

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

***SORDERAS NEUROSENSORIALES POR MUTACIONES
MITOCONDRIALES MÁS FRECUENTES
(Población de sordos de Córdoba – Argentina)***

**Trabajo de Tesis para optar al
Título de Doctor en Medicina y Cirugía**

MARÍA ROSA CHAIG

CÓRDOBA

REPÚBLICA ARGENTINA

2008

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

DIRECTORA:

Prof. Dra. Nelia M. Gerez de Burgos

INTEGRANTES:

Prof. Dr. José Moreno Barral

Prof. Dr. Fernando Romero Moroni

Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS

DEDICO EL PRESENTE TRABAJO:

A mis padres, Ada y Elías que desde donde están junto a Dios, me acompañan.

A quien fue mi Guía Espiritual, Padre Lucas, que desde donde está junto a Dios, me acompaña.

A mi hermano Roberto, por su abnegado compañerismo.

AGRADECIMIENTOS

.- A la Prof. Dra. Nelia M. Gerez de Burgos por su inestimable trabajo, dedicación y colaboración en los estudios realizados.

.- A los Profesores:

Dr. José Moreno Barral

Dr. Fernando Romero Moroni

Por haber aceptado ser integrantes del Tribunal de Tesis.

.- Al Prof. Dr. Mario E. Zernotti, por haber colaborado con sus pacientes para este, Trabajo de Tesis.

.- Al Dr. Fernando Romero Orellano, por haber colaborado con sus pacientes para este, Trabajo de Tesis.

.- Al Instituto del Lenguaje y la Audición Córdoba (ILAC), (Docentes, No Docentes, Padres y Alumnos), por su generosa colaboración, para realizar este estudio.

.- Al Instituto Gregorio Meincke (Ciudad de La Falda), (Docentes, No Docentes, Padres y Alumnos), por su generosa colaboración, para realizar este estudio.

.- A la Prof. Dra. Gladys Martellotto, por sus aportes en los estudios de Microscopía Óptica.

.- A las Dras. Susana Gamron y Graciela Barberis por su colaboración en los temas referidos a Reumatología.

- .- A la Dra. Cristina Maldonado por sus aportes en los estudios de Microscopía Electrónica.
- .- Al Prof. Dr. Pablo Sonzini y el Servicio de Cirugía del Hospital Nacional de Clínicas, por las extracciones de biopsias de músculo.
- .- Al Dr. Nestor W. Soria, por la valiosa ayuda brindada.-
- .- A la Dra. Carlota Carriazo por su colaboración.
- .- Al Ministerio de Solidaridad. Dirección de Discapacidad. Gobierno de la Provincia de Córdoba. (Año 2000 – 2008), por el subsidio otorgado para la realización de este Trabajo.
- .- A la SeCyT – UNC, por haberme otorgado la Beca de Formación Superior para el Proyecto, Trabajo de Tesis. (años 2004 – 2006).
- .- A la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. FCM – UNC, por haberme permitido utilizar sus instalaciones e infraestructura, para realizar los estudios de este Proyecto, Trabajo de Tesis.
- .- A mis maestros en la vida: mis Padres, mi hermano Roberto, Padre Lucas y la Dra. Nelía M Gerez de Burgos.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	pág. 1
HIPÓTESIS.....	pág.29
OBJETIVOS GENERALES.....	pág.29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	pág.29
MATERIAL.....	pág.30
CRITERIOS DE INCLUSION.....	pág.31
CRITERIOS DE EXCLUSION.....	pág.31
MÉTODOS.....	pág.31
RESULTADOS.....	pág.43
DISCUSION - CONCLUSION.....	pág.74
BIBLIOGRAFÍA.....	pág.97

RESUMEN

En los recientes años, se han reportado un número importante de desórdenes clínicos, asociados con mutaciones en el ADN mitocondrial. Se ha establecido que en la mayoría de los síndromes, heredados por la línea materna, las mutaciones puntuales en el ADNmt, serían responsables de producir síndromes como: Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), Ataxia neurogénica y retinitis pigmentaria (NARP), Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF), Miopatía y cardiopatía heredada maternalmente (MMC), Encefalomiopatía, acidosis láctica y ataques recurrentes cerebrales (MELAS). Estos desórdenes, que tienen una particular expresión clínica, afectan también, la función coclear. Dentro de las alteraciones en el ADNmt, las mutaciones que se producen especialmente en los genes ARNr 12S y ARNt^{ser (UNC)}, son considerados como las causas más importantes de pérdida de la audición y ototoxicidad. Pero, en muchos casos estas mutaciones por sí solas, no son causa suficiente para producir el cuadro clínico. Es necesaria, ya sea la presencia de mutaciones en genes modificadores o asociados en el ADNn, o de factores ambientales como los antibióticos aminoglucósidos (ATB-AG). También podrían influir los diferentes haplotipos y polimorfismos del ADNmt.

En esta Tesis se presentan:

1.- Los resultados obtenidos, al investigar en una población de 116 pacientes que presentan sordera neurosensorial, bilateral de severa a profunda (>61db), de los cuales 40 (34,8%), habían recibido tratamiento con antibióticos aminoglucósidos (sordera neurosensorial ototóxica), y de 180 controles, la presencia de mutaciones mitocondriales, en los genes: ARNr 12S, mutaciones: A1555G, A827G

ARNt^{ser(UCN)}, mutaciones: A7443G, G7444A, A7445G

ARNt^{leu(UUR)}, mutación: A3243G

2.- La caracterización clínica, molecular, bioquímica y morfológica en una paciente de Córdoba – Argentina, con pérdida de la audición de severa a profunda, inducida por aminoglucósidos, y que presenta la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} en el ADNmt. El cuadro clínico que se observa por la línea materna, y los estudios moleculares, bioquímicos y morfológicos, podrían indicar que esta, es una nueva presentación de sordera neurosensorial síndrómica y ototóxica, de la mutación G7444A.

3.- Se Informa además la caracterización, clínica, genética y molecular de una familia Argentina, con pérdida de la audición inducida por ATB-AG, en dos de sus miembros. La evaluación clínica, reveló el fenotipo variable de sordera neurosensorial, demostrado por los estudios audiométricos en estas pacientes. El análisis mutacional del ADNmt, en el árbol genealógico de esta familia, demostró la presencia de una mutación con presentación homoplásmica, la A827G, en el gen ARNr 12S, la cual ha sido asociada a pérdida de la audición y ototoxicidad. La mutación A827G está localizada en el sitio A, altamente específico, de la sub-unidad pequeña ribosomal, y es además, muy conservada en numerosas especies. Es posible que la alteración de la estructura terciaria y/o cuaternaria de este ARNr 12S, provocada por la mutación A827G, pueda llevar a disfunción mitocondrial y que juegue un rol en la producción de

sordera y sensibilidad a los ATB-AG. Sin embargo, la incompleta penetrancia de la pérdida de la audición, reflejada en esta familia por la línea materna, indicaría que la mutación por sí sola, no es suficiente para producir el cuadro clínico. Es necesario, en este caso, la presencia de otros factores como mutaciones en genes modificadores y/o asociados en el ADNn, factores del medio ambiente (ATB-AG), haplotipos y/o polimorfismos en el ADNmt.

ABSTRACT

An increasing number of disorders associated with mutations in the mitochondrial genome have been reported in recent years. It has been established that a collection of specific mtDNA point mutations are responsible for most of the maternally-inherited syndromes, including Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON), Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa (NARP), Mioclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres (MERRF), Maternally Inherited Miopathy and Cardiomyopathy (MMC), Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes (MELAS). These disorders, which have a particular clinical expression, affect moreover the cochlear function. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA), especially in the 12S rRNA and tRNA^{ser (UCN)} genes, are considered as the most important causes of both aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. This shows that, the mtDNA mutation(s) itself is not enough to produce the clinical phenotype; it is also necessary either the presence of the other modifier genes

mutaciones nDNA, ambientales factores (ATB-AG) and mitochondrial haplotypes. In this Thesis to be present:

1.- The results of the investigation in a population of 116 patients, with sensorineural deafness, bilateral, >61db. In this population, 40 (34,8%) had received aminoglycoside antibiotics (their hearing loss were considerable ototoxic), and in 180 controls, the presence of mitochondrial mutations in the genes: rRNA 12S, mutations: A1555G, A827G

tRNA^{ser(UCN)} mutations: A7443G, G7444A, A7445G

tRNA^{leu(UUR)} mutation: A3243G

2.- The clinical, molecular and genetic characterization of two patients with aminoglycoside-induced hearing loss, who had the G7444A mutation. The matrilineal pedigree clinical feature, and biochemical and morphological studies, might indicate that this is a novel syndromic and ototoxic presentation of the G7444A mutation in Córdoba – Argentina.

3.- Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) have been found to be associated with sensorineural hearing loss. To be show, the clinical, genetic, and molecular characterization of one Argentinean family, with aminoglycoside-induced impairment in two of their members. Clinical evaluation revealed the variable phenotype of hearing impairment including audiometric configuration in these subjects. Mutational analysis of the mtDNA in these pedigrees showed the presence of homoplasmic 12S rRNA A827G mutation, which has been associated with hearing impairment. The A827G mutation is located at the A-site of the mitochondrial 12S rRNA gene which is highly conserved in mammals.

It is possible that the alteration of the tertiary or quaternary structure of this rRNA by the A827G mutation may lead to mitochondrial dysfunction, thereby playing a role in the pathogenesis of hearing loss and aminoglycoside hypersensitivity. However, incomplete penetrance of hearing impairment indicates that the A827G mutation itself is not sufficient to produce clinical phenotype. It is also necessary the presence of other modifier genes mutations nDNA, enviromental factors (ATB-AG) and mitochondrial haplotypes.

Keywords: Hearing loss; Mitochondrial tRNA^{ser} (UCN); G7444A Mutation; Mitochondrial rRNA 12S A827G Mutation; Aminoglycosides; TRMU.

ANEXO

ABREVIATURAS

“WT”	= “Wild Type” (segmento amplificado de ADN e identificado como normal)
A	= Asma bronquial
AA	= Alopecia Areata
AD	= Autosómica Dominante
ADNmt	= ADN mitocondrial
ADNn	= ADN nuclear
ADP	= Adenosin di fosfato
AIF	= Factores que inducen apoptosis
ANT	= Traslocador de nucleótidos de adenina
AR	= Autosómica Recesiva
ARNm	= Ácido ribonucleico mensajero
ARNpol	= ARN polimerasa
ARNr	= Ácido ribonucleico ribosomal
ARNr 12S	= Subunidad pequeñas del ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	= Ácido ribonucleico de transferencia
ATB	= Antibióticos
ATB-AG	= Antibióticos aminoglucósidos
ATP	= Adenosin tri fosfato
ATPasa	= Adenosin tri fosfato sintasa
C	= Cardiopatías

Ca²⁺	= Calcio iónico
COI	= (subunidad) Citocromo oxidasa I
COII	= (subunidad) Citocromo oxidasa II
COIII	= (subunidad) Citocromo oxidasa III
COL 11 A2	= Gen del colágeno
CoQ	= Coenzima Q
CPT	= Carnitina palmitoil transferasa
CS	= Citrato Sintasa
CTE	= Cadena de transporte de electrones
Cx 26	= Conexina 26
Cyt c	= Citocromo c
DFN	= Sordera neurosensorial ligada al cromosoma X
DFNA	= Sordera neurosensorial autosómica dominante
DFNB	= Sordera neurosensorial autosómica recesiva
D-loop	= Región no codificante en el ADN mitocondrial
EMLM	= Enfermedades mitocondriales por la línea materna
ERO	= Especies reactivas de oxígeno
FRDE	= Factores de riesgo durante el embarazo
GJB2	= Gen de la conexina 26
H	= Cadena pesada en el ADNmt
H/E	= Hematoxilina/Eosina
L	= Cadena liviana en el ADNmt
LHON	= Neuropatía óptica hereditaria de Leber
M	= Miopatías
MDM	= Diabetes Mellitus Mitocondrial

ME	= Membrana externa de la mitocondria
MELAS	= Síndrome de acidosis láctica, encefalopatía y accidentes cerebrovasculares
MERFF	= Encefalopatía mitocondrial con fibras rojas rasgadas
MI	= Membrana interna
MILS	= Síndrome de Leigh de herencia materna
mtPTP	= canal transitorio no específico en la membrana interna mitocondrial
mtTFA o TFAM	= Factor de transcripción mitocondrial
MYH 9	= Gen de miosinas no convencionales
MYO 15	= Gen de miosinas no convencionales
MYO 7A	= Gen de miosinas no convencionales
NAD	= Nicotin-adenin-dinucleótido
NADH	= Nicotin adenin dinucleótido deshidrogenasa
NARP	= Síndrome de neuropatía periférica, ataxia y retinitis pigmentaria
NS	= No Sindrómica
O_H	= Origen de la replicación en la cadena pesada
O_L	= Origen de la replicación en la cadena liviana
OXPHOS	= Cadena de fosforilación oxidativa
PCR	= Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	= Reacción en cadena de la polimerasa y reconocimiento del sitio con enzima de restricción
PDH	= Piruvato deshidrogenasa
P_{H1}	= Promotor en la cadena pesada de la transcripción
P_{H2}	= Promotor en la cadena pesada de la transcripción

P_L	= Promotor en la cadena liviana de la transcripción
POLG	= ADN polimerasa gamma
POU4F3	= Gen de la familia de factores de transcripción POU
PRN	= Peso recién nacido
RNasa MRP	= Endonucleasa procesadora del ARN mitocondrial
S	= Síndromica
SDH	= Succinato deshidrogenasa
SLM	= Sordera neurosensorial por la línea materna
SN	= Sordera Neurosensorial
SNC	= Sistema nervioso central
SSBmt	= Proteína de unión al ADN de hebra única
T	= Tiroideopatías
TERFm	= Factor de terminación de la transcripción
TFAmt Y TFBmt	= Factores de iniciación de la transcripción
TFMB1 y 2	= Factores de transcripción
TRMU	= Gen nuclear, modificador de la región anticodon en el ácido ribonucleico de transferencia mitocondrial

El Proyecto para el trabajo de Tesis Doctoral, ha sido aprobado por el Comité de Bioética del Ministerio de Salud, Gobierno de la Provincia de Córdoba, Resolución N° 296; por el Comité de Bioética de la FCM – UNC; y está acreditado por la SeCyT - UNC resolución N° 2264 (año 2006 / 2007).

“Certifico que el presente trabajo de tesis de la Médica María Rosa Chaig, fue realizado en la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular; Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba”

Córdoba, Diciembre de 2008

Prof. Dra. Nelia M. Gerez de Burgos

“Certifico que en el presente trabajo de tesis de la Médica María Rosa Chaig, los estudios de microscopía óptica fueron realizados en la 1ª Cátedra de Patología, Hospital Nacional de Clínicas. Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba”

Córdoba, Octubre de 2008

Prof. Dra. Gladys Martellotto

“Certifico que en el presente trabajo de tesis de la Médica María Rosa Chaig, los estudios de microscopía electrónica fueron realizados en la Cátedra de Microscopía Electrónica; Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba”

Córdoba, Octubre de 2008

Prof. Dra. Cristina Maldonado

A mutation in mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinian family with hearing loss after aminoglycoside treatment

M.R. Chaig^{a,*}, M.E. Zernotti^{b,d}, N.W. Soria^a, O.F. Romero^c, M.F. Romero^c, N.M. Gerez^a

^a Cátedra de Biología molecular, FCM-UNC, Haya de la Torre, SIN Ciudad Universitaria, 2do. Piso, Pabellón CP 5016, Argentina

^b Cátedra de Otorrinolaringología Hospital de Clínicas (FCM-UNC), Argentina

^c Hospital de Niños de la Provincia de Córdoba, Argentina

^d Servicio de Otorrinolaringología Sanatorio Allende, Argentina

Received 21 January 2008

Available online 7 February 2008

www.elsevier.com/locate/ybbrc

BBRC

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications 368 (2008) 631–636



Abstract

Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) have been found to be associated with sensorineural hearing loss. We report the clinical, genetic, and molecular characterization of one Argentinian family with aminoglycoside-induced impairment in two of their members. Clinical evaluation revealed the variable phenotype of hearing impairment including audiometric configuration in these subjects. Mutational analysis of the mtDNA in these pedigrees showed the presence of homoplasmic 12S rRNA A827G mutation, which has been associated with hearing impairment. The A827G mutation is located at the A-site of the mitochondrial 12S rRNA gene which is highly conserved in mammals. It is possible that the alteration of the tertiary or quaternary structure of this rRNA by the A827G mutation may lead to mitochondrial dysfunction, thereby playing a role in the pathogenesis of hearing loss and aminoglycoside hypersensitivity. However, incomplete penetrance of hearing impairment indicates that the A827G mutation itself is not sufficient to produce clinical phenotype. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Hearing loss; Mitochondrial 12S rRNA; A827G mutation; Aminoglycosides; TRMU

Hearing loss is a common sensory disorder affecting 1 in 1000 newborns and showing a genetic origin or predisposition in at least 50% of the cases. When genetically determined, the inheritance pattern of hearing impairment can be autosomal dominant or recessive, X-linked, and mitochondrial [1]. A number of distinct mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) have been found to be associated with both syndromic and non-syndromic forms of hearing impairment [2]. A particular mitochondrial mutation, an A to G transition at position 1555 in 12S rRNA gene was associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic deafness in many families from different ethnic backgrounds [3–7]. To understand the pathogenesis of maternally inherited aminoglycoside-induced hearing loss, a systematic and extended mutational analysis of mitochondrial DNA has been initiated at our laboratory. In the present study, we

In the absence of aminoglycosides, the A1555G mutation was responsible for a clinical phenotype that ranges from severe congenital deafness to moderate progressive hearing loss with later onset [6], to completely normal hearing [4,6]. Non-syndromic maternally inherited deafness was also associated with the mitochondrial rRNAs_{er} (UCN) gene, as more than three mutations were identified in this gene: A7445G [8], T7510C [9,10], and T7511C [11–14]. Recently, a Chinese family with non-syndromic hearing loss revealed a possible maternal inheritance pattern. Molecular analysis identified the mutation responsible for the hearing impairment, a homoplasmic mtDNA 12S rRNA A827G mutation in all maternally related family members [15].

report the clinical, molecular, and genetic characterization of one Argentinean family with aminoglycoside-induced hearing loss.

In this study, we analyzed the 12S rRNA and tRNA^{Ser} genes in two -aminoglycoside treated sisters who developed hearing loss. The A1555G, A7445G, T7510C, and T7511C mutations were not found in these patients. Interestingly, the A1555G was not found in a large study done in Argentina [16]. For this reason we proceed to perform PCR-amplification of fragments spanning entire mitochondrial genome for one of these sisters. One mutation, A827G, was detected in this patient and later in their matrilineal relatives.

Subjects and methods

An Argentinean family. Four generations of Argentinean family with 30 members is shown in Fig. 1A. Blood samples were collected from eight matrilineal relatives. Informed consent was obtained from all participants prior to their participation in the study, in accordance with the Ethic Committee of The Ministry of health of the Province de Córdoba and the National University of Córdoba, in accord to Helsinki treaty. DNA samples from 120 controls were used to find the presence of mtDNA mutations.

Audiological examinations. A comprehensive history and physical examination were performed to identify any syndromic findings, the history of the use of aminoglycosides, genetic factors related to the hearing impairment in members of this pedigree at the Sanatorio Allende Hospital.

An age-appropriate audiological examination was performed and this examination included pure-tone audiometry (PTA) and/or auditory brainstem response (ABR), immittance testing, and Distortion product otoacoustic emissions (DPOAE). The PTA was calculated from the sum of the audiometric thresholds at 500, 1000, 2000, and 4000 Hz. The severity of hearing impairment was classified into five grades: normal <25 Decibel (dB); mild = 26–40 dB; moderate = 41–70 dB; severe = 71–90 dB; and profound >91 dB.

Analysis for mutations in mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser} (UCN) genes. Total DNA was extracted from peripheral blood using standard procedures. Screening for A1555G and A7445G mutation were carried out using PCR-RFLP [6,17], respectively. DNA fragments from two affected sisters spanning the entire mitochondrial 12S rRNA gene were amplified by PCR using primers PF18-PR18 and PF1-PR1 (all the primer sequences are available from the authors). The entire mitochondrial genome of one girl carrying the A827G mutation was PCR amplified in 19 overlapping fragments by the use of sets of the light-strand and the heavy-strand oligonucleotides primers. Each fragment was purified and subsequently submitted for sequence analysis. The resultant sequence data were compared with the updated consensus Cambridge sequence (GenBank Accession No. NC_001807) [18] (Table 1).

Mutational screening of the mitochondrial A827G mutation. The A827G variant was PCR amplified using the following oligonucleotides: forward 5'-GTAAGATTACACATGCAAGC-3' and reverse 5'-GGGTTAGTATAGCTTAG-3'. After PCR, digestion of the 187-bp fragment was cut with the restriction enzyme TruII, products were analyzed on 3% agarose gels. Normal allele was cut in three fragments of 20, 25, and 142 bp, whereas the mutant allele had 20 and 167 bp.

Mutational analysis of TRMU gene. Genotyping for the G28T variant in TRMU gene was PCR amplified using the following oligonucleotides: forward 5'-ACAGCGCAGAAGAAGAGCAGT-3' and reverse 5'-TTGTCACAGTCTGCTGAGTGGGG-3'. After PCR, digestion of the 843-bp

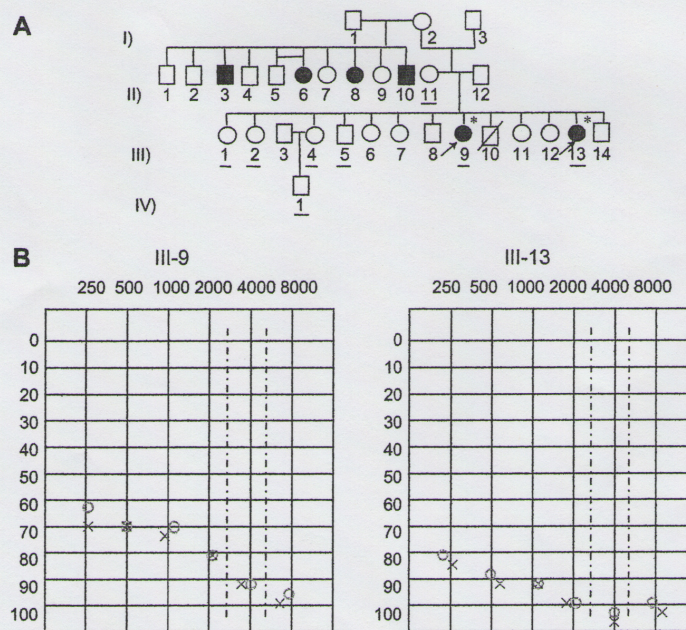


Fig. 1. (A) Argentinean pedigrees with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. Hearing impaired individuals are indicated by filled symbols. Arrow denotes probands. Asterisks denote individuals who had a history of exposure to aminoglycosides. Subjects used for the genotyping analysis were underlined. (B) mtDNA variant A827G in the 12S rRNA pedigrees and its audiometric alterations. Available audiometries of affected patients with the A827G variant.

Table 1
mtDNA variants in Argentinean family with A827G mutation

Gene	Position	Replacement	H/h	Prev. R	codif.
D-loop	499	G to A	H	YES	syn
12S rRNA	827	A to G	H	YES	
ND1	3547	A to G	H	YES	I-V
ND2	4820	G to A	H	YES	syn
ND2	4977	T to C	h	YES	syn
COI	6473	C to T	H	YES	syn
COII/tRNA ^{Lys}	8271–8291	Del 9	H	YES	NC
COIII	9950	T to C	H	YES	syn
ND4	11590	A to G	H	YES	syn
ND5	12696	C to G	H	YES	syn
ND5	12727	T to C	H	YES	NC
ND5	12753	A to G	H	YES	N-S
ND5	12792	C to T	H	NO	S-F
ND5	12795	G to A	H	YES	syn
ND5	12801	C to T	H	YES	syn
ND5	12840	C to T	H	NO	syn
ND5	12873	T to C	H	YES	syn
ND5	12888	C to T	H	YES	syn
ND5	12892	T to C	H	NO	syn
ND5	12904	A to C	H	NO	I-L
ND5	12940	G to A	H	YES	A-T
ND5	12950	A to G	H	YES	N-S
ND5	12951	C to T	H	YES	syn
ND5	12982	C to T	H	NO	L-F
ND5	13011	C to T	H	YES	syn
ND5	13020	T to C	H	YES	syn
ND5	13023	C to T	H	YES	syn
ND5	13062	A to T	H	NO	S-C
ND5	13105	A to G	H	YES	I-V
ND5	13111	T to C	H	YES	syn
ND5	13140	A to G	H	YES	L-E
ND5	13145	G to A	H	YES	S-N
ND5	13164	A to C	H	NO	syn
ND5	13174	T to C	H	NO	L-P
ND5	13272	C to T	H	NO	H-Y
ND5	13281	T to C	H	YES	syn
ND5	13359	G to A	H	YES	M-I
ND5	13368	G to A	H	YES	syn
ND5	13466	G to A	H	NO	syn
ND5	13488	T to C	H	YES	syn
Cyt b	15535	C to T	H	YES	syn
D-loop	16142	C to T	H	NO	NC
D-loop	16356	T to C	H	NO	NC

At the moment, the complete mitochondrial genome analysis from (III-9) detected A827G mutation, and not any other pathological mutation was detected. The matrilineal family have B haplotype. Syn, synonymous; NC, no codification.

fragment was done with the restriction enzyme Bsp1286I. Normal allele must done fragments of 372 and 470 bp, whereas in the mutant allele, the band of 470 bp was cut in two bands of 134 and 336 bp. The Bsp1286I-digested products were analyzed on 1.5% agarose gels.

Results

Clinical findings

The family lives in Córdoba, in the center of Argentine. All of the family members live in the same area. The proband (III-9) began suffering bilateral hearing impairment 30 days after receiving an injection of gentamycin due to an accident in her hand, when she was about 12 years

old. As illustrated in Fig. 1B, an audiogram showed that she had severe SNHL. Other audiological and neurotological examinations including immittance, ABR, and TEO-AEs revealed a cochlear involvement. Otoscopic examination and a CT scan of the temporal bones demonstrated normal results. As shown in Fig. 1A, two out of 30 family members (III-9 and -13 group) in the pedigree exhibited hearing impairment that was bilaterally symmetric, severe to profound, and sensorineural, after aminoglycoside treatment. Serial audiograms were compared in the present study. The hearing loss was reported to be progressive in each affected subject. Interestingly, hearing impairment in these two patients occurred only 30 days only after injection of a regular dose of aminoglycosides (gentamycin). The age at the time of administration varied from 6 to 12 years. Other family members (II-11; III-1 to III-8 and III-10 to III-12, III-14, and IV-1) who did not use the aminoglycoside antibiotics had subsequently normal hearing as indicated by audiological and neurotological examinations. Whereas members (III-3, III-6, III-8, and III-10) in the pedigree exhibited moderate deafness perhaps without aminoglycoside expositions. These family members were not examined by us. There was no evidence that any member of this Argentinean family had any other known cause to account for the hearing impairment. Complete family medical histories of all individuals showed no other clinical disorders, including diabetes mellitus, visual problem, muscular diseases, and neurological abnormalities. Thus, the phenotype of the present pedigree can be considered as non-syndromic SNHL.

Mitochondrial DNA analysis

The maternal transmission of aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss in this family, suggested mitochondrial involvement and led us to analyze the mitochondrial genome of matrilineal relatives. DNA fragments spanning mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser}(UCN) genes, which are the hot spots for deafness-associated mutations were analyzed. First, screening by PCR-RFLP of A1555G and A7445G mutations were done. We did not detect any of these mutations. Second, we amplified 12S rRNA and tRNA^{Ser}(UCN) genes and each fragment was purified and subsequently submitted for DNA sequencing. We did not detect the T961C, T961delT+C(n)ins, T961insC, C1494T, T1095C in the 12S rRNA gene; nor the T7510C, 7472insC, and T7511C mutations in the tRNA^{Ser}(UCN) gene [20]. The complete mitochondrial genome analysis in the proband (III-9), detected other mutations that it have not been described before (C12792T; A12904C; C12982T; A13062T; T13174C; C13272T; Table 1); except the identical mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in all matrilineal relatives in the homoplasmic form (Figs. 2 and 3). Matrilineal family had B haplotype. This haplotype is present in America. One hundred and twenty Argentinean controls without non-syndromic SNHL did not carry this mutation.

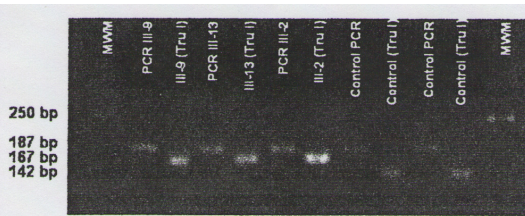


Fig. 2. Ethidium bromide-stained gel showing the PCR-RFLP analysis used for the detection of the A827G variant. Lines 2, 4, and 6, PCR probands, 8 and 10 PCR controls. Lines 3, 5, and 7 (the restriction enzyme TruI) acknowledge site allele mutate, this change produce two fragments of 20 and 167 bp, whereas line 9 and 11 wt, destroy a site resulting in three fragments of 20, 25, and 142 bp.

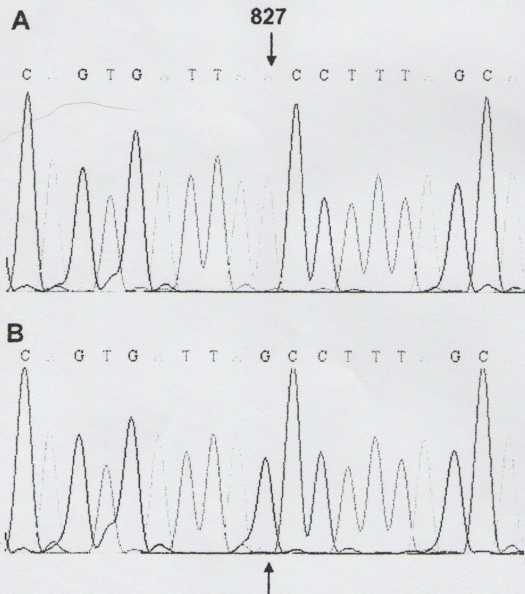


Fig. 3. (A) Wild type individual. (B) The proband III-9 with the A827G variant and sequence the A to G nucleotide change.

Mutational analysis of TRMU gene

To examine the role of TRMU gene in the phenotypic manifestation of the A827G mutation, we also conducted the mutational screening of TRMU gene in the matrilineal members of this family. We failed to detect G28T mutation which has been shown to be associated with non-syndromic hearing loss.

Conservation and secondary structure of 12S rRNA nucleotide variants

We analyzed the A827G for their possible effects on secondary structure of the rRNA using the RNAfold software [19]. We also compared the nucleotide conservation in different species (Fig. 4).

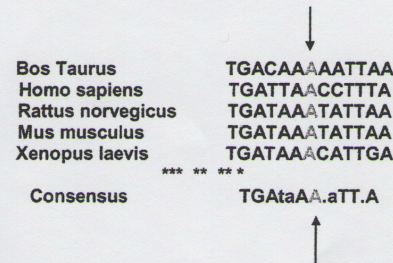


Fig. 4. Sequence alignment of the 12S rRNA gene in different species. Sequence alignment of the 12S rRNA gene in different species. The A at 827 position is highly conserved throughout evolution.

Discussion

In the present study, we have performed the clinical and molecular characterization of an Argentinean family with aminoglycoside-induced non-syndromic sensorineural hearing loss. Type A tympanograms and absence of TEO-AEs in all patients, combined with recordable acoustic reflexes in two patients with severe hearing loss, provided a strong evidence that the cochlear is the site of lesion. Hearing impairment and clinical symptoms were only found in two family members. They had a history of exposure to aminoglycosides, suggesting the mitochondrial DNA involvement for the disorder and led us to analyze the mitochondrial genome of the matrilineal relatives. Here, we have identified a homoplasmic A-to-G transition at position 827 in the mitochondrial 12S rRNA gene. The following evidence suggests that the A827G mutation is the major pathogenic mtDNA mutation that causes a genetic predisposition to non-syndromic hearing impairment in this Argentinean family. First, this mutation is present only in maternal relatives in the homoplasmic form, and not in other members of the family and in 120 Argentinean controls. Furthermore, 12S rRNA A827G mutation has previously been implicated to be associated with both aminoglycoside-ototoxicity and non-syndromic hearing loss in a few genetically unrelated individuals [21,22], indicating that this mutation is involved in the pathogenesis of hearing impairment. Finally, the A827G mutation is located at the A-site of the mitochondrial 12S rRNA gene which is highly evolutionarily conserved in human [18], mouse [23], rat [24], bovine, and *Xenopus laevis* [25] (Fig. 4). It is possible that the alteration of the tertiary or quaternary structure of this rRNA by the A827G mutation may lead to mitochondrial dysfunction, thereby it would play a role in the pathogenesis of hearing loss. Clinical evaluations revealed that only 6 of the 30 matrilineal relatives (20%) in this Argentinean pedigree subsequently developed deafness. The fact of incomplete penetrance indicates that the A827G mutation alone is not sufficient to produce clinical phenotype. Previous studies showed that the expression of clinical phenotype of non-syndromic deafness-associated mtDNA mutations required for the

contribution of modulating factors including aminoglycosides [4,26], mitochondrial haplotypes [27] or nuclear modifier genes [28,29]. But if one of non-descript mutations (C12792T; A12904C; C12982T; A13062T; T13174C; C13272T; Table 1; presents in the III-9 proband) can contribute or no at the phenotype expression A827G mutation, actually we still do not know. This will be evaluated with the clinical feature. The TRMU gene has been shown to modulate the severity of hearing loss associated with the mtDNA mutation [30]. To examine the role of TRMU gene in the phenotypic expression of the A827G mutation, we performed a mutational screening of the TRMU gene in the matrilineal members of this family. Sequence analysis revealed the absence of G28T mutation in the TRMU gene in all subjects carrying the A827G mutation in the 12S rRNA gene. Thus, the clinical phenotype of this Argentinian family is likely to be influenced by additional nuclear modifier genes and/or mitochondrial haplotypes.

Acknowledgments

We thank the patients and their family for their cooperation in the present study. We thank Institute of Hematology and Hemotherapy from Córdoba University for the blood provided to perform of normal controls.

This work was supported in part by Grants from the Dirección de Discapacidad, Ministerio de la Solidaridad, Gobierno de la Provincia de Córdoba (Argentina); Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT) and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina) N.M.G.de B. is career member of CONICET.

References

- [1] C. Petit, J. Leveilliers, J.P. Hardelin, Molecular genetics of hearing loss, *Annu. Rev. Genet.* 35 (2001) 589–646.
- [2] C.G. Van, R.J. Smith, Maternally inherited hearing impairment, *Clin. Genet.* 57 (2000) 409–414.
- [3] N. Fischel-Ghodsian, T.R. Prezant, X. Bu, S. Oztas, Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity, *Am. J. Otolaryngol.* 14 (1993) 399–403.
- [4] T.R. Prezant, J.V. Agopian, M.C. Bohlman, X. Bu, S. Oztas, W.Q. Qiu, K.S. Arnos, G.A. Cortopassi, L. Jaber, J.I. Rotter, Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness, *Nat. Genet.* 4 (1993) 289–294.
- [5] T. Hutchin, I. Haworth, K. Higashi, N. Fischel-Ghodsian, M. Stoneking, N. Saha, C. Arnos, G. Cortopassi, A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 4174–4179.
- [6] X. Estivill, N. Govea, E. Barcelo, C. Badenas, E. Romero, L. Moral, R. Scozzri, L. D'Urbano, M. Zeviani, A. Torroni, Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 27–35.
- [7] R.A. Casano, Y. Bykhovskaya, D.F. Johnson, M. Hamon, F. Torricelli, M. Bigozzi, N. Fischel-Ghodsian, Hearing loss due to the mitochondrial A1555G mutation in Italian families, *Am. J. Med. Genet.* 79 (1998) 388–391.
- [8] T.P. Hutchin, N.J. Lench, S. Arbuzova, A.F. Markham, R.F. Mueller, Maternally inherited hearing impairment in a family with the mitochondrial DNA A7445G mutation, *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (2001) 56–58.
- [9] T.P. Hutchin, M.J. Parker, I.D. Young, A.C. Davis, L.J. Pulleyn, J. Deeble, N.J. Lench, A.F. Markham, R.F. Mueller, A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment, *J. Med. Genet.* 37 (2000) 692–694.
- [10] I. del Castillo, M. Villamar, M.A. Moreno-Pelayo, J.J. Almela, C. Morera, I. Adiego, F. Moreno, I. del Castillo, Maternally inherited non-syndromic hearing impairment in a Spanish family with the 7510T>C mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene, *J. Med. Genet.* 39 (2002) e82.
- [11] C.M. Sue, K. Tanji, G. Hadjigeorgiou, A.L. Andreu, I. Nishino, S. Krishna, C. Bruno, M. Hirano, S. Shanske, E. Bonilla, N. Fischel-Ghodsian, S. DiMauro, R. Friedman, Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene, *Neurology* 52 (1999) 1905–1908.
- [12] K. Ishikawa, Y. Tamagawa, K. Takahashi, H. Kimura, J. Kusakari, A. Hara, K. Ichimura, Nonsyndromic hearing loss caused by a mitochondrial T7511C mutation, *Laryngoscope* 112 (2002) 1494–1499.
- [13] E. Chapiro, D. Feldmann, F. Denoyelle, D. Sternberg, C. Jardel, M.M. Eliot, D. Bouccara, D. Weil, E.N. Garabedian, R. Couderc, C. Petit, S. Marlin, Two large French pedigrees with non syndromic sensorineural deafness and the mitochondrial DNA T7511C mutation: evidence for a modulatory factor, *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (2002) 851–856.
- [14] S.Y. Chu, S.C. Chiang, Y.H. Chien, W.L. Hwu, Screening of mitochondrial DNA mutations in subjects with non-syndromic familial hearing impairment in Taiwan, *Acta Paediatr. Taiwan.* 43 (2002) 330–333.
- [15] G. Xing, Z. Chen, Q. Wei, H. Tian, X. Li, A. Zhou, X. Bu, X. Cao, Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 (2006) 1253–1257.
- [16] L.P. Gravina, M.E. Foncuberta, R.C. Estrada, C. Barreiro, L. Chertkoff, Carrier frequency of the 35delG and A1555G deafness mutations in the Argentinean population. Impact on the newborn hearing screening, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 71 (2007) 639–643.
- [17] F.M. Reid, A. Rovio, I.J. Holt, H.T. Jacobs, Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np 7445 deafness-associated mitochondrial mutation, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 443–449.
- [18] S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, I.G. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290 (1981) 457–465.
- [19] I.L. Hofacker, Vienna RNA secondary structure server, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3429–3431.
- [20] M.X. Guan, Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1011 (2004) 259–271.
- [21] R. Li, J.H. Greinwald Jr., L. Yang, D.I. Choo, R.J. Wenstrup, M.X. Guan, Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA(Ser(UCN)) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss, *J. Med. Genet.* 41 (2004) 615–620.
- [22] Z. Li, R. Li, J. Chen, Z. Liao, Y. Zhu, Y. Qian, S. Xiong, S. Heman-Ackah, J. Wu, D.I. Choo, M.X. Guan, Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss, *Hum. Genet.* 117 (2005) 9–15.
- [23] M.J. Bibb, R.A. Van Etten, C.T. Wright, M.W. Walberg, D.A. Clayton, Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA, *Cell* 26 (1981) 167–180.
- [24] G. Gadaleta, G. Pepe, C.G. De, C. Quagliariello, E. Sbisà, C. Saccone, The complete nucleotide sequence of the *Rattus*

- norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates, *J. Mol. Evol.* 28 (1989) 497–516.
- [25] B.A. Roe, D.P. Ma, R.K. Wilson, J.F. Wong, The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 9759–9774.
- [26] H. Zhao, R. Li, Q. Wang, Q. Yan, J.H. Deng, D. Han, Y. Bai, W.Y. Young, M.X. Guan, Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 139–152.
- [27] L. Zhao, W.Y. Young, R. Li, Q. Wang, Y. Qian, M.X. Guan, Clinical evaluation and sequence analysis of the complete mitochondrial genome of three Chinese patients with hearing impairment associated with the 12S rRNA T1095C mutation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 1503–1508.
- [28] M.X. Guan, N. Fischel-Ghodsian, G. Attardi, Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 573–580.
- [29] Q. Yan, Y. Bykhovskaya, R. Li, E. Mengesha, M. Shohat, X. Estivill, N. Fischel-Ghodsian, M.X. Guan, Human TRMU encoding the mitochondrial 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase is a putative nuclear modifier gene for the phenotypic expression of the deafness-associated 12S rRNA mutations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342 (2006) 1130–1136.
- [30] M.X. Guan, Q. Yan, X. Li, Y. Bykhovskaya, J. Gallo-Teran, P. Hajek, N. Umeda, H. Zhao, G. Garrido, E. Mengesha, T. Suzuki, I. del Castillo, J.L. Peters, R. Li, Y. Qian, X. Wang, E. Ballana, M. Shohat, J. Lu, X. Estivill, K. Watanabe, N. Fischel-Ghodsian, Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 291–302.

Mitochondrial deafness: a novel presentation of the G7444A mutation in the tRNA^{ser(UCN)} gene in Argentinean family.

"Syndromic Mitochondrial Disease, Mutation G7444A"

¹Chaig MR; ³Romero Orellano F; ¹Soria NW; ^{2,4}Zernotti ME; ⁴Martellotto G; ⁵Maldonado C; Martinez J; ²Romero Moroni F; ¹Gerez de Burgos NM.

¹Department of the Biochemical and Molecular Biology; ² Department of the Otorhinolaryngology at Clínicas' Hospital; ⁴Department of the Pathology at Clínicas' Hospital; ⁵Department of the Microscopy (FCM – UNC); ³Children's Hospital at Córdoba province; ⁴Service of Otorhinolaryngology at Sanatorio Allende.

*Corresponding author Address: Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular FCM – UNC. Haya de la Torre S/N Ciudad Universitaria. 2do. Piso. Pabellon Argentina. CP 5016.e-mail: mrchaig@hotmail.com / mchaig@biomed.uncor.edu

ABSTRACT

The disorders associated with mutations in the mitochondrial genome with a particular clinical expression affect moreover the cochlear function. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA), especially in the 12S rRNA and tRNA^{ser (UCN)} genes, are the most important causes of both aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. We studied 40 patients with sensorineural deafness that might have been their cause after aminoglycoside treatment; in this population one patient with aminoglycoside-induced hearing loss, had the G7444A mutation in the tRNA^{ser(UCN)} gene. The matrilineal pedigree clinical feature, biochemical and morphological studies, might indicate that this is a novel syndromic presentation of the G7444A mutation in Córdoba – Argentina; because the muscle biopsy findings in the proband III-5 than the proband II-5, showed in the ME multiple mitochondrial abnormalities in the striated muscle: amorphous mitochondria with paracrystalline inclusions and fibrous sarcomeres and accumulate of glycogen. In the MO ragged red fibres pathognomonic of the mitochondrial disease. The studies of the microscopy have been correlated with the finding biochemical COX/CS ratio, this indicated poor activity of the COX. The mutation is not present in 180 Argentinean controls.

Keywords: Hearing loss; Mitochondrial tRNA^{ser (UCN)}; G7444A Mutation; Aminoglycosides; TRMU.

INTRODUCTION

An increasing number of disorders associated with mutations in the mitochondrial genome have been reported in recent years. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA), especially in the 12S rRNA and tRNA^{ser(UCN)} genes, are the most important causes of both aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss [1, 2, 3, 4, 5 y 6](#). These mutations often occur nearly or complete homoplasmically state; specific mutations are consistently related to well-defined clinical entities, suggesting the presence of a pathogenetic link between molecular and clinical abnormalities. It has been established that a collection of specific mtDNA point mutations are responsible for most of the maternally-inherited syndromes, including Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON), Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa (NARP), Mioclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres (MERRF), Maternally Inherited Miopathy and Cardiomyopathy (MMC), Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes (MELAS). These disorders, with a particular clinical expression affect moreover the cochlear function. Tissues that require a high rate of ATP production are more likely to be affected by mutations that affect the mitochondrial function (for example striated muscle, nervous tissue, cochlea etc.), and mtDNAs dependent dysfunctions have often been found to cause hearing defects in syndromic

or non-syndromic form. On the other hand, two of the main features of mtDNA-linked deafness, are the specificity of tissue and the variable grade of penetrance^{7,8,9 y 10}. In addition, matrilineal relatives of intra-family or inter-family, despite carrying the same deafness-associated mtDNA mutation(s), exhibited variable penetrance and expressivity, including the severity, age-of-onset, and progression in hearing loss. This shows that the mtDNA mutation(s) itself is not enough to produce the clinical phenotype; it is also necessary the presence of other modifier genes mutationses nDNA, enviromental factors (ATB-AG) and mitochondrial haplotypes^{11,3,12}. We report the clinical, biochemical, molecular and genetic characterization of one patient with aminoglycoside-induced hearing loss, who had the G7444A mutation. In this study, we analyzed the 12S rRNA and tRNA^{ser(UCN)} genes in the patient and her matrilineal and patrilineal family relatives. The matrilineal pedigree clinical feature, and biochemical and morphological studies, might indicate that this is a novel syndromic presentation of the G7444A mutation in Córdoba – Argentina.

SUBJECTS AND METHODS

An Argentinean Family. Three generations of Argentinean family with 29 members are shown in Figure 1. Blood samples were collected from 16 matrilineal relatives and two patrilineal relatives. The study protocol and written informed consent that was obtained from all the patients, has been approved by the Ethics Committee of the National University of Córdoba and The Ministry of Health of Córdoba (Res. Number 296) in accord to Helsinky treaty. DNA samples from 180 controls were used to find the presence of mtDNA mutations.

Audiological examinations. A comprehensive history and physical examination were performed to identify any syndromic signs, to determine the possible use of aminoglycosides, and genetic factors related to the hearing impairment in members of this pedigree. These studies were carried out at the Otorhinolaryngology

Service at Children's Hospital of Córdoba. An age-appropriate audiological examination was made, and this examination included pure-tone audiometry (PTA) and/or auditory brainstem response (ABR), immittance testing, and Distortion product otoacoustic emissions (DPOAE). The PTA was calculated from the sum of the audiometric thresholds at 500, 1000, 2000 and 4000 Hz. The severity of hearing impairment was classified into five grades: normal < 25 Decible (dB); mild = 26–40 dB; moderate = 41–70 dB; severe = 71–90 dB; and profound > 91 dB.

Analysis for mutations in mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{ser(UCN)} genes. Total DNA was extracted from peripheral blood using standard procedures. Screening for A1555G, A827G, A7445G, and G7444A mutations were carried out using PCR-RFLP^{12,6,14}. DNA fragments from affected patient spanning the enteric mtDNA 12S rRNA and tRNA^{ser} genes were amplified by PCR using specific primers PF18-PR18 and PF1-PR1 (all the primer sequences are available from the authors)⁶ and each fragment was purified and subsequently submitted for sequencing analysis. The resultant sequence data were compared with the updated consensus Cambridge sequence (GenBank Accession No.:AC_000021.2)

Mutational analysis of TRMU gene¹²: For the rol TRMU gen examination, in the manifestation of the fenotype G7444A^{ser(UCN)} mutation, we genotyping the G28T variant in TRMU gene by PCR-RFLP¹².

Determination of the enzymes activities (Cytochrome c Oxidase (COX) and Citrate Synthase (CS)), and COX/CS ratio.

Activity determinations of Cytochrome c Oxidase (COX) and Citrate synthase (CS) was performed in homogenates of quadriceps biopsy according to Wharton¹⁵ and Ulrich¹⁶ respectively.

Histological and histochemical techniques

Histological and histochemical techniques were performed in longitudinal series of the muscle according to Dubowitz¹⁷ and Engel¹⁸. Serial slides were treated with hematoxylin-eosine (H/E), and modified Gomori trichrome technique¹⁸ to view Ragged Red Fibres (MRRF).

Electron Microscopy

Tissue was washed in 1 ml of PBS (pH 7.0), and fixed with 2% of glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0,1M cacodylate buffer for 2 hour, and then post-fixed with osmium tetr.oxide at 1% in the same buffer, dehydrated and embedded in Araldite. Thin sections were cut with a diamond knife on a JEOL JUM-7 ultramicrotomes and examined in a Zeiss LEO 906E electron microscope^{19,20}

RESULTS

Clinical findings :

The patient (III-5) is from Córdoba, in the centre of Argentina, and treated with aminoglycosides at birth, due to lung infection. She was considerate to have congenital deafness. Her mother did not had risk factors in her pregnancy. On her matrilineal pedigree were present similar clinical antecedents: **Thyroid:** Graves Basedow disease (I-4; II-5 and III-12); hypothyroidism (II-2, II-8 and III-5); the patient III-5 (only showed signs since she was 8 years old until 11 years old). The patient II-2 present hypothyroidism, but his children (they have got idem years-old than them cousin) no showing any disease. **Myopathy:** muscle pain and easily fatigated (II-5, 8; III3, 5, 12 and 14); **rheumatoid arthritis:** (Patient III-7) was diagnosed at the age of nine, she had rheumatoid factor positive (IgM) in serum. Her symptoms were: pain in big articulations, anorexia, low weight (could not gain weigh) and slow growth. She received treatment then but she is not receiving any treatment at the moment; **bronchial asthma:** (III-6 and 13); **Areate alopecia:** (III-10 and 12); and **arrythmy**

cardiac: III-11 (during fetal stage, until he was 6th months old). The patient III-3 and II-5 are pregnant, they have to make rest and both embryos have **arrythmy cardiac** too, growing slow intrauterus and them mothers need repose in bed (Figure 1).

As show in Figure 2A, the audiogram showed severe sensorineural hearing loss (SNHL). Other audiological and neurotological examinations, including immittance, ABR and TEOAEs, revealed a cochlear involvement. Otoscopic examination and CT scan of the temporal bones demonstrated normal results. As shown in Fig. 1, three members (II-3; III-5 and III-4 group) in the pedigree exhibit bilaterally symmetric hearing impairment, severe to profound and sensorineural; in two of them, hearing impairment appeared after treatment with ATB-AG (III-5 and II-3). We have not studied the patient II-3; he was treated with ATB-AG when he was 22 years old, and the hearing impairment occurred only 30 days after injection of regular dose of aminoglycosides (gentamycin). III-5 was treated with gentamycin at birth. Other III-4 hearing impairment might has been caused by the excesive use of headphones. The hearing loss was reported to be progressive in serial audiograms and these were compared in the present study. The others family members (I-2, II-5, 6, 8, and 9; III- 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, and 15) who did not receive aminoglycoside antibiotics had subsequently normal hearing as indicated by audiological and neurological examinations.

MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS

The maternal transmission of aminoglycoside-induced and syndromic hearing loss in this family, suggested mitochondrial involvement and this led us to analyze two mitochondrial genes of matrilineal relatives, DNA fragments spanning that were analysed: 12S rRNA and tRNA^{ser(UCN)} genes, which are the hot spots for deafness-associated mutations and ototoxicity. First, screening by PCR-RFLP of A827G; A1555G, A7445G, G7444A mutations were done. We did not detect any of these

A1555G, A827G mutations. But we detected A7445G or G7444A mutations (they have the same restriction site, but for sequencing it was detected G7444A)(Figure 2B and C). Second, we amplified 12S rRNA and tRNA^{ser} genes and each fragments was purified and subsequently submitted for DNA sequencing. We did not detect any mutation in the 12S rRNA gene, and we did not either detect the T7510C, T7511C, 7472 insC, or A7445G mutations, in the tRNA^{ser} gene. Interestingly we also failed to find any other nucleotide change, except the identical mitochondrial tRNA^{ser} G7444A mutation in all matrilineal relatives, in the homoplasmic form. One hundred and eighty Argentinean controls without SNHL did not carry this mutation.

Mutational analysis of TRMU gene

To examine the role of TRMU gene in the phenotypic manifestation of G7444A mutation; we also conducted the mutational screening of TRMU gene in the matrilineal members of this family. We failed to detect G28T mutation.

BIOCHEMICAL ANALYSIS

In the table 1, we show the enzyme activities from cytochrome c oxidase (COX) and citrate synthase (CS) in three examples of quadriceps muscle biopsies of the patients: III-5 and II-5, they have the G7444A mutation in the tRNA^{ser} and one control. Then we report the cytochrome C oxidase/Citrate synthase ratio.

In III-5 to be show that the activity of the COX ($4,4 \pm 0,088$ U/g tww) is very low respect to control, whereas that the activity to the CS (32,66 U/g tww) the activity is near at control. The value of the ratio COX/CS (0.135) is only 21.7% in regard to control. On

the other hand, in proband's mother (II-5), activity values of both enzymes are lower. Because of this the relation COX/CS is bigger than registered in control.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS

The morphological analysis has been analysed from the longitudinal quadriceps muscle biopsy from the patients: III-5, II-5 and control. The morphology analysed in muscle biopsy of the III-5 and II-5 patients, and control, has showed the next results: The III-5 and II-5 patients: In the histology cut is observed: thin of the muscle fibers and disruption of them. Is observed light variations (decrease or hypertrophy). Had not evidence of the muscle regeneration and it has got normal nucleus. Should to put out (resaltar) the presentation of the little fibers group, with myofibers rupture signs (ragged red fibers). These are not showed with infiltration and inflammation.

The control: Is showed, skeletal muscle conserved, with normal histology characteristics. It is not observed fibrous or other alterations, in H / E color or Gomori technic (Figure 3 A and B).

Electron microscopy

Part of the skeletal muscle biopsy, were processed for electron microscopy by to the standard methods^{19,20} The muscle biopsy findings in the proband (III-5), showed multiple mitochondrial abnormalities in the striated muscle: amorphous mitochondrias with paracrystalline inclusions and fibrous sarcomeres and accumulate of glycogeno (Figure 3 C and D). The figure 3 E show the nucleus with characteristic normal, and in the Figure 3 F the mitochondria is showed amorphous, desorganize and with paracrystalline inclusions. The patient (II-5) had very few mitochondrias, and we did not observe normal structure on the skeletal muscle, because we also were demonstrate that in the muscle biopsy, the ribbons Z, H or A zone were not normals, furthermore it had degenerative changes in mitochondrias and lipid, and paracrystalline inclusions. We have observed one very bad structure of the muscle in the patient II-5 (Figure 3

G). The control patient have a normal striated muscle structure and “normal mitochondrias” too. (Figure 3 H).

DISCUSSION

In this family, three members present hearing loss, and two of them have history of exposition to ATB-AG. In accord to the clinical, bioquematical, morphological and molecular studies, the SNHL might be of syndromic presentation. This family present autoimmunology pathologies associated to deafness (Figure 1). These pathologies have been present by matrilineal inheritance, because the patients I-2, II-5 and II-8 were married more than once, and it was not found any anormalities by patrilineal family. Type A tympanograms and absence of TEOAEs in all patients, combined with recordable acoustic reflexes in two patients (II-5) and (III-5) with severe to profound hearing loss, that might to be after aminoglycoside-treatad, and the other (III-4) without exposition at AG-ATB, but it might be after noise exposition, because he had a lot of hours used the walkman. The patients provided a strong evidence that the cochlear is the site of lesion.

Respect COX/CS ratio in both III-5 and II-5 indicated that the muscle funtion and mitochondrias were affect how the electronic microscopyoptic with amorphous mitochondrias, paracritalins inclusions and fibrous sarcomeres associated to optic microscopy that showed the ragged fiber red, patognomonic of citophaty mitochondrial. Here, we have identified a homoplasmic G to A transition at position 7444 in the mitochondrial tRNA^{ser(UCN)} gene. The clinical feature presentation might be syndromic and the pathologies might be considerate with one component imunology. The following evidence suggests that the G7444A mutation should be the major pathogenic mtDNA mutation, and the cause of genetic predisposition to syndromic hearing impairment of this Argentinean family. This homoplasmic mutation is present only in maternal relatives and not in the other members of the family, but in lynphoid cells. We

think as Kokotas²¹, that it is possible that multisystemic mitochondrial syndromes are lethal in the homoplasmic state and the phenotypic expression of a mitochondrial molecular defect can be influenced by multiple factors, such as the proportion of the mutation in different cells and tissues (the grade of heteroplasmy), and the nuclear genetic background of a given patient. Additionally mtDNA haplotype and environmental factors are also known to play a crucial role. Therefore, when these disorders to be inherited through the mtDNA might to be associated with one younger people presentations as in this family²². It is not present in 180 Argentinean controls. This G7444A mutation tRNA^{ser(UCN)} gene has previously been implicated to be associated with both aminoglycoside-ototoxicity, and non-syndromic hearing loss in a few genetically unrelated individuals²³, indicating that this mutation is involved in the pathogenesis of deafness. It might be that the environment contribute at the syndromic expression of the 7444 mutation, perhaps with other risk factors (the haplotypes mitochondrial, or modified and associates nuclear genes) that are playing a role and to give one high penetrance.

We failed to detect G28T mutation. which has been shown to be associated with nonsyndromic hearing loss for 12S rRNA and tRNA^{ser} genes. Complete medical histories from matrilineal family of all individuals showed clinical disorders, perhaps with a immunological component, that might constitute a syndromic presentation.

CONCLUSION

We think that is possible, the G7444A mutation in the tRNA^{ser(UCN)} gene, in this Argentinean family, have a syndromic presentation. How it was seen, by the biochemical, and morphological studies, and the phenotype expression. But is necessary think that other mutations in the mtDNA or nDNA might be present and to be related with environment's risk factor too. At the moment, this illustrates the limited genotype-phenotype correlation in mitochondrial disease.

Acknowledgment

This work was supported by SeCyT UNC, CONICET, Ministry of Public Health of Cordoba Province.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- T Hutchin, I Haworth, K Higashi, N Fischel-Ghodsian, M Stoneking, N Saha, C Arnos, G Cortopassi. (1993). A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 21: 4174–4179.
- 2.- Moazed D & Noller HF. 1987. Interaction of antibiotics, with functional sites in 16s ribosomal RNA. *Nature* 327: 389-394.
- 3.- TR Prezant, JV Agopian, MC Bohlman, X Bu, S Oztas, W-Q Qiu, KS Arnos, GA Cortopassi; L Jaber, JI Rotter, M Shohat, N Fischel-Ghodsian. (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4: 289-294.
- 4.- Y Zhu; Y Quian; X Tang; J Wang; L Yang; Z Liao; R Li; J Ji; Z Li; J Chaen; DL Choo; MX Guan. (2006). Aminoglycoside – inducal and non – syndromic hearing loss is associated whit the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA ser (UCN) gene in two Chinese families. *Biochen Biophys Res Commun.* Apr 14; 342(3): 843 – 50.
- 5.- G Xing, Z Chen, Q Wei, H Tian, X Li, A Zhou, X Bu, X Cao. (2006) Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344(4):1253-7.
- 6.- MR Chaig; ME Zernotti; NW Soria; F Romero Orellano; F Romero Moroni; NM Gerez. (2008). A mutation in Mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinean Family with Hearing Loss after Aminoglycoside-Treatment. *BBRC April* 368: 653 -659.
- 7.- M Sciacco, G Fagiolari, C Lamperti, S Messina, Bazzi P, L Napoli, L Chiveri, A Prella, P Comi, N Bresolin, G Scarlato, M Moggio. (2001). Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology* 56: 1070-1074.
- 8.- A Torroni, M Petrozzi, L Dúrbano, D Sellitto, M Zeviani, F Carrara, C Carducci, V Leuzzi, V Carelli, P Barboni, A De Negri, R Scozzari. (1997). Haplotype and phylogenetic analyses suggest that European- Specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber Hereditary Mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 60: 1107 - 1121.
- 9.- M Zeviani, MSc Moraes, MD DiMauro, MD Nakase, E Bonilla, EA Schon, MD Rowland. (1988). Deletions of mitochondrial DNA in Kearns – Sayre syndrome. *Neurology* 38: 1339–1346.
- 10.- T Yamasoba, K Tsukuda, Y Oka, MD Kobayashi, K Kaga. (1999). Cochlear histopathology associated with mitochondrial transfer RNA^{leu(UUR)} gene mutation. *Neurology* 52: 1705-1707.

- 11.- A Achilli, UA Perego, CM Bravi, MD Coble, QP Kong, R Scott, A Salas, A Torroni, HJ Bandelt. (2008). The phylogeny of the four Pan-American mtDNA haplogroups: Implications for evolutionary and disease studies. *Plosone*.3: e1764
- 12.- [MX Guan, Q Yan, X Li, Y Bykhovskaya, J Gallo-Teran, P Hajek, N Umeda, H Zhao, G Garrido, E Mengesha, T Suzuki, I del Castillo, JL Peters, R Li, Y Qian, X Wang, E Ballana, M Shohat, J Lu, X Estivill, K Watanabe, N Fischel-Ghodsian.](#) (2006) Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 79(2):291-302.
- 13.- X Estivill, N Govea, A Barcelo, E Perelló, C Banderas, E Romero, L Moral, R Scozzari, L D'urbano, M Zeviani, A Torroni (1998). Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 62: 27-35.
- 14.- FM Reid, A Rovio, IJ Holt, HT Jacobs. (1997); Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np 7445 deafness-associated mitochondrial mutation. *Hum Mol Genet.* 6(3):443-9.
- 15.- H Ulrich Bergmeyer, K Gawehn. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. Second edition. Pag 443.
- 16.- DC Wharton and A Tzagoloff. (1967). Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Meth Enzymol* 10: 245–250.
- 17.- V Dubowitz, RB Fitzsimons. (1985). *Muscle biopsy: a practical approach*. London, Philadelphia, Toronto: Baillière Tindall.
- 18.- WK Engel, GC Cunningham. (1963). Rapid examination of muscle tissue: an improved trichromethod for rapid diagnosis of muscle biopsy fresh-frozen section. *Neurology.* 13: 919-923.
- 19.- FR Widemann, S Vielhaber, R Schröder, CE Elger, WS Kunz. (2000). Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Analytical Biochemistry* 279: 55-60
- 20.- MMK Nass, S Nass. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol* 19: 593–629.
- 21.- H Kokotas; MB Petersen; PJ Willems. (2007). Mitochondrial deafness. *Clin. Genet* 71: 379-391.
- 22.- S DiMauro. (2004). Mitochondrial medicine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1659: 107–114.
- 23.- Y Zhu, Y Quian, X Tang, J Wang, L Yang, Z Liao, R Li, J Ji, Z Li, J Chaen, DL Choo, MX Guan. (2006). Aminoglycoside – induced and non – syndromic hearing loss is associated whit the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA ser (UCN) gene in two Chinese families. *Biochen Biophys Res Commun* 342: 843–50.
- 24.- L Coulbault, B Deslandes, D Herlicoviez, MH Read, N Lporrier, S Schaeffer, A Mouadil, A Lombès, F Chapon, P Jauzac, S Allouche. (2007). A novel mutation 3090 G>A of the mitochondrial 16S ribosomal RNA associated with myopathy. *Biochen Biophys Res Commun* 362: 601-605.

Figure 1

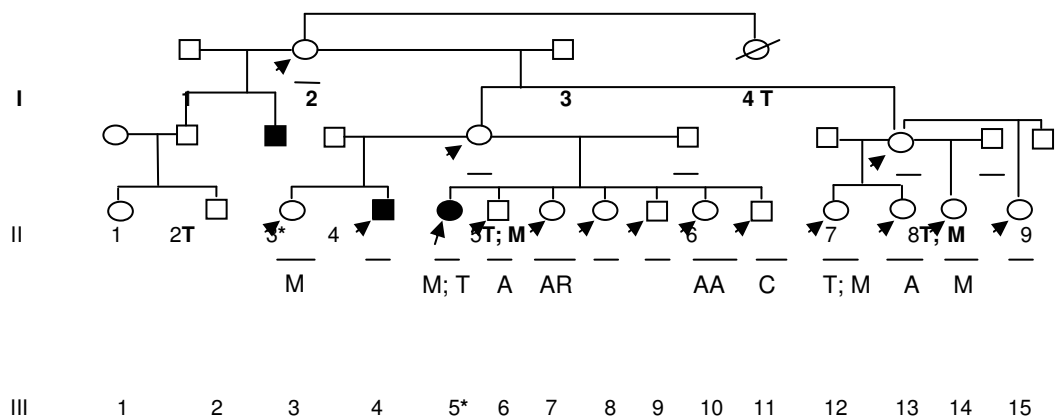


Figure 1: Argentinean pedigrees with aminoglycoside-induced and syndromic hearing-loss. Filled symbol= deafness; Arrow= probands with G7444A mutation; asterisks= individual with exposure to aminoglycosides; underline= all subjects with molecular studies. AR= rheumatoid arthritis; A= bronchial asthma; C= arrhythmia cardiac; M= miopathy; T= thyroideopathy; AA= Areate alopecia.

Figure 2: A, B and C

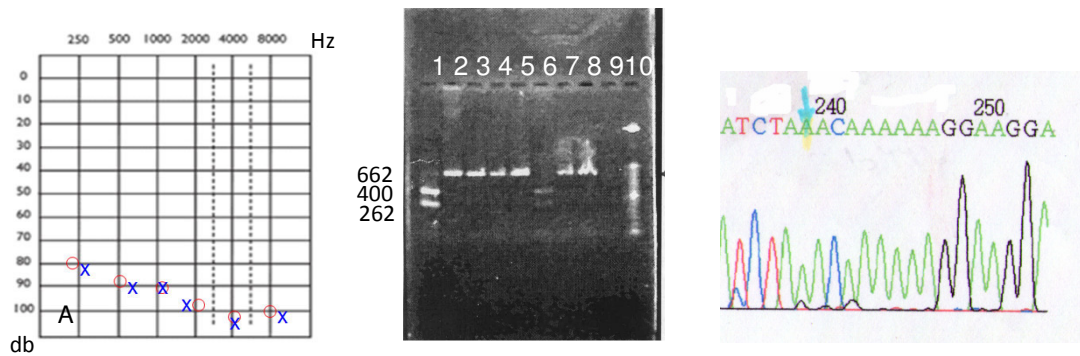
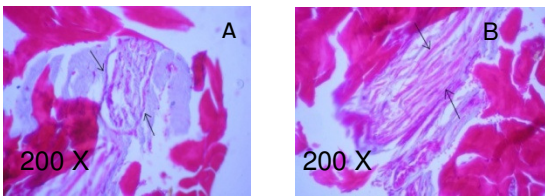


Figure 2A: Pure-tone audiometry patient III-5 with deafness severe to profound. B: PCR-RFLP: line 1 and 6 controls, lines 2 to 5 and 7 to 8 pedigrees with G7444A mutation after of the cut with restriction enzyme Xba1; the enzyme did not recognize the site. C: Electropherogram patient III-5, showed the change nucleotide G to A.

Figure 3: A, B, C, D, E and F



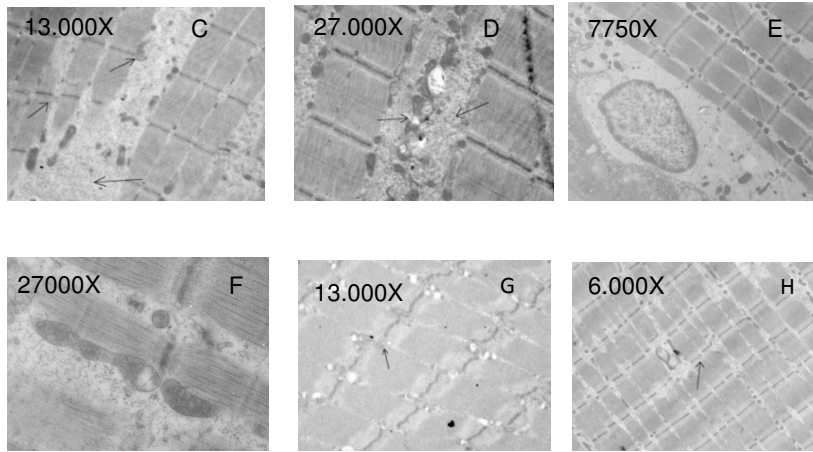


Figure 3 **A** and **B** optic microscopy: patient II-5 and III-5, the arrows showed the ragged red fibers. Electronic microscopy: **C** and **D**: patient III-5, the arrows showed multiple mitochondrial abnormalities in the striated muscle: amorphous mitochondria with paracrystalline inclusions, fibrous sarcomeres and a lot of glycogen. **E** and **F**: Patient III-5 too, in **E**, the arrows showed the nucleus with normal characteristics, and accumulation of the mitochondria. In **F**, the cut, is showing the mitochondria amorphous, with desorganization (see MI) and paracrystalline inclusions. **G**: Patient II-5: showed few and amorphous mitochondria and bad structure on the skeletal muscle: bands Z in z form,

Table 1: Enzymes activities of the COX and CS. COX/CS ratio.

ensayos	III 5	II 5	CONTROL
[]	ACTIVIDAD DE CITOCROMO C OXIDASA		

COX: U/g tejido	4,4 ± 0,088	10,3 ± 2,015	20,6 ± 0,085
ACTIVIDAD DE CITRATO SINTASA			
CS: U/g de tejido	32,66 ± 0,65	10,9 ± 1,015	33,00 ± 0,30
RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD COX/CS			
COX/CS: U/g de tejido	0,135	0,94	0,62

A: Control values are shown as means ±SD (1.07 ± 0.43)

Table 1: The COX/CS ratio in III-5 is lower than the control (21,6%). In the patient II-5, the COX and CS are low, furthermore the COX/CS ratio is greater than the control, but the $p < 0,05$, this indicated that the patient is out normal population.

A: Control values are shown as means ±SD (1.07 ± 0.43) of examples of

SORDERAS NEUROSENSORIALES POR MUTACIONES MITOCONDRIALES MÁS FRECUENTES

(Población de sordos de Córdoba – Argentina)

INTRODUCCIÓN

La audición es la vía natural para adquirir el lenguaje, uno de los más importantes atributos humanos. El lenguaje, permite a los hombres la comunicación a distancia y a través del tiempo. Dado que gran parte de los casos de sordera y defectos de la audición “son prevenibles”, es necesario desarrollar políticas sanitarias, que contribuyan a la salud en la audición y el lenguaje, a fin de elegir estrategias integradoras de prevención. En los países en desarrollo, es necesario por lo tanto, realizar estudios epidemiológicos con datos de base poblacional exactos, acerca de: prevalencia, incidencia y causas etiológicas de la sordera; esta información permitiría generar Planes Nacionales para su Prevención ⁽⁶³⁾. En el año 1985 la 38ava Asamblea Mundial de la Salud efectuó un estudio de “Defectos de audición y sordera”, en la misma se establece que existirían en el mundo 70 millones de personas sordas y que un importante porcentaje de estas sorderas, eran reversibles o de prevención en Atención Primaria. Diez años después, en el año 1995, esta Asamblea registra 120 millones de afectados en el mundo ⁽⁶³⁾. Una tarea prioritaria sería entonces, caracterizar la sordera y realizar investigaciones epidemiológicas, a fin de evaluar los factores de riesgo como medio ambiente y herencia, además de caracterizar su presentación en Síndromicas (S) y No Síndromicas (NS).

La sordera por causa genética, es generalmente, una enfermedad neurosensorial que afecta al 0.1% de recién nacidos, el 5% de individuos menores de 45 años y al 30% de los sujetos mayores de 70 años ¹². En pacientes adultos, la presbiacusia (sordera de aparición hacia los 50 años de edad), es la causa más común de pérdida de la audición e involucra tanto, factores hereditarios como multifactoriales ⁽¹³⁾.

Cuando el origen es genético, se las puede clasificar en sorderas nucleares, si está afectado el ADN nuclear (ADNn), o bien mitocondrial, si se afecta el ADN

mitocondrial (ADNmt). Para la identificación de genes, cuyas alteraciones vayan a ser causa de sordera hereditaria, es necesario, la localización de familias cuyos miembros puedan ser estudiados desde el punto de vista clínico, audiológico y genético. La pérdida de la audición de origen genético, puede deberse a un trastorno de la conducción (está afectado el oído medio) o bien neurosensorial (está afectado el oído interno, ya sea la cóclea, el nervio auditivo o el cerebro). En las sorderas neurosensoriales, el 70% de los casos, se presenta como un síntoma clínico aislado y se denominan: sorderas neurosensoriales no sindrómicas (S NS NS); mientras que el otro 30% se presenta formando parte de un síndrome en el cual está afectado no solo la audición, sino que participan otras anomalías clínicas y se denominan: sorderas neurosensoriales sindrómicas (S NS S)⁽¹²⁾.

A.- Sorderas neurosensoriales por mutaciones en el ADNn.

1.- No Sindrómicas

La hipoacusia NS se puede clasificar según su modo de transmisión en autosómica dominante (AD), autosómica recesiva (AR), y ligada al cromosoma X. En los últimos años se han hecho importantes avances en el diagnóstico de las hipoacusias NS por mutaciones en el ADNn. Se han identificado los loci genéticos y sus productos proteicos, que son responsables de un número importante de casos. Aproximadamente 51 loci para las formas (AD), 17 de los cuales han sido clonados; 39 para las (AR), con 17 genes clonados; y 8 para las ligadas al X con un gen clonado. La nomenclatura internacional utilizada para denominar a los loci genéticos de estas diferentes formas de hipoacusia, se designan: DFNA (Deafness A) para las formas de transmisión autosómica dominante, DFNB (Deafness B) corresponde a las autosómicas recesivas y DFN (Deafness) aquellas con transmisión ligada al X. Además se coloca un número consecutivo según el orden cronológico de su descripción, por ejemplo los loci relacionados con la forma de transmisión AD se designan de DFNA1 hasta DFNA56 ^(13, 67, 12, 68)

Las mutaciones genéticas tanto en el ADNn como en el ADNmt, producen alteraciones funcionales y estructurales del órgano de Corti, que conllevan a un

mal funcionamiento bioquímico y fisiológico del mecanismo de la audición. Detallamos a continuación diferentes alteraciones en el órgano de Corti, por mutaciones genéticas:

1.- Alteraciones de los componentes de la membrana y de proteínas importantes que participan en el equilibrio endolinfático. Se han identificado varias moléculas y una de las más importantes, es la conexina 26 (Cx 26) DFNB1. Mutaciones en esta proteína, son responsables de más del 50% de las sorderas. El gen que la codifica se ha designado GJB2^(1,31, 67).

2.- Alteraciones moleculares del citoesqueleto celular. Están afectados genes que codifican miosinas llamadas no convencionales, diferentes de las encontradas en las células musculares; las miosinas no convencionales se designan con las siguientes siglas: MYO 7A, MYO 15 y MYH 9; se asocian con DFNB2, DFNB3 y DFNA11^(13, 67).

3.- Alteraciones de moléculas estructurales del órgano de Corti y de la matriz extracelular, relacionadas a proteínas de la familia del colágeno. Una de ellas, el gen COL 11 A2, se asocia a DFNA13. La α -tectorina, proteína de la membrana Tectoria, no está relacionada al colágeno y se la asocia a los genes DFNA8, DFNA12 y DFNB21⁽⁶⁷⁾.

4.- Alteraciones de proteínas involucradas en otros procesos celulares. El gen POU4F3 que codifica para un miembro de la familia de los factores de transcripción, que permite la expresión de otros genes, como el del gen DFNA 15. El factor de transcripción POU4F3, juega un rol importante en la regulación de genes de tejidos específicos, como coclear y vestibular.^(67, 20, 84, 86).

2.- Síndrómicas

En algunos casos la transmisión es por herencia AD, por ejemplo Síndrome de Wardenburg, Síndrome de Treacher-Collins y Síndrome Braquio-oto-renal. En cambio en los Síndromes de Pendred o de Usher, la transmisión es AR; y en el Síndrome de Mohr-Trannebjærg la alteración está ligada al cromosoma X^(13, 29, 67, 12).

B.- SORDERAS NEUROSENSORIALES POR MUTACIONES MITOCONDRIALES

Antes de referirnos a sorderas neurosensoriales por mutaciones mitocondriales, describiremos características morfológicas y funcionales de la mitocondria.

LA MITOCONDRIA

La mitocondria es una organela citoplasmática de un diámetro de aproximadamente 0,5 a 1 μm ; su tamaño y número, varía de acuerdo al tipo celular de cada tejido y al estado metabólico de ese tejido. Presenta dos membranas altamente especializadas, la membrana externa (ME) la separa del citoplasma celular y la membrana interna (MI) que forma una serie de invaginaciones denominadas crestas mitocondriales, y aumentan considerablemente su superficie; la cantidad de las mitocondrias depende del requerimiento metabólico de la célula. Entre las membranas está el espacio inter membrana y por dentro de la MI, la matriz mitocondrial, donde se ubican múltiples enzimas diferentes (Figura 1)^(32, 65).

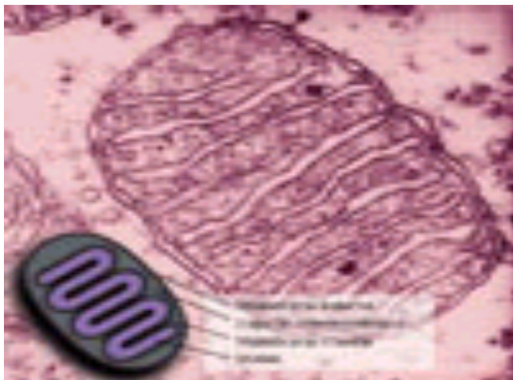


Figura 1: Corte transversal de una mitocondria de una célula muscular. Copyright Dennis Kunkel (M.E. 190.920x <http://www.pbrc.hawaii.edu/~kunkel/gallery/fungi-sm1/92386a.html>),

FUNCIONES DE LA MITOCONDRIA

CADENA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA:

En la MI de la mitocondria, los hidrógenos sustraídos del sustrato, son transferidos en forma gradual a aceptores, que están dispuestos ordenadamente, según un gradiente de potencial de reducción creciente, y asociados íntimamente, a las enzimas que catalizan las transferencias. El conjunto recibe el nombre de cadena respiratoria o de transporte de electrones (CTE). A excepción de la ubiquinona, o coenzima Q, que se encuentra libre en el interior de la doble capa lipídica, y del citocromo *c*, cuyas moléculas están adosadas a la cara externa de la MI de la mitocondria, los restantes componentes de la CTE, se agrupan en cuatro complejos multimoleculares que ocupan todo el espesor de la membrana:

Complejo I, o NADH-ubiquinona reductasa. Recibe hidrógenos de sustratos que son oxidados por deshidrogenasas, ligadas a la coenzima NAD. En su constitución participan FAD y varios centros Fe-S. Los hidrógenos son transferidos a ubiquinona.

Complejo II, o succinato-ubiquinona reductasa. Recibe hidrógenos del sustrato succinato, que es oxidado por deshidrogenasas, ligadas a la coenzima FAD. Es una flavoproteína y posee tres centros Fe-S. Los equivalentes de reducción del succinato son transferidos a la coenzima Q.

Complejo III, corresponde a la ubiquinona-citocromo *c* reductasa. En su constitución participan los citocromos b_{566} , b_{562} y c_1 y un centro Fe-S. Transfiere electrones desde ubiquinona a citocromo *c*.

Complejo IV, o citocromo oxidasa, contiene a los citocromos a y a_3 y dos iones Cu. Este complejo cataliza la reducción de O_2 a H_2O .

La energía de este proceso exergónico, es convertida en potencial de transferencia de fosforilos para la síntesis de ATP, que se forma a partir de ADP y P_i . La mayor parte del ATP es sintetizado por la actividad de una enzima localizada en la MI de la mitocondria, la ATP sintasa, constituida por la asociación de dos complejos proteicos llamados F_1 y F_0 .

Según la hipótesis quimiosmótica de Mitchell, durante la transferencia de electrones en la CTE, se produce pasaje de protones al espacio intermembrana, el mismo se realiza a nivel de los complejos I, III y IV, utilizando la energía generada. Se crea así, un gradiente electroquímico que es positivo y ácido por fuera de la MI, y negativo y alcalino por dentro de la MI. El mecanismo de acoplamiento del retorno de protones, a la matriz mitocondrial, para la síntesis de ATP, no es exactamente conocido. Ha sido propuesto que F_1 y F_0 (Complejo V), funcionan como una máquina rotatoria. Los protones ingresan dentro de la matriz mitocondrial, a través de un canal en el componente F_0 de la ATPasa. Los cambios conformacionales producidos en el complejo $F_0 F_1$, favorecería la formación de ATP dado que, el pasaje de protones condensaría ADP y P_i para producir ATP. Este compuesto, luego es exportado al citosol en intercambio por ADP. Así el consumo de oxígeno por la CTE, es acoplado a la fosforilación del ADP por la ATPasa, a través del gradiente electroquímico^(4, 53, 90).

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La etapa final de la cadena respiratoria, cataliza la reducción de O_2 a H_2O . Si la reducción del oxígeno no es completa, se forman productos tóxicos, que afectan moléculas constituyentes de las células. Estos productos tóxicos son llamados especies reactivas de oxígeno (ERO), que comprenden el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los radicales libres superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo (OH^{\cdot}). Cuando la CTE es inhibida, el acumulo de electrones en etapas tempranas, favorece la transferencia de los mismos, directamente al oxígeno molecular, para dar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La eliminación de este compuesto se realiza mediante una reacción catalizada por la enzima mitocondrial, superóxido dismutasa dependiente de manganeso, y dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno. La eliminación del peróxido de hidrógeno, puede ser llevada a cabo por dos enzimas: glutatión peroxidasa y catalasa. El H_2O_2 en presencia de metales de transición en estado reducido, puede ser convertido en OH^{\cdot} por la reacción de Fenton. Si la exposición a los radicales libres es crónica, resulta en daño a la mitocondria, proteínas celulares, lípidos y ácidos nucleicos. Mientras que una exposición aguda, puede inactivar los centros

hierro-azufre de los complejos de la CTE, resultando en una menor producción de energía^(4; 53; 90).

APOPTOSIS

En los tejidos de todo individuo normal, constantemente ocurre una remoción controlada de células, por un proceso llamado muerte celular programada o apoptosis. La apoptosis está bajo control genético nuclear y es desencadenada por señales, que pueden proceder de estímulos extrínsecos, y dan lugar a la vía extrínseca, o bien, de estímulos intrínsecos mitocondriales. Así la mitocondria también provee señales para la iniciación de la apoptosis. La MI y el espacio intermembrana mitocondrial, contienen un número de factores que promueven la muerte celular, incluyendo citocromo c, factores que inducen apoptosis (AIF), y en su estado de zimógenos, proteasas especializadas, llamadas caspasas. El citocromo c, se une al factor activante de proteasa apoptótica (APAF-1), que a su vez, interacciona con la procaspasa 9, un zimógeno iniciador. Este complejo (cyt c, APAF-1 y procaspasa 9), constituye el denominado apoptosoma, en el cual la procaspasa, se autoactiva a caspasa 9, e inicia la cascada proteolítica con la estimulación de caspasas efectoras. Otra molécula, la endonucleasa G, sería quien degrada el ADN y el AIF^(90, 78, 72).

La muerte celular, puede ser producida además, por aumento de la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} por la mitocondria, mayor exposición a ERO, o bien por una disminución en la capacidad energética. La alteración de la síntesis de ATP, puede dar lugar a una serie de trastornos que se conocen genéricamente como enfermedades mitocondriales. Este término se aplica fundamentalmente a los defectos en el sistema de la OXPHOS⁽⁸⁵⁾.

ADN MITOCONDRIAL

El ADNmt codifica solo trece polipéptidos que pertenecen al sistema de la OXPHOS, el resto de los polipéptidos, que son mayoritarios, se codifican en el núcleo y son importados finalmente a la mitocondria, ensamblándose con los anteriores^(3, 46, 50, 90). Recién en el año 1949, en trabajos con levaduras, se sugirió la existencia de ADN extracromosómico, al observar una serie de fenotipos metabólicos que se transmitían a través de un factor citoplasmático,

mediante herencia no mendeliana⁽²³⁾. Los indicios más tempranos apuntando a la existencia del ADNmt en vertebrados, se obtuvieron en el año 1962 y el propio ADNmt se descubrió en el año 1963⁽⁵⁸⁾. En la Figura 2A se observa a través de tinciones con colorantes fluorescentes, la presencia de los ADN nuclear y mitocondrial (en rojo el ADNn y como puntos fluorescentes en amarillo, las copias de ADNmt), puede apreciarse además, la diferencia en cantidad y distribución de cada tipo de ADN (Figura 2 A). Las moléculas de ADN mitocondrial son circulares, cerradas y superenrolladas, y están presentes en la matriz mitocondrial. Constan de dos cadenas, la H (cadena pesada, con mayor porcentaje de G) y la L (cadena liviana, por el mayor porcentaje de C). El ADNmt humano, tomado como modelo de todos los mamíferos, consta de 16569 pares de bases (pb), cuya secuencia se conoce en su totalidad² y codifica 37 genes: 2 ARN ribosómicos (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 polipéptidos que integran el complejo multienzimático del sistema OXPHOS: 7, de los 46 polipéptidos del complejo I o NADH: ubiquinona oxidoreductasa (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6); 1, de los 11 polipéptidos que forman el complejo III o ubiquinol: citocromo c óxidoreductasa; 3, de los 13 polipéptidos del complejo IV o citocromo c oxidasa (COI, COII, COIII) y por último 2 de los 16 polipéptidos constituyentes de la ATP sintasa (ATPasa I y II) o complejo V^(3, 58). Una zona no codificante de aproximadamente 1100 pb, contiene el origen de la replicación de la cadena pesada H (O_H), los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión del ADNmt (Figura 2 B).

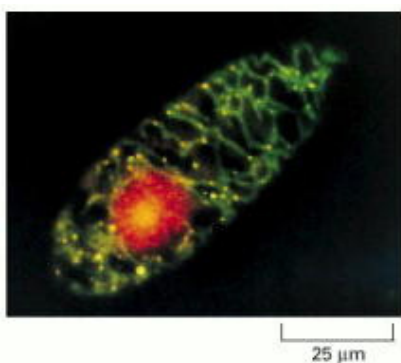


Figura 2 A: ADN Mitocondrial (múltiples puntos amarillos) y ADN Nuclear (rojo) teñidos con colorantes fluorescentes. Célula de *Euglena gracilis*. Imagen tomada de [Alberts et al.](#)

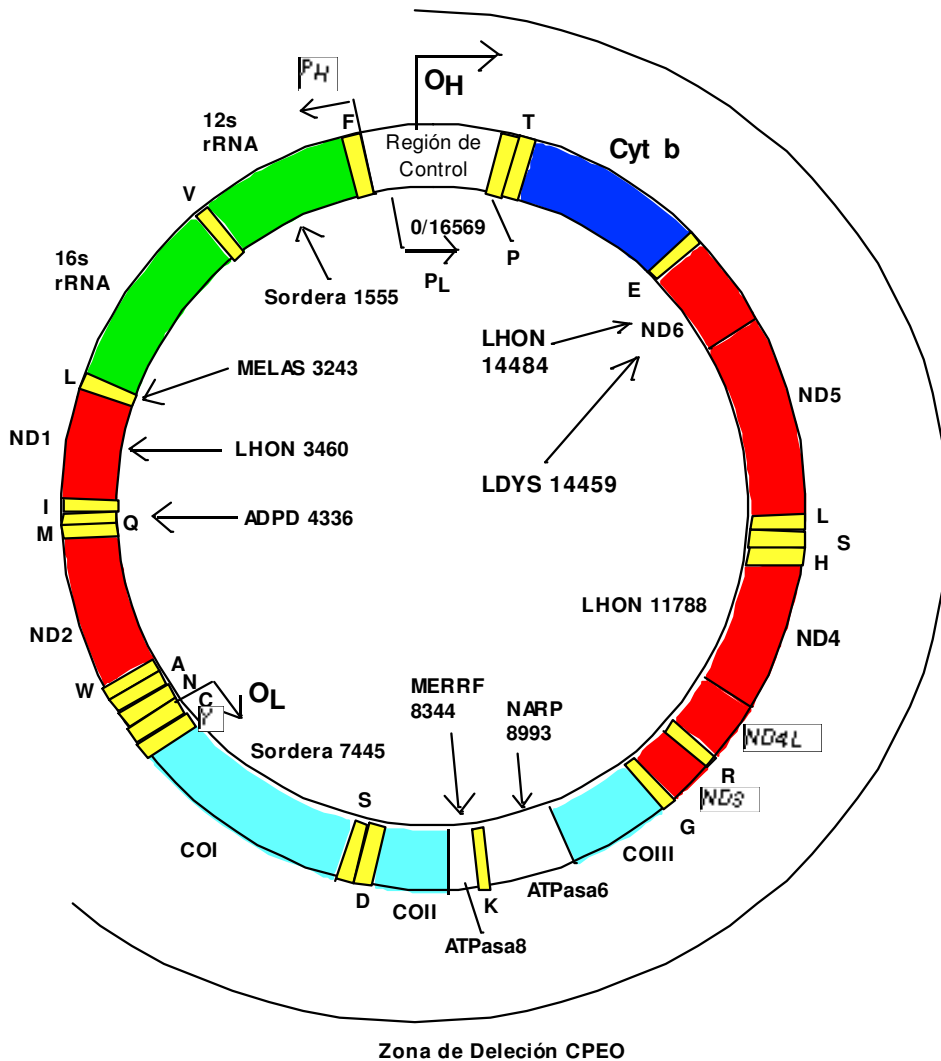


Figura 2 B: En rojo las 7 subunidades proteicas del Complejo I de la cadena respiratoria (de ND1 a ND6); en azul 1 subunidad proteica (Cyt b) del complejo III, en celeste 3 subunidades proteicas (COX I, II, III) del complejo IV, en blanco 2 subunidades proteicas (ATPasas) del complejo V. En total las trece subunidades. En amarillo se indica la ubicación de los genes que codifican para los ARNts (22 en total); en verde la ubicación de los dos genes que codifican para los RNAs y por último la zona Bucle D o región control, única región que no transcribe. P_{H1} , P_{H2} y P_L sentido de la transcripción. O_L y O_H sentido de la replicación.

En general, cada mitocondria contiene varias moléculas de ADNmt, que no se encuentran como moléculas aisladas, sino, asociadas con proteínas formando complejos conocidos como nucleoides, que contienen entre 2 y 10 moléculas

de ADNmt por mitocondria⁽⁴⁶⁾. Son parte de estos nucleoides, el factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA o TFAM), la proteína de unión al ADN de la hebra única (mtSSB), la helicasa Twinkle y la ADN polimerasa gamma (POLG), además de otras proteínas todavía no identificadas⁽⁵⁸⁾.

CONCEPTO DE HOMOPLASMÍA Y HETEROPLASMÍA

Cada célula contiene cientos de mitocondrias y cada una de ellas puede contener 2 a 10 copias de ADN, lo cual origina una situación particular, diferente de aquella encontrada en el núcleo en relación a variantes alélicas. Dada una mutación en un ADNmt, se creará una población constituida por una mezcla de moléculas de tipo salvaje y mutante, situación conocida como heteroplasmía. El porcentaje de ADNmt mutante, puede variar entre el 0% (homoplásmico tipo salvaje) a 100% (homoplásmico mutado). En principio, la distribución de mitocondrias a las células hijas en la división celular (segregación), es al azar y por lo tanto, puede provocar variaciones en los porcentajes de mutación a lo largo de las diferentes líneas celulares (segregación replicativa), lo cual, es la base de la característica multisistémica de las enfermedades mitocondriales (expresividad variable) y del efecto umbral^(58, 88, 17, 27, 28). La tasa de mutación espontánea del ADNmt es diez veces superior a la del ADNn. Como consecuencia de esto, hay una gran variación de secuencias entre especies e incluso entre individuos de una misma especie. En el hombre, se ha calculado que dos individuos escogidos al azar, tendrían en una zona sin traducción de su ADNmt, el promedio de 50 a 70 nucleótidos (nt) diferentes en su secuencia. Si la mutación se pone de manifiesto por primera vez y provoca patología, se le da el término de efecto fundador⁽⁹⁰⁾.

HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES

El ADNmt tiene diez veces más alto grado de posibilidades de mutaciones, que el ADNn, es además alto el número de copias y de recombinación en la segregación. Los cambios mutacionales que se producen, se ha denominado variación del ADNmt. Estas variaciones son consideradas neutrales o sinónimas, que van prevaleciendo a través de la corriente genética, generando acumulación secuencial a lo largo de la línea materna. Este polimorfismo que

va ocurriendo decenas, centenas, miles de años a través del tiempo, hoy, está presente en una determinada población en alta frecuencia, creando “haplogrupos” o “haplotipos” (subgrupos del haplogrupo), lo cual es importante conocerlo para el estudio de las mutaciones mitocondriales que podrían considerarse no ya sinónimas, sino patológicas. Todos los ADNmt partirían de un simple árbol filogenético, considerándose una distribución de tres ramas, una más vieja, la Africana (pérdida del sitio Ddel en la región control y del nt 10394) de la cual derivan las otras dos ramas: Europea, en la cual se ha identificado que un 75% no tienen la pérdida del sitio Ddel y un 25% si; en esta rama también se ha observado los subgrupos H, I, J, K, T, U, V, W, X o sus combinaciones; y la tercer rama, la Asiática, que presenta subgrupos C, D, G, y E. En América, se ha identificado los haplogrupos A, B, C y D y se considera en esta región, una frecuente mezcla de razas ^(82, 90).

La mayoría de los análisis filogenéticos en el ADNmt, se han realizado sobre la observación de la variación en la secuencia del primer segmento hipervariable (HVS-I) de la región control (el alto grado de mutación como su variación), pero el estudio de esta región solamente, podría llevar a error. Para evitar este error, actualmente se realiza el análisis de todo el genoma mitocondrial, por PCR-RFLP y análisis secuencial. Este estudio permite la identificación de polimorfismos, haplotipos, como también de mutaciones que podrían ser consideradas patológicas ^(82, 90).

REPLICACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL

La replicación del ADNmt es unidireccional y asimétrica. Las dos hebras del ADNmt se replican de forma continua a partir de dos orígenes de replicación (O_H y O_L) (Figura 2 B) que están ampliamente separados, pero se requiere de un desplazamiento extenso de una de las hebras del ADN parental, durante la síntesis de la hebra H. Este proceso comienza con la síntesis de un ARN cebador por la ARN polimerasa (ARNpol). Para que esta pueda acceder al ADN molde y comience la replicación del ADNmt, se requiere de un cambio conformacional en la molécula de ADN, que consiste en su inclinación y desenrollado, inducido por la unión del factor de transcripción TFAmt (TFAM) a

la doble cadena del ADN. La topoisomerasa de tipo I, específica de la organela, elimina las torsiones del ADN superenrollado, rompiendo temporalmente enlaces en la molécula esqueleto de ADN. La helicasa mitocondrial desenrolla la doble hebra, rompiendo los enlaces de hidrógeno que mantienen ambas cadenas enfrentadas para producir molde de hebra única. Una proteína de unión al ADN de hebra única (mtSSBM) mantiene la integridad de los intermediarios replicativos, previniendo su renaturalización y acelera la velocidad de síntesis de ADN. Shoubridge^(75, 5, 94) ha descrito dos nuevos factores de transcripción (TFMB1 y 2), que forman heterodímeros con la ARNpol activándola⁽⁷⁵⁾. La ARNpol transcribe un fragmento de ADN en la región del promotor de la cadena liviana (P_L), mientras que, en el origen de replicación de la hebra pesada (H) (O_H), este cebador precursor, se escinde por una endonucleasa procesadora del ARN mitocondrial (RNase MRP). La elongación de la hebra naciente de ADN, se lleva a cabo por la ADN polimerasa gamma (ADNpol gamma – POLG). Esta enzima consta de dos subunidades, una catalítica con actividades de polimerización 5'-3' y exonucleolítica 3'-5', y una segunda, la subunidad accesoria pequeña (b), que se une al ADN de doble hebra, incrementando la afinidad de la enzima por el ADN, confiriéndole procesividad a la subunidad catalítica. Además, está implicada en el reconocimiento del cebador. La mayoría de eventos de inicio de la síntesis de la hebra H terminan prematuramente después de aproximadamente 700 nucleótidos, y tras una secuencia conocida como secuencia asociada a la terminación (TAS). Los niveles de terminación de la replicación, juegan un papel importante en la regulación del número de copias de ADNmt. Así, la terminación prematura de la replicación, provocaría la aparición de una estructura conocida como bucle de desplazamiento (D-loop), que consiste en la porción de ADN dúplex recién sintetizada, más la hebra H parental desplazada. Cuando la síntesis de la hebra H naciente es capaz de continuar a través de la región de terminación prematura, su elongación continúa de forma unidireccional hasta que, después de recorrer dos tercios de la molécula, desplaza la secuencia de la hebra H parental, capaz de establecer una estructura lazo-tallo que constituye el origen de replicación de la hebra L (O_L) y sirve como región de reconocimiento de una ADN primasa, específica de

mitocondrias, la cual sintetizará un cebador corto de ARN, y después la POLG elongará la cadena de forma unidireccional y en sentido contrario al de la hebra H naciente. Al final del proceso de replicación, la topoisomerasa de tipo II introduce los superenrollamientos que mantendrán la molécula en un estado funcional. El modelo es asimétrico, de síntesis continua en cada hebra y carece de fragmentos de Okazaki^(58, 57, 94).

Ha sido propuesto otro modelo de replicación bidireccional, simétrica y desde un único origen de replicación como en el ADN bacteriano, pero los estudios realizados no son concluyentes todavía^(5, 94).

PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN EN EL ADNmt EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La transcripción del ADNmt se inicia a partir de tres promotores diferentes, uno para la cadena liviana (L) y dos para la cadena pesada (P_{H1} y P_{H2}) (Figuras: 2 B, y 3), que darán lugar a tres moléculas policistrónicas largas que se procesarán por cortes endonucleolíticos precisos delante y detrás de cada ARNt. El P_{H1} está localizado 16 nt arriba del gen del ARNt^{Phe} (posición 561) y finaliza en el extremo 3' del gen ARNr 16S. Esta transcripción es responsable de la síntesis de los dos genes ARNrs, y de los genes ARNt^{Phe} y ARNt^{Val}. La segunda transcripción, tiene el sitio de iniciación de la cadena, ubicado en el promotor P_{H2} , dos nt arriba del extremo 5' del gen ARNr 12S (posición 646) y produce una molécula policistrónica de la cadena H. Los ARNms para los doce polipéptidos y los 14 ARNts, derivan del procesamiento de este policistrón⁽²⁶⁾ (Figura 3). El factor de terminación (TERFm) actúa uniéndose en el gen del ARNt^{Leu(UUR)} en una secuencia inmediatamente posterior al gen del ARNr 16S^(44, 69). La cadena L se transcribe mediante una única unidad de transcripción que empieza en el lugar de iniciación L (O_L), cerca del extremo 5' del ARN 7S (poli (A)-ARN 18)⁽¹⁸⁾, dando lugar a 8 ARNts y al único ARNm (ND6) codificado en esa cadena. El inicio de la síntesis de ADN depende también de la actividad de esta unidad de transcripción, que sintetiza el cebador de la replicación. Para llevar a cabo el proceso de transcripción se necesita una ARN polimerasa específica (h-mt Rpol), codificada en el ADNn^{(81,}

⁵⁷⁾, dos factores de transcripción implicados en la iniciación (TFAmt y TFBmt) ⁽⁵⁷⁾ y uno de terminación (TERFm)^(44, 25, 70), todos ellos codificados en el ADNn. El modelo de transcripción descripto, explica, como la iniciación, juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica, y describe el modo de síntesis diferencial de ARNrs y ARNms⁽⁵⁷⁾. En esta regulación parece jugar también un papel muy importante la fosforilación del factor de terminación TERFm. Como se deduce, las dos cadenas de ADN se transcriben completa y simétricamente, y los productos de transcripción del ADNmt humano aislados incluyen los 2 ARNrs (ARN 12S y 16S), los precursores de los ARNts y los 13 precursores de los ARNms poliadenilados. Los 13 polipéptidos codificados en el ADNmt, tienen un tamaño que varía entre 70 y 610 aminoácidos. Los ARNms que los codifican contienen exclusivamente la secuencia del patrón de traducción y una cola de unas 55 adenosinas en el extremo 3'. Los ARNms mt humanos comienzan directamente por el codón de iniciación AUG, AUA o AUU o bien tienen muy pocos nucleótidos (1 a 39 delante de los mismos). Carecen por tanto de uno de los caracteres típicos de los ARNm de otros sistemas, como es la presencia de un tramo no codificante en el extremo 5' ^(57, 38). Tampoco contienen la capucha del extremo 5'. Asimismo, el extremo 3' de la mayor parte de los ARNms carecen de una región no codificante y finalizan U o UA, generándose el codón de terminación completo (UAA) por la poliadenilación postranscripcional⁽⁶¹⁾. Estos ARNms carecen de una secuencia indicadora de poliadenilación⁽²⁵⁾.

Cada cadena tiene su propio origen de replicación y de transcripción, y se transcribe "en una sola pieza"; es decir, se produce una sola molécula de ARN al que se denomina transcrito primario de esa cadena. (Figura 3)

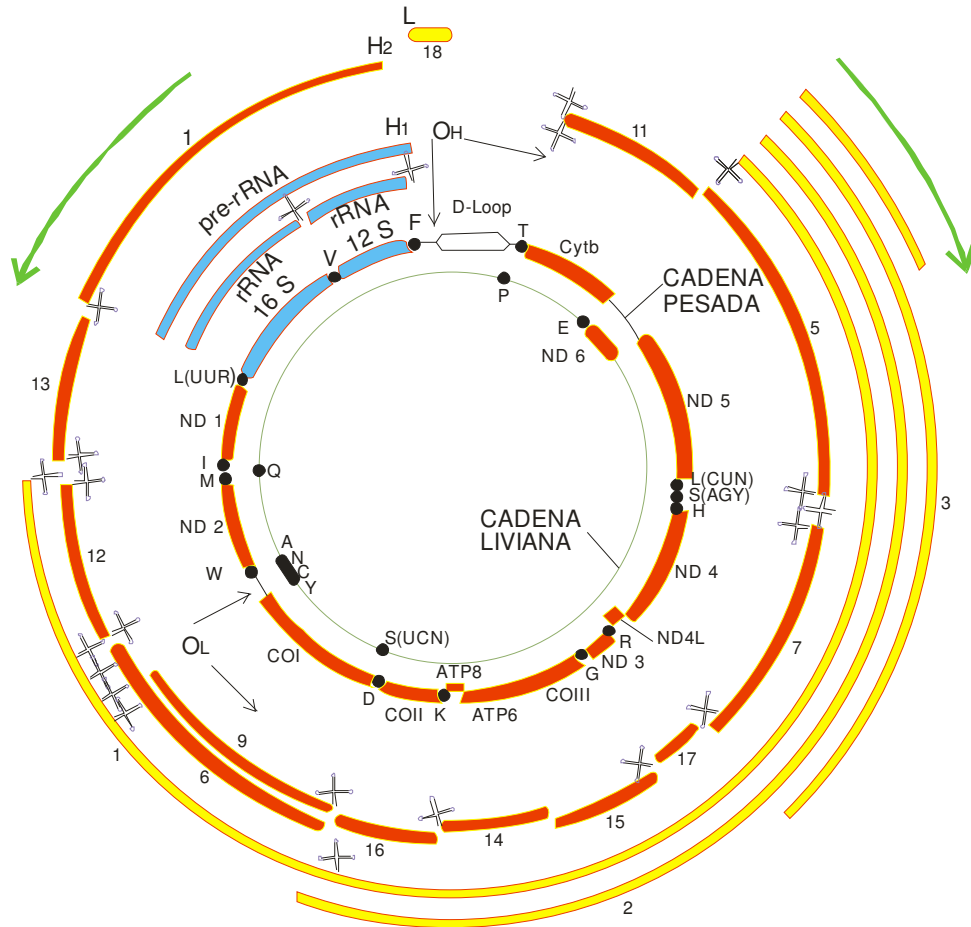


Figura 3: En esta figura se observa el mapa genético y de transcripción del ADNmt humano. Los dos círculos internos, representan ambas cadenas del ADNmt, con los genes que codifican: en celeste: los ARNrs, en negro: los ARNts y en rojo: los genes que codifican las subunidades proteicas. En los círculos externos, los genes que son codificados en la cadena H, son identificados: en celeste y en rojo los ARNs derivados de las unidades de transcripción H₁ y H₂; y los genes que se transcriben en la cadena liviana, en amarillo. Los genes que transcriben a los ARNts se indican con un código de letras, que corresponde a la nomenclatura del amino ácido respectivo. O_H y O_L, representan el origen de la replicación para las cadenas pesadas y livianas respectivamente. H₁, H₂ y L indican el sitio de iniciación para las tres unidades de la transcripción de la cadena pesada y liviana respectivamente. Las flechas indican O_H, O_L, y en la región externa del círculo, la dirección de la replicación y de la transcripción en ambas cadenas. Los números en las cadenas externas indican el orden de los genes en que se va realizando la transcripción. (Dibujo adaptado de Diana Martínez Redondo)

TRADUCCIÓN DE LOS ARNms MITOCONDRIALES

Los ARNms mt se traducen en el interior de las mitocondrias. Estas organelas contienen ribosomas específicos, en los cuales están incluidos los componentes proteicos (78 proteínas ribosómicas) codificados en el ADNn y los ARNs en el ADNmt. La economía genética del ADNmt, también ha propiciado otras características especiales en los sistemas de traducción. Los ARNrs son más pequeños que los citosólicos y de procariotas y han incorporado nuevas proteínas para reemplazar las funciones perdidas en los segmentos de ARNr eliminados. Así, los ribosomas mt son especialmente ricos en proteínas.

El código genético utilizado por la mitocondria es algo diferente del código universal. Mientras en el ADNmt humano el codón UGA codifica triptófano, en el ADNn es codón de terminación. Los codones AUA y AUU se utilizan, al igual que AUG como codones de iniciación, y AGA y AGG, que son codones para arginina en el código universal, en el ADNmt son señales de terminación.

Los polipéptidos sintetizados en las mitocondrias, interaccionan con los componentes del sistema OXPHOS codificados en el ADNn, y sintetizados en ribosomas del citosol, luego importados a la mitocondria para producir el sistema OXPHOS. Así, la biogénesis de este sistema depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear^(3, 18, 34, 46).

LAS PROTEÍNAS DE LA MITOCONDRIA HUMANA

Las proteínas mitocondriales realizan las funciones metabólicas y de transporte características de cualquier organela celular, participan en rutas metabólicas como enzimas, o en la estructura de las membranas, por ejemplo transportadores. Existen cientos de proteínas mitocondriales que intervienen en la formación de las estructuras y/o en los procesos metabólicos, y que necesitan del correcto funcionamiento del genoma que las codifica. La mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en genes nucleares, y su ARNm es traducido en el citosol. Por lo tanto es necesaria la existencia de "péptidos guía" o secuencias guía, que señalan el destino de

estas proteínas mitocondriales que se sintetizan en el citosol. De esta forma, llegan a su destino correcto; es decir, al lugar donde llevarán a cabo su función estructural y/o metabólica, ya sea en la matriz mitocondrial, la membrana interna, el espacio intermembrana o en la membrana externa. Como ya hemos mencionado, solo una pequeña parte de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma mitocondrial en humanos ⁽⁵⁸⁾.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL

A pesar del gran conocimiento que se ha llegado a obtener sobre el ADNmt y su expresión, se tiene muy poca información acerca de la regulación de su expresión y de la coordinación con la expresión del genoma nuclear. No obstante, se ha demostrado que las mitocondrias son capaces de mantener su capacidad transcripcional durante varias horas, después de ser aisladas de su entorno celular, y de modular la transcripción en respuesta a situaciones fisiológicas tales como la demanda energética celular, la falta de aporte de factores citoplasmáticos u hormonas. Recientemente se han descrito mutaciones en genes modificadores nucleares, implicados en la expresión del ADNmt, como el gen TRMU, o bien de genes nucleares asociados como el gen de la conexina 26^(34, 35, 92, 99).

ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

El concepto de enfermedades mitocondriales fue introducido en el año 1962 por Rolf Luft, endocrinólogo, por Lars Ernster, biólogo celular y Björn Afzelins, morfologista, al describir una joven paciente suiza con hipermetabolismo no causado por una disfunción tiroidea y que presentaba un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en mitocondrias de músculo estriado^(17, 56). La primera mutación se describió en el año 1988; esta mutación se encuentra en la posición 8344 en el ARNt^{Lys}, y causa el síndrome de MERRF (Epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas). Desde entonces se han descrito decenas de mutaciones patológicas (puntuales, deleciones, inserciones, depleciones, duplicaciones en el ADNmt). En la mayoría de los casos se observa en los ARNts, y en menor cantidad, en los ARNrs mitocondriales (www.mitomap.org).

Si la presentación de la enfermedad es sindrómica, las manifestaciones clínicas de una citopatía mitocondrial son muy variadas, y en algunos casos va a estar influenciada por el porcentaje de heteroplasmía para una misma mutación, por ejemplo, los distintos fenotipos clínicos que acompañan a la mutación A3243G, ubicada en el gen que transcribe al ARNt^{Leu} (59, 45, 15, 62).

La presencia de los siguientes signos clínicos, pueden sugerir enfermedad mitocondrial: demencia, desórdenes motores, intolerancia al ejercicio, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, ptosis, oftalmoplejía, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera neurosensorial, cardiomiopatía, disfunción hepática y pancreática, Diabetes Mellitus, falta de crecimiento, anemia sideroblástica, pseudo obstrucción intestinal, nefropatías, acidosis metabólica, endocrinopatías y otras más secundarias. En general, son trastornos multisistémicos que afectan fundamentalmente tejidos y órganos, que son los más dependientes del aporte de energía mitocondrial (SNC, músculo cardíaco y estriado, riñones, sistema endócrino, aparato auditivo y visual). En la actualidad, gran parte de los estudios de enfermedad mitocondrial, están referidos a defectos de la cadena respiratoria, que posee un dual control genético (ADNn y ADNmt). Además, las enfermedades mitocondriales originadas por una mutación en el ADNmt, son un grupo de patologías que tienen en común el estar producidas por defectos en los componentes de los complejos multienzimáticos I, III, IV y V del sistema OXPHOS, y que producen un defecto en la síntesis de ATP. Se estudia principalmente: deficiencia de Citocromo C Oxidasa (complejo IV) y NADH deshidrogenasa (complejo I) (17, 58, 50).

SORDERAS MITOCONDRIALES

La función coclear es muy dependiente de la producción de ATP. Una disfunción en el ADNmt, podría conducir a pérdida de la audición, ya sea, de presentación sindrómica o no sindrómica; con un alto grado de especificidad de tejido y variable grado de penetrancia (36, 43, 85, 68).

FISIOLOGÍA DE LA AUDICIÓN

La cóclea es el sitio en donde la energía mecánica de las ondas sonoras, es convertida en potencial de acción del nervio coclear, iniciando así la transmisión de la información auditiva hasta los centros del tronco cerebral y a centros superiores en la corteza cerebral. Es un proceso necesario para la comprensión e interpretación de los sonidos y ruidos. La cóclea está localizada en la porción petrosa del hueso temporal; en su longitud está dividida en tres compartimientos: La escala vestibular, la escala media y la escala timpánica. La escala media contiene endolinfa con altas concentraciones de potasio y bajas concentraciones de sodio. Esta composición electrolítica de la endolinfa de la escala media del oído interno, genera una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de la célula, que juega un papel central en el proceso de transducción de la información que se lleva a cabo en la cóclea (Figura 4)⁽⁶⁶⁾.

Los receptores auditivos son las células ciliadas del órgano de Corti. El extremo de las estereocilias de las células ciliadas externas, están embebidas en la membrana tectoria. Estas cilias tienen un citoesqueleto de actina y formas no convencionales de miosinas, que están fijadas a una lámina cuticular rica en actina, que a su vez, sujeta el citoesqueleto celular de la estereocilia. Las estereocilias, están ancladas unas a otras cerca de su ápice, de forma tal que se mueven en conjunto. Las células ciliadas internas son los receptores primarios y reciben la mayoría de las fibras aferentes del nervio coclear. Las células ciliadas externas, reciben la mayor parte de la información eferente del mismo nervio y tienen por función promover la discriminación de frecuencia y amplificación de la señal; de forma que modulan el funcionamiento del receptor primario⁽⁶⁶⁾.

Los movimientos de la membrana timpánica en respuesta a las ondas sonoras, son transmitidas y amplificadas por la cadena ósea (martillo, yunque y estribo) y retransmitidos como ondas de compresión hacia la escala vestibular de la cóclea. Estas ondas mueven la membrana basilar causando la deflexión de las estereocilias contra la membrana tectoria. La deflexión de las estereocilias,

conduce a la apertura de los canales iónicos, que permiten entrada de potasio al interior de la célula ciliada, induciendo su despolarización. La despolarización celular genera la activación de los canales de calcio, conllevando a movilización de vesículas sinápticas y posterior liberación del neurotransmisor en el espacio sináptico, de esta forma se inicia la activación del nervio coclear. Todo este proceso fisiológico requiere del aporte de energía en la forma de ATP.

Las moléculas de miosina no convencional, juegan un papel importante en el proceso de transducción, manteniendo la tensión entre las uniones de los ápices de las estereocilias.

Para mantener el funcionamiento de la célula ciliada, los iones de potasio que entran en al interior, deben salir, y además debe mantenerse una alta concentración a nivel de la endolinfa. Con el fin de mantener este proceso, se ha descrito un mecanismo de reciclaje del potasio, mediante el cual estos iones salen de la célula ciliada a nivel de la membrana basolateral, por un canal de potasio, alcanzando las células de soporte al órgano de Corti. Posteriormente difunden en forma pasiva de célula a célula, a través de las uniones brecha (gap junctions), compuestas por una proteína multimérica denominada conexina 26, presente en las células de soporte del órgano de Corti, de las células del limbo y del ligamento espiral. Una vez que los iones de potasio alcanzan la vascular estriada, son activamente bombeados hacia la endolinfa por canales de potasio dependientes de voltaje ⁽⁶⁶⁾.

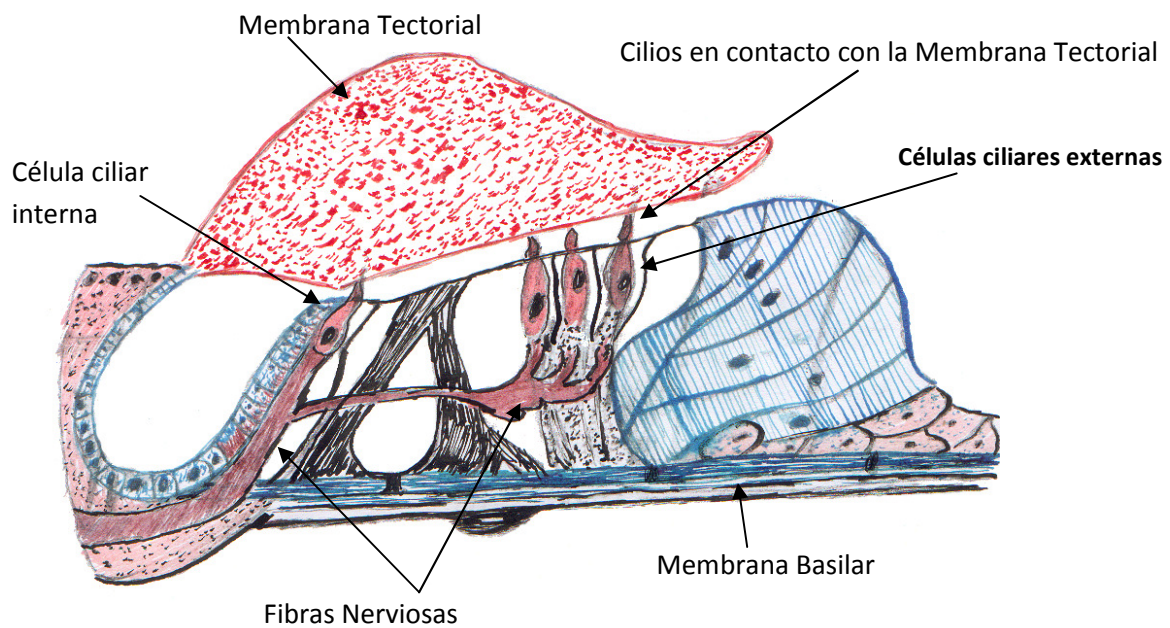


Figura 4: Esquema del oído interno

SORDERAS NEUROSENSORIALES MITOCONDRIALES SINDRÓMICAS

Una de las características de la patología mitocondrial es su complejidad. En general son multisistémicas, muchos órganos o tejidos se pueden ver afectados; y no es raro que una misma mutación de lugar a fenotipos muy diferentes o que distintas mutaciones produzcan el mismo fenotipo. Hoy día todavía se conoce muy poco sobre los mecanismos patogénicos y menos aún sobre las terapias a emplear^(36, 96, 30, 45). Las enfermedades producidas por daños en el ADNmt se pueden dividir en tres grandes grupos según estén asociadas a:

- 1) mutaciones puntuales tanto en genes codificantes de proteínas, como de ARNts y ARNrs.
- 2) reorganizaciones (deleciones y duplicaciones)
- 3) Supresión del ADNmt (disminución del número de copias).

Dentro de la clasificación de S NS S del ADNmt por mutaciones puntuales, en genes codificantes de proteínas, se han descrito los siguientes síndromes: Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON); Síndrome de Leigh de herencia materna (MILS); Síndrome de neuropatía periférica, ataxia y retinitis pigmentaria (NARP); de intolerancia al ejercicio y otros^(72, 82, 96). Las mutaciones puntuales en genes ARNts producen los siguientes síndromes: Síndrome de encefalopatía mitocondrial con fibras rojas rasgadas, con afectación del sistema nervioso central y músculo esquelético (MERRF)⁽⁵²⁾; y Síndrome de acidosis láctica, encefalomiopatía y accidentes cerebrovasculares (MELAS); en este síndrome, el porcentaje de heteroplasmía de la mutación determina la presentación clínica; si el porcentaje es del 95% el fenotipo es MELAS, si el porcentaje de heteroplasmía es más bajo (41 a 61%), el cuadro clínico cambia, y presenta: Diabetes Mellitus Tipo 2 y Sordera neurosensorial o bien, Diabetes Mellitus Tipo 2, S NS y cardiomiopatía (MDM) ^(26,45,54, 62,71, 6,11,15,91, 95, 73). La frecuencia de esta mutación dentro de la población de individuos afectados con Diabetes Mellitus, varía entre el 1 al 6%, según diferentes autores^(29, 15, 62) y como toda citopatía mitocondrial se hereda por línea materna. La MDM se ha observado asociada a Sordera Neurosensorial, los estudios audiológicos y neurológicos sugieren que la pérdida de la audición por mutación A3243G es debida a una patología coclear y no a una lesión neurológica; la vía vestibular raramente está comprometida⁽⁹¹⁾. En estudios post mortem se ha observado que la disminución del ATP produce degeneración de la vascular estriada de las células del oído externo en la cóclea (esta participa en el mantenimiento de la endolinfa, con una concentración aumentada de K⁺ para la buena función de la cóclea) y también produce una disminución en las células del ganglio espiral⁽⁹¹⁾.

Otras mutaciones que se consideran sindrómicas, y asociadas a sordera neurosensorial, son las que se presentan en el gen ARNt^{ser} (UCN):

a) MUTACIÓN 7472 insC

Esta mutación se ha reportado como sindrómica, con pérdida de la audición, ataxia y mioclonus en una familia de Sicilia (Italia). La inserción termina

adicionando una citocina a las seis citocinas que forman parte del gen del ARNt^{ser (UCN)}. Esta mutación alteraría la estructura TψC loop en la hojuela de la estructura secundaria de este gen. El porcentaje de heteroplasmía con que se presenta, determina la expresividad del fenotipo, con una disminución de la actividad del complejo I, con bajo consumo de oxígeno y acidosis láctica, lo que indicaría falla en la fosforilación oxidativa⁽⁸⁰⁾.

b) MUTACIONES T7510C Y T7511C

Se identifica la mutación T7511C en el gen ARNt^{ser (UCN)} ADNmt con un alto porcentaje de heteroplasmía (84 a 92%), pero también se puede manifestar en forma homoplásmica. La presencia de la mutación no se la puede correlacionar con la presentación clínica, ya que varía de un individuo a otro, respecto de la severidad de la pérdida auditiva y a la edad del individuo, en la cual se manifiesta la enfermedad. Se afecta la cóclea y la retrocóclea. La biopsia de músculo ha mostrado que está afectada la COX, observado por la deficiencia de fibras dependientes de COX, aunque no se han observado fibras rojas rasgadas. El análisis bioquímico mostró muy disminuída, la actividad de la COX. La mutación T7510C tiene una presentación heteroplásmica y generalmente no sindrómica^(16, 10, 79, 41).

SORDERAS NEUROSENSORIALES MITOCONDRIALES NO SINDRÓMICAS

Las mutaciones en el ADNmt, especialmente en el gen ARNr 12S y en el gen ARNt^{ser(UCN)}, son consideradas una de las causas importantes, capaz de producir sordera neurosensorial NS, e inducida por tratamiento con antibióticos aminoglucósidos (ATB-AG)^(39, 69). Los aminoglucósidos, tales como la gentamicina, estreptomina, kanamicina y tobramicina entre otros, son drogas clínicamente muy importantes. Son usadas para controlar infecciones por bacterias que requieren de antibióticos de amplio espectro.

Consideraciones sobre antibióticos aminoglucósidos:

Los aminoglucósidos fueron descubiertos en 1944, derivan de actinomiceto y la obtención de los mismos no ha cesado⁽⁵⁵⁾. En este grupo se encuentran: estreptomina, neomicina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina,

entre otros; de acuerdo a los estudios realizados por Hutchin y Estivill^(39, 55), el mecanismo de acción propuesto, es que actúan a nivel de la subunidad ribosómica 16S de *Escherichia coli*^(39, 24). Los ATB-AG perturban el ciclo normal de la función ribosomal, al interferir, al menos parcialmente, en el inicio de la síntesis proteínica, debido a lo cual se acumulan complejos anormales de iniciación. Otro efecto, es que inducen “lectura errónea” de la plantilla de ARNm y se produciría síntesis de proteínas anómalas^(39, 55). Se absorben rápidamente en los sitios de inyección intramuscular. En el plasma las concentraciones máximas se observan entre 30 a 60 minutos. Las concentraciones de los ATB-AG en secreciones y tejidos son bajas. Se detectan altos valores únicamente en la corteza renal y en la endolinfa y perilinfa del oído interno. Se eliminan casi por completo mediante filtración glomerular.

Parecería que la presencia de mutaciones en los genes mitocondriales ARNr 12S y ARNr^{ser(UCN)}, expondría al individuo a mayor severidad en la aparición y profundidad de la sordera neurosensorial producida por ototoxicidad^(100, 69).

GEN ARNr 12S

En el gen ARNr 12S, dos mutaciones: A1555G y C1494T, se cuentan como las más frecuentes de producir sordera y ototoxicidad.

a) Mutación A1555G

Provoca en la mayoría de los casos, una pérdida de la audición irreversible, relacionada con la administración de antibióticos aminoglucósidos (ATB-AG), como la estreptomicina, gentamicina o kanamicina. El ribosoma mitocondrial en la célula de la cóclea, es el blanco de la ototoxicidad de los aminoglucósidos. La mutación ocurre en una región altamente conservada del gen del ARNr 12S, lugar donde se unirían los ATB-AG⁽⁵⁵⁾. Esta mutación es generalmente homoplásmica, y los miembros de una misma familia, pueden presentar una pérdida de audición severa posterior a la administración de ATB-AG, o bien, hipoacusia moderada sin exposición a aminoglucósidos, hasta una audición completamente normal⁽⁶⁸⁾. Evidencias posteriores mostraron que la mutación A1555G también se manifiesta de manera heteroplásmica, aunque con niveles

de ADNmt mutado superiores al 85%^(21, 24).

Muchas preguntas permanecen sin respuesta respecto al mecanismo por el cual la mutación ejerce su efecto. Los ATB-AG parecerían ser los agentes causales de la sordera en los individuos portadores de la mutación, pero aún no está del todo claro porqué la sordera, se manifiesta en algunos pacientes luego de la administración de aminoglucósidos, mientras que en otros la sordera aparece espontáneamente. Tampoco resulta claro porqué esta patología aparece a diferentes edades, ya que algunos pacientes con esta mutación son sordos desde temprana edad, mientras que otros no muestran síntomas hasta la adultez^(21, 76).

b) Mutación C1494T

En presencia de la mutación C1494T y ausencia de ATB-AG, los pacientes muestran un comienzo tardío, pero progresivo de la pérdida de la audición. La administración de ATB-AG, aparentemente se correlaciona con la severidad y progreso de la sordera.

La presencia de esta mutación, al igual que la mutación A1555G, es que crea un apareamiento de bases en el sitio A del ARNr 12S (U1494 – 1555A) y por lo tanto genera un cambio conformacional de la molécula (Figura 5).

La mutación C1494T produce una disminución en la síntesis de la proteína y afecta la capacidad respiratoria de las células. Esta alteración bioquímica se observa incrementada en presencia de un aminoglucósido⁽⁹⁷⁾.

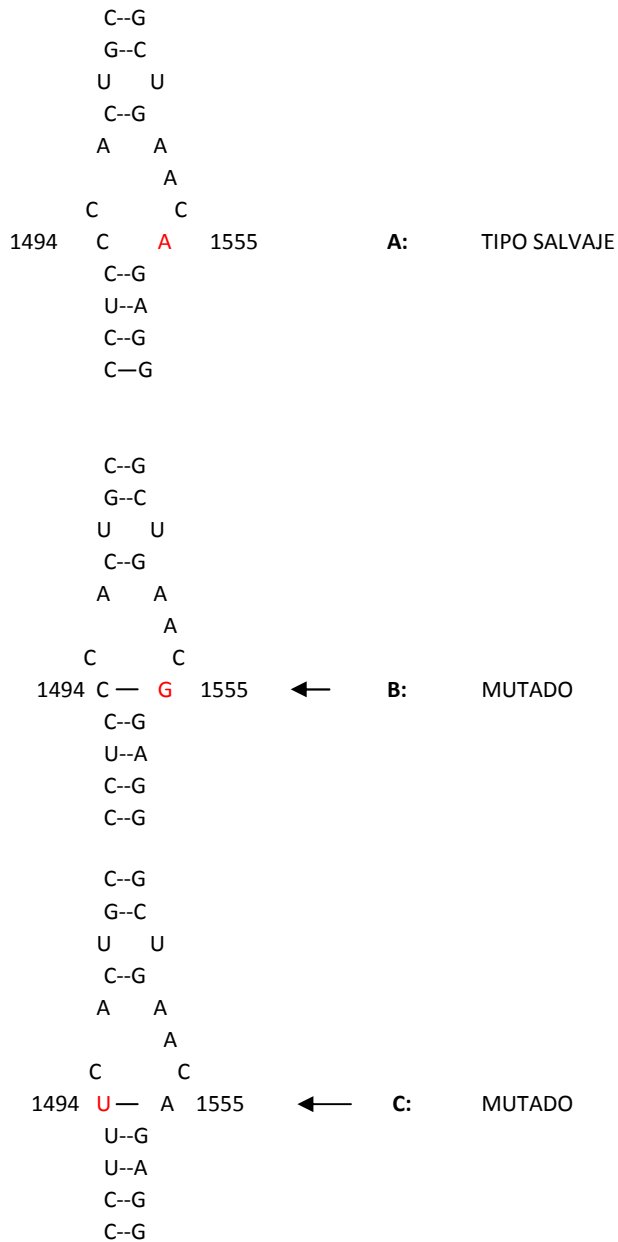


Figura 5: Esquema de un fragmento del sitio A del ARNr 12S, que incluye las posiciones 1494C, y 1555A. A) Tipo salvaje. B) Mutación A1555G y C) Mutación C1494T. El apareamiento de las bases nucleotídicas producidas por las mutaciones, condicionaría una alteración en la estructura secundaria de la molécula, que pueden llevar a cambios en la expresión del fenotipo.

Otras mutaciones han sido descritas en este gen ARNr 12S y asociadas a ototoxicidad:

c) Mutación A827G

En dos familias Chinas no emparentadas entre sí, se ha descrito la presencia de la mutación A827G en el gen ARNr 12S, como causa de producir sordera neurosensorial por línea materna y de estar asociada a ototoxicidad^(89, 8).

La mutación también se localiza en el sitio A del ARNr 12S, altamente conservado en diferentes especies. Es posible que la alteración de la estructura terciaria o cuaternaria de este ARNr 12S producida por la mutación A827G, podría llevar a disfunción mitocondrial y jugaría un rol, tanto en la producción de la sordera neurosensorial como de la ototoxicidad^(89, 8).

d) Mutación T1095C

Esta mutación también está asociada a pérdida de la audición y ototoxicidad con fenotipo variable. Esta transición disrumpe un par de bases de la hélice 25 del ARNr 12S; sugiriendo un importante rol en la iniciación de la síntesis de la proteína. La alteración de la estructura terciaria o cuaternaria de este ARNr 12S producida por la mutación T1095C, podría ser la causa de la alteración de la síntesis proteica⁽⁹⁸⁾.

e) Mutación 961 del o ins, o T961C:

La mutación 961 ins C, se la ha descrito en cosegregación con la mutación A1555G, esta inserción, podría actuar como un factor secundario, en la expresión del fenotipo de sorderas, producidas por la mutación A1555G y ototoxicidad. Aunque se ha presentado en asociación a la mutación A1555G, en controles, la mutación 961 ins C no se la ha observado⁽⁴⁸⁾.

Las mutaciones en el gen ARNr 12S se presentan generalmente en forma homoplásmica y por línea materna.

GEN ARNt^{SER (UCN)}

Tres mutaciones en el gen ARNt^{ser(UCN)} han sido descritas y asociadas con sordera neurosensorial (NS), y algunas de ellas relacionadas con ototoxicidad. La mutación A7445G; A7443G; G7444A. Estas mutaciones afectan a genes codificados por la cadena pesada (H), como por la cadena liviana (L).

a) Mutación A7445G (gen ARNt^{ser(UCN)}).

Esta mutación se encontró inicialmente en dos familias escocesas, que presentaban pérdida de la audición de diferente severidad, y en una familia de Nueva Zelanda; la presentación siempre es homoplásmica⁽³³⁾. En la familia de Nueva Zelanda y en otra familia japonesa, la presentación de esta mutación sería sindrómica, ya que estaría asociada con queratodermia palmo-plantar⁽⁷⁴⁾.

Esta mutación cambia a nivel de la cadena pesada (H), el codón de terminación AGA (en el gen que codifica al ARNm de la subunidad de la Citocromo oxidasa I (COI)) por AGG, que es también codón de terminación⁽⁷⁰⁾. Así mismo, esta mutación provoca en la cadena liviana (L), a nivel del gen que codifica al precursor del ARNt^{ser(UCN)}, un cambio de T por C, y que es sitio de acción de las RNasas (endonucleasas de restricción). Estas enzimas participan en el proceso de maduración de los ARNts, para lo cual cortan los extremos 3' y 5' en los ARNt inmaduros, permitiendo la adición de una secuencia de nucleótidos CCA en el extremo 3' a la cual se une el amino ácido para formar el aminoacil ARNt, para su maduración, y a su vez los hacen más resistentes a los procesos de degradación celular, aumentando tanto su estabilidad metabólica como su vida media⁽⁴⁷⁾. Ha sido determinado que la transición T por C en la posición 7445 de la cadena L afecta la velocidad de transcripción, lo cual provoca una reducción aproximadamente del 70% del contenido del ARNt^{ser(UCN)} y una consiguiente disminución de aproximadamente el 45% en el grado de expresión⁽³³⁾. Esta mutación también está asociada a una marcada reducción en los niveles de ARNm del gen ND6, del complejo I (NADH dehidrogenasa), que está localizado en la cadena L a ~7 Kbp, y se cotranscribe junto al gen del precursor ARNt^{ser(UCN)}. ARNt^{ser(UCN)} y ND6 se transcriben de la cadena L y derivan del procesamiento de largos transcritos policistrónicos⁽⁷¹⁾.

b) MUTACIÓN G7444A

Como ya se mencionó, esta mutación, al igual que la mutación A7445G y la A7443G, afectan tanto el extremo 3' y 5' de la cadena liviana y pesada respectivamente, y por ende, afectarían tanto la maduración del ARNt, como la síntesis de la proteína COI.

Se han caracterizado clínica, genética y molecularmente dos familias Chinas, que poseían esta mutación y que presentaban, sordera neurosensorial inducida por aminoglucósidos, de muy baja penetrancia, homoplásmica y por línea materna. En algunos casos se propuso que la mutación G7444A, estaba asociada con pérdida de la audición, o bien influenciaría la expresión del fenotipo de la mutación A1555G^(64, 93). También ha sido propuesta su asociación al Síndrome LHON, si bien Torrioni⁽⁸²⁾, en un estudio realizado en Italia en 37 familias con el Síndrome de LHON, no encontró en ningún paciente esta asociación, como así tampoco en controles⁽¹⁰⁰⁾.

Estas mutaciones son las más frecuentes, que están descriptas en la literatura, como causantes de sorderas neurosensoriales mitocondriales, sindrómicas y no sindrómicas.

HIPÓTESIS:

La causa de sordera neurosensorial posterior a la administración de antibióticos aminoglucósidos sería debido a la presencia de mutaciones en el ADNmt responsables de la ototoxicidad.

OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Identificar y caracterizar sorderas neurosensoriales, que serían causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial, en nuestra población de sordos Córdoba - Argentina.
- 2.- Analizar la función mitocondrial en los probandos positivos, a través de estudios bioquímicos y morfológicos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Investigar la presencia de mutaciones en los genes: ARNr 12S, mutación: A1555G; ARNt^{ser(UCN)}, mutaciones: A7443G, G7444A, A7445G y ARNt^{leu(UUR)}, mutación: A3243G, y la posible asociación de la mutación con la administración de antibióticos aminoglucósidos para la producción de hipoacusia por

ototoxicidad, en una población de 116 pacientes con S NS y 180 controles sanos.

- 2.- Efectuar en pacientes que presenten mutaciones en el ADNmt y cuadro clínico de enfermedad mitocondrial sindrómica, estudios morfológicos en biopsias de músculo esquelético mediante microscopía óptica y electrónica.
- 3.- Comparar, la actividad de enzimas Citocromo C Oxidasa de la cadena respiratoria, y de la Citrato Sintasa en biopsias de músculo estriado de individuos sanos, y de pacientes que presenten mutación en el ADNmt y cuadro clínico de enfermedad mitocondrial sindrómica.

MATERIAL

Se han estudiado 116 pacientes hipoacúsicos, de los cuales 40 con antecedentes de haber recibido ATB-AG. La población pertenece a diferentes Instituciones y Departamentos de la Provincia de Córdoba: Instituto del Lenguaje y la Audición Córdoba (Capital); Instituto Dr. Gregorio Meinken (Ciudad de La Falda), Dispensario Municipal Mayú Sumaj e Icho Cruz (Departamento Punilla) y derivaciones de consultorios privados y hospitales públicos.

Para la selección de estos pacientes, se tuvo en cuenta dos de los criterios de inclusión: Posible causa de su sordera neurosensorial bilateral, posterior a la administración de ATB-AG (40), y sordera neurosensorial bilateral de severa a profunda >61 decibeles. La presentación fue prelingual y post lingual.

Cuando se detecta alguna/s de las mutaciones estudiadas, la búsqueda se extiende a la familia por rama materna y se estudia el padre.

Se investigaron además 180 controles sanos de edades similares y de ambos sexos.

CRITERIOS DE INCLUSION:

- 1.- Niños y adultos con sordera neurosensorial bilateral severa a profunda >61db.
- 2.- Niños y adultos con sordera neurosensorial bilateral, manifestada con posterioridad a la administración de ATB-AG.
- 3.- Niños con sordera neurosensorial bilateral y que por línea materna presentan familiares con presbiacusia.
- 4.- Controles sanos de edades equivalentes.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- 1.- Población de sordos de la Provincia de Córdoba, a los cuales se considera que su sordera corresponde a mutaciones en ADNn, y que pueden pertenecer a uno de los siguientes grupos: Sordera neurosensorial Autosómica Dominante (AD); Autosómica Recesiva (AR) y ligadas al cromosoma X.
- 2.- De causa probable conocida, por infecciones en el período embrionario: Rubeola, Citomegalovirus, Influenza, Meningitis, Toxoplasmosis etc.
- 3.- Sordera de conducción (oído medio - externo).
- 4.- Sordera post natal de causa no genética.

MÉTODOS

La circunscripción fenotípica de la serie total de sujetos abarcó: Historia clínica orientada a la búsqueda de signos y síntomas del niño sordo y su madre, antecedentes hereditarios (materno - paterno), tóxicos, factores ambientales etc. para interpretar la posible causa de su sordera.

Estudios Audiológicos:

Diapasón - audiometría - impedanciometría - otoemisiones acústicas - potenciales evocados y tomografía del oído interno.

Estudios Moleculares:

a.- Extracción de ADN de muestras de sangre periférica, mediante la técnica de Davis⁽¹⁴⁾, modificada y adaptada en nuestro laboratorio, de controles y pacientes. Se amplificaron mediante “*primers*” específicos distintos segmentos de ADNmt, que poseen el sitio de la mutación. La identificación de las mutaciones se realiza incubando el producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con enzimas de restricción adecuadas; posteriormente se realiza electroforesis en geles de agarosa al 1,6% y 3%, también en geles de poliacrilamida al 7,5% y la visualización de las bandas de ADN con luz UV.

Las mutaciones estudiadas fueron las siguientes:

GENES MITOCONDRIALES

GEN ARNt^{leu} (UUR)

- 1) Sustitución A por G en la posición 3243 del ADNmt (A3243G) del gen que transcribe al ARNt^{leu} (UUR) (30, 59, 54)

Producto de PCR 426 bp

Primers a utilizar: *Forward* (3130)5`-AGGACAAGAGAAATAAGGCC-3` (3149)

Reverse (3555)5`-AAGAGCGATGGTGAGAGCT-3` (A3536)

La enzima de restricción Hae III corta si encuentra la secuencia GG  CC

Producto de PCR amplificado 426 bp:	normal	240	Mutado	240
		169		97
		17 no se ve		72

El producto se incubaba a 37°C con la enzima Hae III toda la noche. Ante la presencia de la mutación se crea un nuevo sitio de corte, y se produce una

banda adicional de 72 pb. Se visualiza en UV, previa corrida electroforética en geles de acrilamida al 7,5%.

GEN ARNt^{ser (UCN)}

2) Sustitución A por G en la posición 7445 del ADNmt (A7445G) del gen que transcribe al ARNt^{ser (UCN)} (70)

3) Sustitución de A por G en la posición 7443 del ADNmt (A7443G) del gen que transcribe al ARNt^{ser(UCN)} (70).

4) Sustitución G por A en la posición 7444 del ADNmt (G7444A) del gen que transcribe al ARNt^{ser(UCN)} (71)

Estas 3 mutaciones tienen el mismo sitio de restricción para la enzima Xba I, y para determinar cual mutación está presente, se hace por análisis de secuenciación. Se utiliza el mismo juego de "primers" "forward" y "reverse".

Producto de PCR 662 bp

Primers a utilizar: *Forward* (7178)5`-CTTCCCACAACACTTTCTCGG-3' (7198)

Reverse (7840)5'-GTAAAGGATGCGTAGGGATG-3' (7821)

La enzima de restricción Xba1 corta si encuentra: 5'-T[↓]CTAGA-3'
3'-A[↑]GATCT5'

El producto de PCR amplificado es de 662 pb. En el ADN que no presenta la mutación, la enzima de restricción lo corta en dos fragmentos de 400 y 262 pb respectivamente; en el gen mutado no encuentra sitio de restricción y no corta:

normal 400 pb

Mutado 662 pb

262 pb

El producto se incubó a 37°C con la enzima Xba1 toda la noche, y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,6%.

5) Sustitución A por G en la posición 1555 del ADNmt (A1555G) del gen que transcribe al ARNr 12S⁽²⁴⁾

Producto de PCR 337 bp

Primers a utilizar:

Forward (1247)5`...GCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC..3' (1274)

Reverse (1583)5`...TCCAGTACACTTACCATGTTACGACTGG..3' (1556)

La enzima de restricción Hae III corta si encuentra:

$$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GG \quad CC3' \\ \\ 3'-CC \quad GG5' \\ \uparrow \end{array}$$

El producto de PCR amplificado es de 337 bp:

normal 218pb Mutado 218 pb

119 pb **91pb**

28 pb (no se ve)

El producto se incubó a 37°C con la enzima Hae III toda la noche, la presencia de la mutación crea un nuevo sitio de corte, generando un segmento de 91 pb y 28 pb. El análisis de la PCR-RFLP se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

6) Sustitución de A por G en la posición 827 del ADNmt (A827G) del gen que transcribe al ARNr 12S⁽⁸⁾

Primers a utilizar^(8, 89) *Forward* (683)5`-GTAAGATTACACATGCAAGC -3' (702)

Reverse (870)5'-GGGGTTAGTATAGCTTAG-3' (853)

El producto de PCR amplificado es de 187 bp

La enzima de restricción Tru 1I corta si encuentra:

$$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-T \quad T \quad A \quad A-3' \\ \\ 3'-A \quad A \quad T \quad T-5' \\ \uparrow \end{array}$$

normal: 142pb

Mutado: **167pb**

25pb (no se ve)

20pb (no se ve)

20pb (no se ve)

El producto se incubó a 65°C con la enzima Tru 11 5 horas, la presencia de la mutación produce un sitio de corte de dos segmentos de 167pb y 20pb (este segmento no se visualiza), si la mutación no está presente la enzima corta el producto de PCR en tres segmentos de 142pb, 25pb y 20pb (estos dos últimos segmentos no se ven). Se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% bajo UV.

GENES NUCLEARES

7) Sustitución de G por T en la posición 28 del ADNn (G28T) del gen que transcribe TRMU (gen modificador nuclear) ^(35, 92)

Primers a utilizar⁽³⁵⁾: Forward 5' ACAGCGCAGAAGAAGAGCAGT 3'

Reverse 5' TTGTCCAGTCTGCTGAGTGGGG 3'.

El producto de PCR amplificado es de 843 bp

La enzima de restricción *Sdu I* corta si encuentra:

	↓
5'-G	GGCC
C-3'	
	3'-C CCGG
	G-5'
	↑

normal: 373 pb

Mutado: 373 pb

470 pb

134 pb

336 pb

El producto se incubó a 37°C con la enzima *Sdu I* toda la noche, la enzima corta en ausencia de la mutación dos segmentos de 373pb y 470pb. En presencia de la mutación genera un nuevo sitio de corte en el segmento de 470pb produciendo dos segmentos de 134pb y 336pb. Se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Condiciones de PCR:

Las condiciones para la mezcla de incubación, de la PCR, en el estudio de las mutaciones A1555G, A3243G, A7445G, G7444A, A7443G, G28T fueron las siguientes:

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μ L conteniendo:

100 ng de ADN genómico, 0,2 mM de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosforados (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP), Buffer PCR 10X sin $MgCl_2$, 15 mM de $MgCl_2$, 10 μ M *Primer forward* y 10 μ M *Primer reverse*, 2,5 U/ μ L Taq ADN (Universidad de Quilmes).

Las muestras fueron sometidas a 40 ciclos de amplificación, inicio de desnaturalización 4 minutos a 94°C, luego cada uno de los ciclos de amplificación consistió de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a la temperatura apropiada, para cada par de oligonucleótidos, entre 56° a 60°C, y 1 minuto de extensión a 72°C y un paso final de 10 minutos a 72°C, luego se transfiere a 12°C. Las condiciones para la mezcla de incubación, para la PCR, en el estudio de la mutación A827G, fueron las siguientes: Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 30 μ L conteniendo: 100 ng de ADN genómico, 0,2 mM de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosforados (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP), Buffer PCR 5X con $MgCl_2$, 10 μ M *Primer forward* y 10 μ M *Primer reverse*, 2,5 U/ μ L Taq ADN GoTaq (Promega). Las muestras fueron sometidas a 45 ciclos de amplificación, inicio de desnaturalización 4 minutos a 94°C, luego cada uno de los ciclos de amplificación consistió de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a la temperatura apropiada de 56°, y 1 minuto de extensión a 72°C y un paso final de 10 minutos a 72°C, luego se transfiere a 12°C.

Para investigar la presencia de polimorfismos/haplotipos u otras mutaciones, que acompañen a la mutación observada por análisis de PCR-RFLP, en los genes considerados "hot spot" de producir ototoxicidad, y a fin de corroborar su patogenicidad:

- 1.- en una primera instancia se secuencia los genes ANRr12S y ARNt^{ser(UCN)}.

- 2.- a posterior se secuencia todo el genoma mitocondrial

1) Para la secuenciación del gen ARNr 12S completo, se utilizaron los siguientes juegos de *primers*⁽⁸⁾:

La región de la molécula que contiene nts 533 al 1152

Primer Forward 5'-CCCATACCCCGAACCAACCAAA-3'

Primer Reverse: 5'-TGGCTCGTAGTGTTCTGGCGA-3'

Producto de 620 pb

La región de la molécula que contiene nts 1247 al 1589

Primer Forward 5'-GCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC-3'

Primer Reverse: 5'-GCACTTTCCAGTACACT-3'

Producto de 342 pb

La región de la molécula que contiene nts 1548 al 1800

Primer Forward: 5'-AGAGGAGACAAGTCGTAACA-3'

Primer Reverse: 5'-CATCTTTCCCTTGCGGTACTA-3'

Producto de 253 pb

Los productos, tanto en *forward* como en *reverse*, luego de amplificados por PCR, y en condiciones similares para la amplificación del segmento en el estudio de la mutación A827G, se purificaron, mediante desalinización con QIAEX II (Protocolo para desalinizar y concentrar ADN indicado por la firma comercial "QIAGEN Distributors"), y se envió para su secuenciación, a tres diferentes laboratorios, por lo que se realizaron, por tres determinaciones para cada segmento, tanto del probando, como de sus familiares por la línea materna.

2) Para amplificar el gen ARNt^{ser(UCN)}, para el análisis de secuenciación, se utilizaron los mismos juegos de *primers* que para la búsqueda de las mutaciones A7445G, G7444A y A7443G, ya que amplificaban todo el gen. Se analizaron tanto los productos *forward* como *reverse*.

3) Para la secuenciación del genoma mitocondrial completo, se utilizaron los siguientes 18 juegos de *primers*⁽⁸⁾:

- 18** La región de la molécula que contiene nts 535 al 1589
Primer Forward: 5'-CCCATACCCCGAACCAACCAAA-3'
Primer Reverse: 5'-GCACTTTCCAGTACTACT-3'
 Producto de 1055 pb
- 1** La región de la molécula que contiene nts 1548 al 2569
Primer Forward: 5'-AGAGGAGACAAGTCGTAACA-3'
Primer Reverse: 5'-GCCGTTAAACATGTGTCACT-3'
 Producto de 1022 pb
- 2** La región de la molécula que contiene nts 2477 al 3499
Primer Forward: 5'-GGCAAATCTTACCCCGCCTGTTT-3'
Primer Reverse: 5'-TGGCGGGTTTTAGGGGCTCTTT-3'
 Producto de 1023
- 3** La región de la molécula que contiene nts 3404 al 4490
Primer Forward: 5'-TACGCAAAGGCCCAACGTTGT-3'
Primer Reverse: 5'-GGGTTGGGCCAGGGGATTAATTA-3'
 Producto de 1087 pb
- 4** La región de la molécula que contiene nts 4416 al 5439
Primer Forward: 5'-AATAAGCTATCGGGCCATA-3'
Primer Reverse: 5'-GGGTGGGTTTTGTATGTTCA-3'
 Producto de 1024 pb
- 5** La región de la molécula que contiene nts 5350 al 6361
Primer Forward: 5'-TACGCCTAATCTACTCCAC-3'
Primer Reverse: 5'-GCTAGGTGTAAGGAGAAGA-3'
 Producto de 1012 pb
- 6** La región de la molécula que contiene nts 6250 al 7333
Primer Forward: 5'-CTATAGTGGAGGCCGGAGCAGGA-3'

Primer Reverse: 5'-GCGAAGGCTTCTCAAATCATGA-3'

Producto de 1084 pb

7 La región de la molécula que contiene nts 7250 al 8250

Primer Forward: 5'-ATGAAACATCCTATCATCT-3'

Primer Reverse: 5'- CCTATTTCAAAGATTTT-3'

Producto de 1001 pb

8 La región de la molécula que contiene nts 8152 al 9157

Primer Forward: 5'-GGGGGTATACTACGGTCAAT-3'

Primer Reverse: 5'-CTTGGATTAAGGCGACA-3'

Producto de 1006 pb

9 La región de la molécula que contiene nts 9050 al 10100

Primer Forward: 5'-GAAGCGCCACCCTAGCAATA-3'

Primer Reverse: 5'-GGCTAGGAGGGTGTGATTATT-3'

Producto de 1051pb

10 La región de la molécula que contiene nts 9908 al 10934

Primer Forward: 5'-CTTCGAAGCCGCCGCCTGATA-3'

Primer Reverse: 5'-CGGAGGAAAAGGTTGGGGAACA-3'

Producto de 1027 pb

11 La región de la molécula que contiene nts 10831 al 11849

Primer Forward: 5'-AATCAACACAACCACCCACA-3'

Primer Reverse: 5'-GGCTTGCTAGAAGTCATCAA-3'

Producto de 1019 pb

12 La región de la molécula que contiene nts 11751 al 12765

Primer Forward: 5'-ACTCAAACACTACGAACGCACT-3'

Primer Reverse: 5'-GCCGATGAACAGTTGGAATA-3'

Producto de 1015 pb

13 La región de la molécula que contiene nts 12606 al 13605

Primer Forward: 5'- CCCTGTAGCATTGTTGTTA-3'

Primer Reverse: 5'-GCTATAGGCGCTTGTCA-3'

Producto de 1000 pb

14 La región de la molécula que contiene nts 13503 al 14534

Primer Forward: 5'-CTACTCCAAAGACCACATCA-3'

Primer Reverse: 5'-GGGGAGGTTATATGGGTTTA-3'

Producto de 1032 pb

15 La región de la molécula que contiene nts 14453 al 15460

Primer Forward: 5'-GCCATCGCTGTAGTATA-3'

Primer Reverse: 5'-GGAGAGAAGGAAGAGAAGT-3'

Producto de 1008 pb

16 La región de la molécula que contiene nts 15342 al 16369

Primer Forward: 5'-TCTTGCACGAAACGGGATCAAA-3'

Primer Reverse: 5'-CATGGGGACGAGAAGGGATTTGA-3'

Producto de 1028 pb

17 La región de la molécula que contiene nts 16200 al 630

Primer Forward: 5'-ACAAGCAAGTACAGCAAT-3'

Primer Reverse: 5'-GAGCCCGTCTAACATT-3'

Producto de 1000 pb

Las condiciones de la mezcla de incubación, para amplificar los productos en la PCR, son similares a los ya descritos, y la temperatura de anelling para los diferentes segmentos fue de 58°C a 60°C.

Para realizar el estudio filogenético de los probables cambios conformacionales en los ARNs, ocasionados por mutaciones en el ADNmt, se utilizó el Programa de informática, MITOMAP; RNA Draw.

ESTUDIOS MORFOLOGICOS:

a) Microscopía óptica: una biopsia de músculo cuádriceps (corte longitudinal), es fijada en medio de Bowin. A posterior, algunos cortes se tiñen con hematoxilina y eosina (H/E) y otros se tiñen con la técnica de tricromo

Gomori modificada. Esta técnica permite observar fibras rojas rasgadas, patognomónicas de citopatía mitocondrial^(19, 22)

b) Microscopía electrónica: El tejido fue lavado en 1 mL de PBS (pH 7.0) y fijado con 2% de glutaraldehído y 4% de formaldehído en 0.1 M cocodilato buffer por 2 hs, y luego post fijado con tetróxido de osmio al 1% en el buffer; deshidratado y embebido en Araldita. Secciones delgadas fueron cortadas con una aguja diamantada en ultramicrotomo JEOL JUM 7 y examinado en un microscopio electrónico Zeiss LEO 906E. ^(7, 88, 60)

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS:

Se realizan en muestras de biopsia de músculo cuádriceps (corte longitudinal) de aproximadamente 50 a 100 mg, inmediatamente colocadas en aire líquido hasta ser procesada. Tratamiento: 50 mg del tejido se colocan en buffer fosfato y se homogeneizan con un disruptor (ULTRATURRAX) a 20000g durante 15” por tres veces, luego se centrifugan, guardándose el sobrenadante y el precipitado en aire líquido hasta su uso. En muestras de músculo esquelético de pacientes con sordera, en quienes se sospecha miopatía mitocondrial. Se midió la actividad de la enzima: citocromo c oxidasa (COX) por el método de Wharton y Tzagoloff^(87, 83) y de la citrato sintasa (CS) por el método de Wiedemann⁽⁸⁷⁾. Ambas enzimas son mitocondriales, y la citrato sintasa es exclusivamente sintetizada por el ADNn, por lo cual la relación COX/CS, permite normalizar los valores de la actividad de la COX.

DATOS CLÍNICOS

Se realizó a cada paciente con sordera neurosensorial una historia clínica completa. Se trató de identificar síntomas y signos, herencia, y antecedentes personales patológicos que podrían ser considerados como causa probable de enfermedad mitocondrial. Los datos en la historia clínica, que se utilizaron para el estudio de probable patología mitocondrial, de la población hipoacúsica, fueron los siguientes:

A) Si nació a término. **B)** Si presentó al nacer síntomas o patologías que podrían corresponder a enfermedades mitocondriales, como por ejemplo: retardo de crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer, hipoxemia, trastornos cardíacos de conducción (pausas), insuficiencia hepática, retardo de crecimiento post natal, sordera neurossensorial congénita, o post ATB-AG. **C)** Si la madre del probando durante el embarazo, estuvo expuesta a factores de riesgo como por ejemplo: mala alimentación (falta de nutrientes), o se le prescribió por infección ATB-AG, debilidad o fatiga muscular, Diabetes Mellitus tipo 2, arritmias cardíacas, endocrinopatías, ceguera (se preguntó además si estos síntomas o patologías de estar presentes son por línea materna). **D)** También se interrogó sordera por la línea materna.

RESULTADOS

De 116 pacientes que presentaban sordera neurosensorial bilateral de severa a profunda, pre y post lingual estudiados; 40 habían recibido ATB-AG (34,8%), y podría considerarse que la causa de su sordera sería debido a ototoxicidad. Se estudiaron también 180 controles (población de Córdoba – Argentina) de edades similares y de ambos sexos, para el screening de: presencia de polimorfismos o variantes en el ADNmt. En las dos poblaciones, no se detectaron las siguientes mutaciones: A1555G en el gen ARNr 12S (considerada de mayor prevalencia e incidencia en diferentes países del mundo, y relacionada a ototoxicidad), como tampoco las mutaciones en el gen ARNt^{ser(UCN)}: A7445G, A7443G, ni la mutación A3243G en el gen ARNt^{leu(URR)}.

Identificación de la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)}:

Esta mutación fue encontrada en dos niñas no emparentadas entre sí. Las dos pacientes habían recibido ATB-AG al nacer (Gentamicina), debido a que presentaban infección pulmonar. A los pocos meses de nacidas, se les diagnosticó sordera neurosensorial bilateral severa, congénita, que podría ser por ototoxicidad. El análisis de las historias clínicas realizadas en estas dos familias (1ra familia: FS1 y la 2da. familia: FS2) señaló que tenían positivos los siguientes datos clínicos: Nacieron con enfermedades que podrían ser consideradas de causa mitocondrial (retardo de crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer); presentaban además antecedente de sordera NS por la línea materna. Por línea materna también referían enfermedades que podrían tener una etiología mitocondrial (trastornos de la conducción cardíaca, endocrinológicos, mialgias inespecíficas y fatiga muscular). Las dos pacientes no emparentadas, habían recibido ATB-AG al nacer, y pocos meses después del nacimiento se les diagnosticó sordera neurosensorial bilateral congénita progresiva (pre lingual), posiblemente producida por ototoxicidad, sin estudio genético.

FAMILIA FS1

Dado la presencia de la mutación G7444A, y la asociación de patologías que se presentan por la línea materna, se decidió, previo consentimiento informado realizar estudios bioquímicos y morfológicos.

En este estudio se presenta la caracterización clínica, molecular, bioquímica y morfológica de un probando y su familia por línea materna (FS1).

Se describen a continuación los resultados de la FS1:

La paciente de la FS1, fue llevada a consulta al Servicio de ORL del Hospital de Niños de la provincia de Córdoba, pocos meses después de su nacimiento. Como se ilustra en la Figura 7 (audiogramas), se observa que el probando presentaba pérdida de la audición severa a profunda. Otros exámenes audiológicos y neurológicos que incluyeron: otoemisiones acústicas, impedanciometría, potenciales evocados y tomografía axial computada de hueso temporal, revelaron que la cóclea estaba afectada, pero que no presentaba malformaciones en el aparato auditivo. En la figura 6 se muestra el árbol genealógico del probando (III-5); en el mismo se observa que el probando III-5, como III-4 (su hermano) y II-3 (su tío) por línea materna, presentan sordera NS bilateral. En III-5 de severa a profunda y progresiva, cuya etiología se consideró posterior a la administración de ATB-AG al momento del nacimiento; mientras que III-4 es leve a moderada y podría contribuir a las manifestaciones clínicas, el uso continuado de auriculares. El paciente II-3, en la actualidad es portador de HIV, y a la edad de 22 años, por una infección, se le prescribió ATB-AG, treinta días después presentaba sordera neurosensorial; él, no accedió a ser estudiado en esta Tesis. De acuerdo a estudios audiológicos seriados, la pérdida de la audición de los pacientes III-4 y III-5, fue informada como progresiva. Los otros miembros de la familia (grupos I-2; II-2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; III-3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, y 15), quienes no habrían recibido ATB-AG, tienen audición normal, como se reflejó en los estudios audiológicos realizados.

La historia médica completa de todos los individuos de esta familia demostró otros desórdenes clínicos: I-4: Enfermedad de Graves Basedow (fallecida);

II-2: Hipotiroidismo; II-5: Enfermedad de Graves Basedow; II-8: Hipotiroidismo; III-3 (de 17 años de edad): Miopatía (fatiga, debilidad muscular); III-5: Hipotiroidismo; III-6: Asma Bronquial; III-7: Artritis reumatoidea; III-10: Alopecia Areata; III-11: Pausas Cardíacas en período embrionario y tres meses post natal; III-12: Enfermedad de Graves Basedow, a los 11 años de edad; III-13: Asma Bronquial; III-14: Miopatía (dolor muscular, fatiga muscular, desde los tres años de edad). La enfermedad de Graves Basedow fue confirmada por el alto porcentaje de anticuerpos antiperoxidasa, antitiroglobulina y anti-receptor tiroestimulante. La paciente III-7, fue tratada por artritis reumatoidea a la edad de 6 a 8 años, tenía Factor Reumatoideo positivo (Ig M) en suero, sus síntomas eran dolor en grandes articulaciones, disminución del apetito, no aumentaba de peso y crecimiento lento, actualmente tiene 13 años de edad, no está bajo tratamiento, pero refiere fatiga, dolor muscular y dolor articular, y no hay informe de repetición de estudios pertinentes.

Estas patologías, sólo se observan por la línea materna, y es importante destacar que en esta familia, los probandos I-2 y III-5, se han casado dos veces, y II-8 se ha casado tres veces. En la generación III, se observa que III-3 y III-4 son medios hermanos de III-5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 por parte de madre. Los familiares III-12 y 13, son medias hermanas de III-14 y de III-15, también por parte de madre. La presentación de estas patologías (alguna de ellas, con probable etiología autoinmune), que se manifiestan sólo por la línea materna, podría llevar a la interpretación de que estarían constituyendo una presentación **sindrómica de la hipoacusia**.

Figura 6

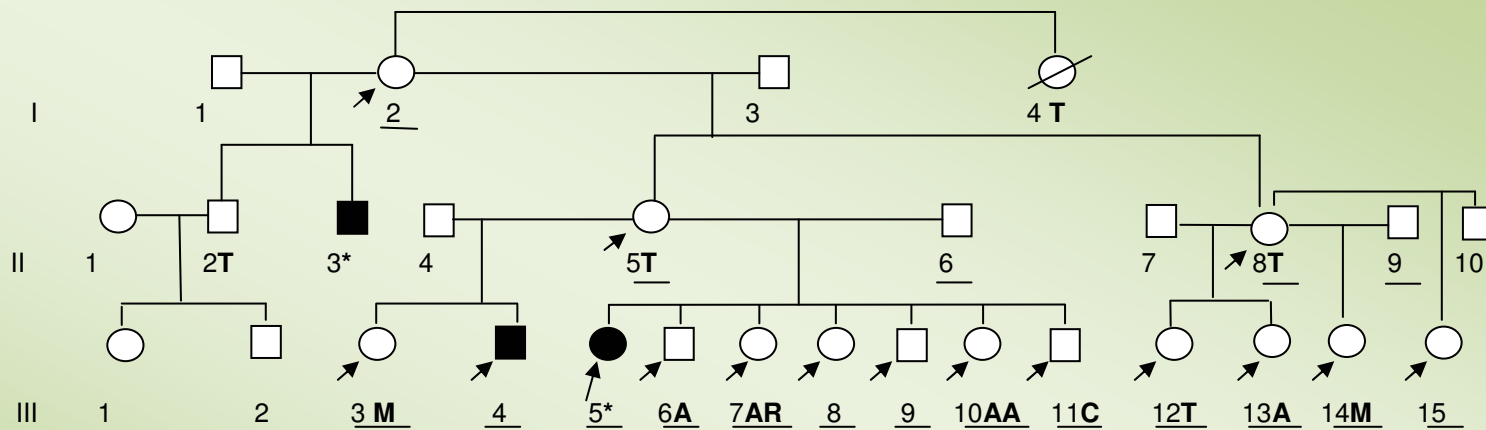


Figura 6: Árbol genealógico de la familia FS1 (Argentina), en la que dos de sus integrantes presentan pérdida de la audición inducida por ATB-AG. La sordera es indicada por símbolos llenos: II-3 (HIV) and III-5, quienes tenían una historia de exposición a ATB-AG, and III-4 quizás por el uso continuado de auriculares. Las flechas indican los probandos que presentaban la mutación G7444A. Con asteriscos, se indican los individuos que tenían una historia de exposición a ATB-AG. Todos los sujetos que se estudiaron molecularmente son subrayados. AR= artritis reumatoidea, A= Asma Bronquial, C= Arritmia cardíaca, M= Miopatía, T= Tiroideopatía. AA= Alopecia Areata

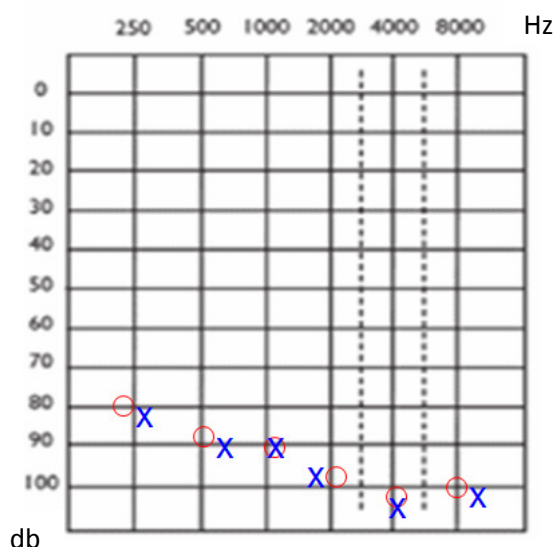
Figura 7

Figura 7: Estudio de audiometría de la paciente III-5 que presenta la mutación G7444A en el gen $ARNt^{ser(UCN)}$ ADNmt; en este estudio se observa sordera bilateral profunda a frecuencias altas y bajas > 80 db. (db= decibeles; Hz= frecuencias altas y bajas, símbolos rojos= oído derecho; símbolos azules= oído izquierdo)

RESULTADOS MOLECULARES DE LA FS1

La transmisión materna de la pérdida de la audición, su relación con ototoxicidad y la asociación repetitiva de patologías, también por la línea materna, sugerían la participación de mutaciones en el ADNmt, lo cual, nos llevó a analizar los dos genes mitocondriales, considerados “hot spot”, para mutaciones asociados a sorderas neurosensoriales y ototoxicidad: $ARNr$ 12S y el $ARNt^{ser(UCN)}$. En la paciente, no se detectaron las mutaciones A3243G, A1555G, y A827G (esta última mutación, se analizó con técnicas implementadas en nuestro laboratorio), pero si se observó (sin poder diferenciarlas, porque tienen el mismo sitio de restricción) las probables mutaciones: A7443G, A7445G, y G7444A. Tanto en el probando positivo, como en los familiares por la línea materna, la presentación de la mutación en la línea linfocitaria es homoplásmica (Figura 8). Como estas mutaciones tienen el mismo sitio de restricción, para identificarlas es necesario su secuenciación. Además, a fin de descartar cualquier otra mutación que pudiera estar presente

en los genes considerados “*hot spot*”, se amplificó el gen completo del ARNr 12S y del ARNt^{ser(UCN)}. A posterior fueron enviados para su secuenciación, los fragmentos “*forwards*” y “*reverses*”, correspondientes tanto del probando (III-5), como de la madre (II-5). Este estudio fue enviado a tres lugares diferentes, para su secuenciación (Figura 9). El resultado corroborado de este estudio, indicó sólo, la presencia de la mutación G7444A. Interesantemente nosotros no encontramos ningún otro cambio de nucleótidos en este gen, excepto la mutación mitocondrial G7444A, y el estudio de PCR-RFLP la presenta en forma homoplásmica (línea celular linfocitaria), la mutación se observa además, sólo por línea materna. Tampoco encontramos ninguna mutación en el gen ARNr 12S. En 180 controles no hemos encontrado ninguna de las mutaciones estudiadas, esto es importante porque permite identificar el hallazgo molecular como una mutación, y no como un polimorfismo.

GENES NUCLEARES MODIFICADORES

Análisis de la mutación en el gen TRMU^{35, 92}.

Para examinar el rol del gen TRMU en la manifestación del fenotipo de la mutación G7444A en esta familia, nosotros realizamos la búsqueda de la mutación G28T en el gen TRMU (la cual modificaría la presentación clínica de la pérdida de la audición, cuando está asociada a mutaciones en los genes ARNr 12S y ARNt^{ser(UCN)}). El resultado fue negativo.

Figura 8

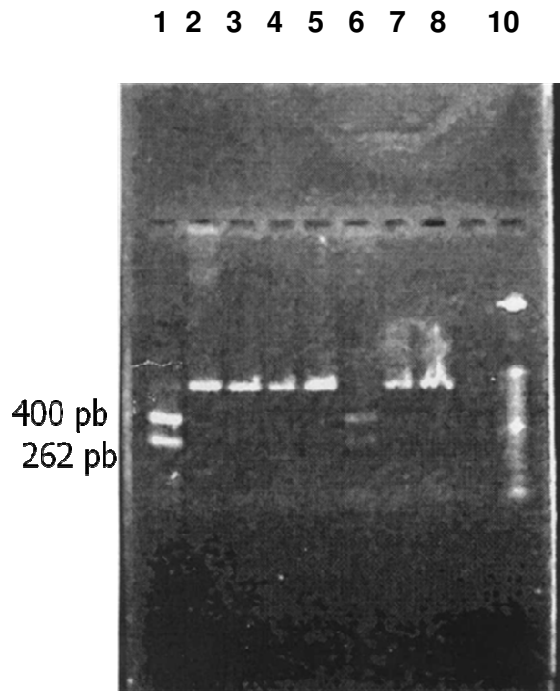
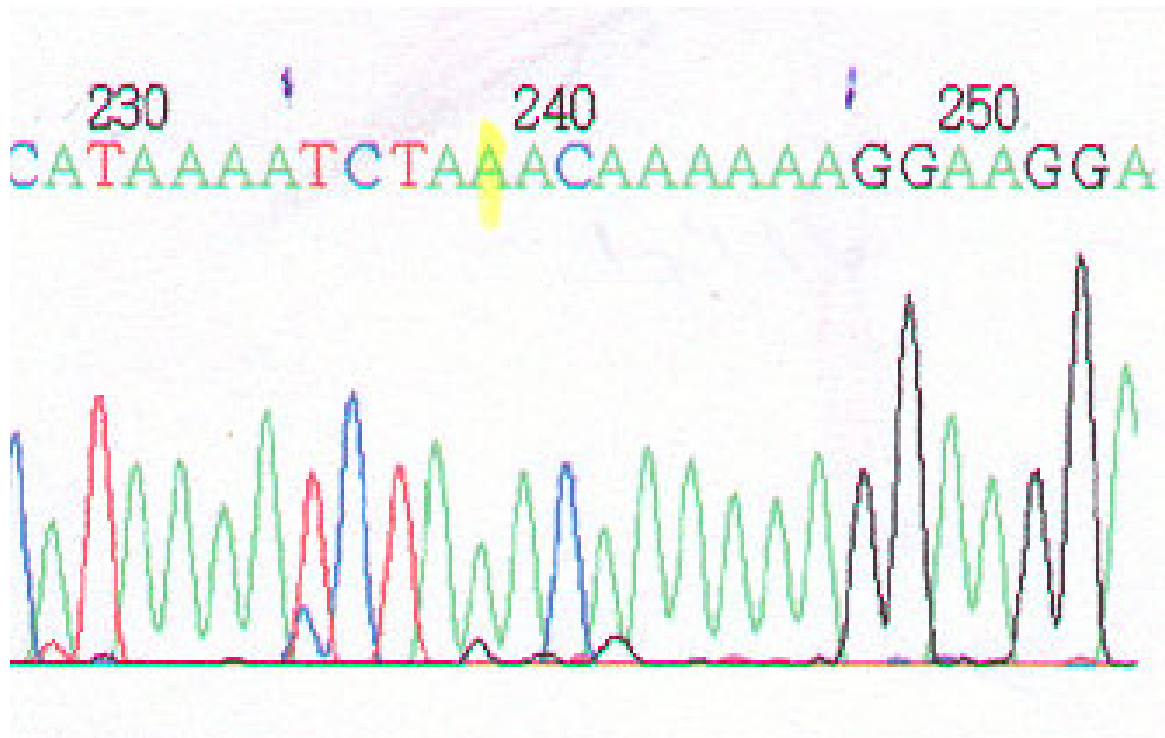


Figura 8: En la electroforesis en gel de agarosa al 1,6%, se observó la presencia de una de las mutaciones: A7443G, G7444A, A7445G en el gen $ARNt^{ser(UCN)}$ (tienen el mismo sitio de restricción) en el probando y familiares por la línea materna. Líneas 1 y 6 corresponden a controles (se estudian en la misma preparación de PCR que para los probandos), la enzima Xba I corta el segmento amplificado por PCR de 662pb, en dos fragmentos de 400 y 262 pb. Las líneas 2, 3, 4, 5, 7 y 8, la presencia de la mutación, hace perder el sitio de restricción y la enzima no puede cortar el segmento amplificado de 662 pb. Línea 10 marcador de 100 a 800 pb.

Figura 9 A y B

A



B

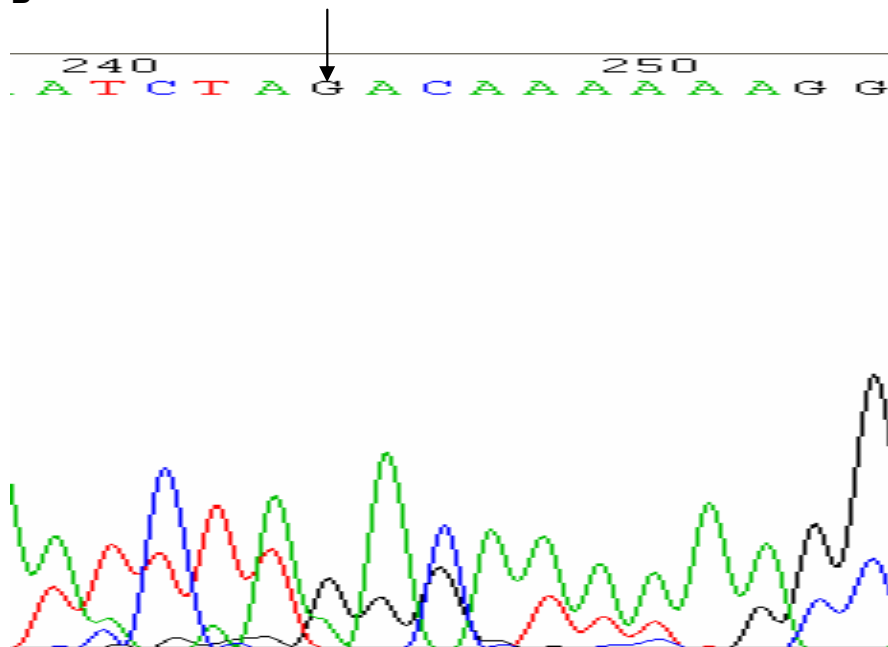


Figura 9 A y B: **A:** El electroforegrama muestra el cambio nucleotídico de G por A en la posición 7444 (señalado en amarillo). **B:** Indica el nucleótido correcto en la posición 7444, en el electroforegrama (señalado con una flecha).

ANÁLISIS BIOQUÍMICOS FS1

En la tabla 1, se muestran los valores de actividad enzimática de dos enzimas mitocondriales 1) citocromo c oxidasa (COX), en cuya estructura participan polipéptidos que están codificados por el ADNn y por el ADNmt, 2) citrato sintasa (CS), cuya síntesis está exclusivamente dirigida por el ADNn. Los ensayos se realizaron en biopsias del músculo esquelético cuádriceps de dos pacientes de la FS1 (III-5 y II-5) que poseen la mutación G7444A y de un individuo control. A posterior se determina la relación COX/CS.

En el probando (III-5) se observa que la actividad de la COX ($4,4 \pm 0,088$ U/g de tejido) es muy baja respecto del control, mientras que la actividad de la CS (32,66 U/g de tejido) es similar a la que presenta el control, así el valor de la relación COX/CS es 0,135, este resultado indica que la actividad de la citocromo c oxidasa es solo 21,6% respecto del control. En la madre del probando (II-5), están disminuidas no solo la actividad de COX, sino también la de la CS, en consecuencia el valor de la relación COX/CS es aún mayor que en el control (0,94) (Tabla 1).

Table 1: Actividad de las enzimas citocromo oxidasa y citrato sintasa.

ensayos	III 5	II 5	CONTROL	
[]	ACTIVIDAD DE CITOCROMO C OXIDASA			
COX: U/g tejido	4,4 ± 0,088	10,3 ± 2,015	20,6 ± 0,085	
	ACTIVIDAD DE CITRATO SINTASA			
CS: U/g de tejido	32,66 ± 0,65	10,9 ± 1,015	33,00 ± 0,30	
	RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD COX/CS			
COX/CS: U/g de tejido	0,135	0,94	0,62	A: valor medio en controles COX/CS: 1,07 ± 0,43

Tabla 1: La relación Citocromo C Oxidasa / Citrato Sintasa en la paciente III-5 es menor que en el control. En II-5 al estar disminuída la actividad de las dos enzimas, el valor de la relación COX/CS es mayor que el control. En **A**, se indica el valor medio de la relación COX / CS en sujetos controles sanos, de acuerdo a la literatura⁽¹⁰¹⁾.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO FS1

El análisis morfológico ha sido analizado en biopsia de corte longitudinal de músculo cuádriceps de las pacientes III-5, II-5 y de un control. En las pacientes III-5 y II-5, en el corte histológico del músculo esquelético se observa: adelgazamiento de fibras musculares y disrupción de algunas de ellas. Se observa ligera variación del tamaño de las fibras (algunas disminuídas de tamaño y otros ligeramente hipertróficas). No hay evidencia de regeneración muscular y los núcleos son normales. Debe destacarse la presencia de algunos grupos de fibras con signos de ruptura de miofibrillas, **fibras rojo rasgadas**, claramente evidentes en la coloración de Gomori. No se observa infiltrado inflamatorio. Control Sano: El músculo esquelético conserva las características histológicas habituales. No se observa

fibrosis, alteraciones de las fibras u otras alteraciones, tanto en la coloración con H/E, como en la técnica de Gomori (Figura 10).

Figura 10

A: paciente II-5

X-200

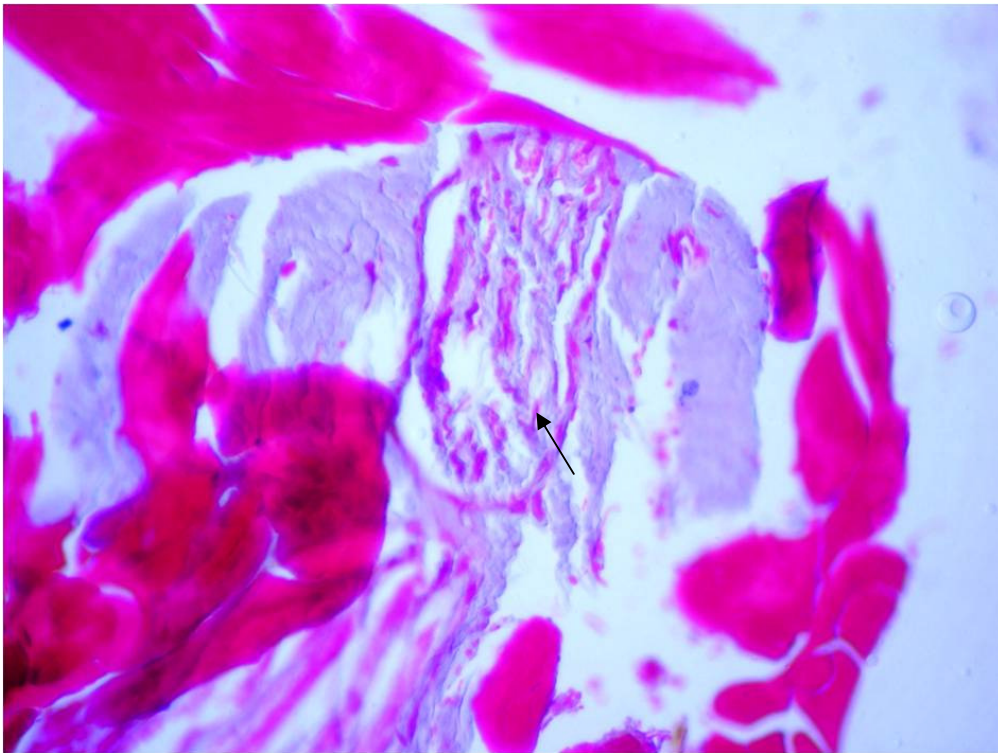


Figura 10 A: Cortes de MO, de biopsia de músculo cuádriceps de la paciente II-5: Muestra fibras musculares adelgazadas y disrupción de las mismas. No se observa regeneración de las células musculares. Con la técnica de Tricromo Gomori se observan fibras rojas rasgadas, señaladas con las flechas.

B: paciente III-5

X-200

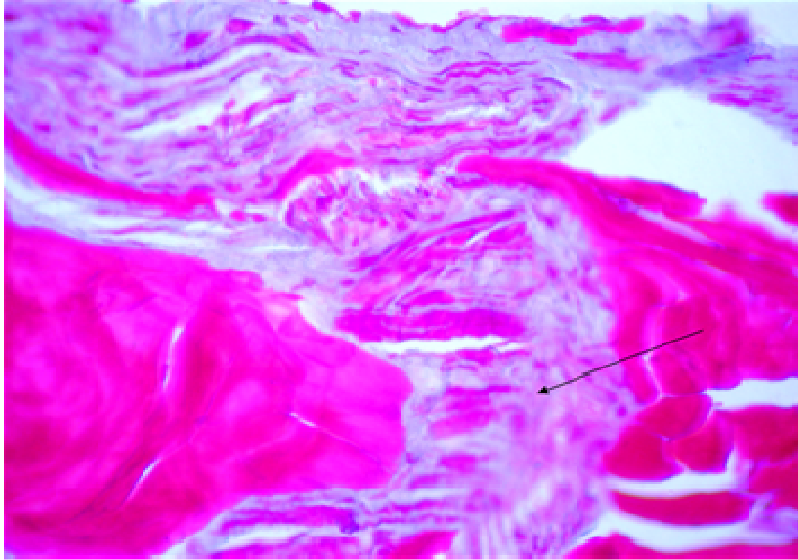


Figura 10 B: Cortes de MO, de biopsia de músculo cuádriceps de la paciente III-5: presenta menor adelgazamiento de las fibras musculares y disrupción. También se observan fibras rojas rasgadas, presentes en citopatías mitocondriales (señalada con flecha). Técnica tricromo modificada de Gomori.

Microscopía Electrónica

Parte de la biopsia de músculo esquelético fue procesada de acuerdo a métodos establecidos^(7, 19, 78.) para microscopía electrónica.

Los hallazgos en la biopsia de músculo en la paciente III-5, (Figuras 11 A y B), mostró múltiples anomalías mitocondriales: mitocondrias amorfas con inclusiones paracristalinas y sarcómeros fibrosos y acúmulo de glucógeno. En la figura 11C, se observa el núcleo sano sin signos de apoptosis, y en la figura 11D, una mitocondria muy amorfa, desorganizada, en especial al observar la membrana interna de la mitocondria; con inclusiones paracristalinas. Su madre II-5, (Figura 11 E), tenía muy pocas mitocondrias en la región anatómica

seleccionada de varios cortes y con características amorfas; el corte muestra pérdida de la estructura normal del músculo esquelético, ya que se observa un zig-zag de las bandas Z. Mientras que en el control (un joven deportista, de 21 años de edad, que había tenido una lesión en su miembro inferior, por lo que requirió tratamiento quirúrgico) el músculo estriado posee una estructura correcta y sus mitocondrias son normales (Figura 11F).

Figura 11 A

13.000X

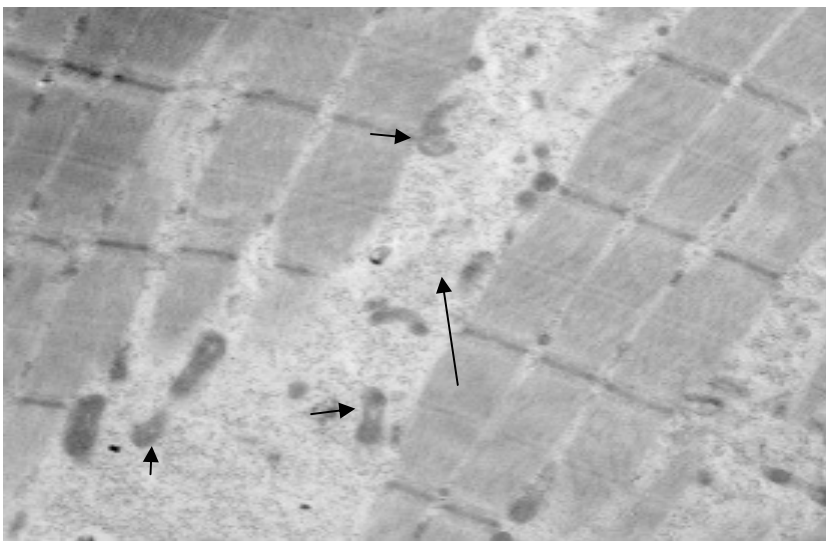


Figura 11 A: El corte de ME, en biopsia de músculo cuádriceps, de la paciente III-5, muestra la presencia de mitocondrias amorfas, con inclusiones paracristalinas, abundante depósito de glucógeno y fibrosis de los sarcómeros (indicados con flecha)

11 B**27.000X**

Figura 11B: Corte de ME de biopsia de músculo cuádriceps de la paciente III-5, las flechas indican inclusión paracristalina dentro de la mitocondria, y el abundante depósito de glucógeno.

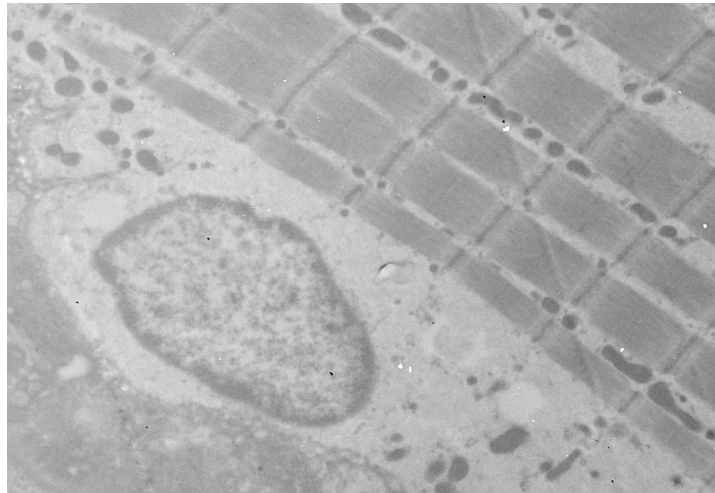
11 C7750X

Figura 11C: El corte de biopsia de músculo cuádriceps, de la paciente III-5, en la microscopía electrónica, muestra el núcleo sano sin signos de apoptosis. Alrededor del núcleo se observan acúmulos de mitocondrias.

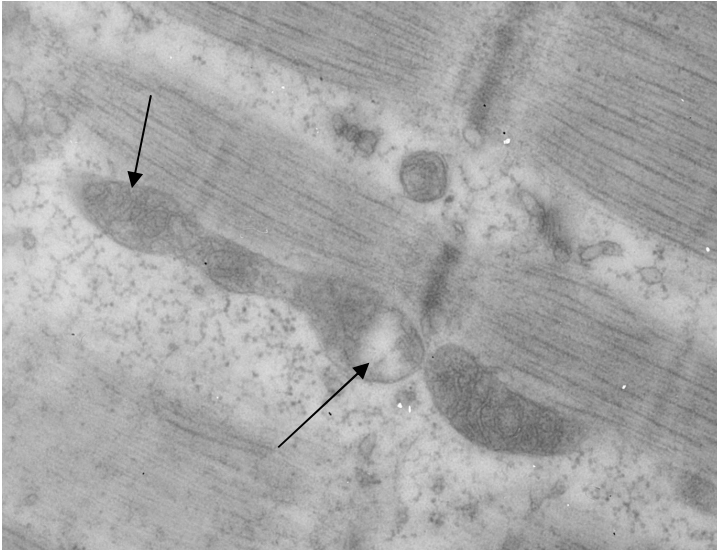
11 D**27000X**

Figura 11D: El corte de biopsia de músculo cuádriceps de la paciente III-5 en microscopía electrónica muestra mitocondrias amorfas, desorganizadas (obsérvese la membrana interna) y las inclusiones paracristalinas.

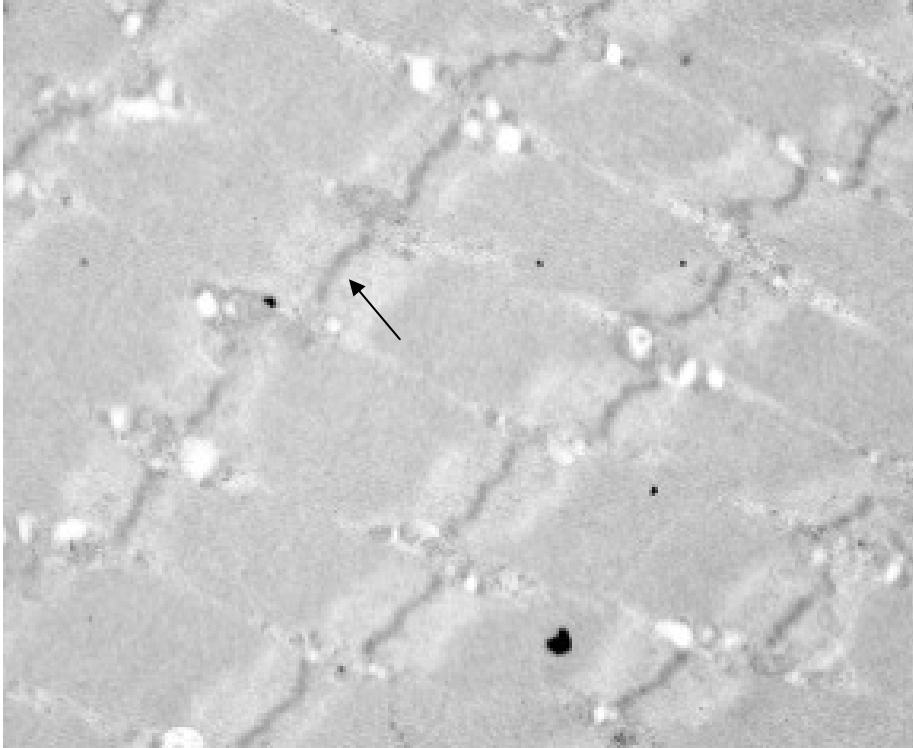
11 E**13.000X**

Figura 11E: Corte de ME de biopsia de músculo cuádriceps de la paciente II-5, la flecha indica el zig-zag de las bandas Z. Se observa además muy pocas mitocondrias, muy amorfas, y vacuolas lipídicas.

11 F

6000X

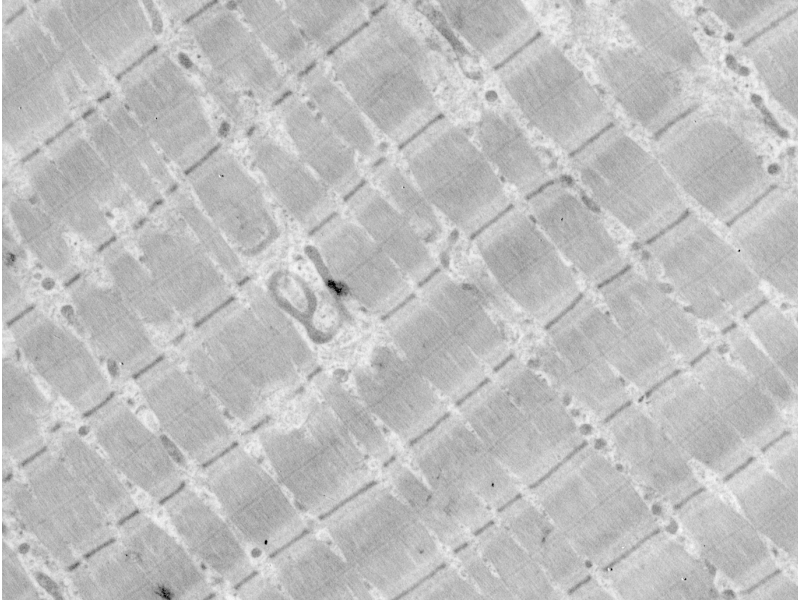


Figura 11F: El corte de ME, en biopsia de músculo cuádriceps del control, muestra estructura normal de músculo estriado y mitocondrias.

Se describen a continuación los resultados obtenidos al estudiar la **FS2**

En este estudio se presenta sólo la caracterización clínica y molecular de un probando y su familia por línea materna (FS2), debido a que no accedieron al estudio bioquímico y morfológico.

La paciente de la FS2 (III-1), fue llevada a consulta al Servicio de ORL del Hospital de Niños de la Provincia de Córdoba, pocos meses después de su nacimiento. Como se ilustra en la Figura 12 (audiograma), se observa que el probando (al igual que el probando en la familia FS1, Figura 7), presentaba pérdida de la audición de severa a profunda. Otros exámenes audiológicos y neurológicos que incluyeron: otoemisiones acústicas, impedanciometría, potenciales evocados y tomografía axial computada de hueso temporal, revelaron que la cóclea estaba afectada, pero que no presentaba malformaciones en el aparato auditivo. En la figura 13 se observa el árbol genealógico del probando III-1. La abuela materna (fallecida) presentaba presbiacusia según refiere la hija (madre del probando), la aparición de la sordera NS y bilateral comenzó alrededor de los 50 años de edad.

La historia médica completa de todos los individuos de esta familia demostró otros desórdenes clínicos: I-1, 3, 4, y II-2 trastornos de la conducción cardíaca; I-3, 4, y II-5 tireoideopatías (Enfermedad de Graves Basedow e Hipotiroidismo) de acuerdo a las pruebas funcionales y anticuerpos específicos (antiperoxidasa, antitiroglobulina y antirreceptor de tiroestimulante), que se les solicitaron para estudios de glándula tiroidea; II-1 asma bronquial; II-4 glaucoma. El probando III-1 había nacido con sindactilia (dedos de la mano unidos por una membrana).

Figura 12

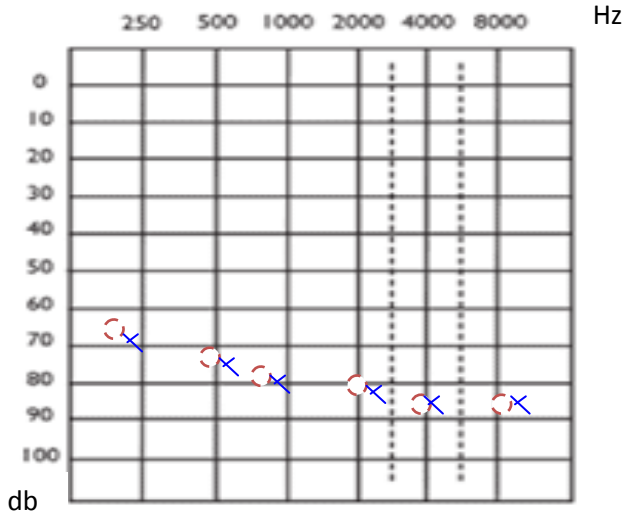


Figura 12: Estudio de audiometría de la paciente III-1 de la FS2, que presenta la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} ADNmt; en este estudio se observa sordera bilateral profunda a frecuencias altas y bajas > 70 db. (db= decibeles; Hz= frecuencias altas y bajas, símbolos rojos= oído derecho; símbolos azules= oído izquierdo)

Figura 13

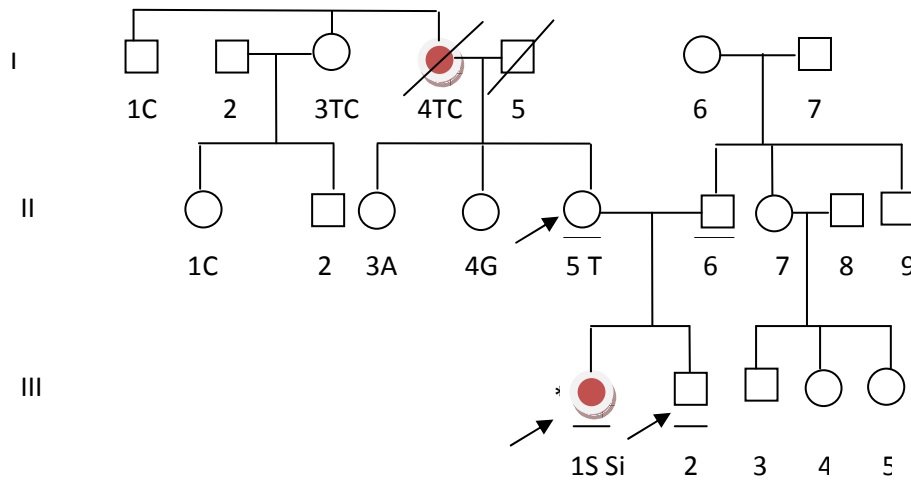


Figura 13: Árbol genealógico de la FS2 (Argentina) con pérdida de la audición inducida por ATB-AG III-1 y presbiacusia I-4 abuela del probando (la sordera es indicada por símbolo lleno en color rojo). El asterisco indica individuo que tenía historia de exposición a ATB-AG. Subrayado, individuos a quienes se les realizaron los estudios moleculares. La flecha indica los individuos que presentan la mutación G7444A. C= trastornos de la conducción cardíaca; A= asma bronquial; T= tireoideopatías: Enfermedad de Graves Basedow (I-3 y I-4), Hipotiroidismo: II-5; G= glaucoma; S= sordera; Si= sindactilia.

Estudios Moleculares FS2

En esta familia FS2 al igual que en la FS1 la transmisión materna de la pérdida de la audición, su relación con ototoxicidad y la misma asociación repetitiva de patologías, también por la línea materna, sugirieron no solo que el ADNmt estaba involucrado sino, que esta familia podría presentar la misma mutación que la FS1, lo cual se comprobó primero por los estudios de PCR-RFLP, utilizando la enzima de restricción Xba1 (Figura 14). Estos resultados nos llevaron a analizar los dos genes considerados “*hot spot*”, para mutaciones asociadas a sorderas neurosensoriales y ototoxicidad: ARNr 12S y el ARNt^{ser(UCN)}. En la paciente no se detectaron las mutaciones A3243G, A1555G, ni tampoco la A827G, pero sí se observó (tienen el mismo sitio de restricción) las probables mutaciones: A7443G, G7444A y A7445G, tanto en el probando positivo como en la madre y el hermano. Para identificar cuál mutación estaba presente se envió el producto de PCR para su secuenciación, el resultado indicó sólo la presencia de la mutación G7444A. El padre no presentaba la mutación, los demás familiares por línea materna no accedieron al estudio, y la abuela por línea materna había fallecido (Figura 14). El análisis de secuenciación de los genes considerados “*hot spot*” ARNr 12S y ARNt^{ser(UCN)}, mostraron una única e idéntica mutación la G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} (Figura 15), al igual que la FS1.

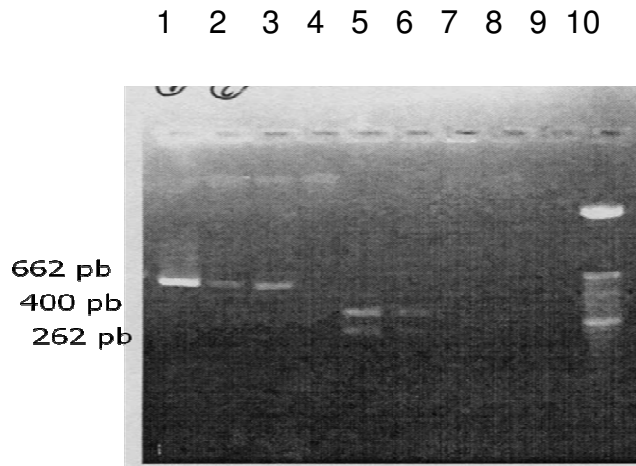
Figura 14

Figura 14: En la electroforesis en gel de agarosa al 1,6%, se observa el mismo sitio de restricción para las mutaciones (A7443G, G7444A, A7445G), en el probando, su madre y su hermano, la enzima de restricción Xba 1 no encuentra sitio de corte por la presencia de la mutación y no puede cortar el segmento amplificado de 662pb (líneas 1, 2 y 3). Las líneas 5 y 6 son controles sanos, la enzima Xba 1 encuentra sitio de corte y el segmento amplificado de 662pb, se corta en 400pb y 262pb. Línea 10 indica marcador de peso molecular de 100 a 800 pb.

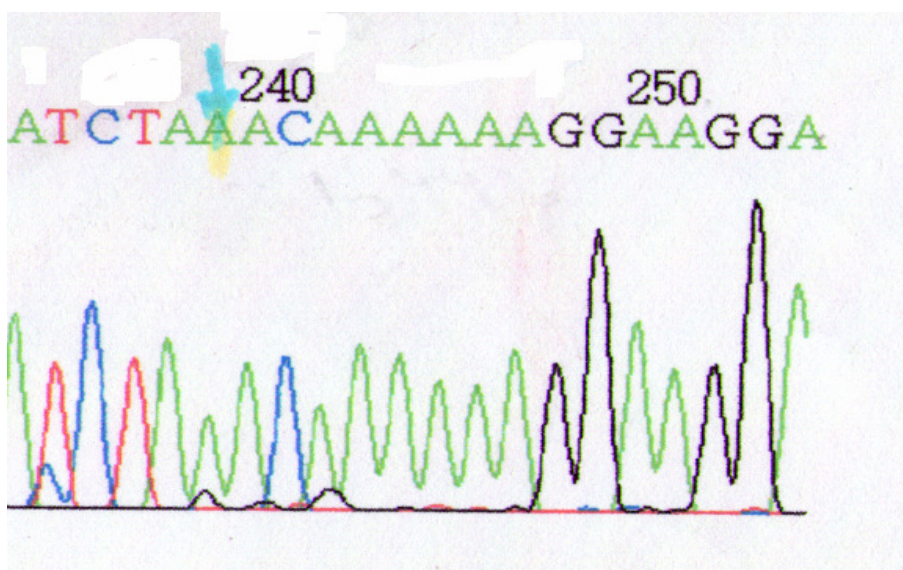
Figura 15

Figura 15: El electroforegrama muestra el cambio nucleotídico de G por A en la posición 7444, señalado en celeste.

Identificación de la mutación A827G en el gen ARNr 12S:

FS3

Hallazgos clínicos

En dos pacientes emparentadas (hermanas), que presentan sordera neurosensorial bilateral posterior a la administración de ATB-AG clínicamente no sindrómica, se observó la mutación A827G. La familia (**FS3**), vive en Córdoba – Capital. La figura 16 corresponde a un diagrama del árbol genealógico de la FS3, el probando III-9 presenta sordera neurosensorial progresiva de severa a profunda treinta días posterior a la administración de ATB-AG, luego que sufriera un accidente en sus manos a la edad de 12 años (Figuras 16 y 17). Su hermana (III-13), se accidenta también y recibe gentamicina en dosis habituales en diferente tiempo y edad (a los 9 años), al mes también presenta pérdida de la audición progresiva de severa a profunda (Figura 17). Otros exámenes audiológicos y neurológicos incluyeron: otoemisiones acústicas, impedanciometría, potenciales evocados y tomografía axial computada de hueso temporal, los mismos revelaron que la cóclea estaba afectada, pero que no presentaba malformaciones en el aparato auditivo. Varias pruebas audiológicas fueron comparadas en este estudio. En otros miembros de la familia (II-11; III-1 a III-8 and III-10 a III-12, III-14 y IV-1), quienes no tenían historia de haber recibido ATB-AG, la audición, era normal, como se observó por los estudios audiológicos y neuro-otológicos realizados. Mientras que los miembros (III-3, III-6, III-8 and III-10), exhiben sordera moderada, y refieren no haber recibido aminoglucósidos. Estos miembros no fueron examinados en este estudio.

No hay evidencia de que en esta familia, la hipoacusia pudiera acontecer por alguna otra causa. Las historias clínicas completas de los individuos estudiados no demostró ningún otro desorden como: Diabetes Mellitus, problemas visuales, enfermedades musculares, o anomalías neurológicas. El fenotipo del presente árbol genealógico, podría ser considerado como sordera neurosensorial mitocondrial, no sindrómica.

Figura 16

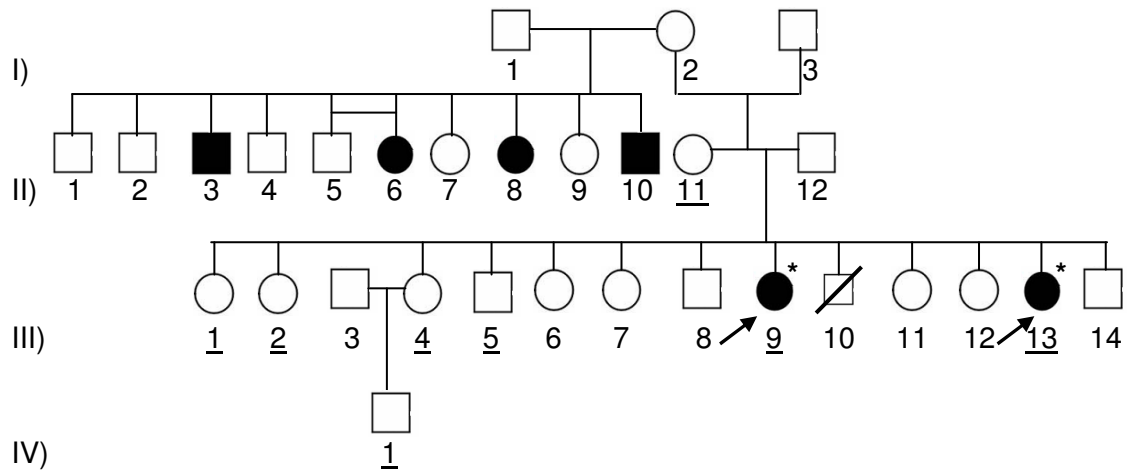


Figura 16: La pérdida de la audición se indica con símbolos llenos. Las flechas indican los probandos. Los asteriscos indican individuos que tienen una historia de exposición a ATB-AG. Los pacientes que fueron estudiados para el análisis molecular han sido subrayados.

Figura 17

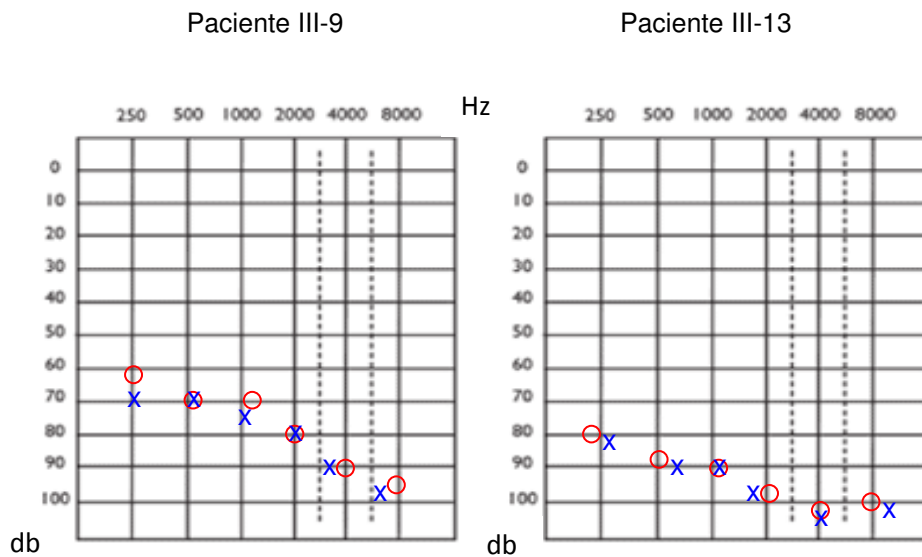


Figura 17: Estudio de audiometría realizado a las probandos III-9 y III-13 que presentan la mutación A827G en el gen ARNr 12S del ADNmt. Se observa sordera NS bilateral de severa a profunda tanto a frecuencias bajas como altas. Con el símbolo círculo se representa Oído derecho, la cruz representa el oído izquierdo. Db= decibeles; Hz= frecuencias altas y bajas.

RESULTADOS MOLECULARES

En la familia (**FS3**), se realizó en los dos genes considerados “*hot spot*”, mediante PCR-RFLP, la búsqueda de las mutaciones descritas como más frecuentes en relación a sordera y ototoxicidad: la A1555G en el gen ARNr 12S y las mutaciones A7445G, G7444A y A7443G, en el gen ARNt^{ser(UCN)}, los resultados fueron negativos. Tampoco se detectó la mutación A3243G en el gen ARN^{leu(UUR)}. La presentación clínica en las dos hermanas, sordera neurosensorial progresiva que se manifiesta 30 días después de la administración de ATB-AG, unido a los resultados mencionados, señaló la necesidad de amplificar fragmentos que incluyan los genes completos de: ARNr 12S Y ARNt^{ser(UCN)}, a fin de ser secuenciados. Estos experimentos permitieron detectar la presencia de la mutación A827G en el gen ARNr 12S en las dos hermanas y la madre (Figura 18).

En esta familia la presencia de la mutación A827G, se observa con diferente expresividad clínica. El no haber encontrado las mutaciones descritas como más frecuentes en relación a sordera y ototoxicidad, y a fin de investigar si otra/s mutación ubicada/s en otra región del ADNmt podrían contribuir al fenotipo, o bien que la mutación A827G por sí sola era patogénica, se analizó el genoma mitocondrial completo del probando III-9. Se amplificaron por PCR, 18 pares de fragmentos con sentido o “*forward*” (PF) y anti-sentido o “*reversa*” (PR), que permitieran conocer la secuencia completa del genoma mitocondrial (PF18-PR18 y PF1-PR1); la selección de los “*primers*” fue implementada en nuestro laboratorio. Luego de amplificados por PCR, los segmentos de ADNmt, se purificaron y se enviaron para su secuenciación. A partir del análisis de cada fragmento amplificado del genoma mitocondrial, y por comparación de los cambios nucleotídicos, en la base de datos del programa de informática del MITOMAP, se identificaron todos los polimorfismos presentes. Los resultados se muestran en la tabla 2. No se observan otros cambios de nucleótidos que pudieran considerarse patológicos de acuerdo al Programa de Informática MITOMAP. De 43 polimorfismos encontrados, 28 cambios de nucleótidos son considerados sinónimos, 9 son reemplazos. De éstos nueve reemplazos 4 pueden ser considerados como cambios de nucleótidos que corresponden en

la traducción a amino ácidos estructuralmente similares: en el gen ND1, nucleótido (nt) 3547: I por V; en el gen ND5, nt 12727: N por S; nt 12940: A por T; nt 12950: N por S; nt 13105: I por V; nt 13140: L por E; nt 13145: G por A; nt 13359: M por I. Dos variantes no han sido descritas todavía, como A12904C; C12982T y 2 polimorfismos están en la región no codificantes (NC). La nomenclatura de los aminoácidos descriptos, es la siguiente: I = isoleucina; V= valina; N= asparragina; S= serina; A= alanina; T= treonina; L= leucina; E= ácido glutámico; G= glicina; M= meteonina.

Se observó además, una delección de 9 pares de bases en la región 8271 a 8281 de los genes COII/ARNt^{lys}, esta delección se la considera como haplogrupo B en la población Ameroindígena.

La observación de una delección de 9 pares de bases en la región 8271 a 8281 de los genes COII/ARNt^{lys}, indica que la paciente III-9 presenta el Haplogrupo B. Se analizó también este segmento, en la madre y en cuatro hermanos de las probandos positivos. Se observó este mismo haplogrupo en los familiares estudiados, por lo que podríamos decir que esta familia por línea materna presenta el haplogrupo B (cabe destacar que esta familia no tiene antecedente Ameroindia, sino Europea). El resultado de la secuencia fue comparado con el dato obtenido del consenso de secuencia Cambridge (GenBank Accession No.: AC_000021.2) [18]. Tabla 2. Los resultados observados en este cuarto análisis de secuenciación, solo identificaron como patológica la mutación A827G en el gen ARNr 12S.

En esta familia la presencia del haplogrupo B (NC), determina la necesidad de realizar más estudios poblacionales para sugerir alguna información al respecto; dado que esta familia de acuerdo a la información obtenida tendría ascendencia europea ⁽⁸⁸⁾. Los resultados indicarían que no se ha identificado ninguna otra mutación descrita como patológica, excepto, la mutación A827G en el gen ARNr 12S y en forma homoplásmica (Figura 18). Ante la necesidad de identificar esta mutación en nuestra población de sordos (en especial aquellos considerados con probable pérdida de la audición, por ototoxicidad), es que implementamos en nuestro laboratorio, una técnica de PCR-RFLP. Se

seleccionó un juego de “*primers*” y el análisis del sitio de restricción se realizó mediante la enzima de restricción Tru 1I. (Figura 19). En 180 controles no hemos encontrado la mutación.

Conservación y variantes nucleotídicas de la estructura secundaria del ARNr 12S

Se observó la conservación del nucleótido A en la posición 827, en diferentes especies (Figura 20)

Nosotros analizamos el cambio de A827G, por sus posibles efectos sobre la estructura secundaria del ARNr, usando el software RNAfold (Hofacker IL). El estudio no demostró cambios en la estructura del ARNr 12S.

Figura 18

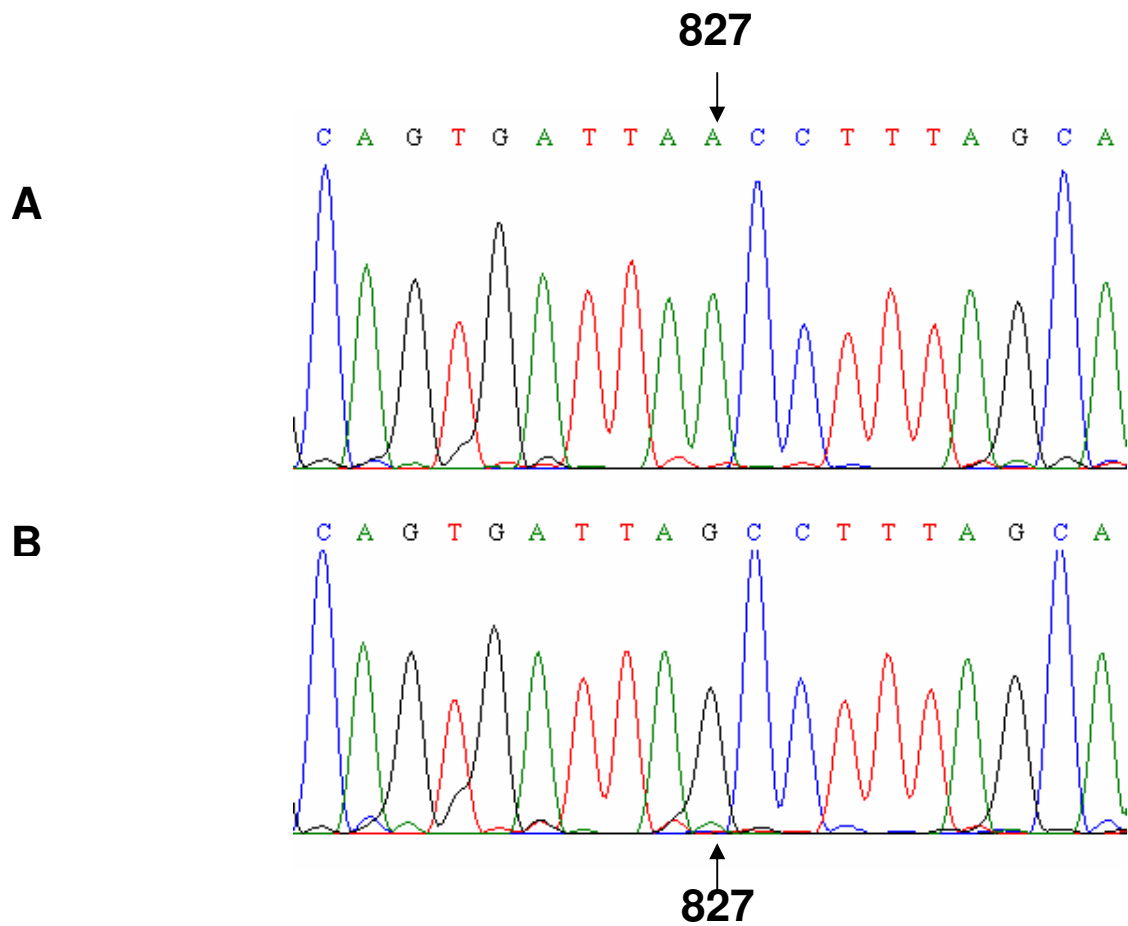


Figura 18: Muestra el electroforegrama de un fragmento amplificado del gen ARNr 12S: A: individuo normal. B: el probando III-9 con la variante A827G y la secuencia del cambio nucleotídico.

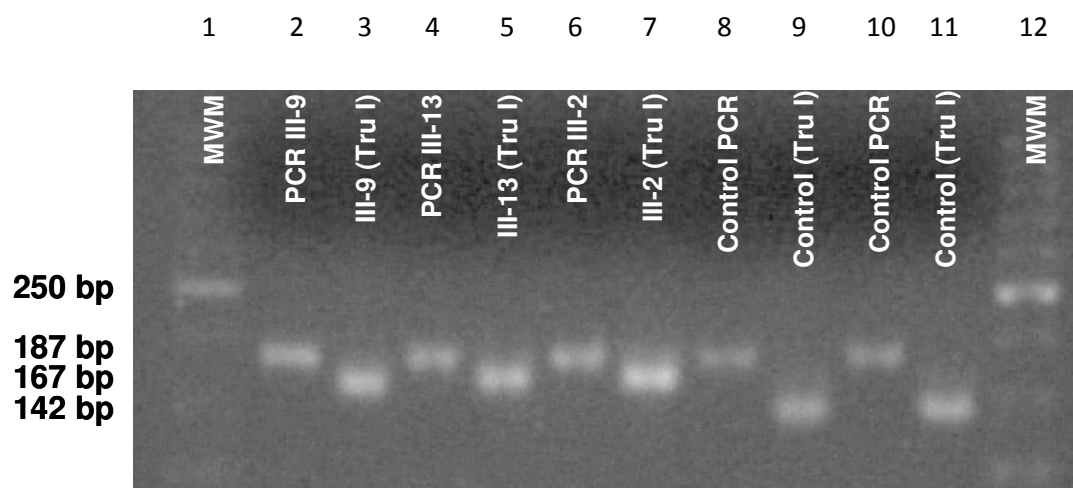
Figura 19

Figura 19: En la electroforesis en gel de agarosa al 3%, se observa la presencia de la mutación A827G en el gen ARNr 12S. Líneas 2, 4, y 6 el producto de PCR de 187 pb de probandos, 8 y 10 producto de PCR de controles. Líneas 3, 5 y 7 la enzima de restricción Tru 1 reconoce el sitio del alelo mutado, este cambio produce 2 fragmentos de 167 pb y 20 pb (este segmento no se visualiza), mientras que en las líneas 9 y 11 que son controles, la enzima reconoce otro sitio de restricción, resultando en tres fragmentos de 142 pb, 25 pb y 20 pb, éstos dos últimos fragmentos no se visualizan.

Figura 20

Bos Taurus	TGACAA A AATTAA
Homo sapiens	TGATTA A CCTTTA
Rattus norvegicus	TGATAA A TATTAA
Mus musculus	TGATAA A TATTAA
Xenopus laevis	TGATAA A CATTGA
	*** ** ** *
Consensus	TGAta A .aTT.A

Figura 20: Alineamiento de secuencias del gen ARNr 12S en diferentes especies. La posición A 827 es altamente conservada a través de la evolución.

Tabla 2. Polimorfismos que están presentes en el ADNmt completo, de la paciente III-9, que vive en Córdoba - Argentina y que porta la mutación A827G.

Gen	Posición	Reemplazo	H/h	Prev. R	codif.
D-loop	499	G por A	H	SI	syn
12S rRNA	827	A por G	H	SI	Mut.
ND1	3547	A por G	H	SI	I - V
ND2	4820	G por A	H	SI	syn
ND2	4977	T por C	h	SI	syn
COI	6473	C por T	H	SI	syn
COII/trRNA ^{Lys}	8271-8281	Del 9	H	SI	NC
COIII	9950	T por C	H	SI	syn
ND4	11590	A por G	H	SI	syn
ND5	12696	C por T	H	SI	syn
ND5	12727	T por C	H	SI	NC
ND5	12753	A por G	H	SI	N - S
ND5	12792	C por T	H	SI	syn
ND5	12795	G por A	H	SI	syn
ND5	12801	C por T	H	SI	syn
ND5	12840	C por T	H	SI	syn
ND5	12873	T por C	H	SI	syn
ND5	12888	C por T	H	SI	syn
ND5	12892	T por C	H	SI	syn
ND5	12904	A por C	H	NO	I - L
ND5	12940	G por A	H	SI	A-T
ND5	12950	A por G	H	SI	N-S
ND5	12951	C por T	H	SI	syn
ND5	12982	C por T	H	NO	L - F
ND5	13011	C por T	H	SI	syn
ND5	13020	T por C	H	SI	syn

ND5	13023	C por T	H	SI	syn
ND5	13062	A por T	H	SI	syn
ND5	13105	A por G	H	SI	I-V
ND5	13111	T por C	H	SI	syn
ND5	13140	A por G	H	SI	L - E
ND5	13145	G por A	H	SI	S-N
ND5	13164	A por C	H	SI	syn
ND5	13174	T por C	H	SI	syn
ND5	13272	C por T	H	SI	syn
ND5	13281	T por C	H	SI	syn
ND5	13359	G por A	H	SI	M-I
ND5	13368	G por A	H	SI	syn
ND5	13466	G por A	H	SI	syn
ND5	13488	T por C	H	SI	syn
Cyt b	15535	C por T	H	SI	syn
D-loop	16142	C por T	H	SI	NC
D-loop	16356	T por C	H	SI	NC

Table 2: El análisis del genoma mitocondrial completo, en el paciente (III-9), no indica que esté presente, ninguna otra mutación que se considere patológica. Esta familia presenta por línea materna el haplotipo B. (syn: sinónimos; NC: no codificantes) H/h homoplasmía o heteroplasmía respectivamente. Prev. R: Ya identificada (si). Codificación (Codif.): indica una mutación sinónima o bien, indica, el cambio de amino ácido. De 43 polimorfismos, 28 son sinónimos, 9 son reemplazos, de los cuales 4 pueden ser considerados traducción de amino ácidos estructuralmente similares. Dos variantes no han sido descriptos todavía (A12904C; C12982T) y 2 son NC.

GEN NUCLEAR: Análisis de la mutación en el gen TRMU^{35, 92}.

Para examinar el rol del gen TRMU en la manifestación del fenotipo de la mutación A827G en esta familia, nosotros realizamos la búsqueda de la mutación G28T en el gen TRMU, la cual está asociada con pérdida de la

audición producida por mutaciones en los genes ARNr 12S y ARNt^{ser}. El resultado de la búsqueda de esta mutación fue negativo.

DISCUSIÓN

En esta Tesis se presentan los resultados de la búsqueda de mutaciones mitocondriales, consideradas como responsables de producir S NS, en 116 individuos sordos y en 180 individuos controles de la Provincia de Córdoba.

De 116 pacientes que presentan sordera neurosensorial bilateral, de severa a profunda, 40 pacientes (34,8%), habían recibido ATB-AG, la sordera fue diagnosticada como pre lingual o bien post lingual. En esta subpoblación se identifican tres familias (7,5%), que presentan una mutación en los genes considerados “hot spot” (ARNr 12S Y ARNt^{ser(UCN)}), en relación a producir sordera neurosensorial, ototóxica, posterior a la administración de ATB-AG. En dos familias, se encontró en el gen ARNt^{ser(UCN)} la mutación G7444A, con una nueva presentación sindrómica de sordera neurosensorial (de acuerdo a lo descrito en la literatura), y en una familia en el gen ARNr 12S la mutación A827G de presentación no sindrómica.

La identificación de la mutación (tanto en el gen ARNr 12S (A827G), como en el gen ARNt^{ser(UCN)} (G7444A)), se realizó por análisis de PCR-RFLP y de secuenciación.

MUTACIÓN G7444A

La mutación G7444A^{ser(UCN)} fue encontrada en dos familias (FS1 y FS2), que residen en Córdoba – Argentina. En la FS1, tres miembros presentan pérdida de la audición, y dos de ellos poseen historia de exposición a ATB-AG. De acuerdo a los estudios clínicos, de laboratorio y morfológicos, la sordera neurosensorial sería de presentación sindrómica. Es interesante destacar algunos hechos:

1) La presencia de patologías autoinmunes, asociadas a la sordera, por ejemplo: en la primera generación, I-4 (tía fallecida) padeció Enfermedad de Graves Basedow; los familiares en la segunda generación (son hermanos por la línea materna) presentan: II-5 Enfermedad de Graves Basedow, II-2 y II-8 presentan Hipotiroidismo; en la tercera generación III-6 Asma Bronquial, III-7 tenía diagnóstico en la niñez de Artritis Reumatoidea (actualmente no está

bajo medicación pero refiere dolor muscular, fatiga y dolores articulares no específicos); III-10 Alopecia Areata, sus primas por línea materna presentan, III-12 Enfermedad de Graves Basedow, y III-13 Asma Bronquial.

2) Estas patologías se observan transmitidas por la línea materna, no por la línea paterna. Esta observación es reforzada por la situación de que la abuela (I-2) y la madre de los probandos (II-5) se casaron dos veces, y una tía (II-8) se ha casado tres veces; el tío (II-2) padece Hipotiroidismo, pero sus hijos, que tienen edades similares a sus primos por la línea materna, **no** padecen ninguna enfermedad hasta la fecha.

3) Cabe destacar además, que los familiares por la línea materna en la generación III, presentan patologías que pueden ser consideradas mitocondriales, por estar afectado el ADNmt, como por ejemplo III-3, III-14 refieren astenia, fatiga y dolor muscular desde muy temprana edad y III-11 pausas cardíacas en período embrionario, y post natal hasta el tercer mes de vida. Actualmente II-5, y III-3 están embarazadas y los embriones presentan pausas cardíacas, retardo de crecimiento intrauterino, y las madres requieren reposo absoluto.

La presencia de patologías a más temprana edad en las últimas generaciones, como también, la diferente penetrancia en la presentación de Sordera NS, podría estar condicionada por el porcentaje de heteroplasmía y la acumulación de la mutación, que se va produciendo con la edad, la segregación y las nuevas generaciones. Durante el envejecimiento, las células podrían acumular mutaciones nuevas en el ADNmt; lo cual podría producirse debido a que hay más de 100 copias de ADNmt por célula, (el número de copias depende de la función de la célula en ese tejido). Además, el grado de mutación (o de cambios nucleotídicos) es 10 veces mayor para el ADNmt que para el ADNn, debido a que el ADNmt no posee histonas que lo protejan, y no posee el sistema de corrección que posee el ADNn, lo que hace que el mecanismo de reparación sea menos probable⁽⁴³⁾. La ubicación del ADNmt próximo al sitio de producción de ERO, lo hace muy sensible de sufrir daños químicos favorecidos por el aumento de ERO, lo cual ocasiona más daño en el ADNmt y

de proteínas mitocondriales; además su cercanía al sistema de la OXPHOS, cuando esta está deficitaria y con menor producción de ATP, lo hace susceptible de adquirir mutaciones que se podrían acumular con el tiempo^(71,77, 38, 40, 51, 61). Estas condiciones provocarían un círculo vicioso: la presencia de la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} del ADNmt, afectaría el sistema de la OXPHOS, lo cual llevaría a un aumento en la producción de ERO, y se produciría una mayor alteración de la función mitocondrial de la OXPHOS, lo cual provoca mayor daño en el ADNmt^(90, 43, 85, 99).

Desde el punto de vista audiológico, la S NS en esta familia, que porta la mutación G7444A, se la ha asociado a factores del medio ambiente, ya sea a ATB-AG, como a exposición a ruidos. Por lo tanto podríamos considerar que causas multifactoriales (interacción entre factores del medio ambiente y susceptibilidad genética) podrían condicionar el fenotipo. Si bien estudios recientes han implicado a un gen nuclear que codifica a una proteína de los canales de K⁺, como responsable de producir S NS luego de exposición a ruidos, todavía no se han descrito mutaciones en el ADNmt, que estén asociadas a ruidos^(43, 1, 31, 32).

En la **FS2**, la presencia de enfermedades asociadas a sordera, como por ejemplo: en las pacientes I-3 y 4; II-5 (enfermedad de Graves Basedow e hipotiroidismo), II-3 (asma bronquial), I-1, 3 y 4; II-1 (trastornos de la conducción cardíaca), es decir un fenotipo similar a la FS1, al igual que la presentación de la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} por la línea materna. Si bien no se pudo realizar en la FS2 los estudios morfológicos y bioquímicos, los resultados obtenidos indicarían que la mutación estaría provocando el mismo fenotipo en estas dos familias.

Se ha identificado la transición de G por A en la posición del nucleótido 7444 en el gen ARNt^{ser(UCN)} de presentación homoplásmica en la línea linfocitaria. No es posible utilizar el tejido coclear, para la búsqueda de la presencia de la mutación. Esto es importante, debido a que algunos autores, han considerado que mutaciones puntuales en los genes ARNts del ADNmt, conducen a Sordera NS no sindrómica, ya que no estarían afectados otros órganos o

sistemas^(43,39,69, 20). Sin embargo, otros autores han propuesto que mutaciones puntuales en los genes que codifican a los ARNts, ocasionarían presentaciones sindrómicas, y que pueden estar acompañadas o no de sordera NS^(72, 82, 52, 54, 96, 62, 6, 11).

Forli²⁸ describe las mutaciones mitocondriales que producen sordera NS sindrómica, identificadas en diferentes regiones en el mundo:

En el gen ARNt^{leu(UUR)}, el síndrome de MELAS (acidosis láctica, mioencefalopatía y ataques recurrentes vasculares; Diabetes mellitus y sordera NS), mutaciones:

A3243G

A3252G

C3256T

T3271C

T3291C

En el gen ND4, en el gen ARNt^{ser(UCN)}, y en el gen ARNr 12S, el síndrome de MERRF (epilepsia mioclónica, ataxia, demencia, atrofia óptica y pérdida de la audición, con presencia de fibras rojas rasgadas), mutaciones:

A11084G

A8344G

T8356C

G12147A

T7512C

G611A

Deleciones/duplicaciones en el ADNmt y en los genes ARNt^{leu(UUR)}, ARNt^e, y ATPasa8, el síndrome Diabetes y sordera heredadas por línea materna (MIDD), mutaciones:

A3243G

A8296G

T14709C

En el gen $ARNt^{ser(UCN)}$, síndrome de sordera y queratodermia palmoplantar, síndrome de sordera, ataxia y mioclonus, mutaciones:

A7445G

7472insC

Deleciones en el ADNmt, el síndrome de Kearns-Sayre (KSS)

Deleciones en el ADNmt y transmisión autosómica recesiva, síndrome de Diabetes mellitus, diabetes insípida, atrofia óptica y pérdida de la audición.

La mutación G7444A en el gen $ARNt^{ser(UCN)}$, ha sido previamente descrita que produce sordera neurosensorial **no sindrómica** y asociada a ototoxicidad⁽¹⁰⁰⁾. Pero en la **FS1**, como en la **FS2**, la presencia de la mutación asociada a patologías que se presentan con una etiología autoinmune como enfermedad de Graves Basedow, hipotiroidismo, asma bronquial y además en **FS1** alopecia Areata, y que se manifiestan solo por la línea materna. Dado que en esta familia los estudios bioquímicos y morfológicos indican enfermedad mitocondrial, sugiere que en estas dos familias no emparentadas entre sí, la mutación tiene una **nueva presentación sindrómica**. Este nuevo fenotipo clínico estaría relacionado con la mutación en el ADNmt, pero creemos que otros factores, podrían estar jugando un rol en la presentación del fenotipo. Ante la presencia de una mutación mitocondrial, es necesario tener presente la relación intergenómica, ya que genes nucleares, no solo codifican proteínas que intervienen en la OXPHOS, sino que codifican además proteínas que están involucradas en la formación de ERO, apoptosis y de la integridad y replicación del ADNmt. Así el complejo inter-juego de defectos en la OXPHOS, apoptosis y control del “*stress*” oxidativo, causados por mutaciones genéticas o adquiridas, tanto en genes mitocondriales o nucleares, involucraría proteínas mitocondriales, lo cual afectaría la función mitocondrial^(43, 12, 85). El medio ambiente podría contribuir en la expresión sindrómica de la mutación 7444 con una alta penetrancia, pero es necesario pensar, que quizás otros factores de riesgo, además de los aminoglucósidos, estén jugando un rol, como haplotipos

mitocondriales y/o genes nucleares modificadores o asociados. Habida cuenta la marcada variación geográfica de los subhaplogrupos específicos, Hudson⁽³⁷⁾ propuso que la asociación subhaplogrupo – mutación, puede ser importante en una región o país, pero no en otra. Así, la variación geográfica implica que otros factores estén jugando un rol. Por ejemplo el fenotipo asociado a una mutación mitocondrial, como la G7444A, puede ser diferente en distintas regiones o países. Esta situación podría ser debida a su asociación a diferentes haplogrupos o haplotipos presentes en esas regiones. Otro punto a considerar en la expresión del fenotipo o la penetrancia de la mutación, es la presencia de genes nucleares modificadores o asociados que estén jugando un rol. Por último, sería necesario tener en cuenta en la expresión clínica de la mutación, factores del medio ambiente, tanto externos como internos, por ejemplo: mala alimentación, ATB-AG, tabaco, alcohol, drogas etc.

Las alteraciones bioquímicas y morfológicas que se observan en biopsia de músculo del probando III-5 permitiría establecer una relación entre la presencia de la mutación y la presentación clínica observada en la paciente. Es posible que también contribuya al fenotipo, un diferente porcentaje de heteroplasmía que los tejidos afectados posean. Todos estos factores contribuirían en la expresión clínica de sordera neurosensorial, astenia, fatiga y disminución del coeficiente intelectual.

En el presente estudio, se cuantificó la actividad enzimática del complejo IV (COX) de la cadena respiratoria y de la citrato sintasa, en homogenatos de biopsia de músculo esquelético. Mediante la relación de la actividades de la Citocromo C Oxidasa (enzima sintetizada por el ADNmt y el ADNn), respecto de la actividad de la Citrato Sintasa (enzima exclusivamente mitocondrial, que es sintetizada solamente por el ADNn), las actividades fueron normalizadas para el control y las pacientes III-5 y II-5.

En la paciente II-5 es llamativa aparte de la baja actividad de la COX, la baja actividad de la CS. Al observar las fotos de ME (Figura 11 E), se destaca el bajo número de mitocondrias y de apariencia muy amorfas. Esto podría explicar el valor tan bajo de la actividad de la CS. Además, no sabemos si algún factor o

factores, además de la disminución en la actividad de la COX, es responsable de la disminución en el número de mitocondrias y de las alteraciones que se observan en las mismas. Para esta paciente la relación COX/CS (0,94) es mayor que en el control (Tabla 1). Estos datos se correlacionan con los estudios en microscopía óptica, en los que se destaca la presencia de fibras rojas rasgadas que son patognomónicas de citopatía mitocondrial (Figura 10 A). En relación a la ME, hay alteración de la estructura del músculo y número disminuido de mitocondrias⁽⁷⁸⁾, lo cual indicaría la afectación funcional del músculo (Figura 11 E). En la paciente III-5 los valores de actividad de CS son muy similares a los del control; en cambio hay una marcada disminución de la actividad de COX, por lo cual el valor de la relación COX/CS es muy inferior al del control (21,6%). En la MO se observa la presencia de fibras rojas rasgadas (Figura 10 B). En los estudios de ME se observan (fibrosis del sarcómero, mitocondrias amorfas con inclusiones paracristalinas y depósito abundante de glucógeno, Figura 11 A y B), correlacionados con los resultados de la actividad enzimática y la relación COX/CS (que está indicando una actividad del 21,6% respecto del control), determinan que la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} en esta familia, tiene una **nueva presentación sindrómica de la S NS**. Es importante destacar en la ME del corte de biopsia de músculo esquelético, de la paciente III-5, que el núcleo de la fibra muscular está sano, sin signos de apoptosis (Figura C). Mientras que la mitocondria se presenta amorfa, desorganizada en especial al observar la membrana interna de la mitocondria, y con la presencia de inclusiones paracristalinas (Figura 11D). Esto indicaría que la afectación del músculo es funcional.

En la FS2 (no emparentada con la FS1), que presenta: 1.- sordera neurosensorial bilateral prelingual posterior a la administración de ATB-AG; 2.- similaridad en la presentación de patologías por línea materna; 3.- presencia de la mutación G7444A (si bien no se pudo realizar los estudios bioquímicos y morfológicos), estos hallazgos clínicos y moleculares, indicarían el carácter sindrómico de la mutación G7444A en estas dos familias. Este fenotipo, que podría estar condicionado por el medio ambiente o bien, por la participación de otros factores como genes nucleares modificadores o asociados y/o haplotipos

mitocondriales, también podrían estar favoreciendo la presentación sindrómica de la mutación. La familia (FS2) no accedió al estudio bioquímico y morfológico, pero desde el punto de vista clínico y molecular guardan la misma relación que la FS1. La mutación G7444A en el gen $ARNt^{ser(UCN)}ADNmt$ se presenta también en FS2, homoplásmica en línea celular linfocitaria y por línea materna. La presencia de patologías como trastornos de la conducción cardíaca, tireoideopatías: Enfermedad de Graves Basedow, e hipotiroidismo, y asma bronquial son índices que identificarían a la mutación como su etiología.

MUTACIÓN A827G

Respecto a la familia (**FS3**), se informa la caracterización clínica y molecular de una familia Argentina que presenta sordera neurosensorial inducida por aminoglucósidos. Los estudios audiológicos: audiometrías, impedanciometrías, potenciales evocados y otoemisiones acústicas realizados a los miembros de esta familia (Figura 13), indicaron que únicamente III-9 y III-13 presentan hipoacusia bilateral neurosensorial, de severa a profunda y progresiva. Que se presenta posterior a la administración de ATB-AG, al momento de padecer un accidente en sus manos en diferentes tiempos y edades. Los pacientes II-3, 6, 8 y 10 (Figura 12) también presentan hipoacusia pero moderada, y no es posible precisar si estuvieron o no expuestos a ATB-AG. Estos miembros de la familia por línea materna, no accedieron a ser estudiados en el presente estudio. La resonancia magnética nuclear de hueso temporal, realizadas a las pacientes III-9 y 13, no demuestran malformación del aparato auditivo. Estas pacientes presentan una fuerte evidencia de que la cóclea está afectada; la historia de exposición a ATB-AG, sugirió que el ADNmt estaba involucrado, lo que nos llevó a estudiar y analizar primero las mutaciones asociadas a los genes considerados “*hot spot*” como ARNr 12S y ARNt^{ser(UCN)}. Dado que no se encontraron las mutaciones A1555G, A7443G, A7445G, G7444A, y tampoco la mutación A3243G en el gen ARNt^{leu(UUR)}; se decidió estudiar por secuenciación los genes completos del ARNr 12S y ARNt^{ser(UCN)} por la línea materna. Nosotros identificamos sólo la transición A827G en el gen ARNr 12S en el ADNmt. Nuestro resultado estaría confirmando que la mutación estaría involucrada en la expresión de la sordera neurosensorial no sindrómica, posterior a la administración de aminoglucósidos (gentamicina), en esta familia. Primero, la mutación está presente solamente en miembros de la familia por la línea materna en forma homoplásmica; en la búsqueda poblacional realizada en 180 controles, no se la ha encontrado. Además en el año 2004 se describe por primera vez, en otras dos familias Chinas no emparentadas entre sí, que esta mutación ha sido implicada de estar asociada con sordera neurosensorial no sindrómica y de producir ototoxicidad posterior a la administración de ATB-AG⁽⁸⁹⁾, lo cual indicaría la patogénesis de la mutación. Segundo, la mutación

está localizada en el sitio A del ARNr 12S que es altamente conservado a través de la evolución en diferentes especies (Figura 16). Pero la mutación por sí sola, no es suficiente para la presentación del fenotipo, otros factores de riesgo además del medio ambiente podrían estar jugando un rol [\(2, 17, 35, 39, 48, 55\)](#), como por ejemplo otras mutaciones en el ADNmt. Por lo que se decidió estudiar el genoma mitocondrial completo en la paciente III-9. En este estudio no se encontró ninguna otra mutación, que pudiera ser considerada patológica. De 43 cambios nucleotídicos, 28 son sinónimos, 9 son reemplazos de amino ácidos, y de éstos 9, 4 codifican amino ácidos con características de polaridad similares. Dos variaciones, no han sido descritas todavía, y 2 son no codificantes (NC), (Tabla 2). La paciente III-9, presenta el haplotipo B, al igual que 6 miembros de la familia, por la línea materna (en quienes se les estudió por secuenciación los segmentos que se consideraron de interés, de acuerdo al resultado obtenido de la paciente III-9), por lo que podríamos decir que esta familia porta el haplotipo B (Tabla 2).

De acuerdo a lo expresado por Acchilli⁽²⁾, América es el Continente del cual se posee la menor información respecto a haplogrupos de su población nativa. En esta población se incluyen nativos puros, que se considera que ingresaron siguiendo el estrecho de Beringian, de aquella población que se ha mezclado con las corrientes inmigratorias. Sólo a un número limitado de individuos Nativos de América (Ameroindios), se les ha podido realizar el estudio, mediante secuenciamiento completo del ADN mitocondrial, para el estudio de los haplogrupos. Así, se han identificado los siguientes haplogrupos: A2, B2, C1 y D1 de los cuáles derivan otros haplotipos: A2a, A2b; B2a, B2b, B2c y B2d; C1a, C4a y C4b; D2b y D4h1.

La **FS3** que porta la mutación A827G en el gen ARNr 12S, presenta por línea materna el haplogrupo B. El haplogrupo B, es una delección de 8 pares de bases que se presenta en los genes COII/ARNt^{lys} (nts 8271 a 8281). Nosotros no hemos asociado la presencia del haplogrupo B en esta FS3, con los diferentes haplotipos descritos por Achilli⁽²⁾, para este haplogrupo, en la población Ameroindia. Por ejemplo:

- 1.- La transición C16111T ni G16483A que identifica al haplotipo B2a.
- 2.- La transición A10895G que identifica al haplotipo B2a1.
- 3.- La transición G6755A y A7241G, para el haplotipo B2b y B2c, respectivamente.
- 4.- Nucleótidos que sufren modificación como: 4122, 4123, 8875 y 9682, para el haplotipo B2d. (Tabla 2).

Cabe destacar que la familia **FS3** por línea materna, tiene ascendencia española. Estos hechos, no nos permiten concluir si este haplogrupo en esta familia, podría de alguna manera estar modificando el comportamiento de la mutación A827G en el gen ARNr 12S. Es necesario realizar estudios poblacionales en relación a los haplogrupos, para poder arribar a una información más aproximada. Por lo tanto, es importante analizar en un futuro, si esto podría responder quizás, de qué manera, la distribución de la variación nucleotídica, en las diferentes regiones geográficas del mundo, permitiría conocer si los haplogrupos son debidos a una adaptación a los diferentes climas, o bien que su distribución es consecuencia de un cambio genético gradual al azar, dirigido por una segregación que va eliminando los cambios no sinónimos⁽⁴²⁾.

Es posible que la alteración de la estructura cuaternaria del ARNr 12S por la mutación A827G, pueda llevar a disfunción mitocondrial y jugar un rol en la patogénesis de la sordera. En especial cuando se administra ATB-AG, debido a que se condicionaría una interacción importante del ARNr 12S con los ATB-AG. Esta interacción, ocasionaría una disminución en la biosíntesis de proteínas mitocondriales, y por consiguiente una disminución en la producción de ATP, tan necesario para el buen funcionamiento del aparato auditivo.

Las evaluaciones clínicas revelaron que solamente 6 de 30 miembros en esta familia Argentina (20%), desarrollaron pérdida de la audición. El hecho de la incompleta penetrancia indicaría que la mutación sola, no sería suficiente para producir el fenotipo y que requiere de la contribución de factores moduladores

incluyendo los aminoglucósidos^(69, 97), polimorfismos/haplotipos mitocondriales o genes nucleares modificadores o asociados^(35, 97). Si el haplotipo B (que está presente en población Indígena Americana) o las variaciones no descritas todavía en el Mitomap (www.mitomap.org.) como A12904C; C12982T (Tabla 2) podrían influir en la expresión del fenotipo de la mutación A827G, requerirá de seguimiento y evaluación clínica. También es importante buscar la presencia de estas variaciones nucleotídicas en otros pacientes sordos, que presenten o no la mutación A827G. En la FS3 deberán ser evaluados incidencia de patologías que se presenten por línea materna, que en el presente no manifiestan. Otro aspecto, es observar la actualización del Programa de Informática MITOMAP, que indique si estas variaciones están presentes y si se consideran patológicas o no. Por lo tanto, es importante continuar el seguimiento y evaluación clínica de las dos pacientes y sus familiares por línea materna, y ante la sospecha de otro signo o síntoma considerado como causa probable mitocondrial, se evaluará la necesidad de realizar estudios de función mitocondrial, que nos permitan identificar a la mutación ya no, como no sindrómica, sino sindrómica. En relación al haplogrupo B destacamos que por línea materna, esta familia tiene ascendencia europea. Así, un punto a discutir sería, ¿de qué manera el polimorfismo podría estar jugando un rol en la presentación del fenotipo, ante una mutación en el ADNmt, considerada patogénica? Se sabe que en el ADNmt ocurren mutaciones mitocondriales espontáneas, que no tienen significancia clínica (polimorfismo); por ejemplo entre individuos, aun intra-familias, puede haber cambios de 50 a 70 nucleótidos de diferencia. Para valorar este punto se requiere observar ante una mutación en el ADNmt considerada patogénica, el polimorfismo en el probando y también el polimorfismo en los miembros de la familia por la línea materna, para la presentación del fenotipo. Por otra parte, la presencia de una mutación en el gen TRMU, ha sido considerada que es capaz de modificar la severidad de la pérdida de la audición cuando está asociada con mutaciones en el ADNmt^(35, 77). Para examinar el rol del gen TRMU en la expresión del fenotipo, nosotros realizamos la búsqueda de la mutación en esta familia. Tanto el estudio de PCR-RFLP como de secuenciación reveló ausencia de la mutación.

Es importante resaltar:

En este trabajo realizado en una poblaciones de 116 pacientes con S NS (de los cuáles 40 habían recibido ATB-AG), y otra de 180 controles, hemos observado:

Dos presentaciones de sorderas neurosensoriales mitocondriales: **Sindrómicas** (la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} en dos probandos no emparentados y sus familias por línea materna); y **No Sindrómica** (la mutación A827G en el gen ARNr 12S en el ADNmt)

Cabe destacar que para considerar que una mutación en el ADNmt, es patogénica, es necesario observar:

1º.- Que la mutación no se presente en individuos considerados normales.

2º.- La mutación en el ADNmt debe alterar un sitio considerado altamente específico y conservado, tanto en humanos como en otras especies.

3º.- La mutación en el ADNmt debería afectar la fosforilación oxidativa.

4º.- Se debe considerar el grado de heteroplasmía y severidad clínica, y en homoplasmía la especificidad de tejido.

En relación al punto 1, en la búsqueda de las mutaciones en el ADNmt, no se encontraron las mutaciones descritas y consideradas como patológicas. En 180 individuos controles, no se las ha encontrado tampoco.

Con respecto al punto 2: Las mutaciones G7444A y A827G, se encuentran en sitios altamente conservados en la evolución en diferentes especies.

En el punto 3: Las FS1 y FS2, presentan la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser}. Desde el punto de vista clínico, presentan también, las mismas patologías por línea materna. Los estudios morfológicos y bioquímicos realizados en la FS1, indicaron la afectación del complejo IV de la OXPHOS. Si

bien en la FS2 no se pudo realizar los estudios bioquímicos y morfológicos, la similitud en los hallazgos de la presentación clínica y de los estudios moleculares realizados en esta familia, nos permitiría identificar a la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)} ADNmt en nuestra población de sordos Córdoba - Argentina como **una nueva presentación sindrómica de la mutación.**

Respecto del punto 4 (heteroplasmía, homoplasmía), la presencia de una mutación en el ADNmt (en tejidos o líneas celulares accesibles), podría condicionar que el umbral sea más alto en algunos tejidos, afectándose la OXPHOS (en especial en aquellos que requieren necesidades energéticas mayores, como sistema nervioso, músculo estriado y cardíaco, sistema endócrino, cóclea, visión). Mientras que para otros tejidos es más bajo el umbral en un mismo individuo, o bien con diferente penetrancia para individuos inter e intra-familia (no afectándose la OXPHOS). Así, la relación de moléculas de ADNmt normales y mutadas, serían muy variables, de célula a célula, de tejido a tejido de individuo a individuo. Hudson⁽³⁷⁾ al estudiar una población que presenta el Síndrome de LHON, refiere que en la línea de células linfocitaria, la presencia de la mutación se presenta homoplásmica. La presentación clínica respecto a la edad de comienzo, severidad y progresión de la enfermedad es más grave, que cuando se presenta la mutación en forma heteroplásmica en la misma línea celular. Esto indicaría que la especificidad de tejido, de alguna manera estaría relacionada con la presentación de la mutación tanto en las células de la visión, como de la línea linfocitaria. Otro punto interesante de analizar sería el polimorfismo y/o el haplogrupo/haplotipo.

En la FS1 el músculo esquelético demuestra por los estudios bioquímicos y morfológicos realizados, la citopatía mitocondrial y nos permite relacionar este hallazgo en músculo, con la afectación de otros tejidos o sistemas que presenta esta familia por la línea materna.

En la FS3, se observa más bien especificidad de tejido, y no sabemos con precisión de qué manera el polimorfismo y/o el haplotipo, intervienen en la presentación del fenotipo. La diferente presentación tanto de hipoacusia como de audición normal que se observa en los diferentes miembros de esta familia,

sugeriría que la presencia de una mutación patológica en algunas copias del ADNmt (heteroplasmía en alto porcentaje u homoplasmía para la mutación), no siempre llevan inexorablemente a enfermedad. Habría individuos que, pueden a pesar de tener cantidades detectables de la mutación en su sangre, no manifestar los síntomas hasta avanzada edad, en que los presenta, como presbiacusia. Otros, en cambio, pueden padecer la enfermedad en su máximo grado desde temprana edad. Hasta el presente no hay suficiente conocimiento sobre la patogenicidad y desarrollo de sorderas NS, tanto sindrómicas como no sindrómicas mitocondriales. Es probable, que otros factores como medio ambiente externo e interno y genes nucleares modificadores o asociados jueguen un papel en la expresión del fenotipo. Ya sea inhibiendo o estimulando la expresividad genética y alterando o conservando la función mitocondrial.

La discordancia observada en estudios de sordera neurosensorial, por estar afectados genes del ADNmt en el mundo, reflejan la necesidad de seguir analizando los hallazgos en cada región. Por ejemplo: Pandya⁽⁶⁴⁾ demostró en estudiantes de Mongolia que presentaban sordera NS, la coexistencia de dos mutaciones mitocondriales una en el gen ARNr 12S (A1555G) y la otra en el gen ARNt^{ser(UCN)} (G7444A). La asociación de estas dos mutaciones sugirió, cuál sería la causa de que en esta población, se presentaba la S NS con mayor severidad y a más temprana edad, que en la población de hipoacúsicos que presentaban la mutación A1555G sola y sin exposición a ATB-AG.

López-Biga⁽⁴⁹⁾ investiga la asociación de mutaciones en genes considerados "hot spot" del ADNmt, para producir sordera neurosensorial por ototoxicidad (ARNr 12S Y ARNt^{ser(UCN)}), con mutaciones en genes nucleares, en relación a la expresividad de estos genes mitocondriales. El estudio se realiza en 42 familias, en las cuáles algunos de sus miembros presentaban S NS y posiblemente en alguno de sus miembros la S NS se debía a ototoxicidad. De estas familias, 19 presentaban la mutación A1555G ARNr 12S y en esta misma población estudiaron también el exón 2 de la conexina 26 gen GJB2 del ADNn. En aquellas familias donde se observó la presencia de las dos mutaciones, no se reportó evidencia de que el gen de la conexina 26, pudiera con su mutación, modificar la expresividad de la mutación A1555G en el gen

ARNr 12S, sea en la edad de aparición de la sordera, la severidad y/o progresión de la misma en pacientes de España.

En Argentina, los estudios de Gravina⁽³¹⁾, como los estudios nuestros⁽⁸⁾, no reportan el hallazgo de la mutación A1555G en el gen ARNr 12S (en las poblaciones de sordos de Buenos Aires y Córdoba – Argentina), descrita en el mundo como la de mayor prevalencia de producir S NS NS y asociada a ototoxicidad. Pero en esta Tesis sí reportamos, la mutación A827G en el gen ARNr 12S de producir sordera NS NS y asociada a ototoxicidad.

Respecto de las mutaciones A7443G, G7444A Y A7445G (en el gen ARNt^{ser(UCN)}), Pandya⁽⁶⁴⁾ encontró la mutación G7444A^{ser(UCN)} asociada al Síndrome de LHON (que no se acompaña de sordera). La consideró asociada o bien, como un polimorfismo asociado a las mutaciones mitocondriales responsables de causar el síndrome de LHON, G11778A, T14484C y G3460A. En este estudio Pandya⁽⁶⁴⁾ destacó que la mutación G7444A^{ser(UCN)} no la encontró en controles. Mientras que Torroni⁽⁸²⁾ en Italia, en un estudio realizado en 37 familias que padecen el Síndrome de LHON, no encuentra la mutación G7444A ARNt^{ser(UCN)}, asociada a las mutaciones G11778A, T14484C y G3460A. Tampoco la identifica en controles. **Curiosamente Pandya⁽⁶⁴⁾, encuentra (en una población de sordos de Estados Unidos) a la mutación G7444A^{ser(UCN)}, como responsable de producir sordera NS por sí sola.**

En este estudio hemos caracterizado la mutación G7444A^{ser(UCN)}, como causa de producir sordera NS, posiblemente posterior a la administración de ATB-AG, por lo que la mutación estaría relacionada a ototoxicidad. En la FS1 la S NS posiblemente también esté relacionada a la exposición continuada de ruidos. Los estudios bioquímicos y morfológicos indicarían que en Córdoba – Argentina la mutación tendría una nueva presentación sindrómica, reforzada por el hecho de que en controles no se la ha encontrado.

Los cuatro puntos 1) no se debe observar la mutación en la población control, 2) debe alterar un sitio considerado como altamente específico y conservado en la evolución de diferentes especies, 3) debe afectar la OXPHOS, y 4) la presencia de la mutación en alto porcentaje de heteroplásmica u homoplásmica

(en la línea linfocitaria, o en tejidos de fácil acceso), se han correlacionado en estas familias estudiadas. Por lo tanto, se podría establecer una correlación entre genotipo y fenotipo, ante la presencia de la mutación en el ADNmt considerada patogénica, capaz de producir enfermedad mitocondrial, sea individual, inter, intra-familia o de familias no emparentadas, pero que presentan la misma mutación^(43, 69, 90).

Las mitocondrias cumplen funciones metabólicas especializadas diferentes de acuerdo al tejido en que se encuentren, que son debidas a la especialización obligada en la diferenciación celular, de la célula en la cual reside. Estos cambios obligados (que los humanos desarrollan desde la etapa embrionaria al adulto), están dados por el comportamiento y medio ambiente post natal de nuestros tejidos en crecimiento, maduración y adaptación^(90,43). Se observa así, en cada sujeto, si se le secuencian el genoma mitocondrial completo, un número de variaciones nucleotídicas respecto a la secuencia de Cambridge. La vasta mayoría de estas diferencias son simples polimorfismos y no son clínicamente significativas. ¿Pero de qué manera podría el medio ambiente, influir ante una mutación mitocondrial no sinónima? La respuesta no está clara todavía y es necesario realizar otros estudios, sin dejar de descartar que otros factores como genes nucleares, podrían estar influyendo en la presentación del fenotipo.

CONCLUSIÓN

Este es el primer trabajo que se realiza en la Provincia de Córdoba, y el segundo en el País, en relación a la identificación de mutaciones en el ADNmt, consideradas como causa de producir Sordera Neurosensorial Sindrónica y No Sindrónica, relacionada además con ototoxicidad.

1.- En esta población de hipoacúsicos, considerados posiblemente por ototoxicidad, no se han encontrado las mutaciones de mayor incidencia o prevalencia descritas como causante de sordera NS y ototoxicidad como la mutación A1555G, en el gen ARNr 12S^(31,24,48), ni tampoco la mutación A7445G en el gen ARNt^{ser(UCN)}⁽³³⁾. Sin embargo, en dos familias, se ha encontrado la mutación G7444A, y en una tercera familia la mutación A827G. Por lo tanto destacamos la necesidad de estudiar por análisis de secuenciación, en el resto de esta población de hipoacúsicos estudiada (como en todo individuo cuya sordera neurosensorial sea considerada posterior a la administración de aminoglucósidos), en primer lugar los genes considerados “*hot spot*” para la búsqueda de otras mutaciones que pudieran estar presentes en estos genes, en nuestra población de sordos.

2.- El resultado negativo de la secuenciación de los genes considerados “*hot spot*”, en un individuo sordo, cuya causa probable sea por ototoxicidad, se sugiere realizar un estudio de análisis secuencial de todo el genoma mitocondrial, que nos va a permitir conocer si otras mutaciones están presentes en el ADNmt. Observar también la presencia de haplogrupos o haplotipos que pudieran determinar el fenotipo, y su relación con el medio ambiente, en nuestra población de sordos.

3.- Basado en los estudios clínicos, moleculares, bioquímicos, morfológicos y la expresión del fenotipo, es posible considerar que la mutación G7444A en el gen ARNt^{ser(UCN)}, en la familia (FS1) y en (FS2) de Córdoba – Argentina, tenga una **nueva presentación sindrónica** de sordera neurosensorial, asociada a ototoxicidad. Es necesario no descartar otros factores de riesgo, que podrían estar presentes además del medio ambiente, como mutaciones en genes nucleares modificadores o asociados y haplogrupos/haplotipos en el ADNmt.

- 4.- La mutación A827G en el gen ARNr 12S (FS3), puede ser considerada no sindrómica, homoplásmica y de ser responsable de la ototoxicidad luego de la administración de ATB-AG.
- 5.- Es necesario analizar en la FS3, si el haplogrupo B (que no presenta los haplotipos descritos en la literatura⁽²⁾), como las mutaciones no descritas todavía en el Mitomap (www.mitomap.org.) A12904C; C12982T (Tabla 2) podrían influir en la expresión del fenotipo de la mutación A827G. Por lo que se requerirá de seguimiento y evaluación clínica de las dos pacientes y sus familiares por línea materna, y ante la sospecha de otro signo o síntoma considerado como causa probable mitocondrial, se evaluará la necesidad de realizar estudios de función mitocondrial, que nos permitan identificar a la mutación ya no, como no sindrómica, sino sindrómica.
- 6.- La asociación de las mutaciones A827G y G7444A con la producción de sordera neurosensorial posterior a la administración de ATB-AG, determina la importancia de realizar prevención, mediante Programas de Prevención, y Educación en Salud.
- 7.- Otra población que debería considerarse en estudio para mutaciones en el ADNmt (en este Programa de Prevención y Educación en Salud), sería la población expuesta a ruidos. En la búsqueda de mutaciones en el ADNmt como así también en el ADNn, y observar si existe asociación entre estas mutaciones de ambos ADNs y ototoxicidad.
- 8.- Se considera además necesario evaluar la presencia de signos y síntomas, en el Sistema Nervioso Central, Sistema Endocrinológico, Digestivo, Muscular, órganos de la visión y auditivo, que podrían corresponderse con una etiología mitocondrial, en el recién nacido, niño, joven o adulto, para evaluar la posibilidad de estudios genéticos, bioquímicos y morfológicos. El estudio completo de estos pacientes nos permitirían realizar asesoramiento genético, prevención en la familia (en el caso de la presencia de la mutación en genes considerados "*hot spot*"), en el uso de ATB-AG por la línea materna, además de estudiar el comportamiento del ADNmt en nuestra población de sordos Córdoba – Argentina.

En anexo 1 se detalla un protocolo de estudio en el seguimiento de un paciente, en quién se sospecha una citopatía o enfermedad mitocondrial.

ANEXO 1**PROTOCOLO DE ESTUDIO:****SORDERAS MITOCONDRIALES SINDRÓMICAS Y NO SINDRÓMICAS****Presentación clínica:**

Feto: Retardo de crecimiento intrauterino (pequeño para la edad gestacional)

Alteraciones cardíacas

Insuficiencia hepática

Nacimiento: Bajo peso al nacer

Trastornos cardíacos

Insuficiencia hepática

No ganan peso

Neuromiopatías

Acidosis láctica

Ataques recurrentes vasculares

Sordera neurosensorial

Primera infancia: Sordera neurosensorial/ congénita o post ATB-AG

Neuromiopatías

Acidosis láctica

Ataques recurrentes vasculares cerebrales

Velocidad de crecimiento retardada

Dolores musculares / fatiga/ astenia al caminar

Segunda infancia: Sordera neurosensorial/ congénita, post lingual o por ATB-AG

Enfermedad sistémica inmunológica?

Fatiga/astenia dolores musculares

Neuromiopatías de difícil diagnóstico etiológico

Cefaleas mitocondriales

Adolescencia: Idem

Adulto: Sordera neurosensorial/ pre y post lingual/ post ATB-AG

Diabetes mellitus

Trastornos de conducción cardíaca

Miopatías mitocondriales

Cefaleas mitocondriales

Tercera edad: Idem

Sordera neurosensorial como presbiacusia

Ante la presencia de estos signos o síntomas en las diferentes etapas etarias, se deberá realizar:

Métodos complementarios de estudio:

Extracción de ADN de leucocitos, orina, exudado yugal, otros. Estudio de genes mitocondriales relacionados con sordera neurosensorial síndromica y no síndromica.

Genes a estudiar: ARNr 12S

En nuestro laboratorio hemos implementado el método de búsqueda de la mutación A827G en el gen ARNr 12S ADNmt

tRNA^{ser} (UCN)

tRNA^{leu} (UUR)

Mutación estudiada positiva se deriva a servicio de secuenciación, por lo menos dos veces.

Estudio del ADNmt completo, para la observación del polimorfismo y haplotipos.

Búsqueda de mutaciones en genes nucleares modificadores y/o asociados.

OTROS ESTUDIOS, si se considera sordera neurosensorial sindrómica mitocondrial:

Bioquímicos:

Espectrofotometría: se observa actividad enzimática de COX, CS, y ratio COX/CS, NADH.

Dosaje de lactato/piruvato en sangre

Dosaje de sustratos mitocondriales (ciclo de Krebs) en orina

Muestra de biopsia de músculo para estudios morfológicos:

MO: Tinciones con H/E y tricromo modificada de Gomori, para observar fibras rojo rasgadas en deficiencia enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial.

ME: Proliferación subsarcolémica de mitocondrias amorfas y observar también inclusiones paracristalinas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abe S, Usami SI, Shinkawa P, Kelley PM, Kimberling WJ. 2000. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutation in Japanese. *J Med Genet* 37: 41-43.
- 2.- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Scott R, Salas A, Torroni A, Bandelt HJ. 2008. The phylogeny of the four Pan-American mtDNA haplogroups: Implications for evolutionary and disease studies. *Plosone* 3: e1764
- 3.- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Brujin MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Scheier HP, Smith AJH, Stader R, Youn IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 427-465.
- 4.- Blanco A. Química Biológica. Córdoba – Argentina. 2006 Editorial: El Ateneo 8va Edición.
- 5.- Bowmaker M, Yan MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. 2003. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 28: 233-38
- 6.- Brändle M, Lehmann R, Maly FE, Schmid Ch, Spinass GA. 2001. Diminished insulin secretory response to glucose but normal insulin and glucagon secretory responses to arginine, in a family with maternally inherited diabetes and deafness caused by mitochondrial tRNA^{leu (UUR)} gene mutation. *Diabetes Care* 24: 1253-1258.
- 7.- Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos N, Aoki A, Blanco A. 1995. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C₄ in mice. *Biology of Reproduction* 53: 84-92.
- 8.- Chaig MR, Zernotti ME, Soria NW, Romero O F, Romero M F, Gerez NM. 2008. A mutation in mitochondrial 12S rRNA, A827G, in Argentinean family with hearing loss after aminoglycoside treatment. *Biochem Bioph Res Comm* 368: 631-636.
- 9.- Chaig MR, Romero Orellano F, Zernotti ME, Soria NW, Martinez J, Romero Moroni F, Martellotto G, Maldonado C, Gerez de Burgos NM. 2008. A novel presentation syndromic of the mutation G7444A RNA^{ser (UCN)} gene, DNAm_t, in one Argentinean family. *Biochem Bioph Res Comm* (Enviado a revisión)
- 10.- Chapiro E, Feldmann D, Denoyelle F, Sternberg D, Jardel C, Eliot M.M, Bouccara D, Weil D, Garabedian EN, Couderc R, Petit C, Marlin S. 2002. Two large French pedigrees with non syndromic sensorineural deafness and the mitochondrial DNA T7511C mutation: evidence for a modulatory factor. *Eur J Hum Genet* 10: 851-856.
- 11.- Chinnery PF, Taylor DJ, Brown DT, Manners D, Styles P, Lodi R. 2000. Very low levels of the mtDNA A3243G mutation associated with mitochondrial dysfunction in vivo. *Ann Neurol* 47: 381 - 384.
- 12.- Cohen MM & Gorlin RJ. 1995. Epidemiology, etiology and genetic pattern In: Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford University Press pp: 9-21.
- 13.- Cremers FPM. 1998. Genetic causes of hearing loss. *Curr Opin Neurol* 11: 11-16.

- 14.- Davis LG, Dibner MD, Battey JF. 1986. Preparation of DNA from eucaryotic cell. In Davis LG, Ed. *Basic Methods in Molecular Biology*. New York: Elsevier 42-64.
- 15.- Degoul F; Diry M; Viader F; Boilier E; Marsac C; Eymard B; Romero MB; Lechevalier B; Chapon F. (1995) Intrafamilial heterogeneous clinical presentation of the mitochondrial 3243 MELAS mutation; molecular investigations among four generations. *European Journals of Neurology* 2: 573-579.
- 16.- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Almela JJ, Morera C, Adiego I, Moreno F, del Castillo I. 2002. Maternally inherited non-syndromic hearing impairment in a Spanish family with the 7510T > C mutation in the mitochondrial tRNASer(UCN) gene. *J Med Genet* 39: e82
- 17.- DiMauro S. 2004. Mitochondrial medicine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1659: 107–114.
- 18.- Dubin DT; Montoya J, Timk KD, Attardi G. 1982. Sequence Analysis and precise mapping of the 3'-ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J Mol Biol* 157: 1–19.
- 19.- Dubowitz V, Fitzsimons RB. 1985. *Muscle biopsy: a practical approach*. London, Philadelphia, Toronto: Baillière Tindall.
- 20.- Eisen MD, Ryugo DK. 2007. Review: Hearing molecules, contributions from genetic deafness. *Cell Mol Life Sci* 64: 566-580
- 21.- EL-Schahawi M, Lopez de Muain A, Sarrazin AM, Shanske, MD; Basirico M, Shanske PHD, DiMauro MD. 1997. Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic sensorineural deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12S rRNA gene: Evidence of heteroplasmy. *Neurology* 48: 453-456.
- 22.- Engel WK, Cunningham GC. 1963. Rapid examination of muscle tissue: an improved trichromethod for rapid diagnosis of muscle biopsy fresh-frozen section. *Neurology* 13: 919-923.
- 23.- Ephrussi B, Hottinguer H, Tavlitzi J. 1949. Action de L'acriflavine sur les levures. II Etude génétique du mutant "petite colonie". *Ann Ins Pasteur* 76: 351–367.
- 24.- Estivill X, Govea N, Barcelo A, Perelló E, Banderas C, Romero E, Moral L, Scozzari R, D'urbano L, Zeviani M, Torroni A. 1998. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 62: 27-35.
- 25.- Fernández-Silva P, Martínez-Azorin F, Micol V, Attardi G. 1997. The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO J* 16: 1066-1079.
- 26.- Fernández-Vizarra E, Fernández – Silva P, López-Perez MJ, Montoya J. 2005. Advances in mammalian mitochondrial DNA transcription. En: (Eds) Villarroya F. *India Research Signpost* 1 -19.
- 27.- Fischel-Ghodsian N. 1998. Mitochondrial mutations and hearing loss: Paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 62:15-19.

- 28.- Forli F;Passeti S; Mancuso M; Seccia V; Siciliano G.(2007) Mitochondrial syndromic sensorineural hearing loss. *Biosci Rep* 27: 113-123
- 29.- Gasparini P, Estivill X, Fortina P. 1999. Vestibular and hearing loss in genetic and metabolic disorders. *Curr Opin in Neurol* 12: 35-39.
- 30.- Goto Y, Nonaka I & Horai S. 1990. A mutation in the tRNA^{leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348: 651-653.
- 31.- Gravina LP, Foncuberta ME, Estrada RC, Barreiro C, Chertkoff L. 2007. Carrier frequency of the 35delG and A1555G deafness mutations in the Argentinean population. Impact on the newborn hearing screening. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71: 639-43.
- 32.- Gray MW, Burger G, Lang F. 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* 283: 1476–81.
- 33.- Guan M-X, Enriquez JA, Fischel-Ghodsian N, Purahan RS, Lin CP, Maw MA, Attardi G. 1998. The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA^{Ser(UCN)} precursor processing, has log-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. *Mol Cell Biol* 18: 5868-5879.
- 34.- Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. 2001. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 10: 573–580.
- 35.- Guan MX, Yan Q, Li X, Bykhovskaya Y, Gallo-Teran J, Hajek P, Umeda N, Zhao H, Garrido G, Mengesha E, Suzuki T, del Castillo I, Peters JL, Li R, Qian Y, Wang X, Ballana E, Shohat M, Lu J, Estivill X, Watanabe K, Fischel-Ghodsian N. 2006. Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *Am J Hum Genet* 79: 291-302.
- 36.- Guerrero A, Castro M, Martín E. 1998. Aspectos clínicos de las enfermedades mitocondriales. *Neurol* 26: 50–60.
- 37.- Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerard M, Mowbray C, Acchilli A, Pyle A, Elson J, Howell N, La Mogia Ch, Valentino ML, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Sadun AA, Salomao SR, Belfort Jr R, Griffiths P, Yu Eai Man P, de Coo RFM, Horvath R, Zeviani M, Smeets HHT, Torroni A, Chinnery PD. 2007. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *The Am J Hum Gen* 81:228-233
- 38.- Hofacker IL. 2003. Vienna RNA secondary structure server *Nucleic Acids Res.* 31: 3429-3431.
- 39.- Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, Stoneking M, Saha N, Arnos C, Cortopassi G. 1993. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 21: 4174–4179.
- 40.- Hutchin TP, Parker MJ, Young ID, Davis AC, Pulleyn LJ, Deeble J, Lench NJ, Markham AF, Mueller RF. 2000. A novel mutation in the mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} gene in a family with nonsyndromic sensorineural hearing impairment. *J Med Genet* 37: 692–694.

- 41.- Ishikawa K, Tamagawa Y, Takahashi K, Kimura H, Kusakari J, Hara A, Ichimura K. 2002. Nonsyndromic hearing loss caused by a mitochondrial T7511C mutation. *Laryngoscope* 112: 1494–1499.
- 42.- Kivisild T, Shen P, Wall DP, Do B, Sung R, Davis K, Passarino G, Underhill PA, Scharfe C, Torroni A, Scozzari R, Modiano D, Coppa A, Knijff P, Feldman M, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. 2006. *Genetics* 172: 373-387
- 43.- Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. 2007. Mitochondrial deafness. *Clin Genet* 71: 379-391.
- 44.- Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. 1989. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* 58: 391–397.
- 45.- Kunihiro Y, Chie T, Kasuhiro U, Ken-ichi U, Takashi I, Kouichi H, Michihiro G, Tadashi L, Katsumi T, Hiroshi K, Hideko N, Masaki K, Akio K, Tsukuba. 2000. Prevalence of Japanese dialysis patients with an A to G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial tRNA leu (UUR) gene. *Nephrol Dial Transplant*. 5: 385-388.
- 46.- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A, Rojo M. 2004. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J cell Sci* 117: 2653-62
- 47.- Levinger L, Jacobs O, James M. 2000. In vitro 3' -end endonucleolytic processing defect in a human mitochondrial tRNA^{ser(UCN)} precursor with the U7445C substitution, which causes non-syndromic deafness. *Nucleic Acids Research*. 21: 4334-4340.
- 48.- Li R, Xing G, Yan M, Cao X, Liu XZ, Bu X, Guan MX. 2004. Cosegregation of C-insertion at position 961 with A1555G mutation of mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. *Am J Med Genet* 124: 113–117.
- 49.- López-Bigas N, Martínez E, Bravo O, Girons J, Borragan A, Pellicer M, Arbonés ML, Estivill X. 2000. Mutations in the mitochondria TRNA^{ser(UCN)} and in the GJB (connexin 26) gene are not modifiers of the age at onset or severity of hearing loss in Spanish patients with the 12S rRNA A1555G mutation. *Am J Hum Genet*. 66: 1465-1467.
- 50.- Malka F, Lombés A, Rojo M. 2006. Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: Focus on vertebrate nucleoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 463–472.
- 51.- McFarland R, Swalwell H, Blakely EL, He L, Groen EJ, Turnbull DM, Bushby KM, Taylor RW. 2008. The m.5650>A mitochondrial tRNA^{ala} mutation is pathogenic and causes a phenotype of pure myopathy. *Neuromuscul Disord* 63: 35-39
- 52.- Mancuso M, Petrozzi L, Filosto M, Nesti C, Rocchi A, Choub A, Pistolesi S, Massettani R, Fontanini G, Siciliano G. 2007. MERRF syndrome without ragged-red fibers: the need for molecular diagnosis. *Bioch Bioph Res Commun* 354: 1058–1060.
- 53.- Matti S. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488 - 1493
- 54.- Miyabayashi S, Hanamizu H, Nakamura R. 1993. Clinical and biochemical phenotype of the MELAS mutation. *J Inher Metab Dis* 16: 886-892.

- 55.- Moazed D & Noller HF. 1987. Interaction of antibiotics, with functional sites in 16s ribosomal RNA. *Nature* 327: 389-394.
- 56.- Montoya J, Playán A, Alcaine J, Enriquez JA, Fernández Silva P, López Perez J, Martínez Azorin F, Perez Martos A. 2001. Enfermedades del ADN mitocondrial. Página: Web
<http://www.scn.es/cursos/muscular/genmito/mitocondria.htm>
- 57.- Montoya J, Gaines GL, Attardi G. 1983. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34: 151–59.
- 58.- Montoya J. 2005. Biogénesis y patología mitocondrial. *Rev Real Academia de Ciencias. Zaragoza* 60: 7–28.
- 59.- Moraes C, Ricci E, Bonilla E, Di Mauro S, Schon E. 1992. The mitochondrial tRNA leu (UUR) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am J Genet* 50: 934 - 939
- 60.- Nass MMK, Nass S. 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol* 19: 593–629.
- 61.- Ojala D, Montoya J, Attardi G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290: 470-474
- 62.- Olsson C, Zethelius B, Lagerstrom-Fermer M, Asplund J, Berne C, Landergren U. 1998. Level of heteroplasmy for the mitochondrial mutation A3243G correlates with age at onset of diabetes and deafness. *Nat Genet* 4: 289-294.
- 63.- OMS - PDH. 1997. informe de la primera consulta oficiosa, Ginebra, 23 - 24 de Enero de 1997. Prevención de la sordera y los defectos de la audición (PDH). 97: 3-6.
- 64.- Pandya A, Xia XJ, Erdenetungalap R, Amendola M, Landa B, Radnaabazar J, Dangaasuren B, Van Treyle G, Nance WE. 1999. Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA ser (UCN) precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf students from Mongolia. *Am J Hum Genet* 65: 1803-6
- 65.- Paweletz N. 2001. Walther Flemming: Pioneer of mitosis research. *Nature* 2: 72–75.
- 66.- Pennisi E. 1997. The architecture of hearing. *Science* 278: 1223–1224.
- 67.- Petersen MB, Wang Q, Willems PJ. 2008. Review. Sex-linked deafness. *Clin Genet* 73: 14-23
- 68.- Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 35: 589-646.
- 69.- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu W-Q, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. 1993. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4: 289-294.
- 70.- Prieto-Martin A, Montoya J, Martínez Azorin F. 2004. Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mtTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 32: 2059-2068.
- 71.- Reid FM, Rovio A, Holt IJ, Jacobs HT. 1997. Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np 7445 deafness-

- associated mitochondrial mutation. *Human Molecular Genetics* 6: 443-449.
- 72.- Sciacco M, Fagiolari G, Lamperti C, Messina S, Bazzi P, Napoli L, Chiveri L, Prella A, Comi P, Bresolin N, Scarlato G, Moggio M. 2001. Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology* 56: 1070-1074.
- 73.- Sereday M, Gonzalez C, Giorgini D, De Loredò L, Bragu J, Cobeñas C, Libman C, Tesone C. 2004. Prevalence of diabetes, obesity, hypertension, and hiperlipidemia in the central area of Argentina. *Diabetes & Metabolism* 30: 335-339.
- 74.- Servior KB, Hatamochi A, Stewart IA, Bykhovskaya Y, Allen-Powell DR, Fischel-Ghodsian N, Maw MA. 1998. Mitochondrial A7445G mutation, in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet* 75: 179-185.
- 75.- Shoubridge EA. 2002. The ABCs of mitochondrial transcription. *Nat Genet* 31: 227-228.
- 76.- Simdon J, Watters D, Bartlett S, Connick E. 2001. Ototoxicity associated with use of nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors: a report of 3 possible cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 32: 1623-1627
- 77.- Someya S, Yamasoba T, Kujoth C, Pugh TD, Weindruch R, Tanokura M, Prolla TA. 2007. The role of mtDNA mutations in the pathogenesis of age-related hearing loss in mice carrying a mutator DNA polymerase γ . *Neurobiol Aging* 29: 1080-92
- 78.- Sprott H, Salemi S, Gay RE, Bradley LA, Alarcón GS, Michel BA, Gay S. 2004. Increased DNA fragmentation and ultrastructural changes in fibromyalgic muscle fibres. *Ann Rheum Dis*. 63: 245-251
- 79.- Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Andreu AL, Nishino I, Krishna S, Bonilla E, Fischel-Ghodsian N, DiMauro S, Friedman R. 1999. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNASer(UCN) gene. *Neurology* 52: 1905-1908.
- 80.- Tiranti VP, Chariot P, Carella F, Toscano A, Soliveri P, Giranda P, Carrara F, Fratta GM, Reid FM, Mariotti C, Zeviani M. 1995. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA Ser (UCN) gene. *Hum Mol Genet* 4: 1421-1427.
- 81.- Tiranti V, Savoia A, Forti F, Dapolito MF, Centra M, Racchi M, Zeviani M. 1997. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* 6: 615-625.
- 82.- Torroni A, Petrozzi M, Dúrbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, Carducci C, Leuzzi V, Carelli V, Barboni P, De Negri A, Scozzari R. 1997. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that European-Specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber Hereditary Mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 60: 1107-1121.
- 83.- Ulrich Bergmeyer H, Gawehn K. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Second edition. Pag 443.

- 84.- Vahava O, Morell R, Lynch ED, Weiss S, Marjory E, Ahituv N, Morrow JE, Lee MK, Skvorak AB, Morton CC, Blumenfeld A, Frydman M, Fridman TB, King M, Avraham KB. 1998. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in human. *Science* 279: 1950-1954
- 85.- Wallace DC. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488.
- 86.- Weiss S, Gottfried I, Mayrose I, Khare SL, Xiang M, Dawson SJ, Avraham KB. 2003. The DFNA15 deafness mutation affects POU4F3 protein stability, localization, and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 22: 7957-64.
- 87.- Wharton DC and Tzagoloff A. 1967. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Meth Enzymol* 10: 245–250.
- 88.- Widemann FR, Vielhaber S, Schröder R, Elger CE, Kunz WS. 2000. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Analytical Biochemistry* 279: 55-60
- 89.- Xing G, Chen Z, Wei Q, Tian H, Li X, Zhou A, Bu X, Cao X. 2006. Maternally inherited non-syndromic hearing loss associated with mitochondrial 12S rRNA A827G mutation in a Chinese family. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 1253-7.
- 90.- Yaffe MP. 1999. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283: 1493-1497.
- 91.- Yamasoba T, Tsukuda K, Oka Y, Kobayashi MD, Kaga K. 1999. Cochlear histopathology associated with mitochondrial transfer RNA^{leu(UUR)} gene mutation. *Neurology* 52: 1705-1707.
- 92.- Yan Q, Bykhovskaya Y, Li R, Mengesha E, Shohat M, Estivill X, Fischel-Ghodsian N, Guan MX. 2006. Human TRMU encoding the mitochondrial 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase is a putative nuclear modifier gene for the phenotypic expression of the deafness-associated 12S rRNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 1130–1136.
- 93.- Yuan H, Qian Y, Xu Y, Cao J, Bai L, Shen W, Ji F, Zhang X, Kang D, Mo JQ, Greinwald JH, Han D, Zhai S, Young WY, Guan MX. 2005. Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA(Ser(UCN)) genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet* 138: 133-40.
- 94.- Yasukawa T, Yan MY, Jacobs HT, Holt IJ. 2005. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell* 18: 651–62.
- 95.- Zachary TB. Genes and the cell biology of insulin secretion and insulin resistance. 1999. *Diabetes Care* 22: 849-853.
- 96.- Zeviani M, Moraes MSc, DiMauro MD, Nakase MD, Bonilla E, Schon EA, Rowland MD. 1988. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns – Sayre syndrome. *Neurology* 38: 1339–1346.
- 97.- Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. 2004. Maternally inherited aminoglycoside-induced and non-syndromic deafness is associated with the novel C1494T

- mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 74: 139–152.
- 98.- Zhao L, Young WY, Li R, Wang Q, Qian Y, Guan MX. 2004. Clinical evaluation and sequence analysis of the complete mitochondrial genome of three Chinese patients with hearing impairment associated with the 12S rRNA T1095C mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1503–1508.
- 99.- Zhao SY, Zhang HJ, Xu CH, Shan XN. 2006. Nuclear gene involves in phenotype of non – syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 39: 39–45.
- 100.- Zhu Y, Quian Y, Tang X, Wang J, Yang L, Liao Z, Li R, Ji J, Li Z, Chaen J, Choo DL, Guan MX. 2006. Aminoglycoside – induced and non – syndromic hearing loss is associated with the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA ser (UCN) gene in two Chinese families. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 843–50.
- 101.- Zoulbault L, Deslandes B, Herlicoviez D, Read MH, Leporrier N, Schaeffer S, Mouadil A, Lombès A, Chapon F, Jauzac P, Allauche S. (2007) A novel mutation 3090 G > A of the mitochondrial 16S ribosomal RNA associated with myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 601-605.