecen de terapias clínicamente eficaces que pueden revertir la situación patológica. Las nuevas terapias de reemplazo mitocondrial permiten una corrección genética de ciertas enfermedades mitocondriales y así evitan la transmisión de estas enfermedades a la siguiente generación. Sin embargo, solo se pueden tratar aquellos enfermedades que tienen su origen en el ADN mitocondrial y hay otras complicaciones, debido a que ninguno de los tres métodos actuales puede eliminar por completo un cierto arrastre de ADN mitocondrial mutado. En consecuencia se necesitan más estudios para verificar que los niños que nacen mediante estas técnicas serán fenotípicamente sanos durante toda su vida y que no transmitirán la enfermedad a su propia descendencia.

Bibliografía

1. **Bianco B, Montagna E.** 2016. The advances and new technologies for the study of mitochondrial diseases. *Einstein* **14**: 291-3.
2. **DiMauro S, Davidzon G.** 2005. Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine* **37**: 222-232.
3. **Felczak P, Lewndowska E, Stepniak I, Oldak M, Pollak A, Lechowicz U, Pasennik E, Stepien T, Wierzba-Bobrowicz T.** 2017. Pathology of mitochondrial in MELAS síndrome: an ultrastructural study. *Pol J Pathol* **68**: 173-181.
4. **Francis P, Hudson G.** 2013. Mitochondrial genetics. *British medical Bulletin* **106**: 125-159.
5. **Gómez L, Hernández J, Aznar J.** 2017. Mitochondrial Modification Techniques and Ethical Issues. *J Clin Med.* **6**: 25.
6. **Graeber M, Müller U.** 1998. Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *Journal of Neurological Sciences* **153**: 251-263.
7. **Greaves L, Taylor R.** 2006. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. *IUBMB Life* **3**: 143-151.
8. **Greenfield A, Braude P, Flinter F, Lovell-Badge R, Ogilvie C, Perry A.** Assisted reproductive technologies to prevent human mitochondrial disease transmission. 2017. *Nature Biotechnology* **35**: 11.
9. **Greggains G, Lister L, Tuppen H, Zhang Q, Needham L, Prathalingam N, Hyslop L, Craven L, Polanski Z, Murdoch A, Turnbull D, Herbert M.** 2014. Therapeutic potential of somatic cell nuclear transfer for degenerative disease caused by mitochondrial DNA mutations. *Scientific reports* **4**: 3844.
10. **Jacobs L, Wert G, Geraeds J, Coo I, Smeets H.** 2006. The transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this. *Human Reproduction Update* **12**: 199-136.
11. **Karaa A, Kriger J, Grier J, Holbert A, Thompson J, Patikh S, Hirano M.** 2017. Mitochondrial Disease Patients' Perception of Dietary Supplements' Use. *Mol Genet Metab* **119**: 100-108.
12. **Kauppila J, Stewart J.** 2015. Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. *Biochimica et Biophysica*: 1354-1361.
13. **Manna P, Jain S.** 2015. Obesity, Oxidate Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* **13**: 423-444.
14. *Medicina de Familia. Andalucía. Volumen 13, nº 3, 2012. ISSN: 1576-4524.*
15. **Mikhed Y, Daiber A, Steven S.** 2015. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci* **16**: 15918-15953.
16. **Mishra P, Chan D.** 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell división, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 634-646.
17. **Mitalipov S, Wolf D.** 2014. Clinical and Ethical Implications of Mitocohndrial Gene Transfer. *Trends Endocrinol Metab.* **25**: 5-7.
18. **Palacios C, Medina M.** 2017. Mitochondrial replacement techniques and Mexico's rule of law: on the legality of the first maternal spindle transfer case. *J Law Biosci* **4**: 50-69.

19. **Palacios-González C.** 2016. Mitochondrial replacement techniques: egg donation, genealogy and eugenics. *Monash Bioeth. Rev.* **34**: 37-51.
20. **Parr R, Martin L.** 2012. Mitochondrial and nuclear genomics and the emergence of personalized medicine. *Human Genomics* **6**.
21. **Patrushev M, Kamenski P, Mazunin I.** 2014. Mutations in Mitochondrial DNA and Approaches for Their Correction. *Biochemistry (Moscow)* **79**: 1151-1160.
22. **Poulton J, Finsterer J, Yu-Wai-Man P.** 2017. Genetic Counselling for Maternally Inherited Mitochondrial Disorders. *Mol Diagn Ther* **21**: 419-429.
23. **Saki M, Prakash A.** 2017. DNA Damage Related Crosstalk Between the Nucleus and Mitochondria. *Free Radic Med* **107**: 216-227.
24. **Sallevelt S, Die-Smulders C, Hendrickx A, Hellebrekers D, Coo I, Alston C, Knowles C, Taylor R, McFarland R, Smeets H.** 2017. De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk. *J Med Genet* **54**: 114-124.
25. **Saneto R, Sedensky M.** 2013. Mitochondrial Disease in Childhood: mtDNA Encoded. *Neurotherapeutics* **10**: 199-211.
26. **Schatten H, sun Q-Y, Prather R.** 2014. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reproductives Biology and Endocrinology* **12**: 111.
27. **Schon E, DiMauro S, Hirano M.** 2012. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* **13**: 878-890.
28. **Subramaniam S, Chesselet M.** 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **0**: 17-32.
29. **Taylor R, Turnbull D.** 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* **6**: 389-402.
30. **Tuppen H, Blakely E, Turnbull B, Taylor R.** 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**: 113-128.
31. United Mitochondrial Disease Foundation (UMDF): <http://www.umdf.org>.
32. **Wang T, Sha H, Ji D, Zhang H, Chan D, Cao Y, Zhu J.** Polar body Genome Transfer for Preventing the Transmission of Inherited Mitochondrial Diseases. *Cell* **7**: 1591-1604.
33. **Wang Y-X, Le W-D.** 2015. Progress in Diagnosing Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes. *Chinese Medical Journal.* **128**.
34. **Wei Y, Zhang T, Wang Y, Schatten H, Sun Q.** 2015. Polar bodies in Assisted Reproductive Technology: Current Progress and Future Perspectives. *Biology of Reproduction* **92**: 1-8.
35. **Wolf D, Mitalpov N, Mitalpov S.** 2015. Mitochondrial Replacement Therapy in Reproductive Medicine. *Trends Mol med* **21**: 68-76.
36. **Wrigley A, Wilkinson S, Appleby J.** 2015. Mitochondrial Replacement: ethics and identity. *Bioethics* **29**: 1467-8519.