

# DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE ADNMITOCONDRIAL POR PCR EN TIEMPO REAL A PARTIR DE LEUCOCITOS DE ADULTOS

Landeros Sara Abigail (1), Dr. Alegría Torres Jorge Alejandro (2), M.C. García Torres Lizeth (3)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo. División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato. UG] | [sara.landeros@hotmail.com]

2 [Departamento de Farmacia. División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato. UG] | [giorgio\_alegretto@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología Molecular, Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición (LIMÓN). Universidad del Centro de México] | [liz\_gato88@hotmail.com]

## Resumen

El presente artículo describe la metodología establecida y seguida para la obtención de leucocitos humanos, que se obtuvieron de muestras sanguíneas de adultos, así como la generación y medición del número de copias de ADNmitocondrial bajo la técnica de PCR en tiempo real de dichas muestras. La determinando de dicho número de copias se realiza por análisis estadístico de los datos que arroja el software del equipo Bio-Rad que se usó en el presente trabajo

## Abstract

The present article describes the methodology established and followed for the production of human leukocytes obtained from adult blood samples, as well as the generation and measurement of the number of copies of DNAmitchondrial under the real-time PCR technique of these samples. The determination of said number of copies is done by statistical analysis of the date that the software of the Bio-Rad equipment that was used in the present work

## Palabras Clave

ADNmit;  $\beta$ -Globina; qPCR; POOL; PCR en tiempo real

## INTRODUCCIÓN

El ADN Mitocondrial (ADNmt) o genoma mitocondrial es el material genético de las mitocondrias, los elementos de la célula que generan energía para la misma. Se trata de un material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares.

Generalidades.

La mitocondria es un orgánulo de probable origen endosimbiótico que se ha adaptado a su nicho intracelular: para aumentar su tasa de replicación y asegurar la transmisión a las células hijas después de cada división mitótica, el genoma de las mitocondrias de mamíferos se ha ido reduciendo de tamaño hasta alcanzar las 16.569 kb en el caso del genoma mitocondrial humano. Las mitocondrias son las verdaderas centrales térmicas de nuestro organismo ya que en ellas tiene lugar la fosforilación oxidativa (OXPHOS), es decir, la respiración celular acoplada a la producción de energía en forma de ATP. El funcionamiento del sistema OXPHOS tiene, además, importancia médica por la generación de especies reactivas de O<sub>2</sub> (Reactive Oxygen Species, ROS) y por la regulación de la muerte celular programada o apoptosis. Las proteínas incluidas en la OXPHOS se localizan dentro de la membrana mitocondrial interna, e incluyen: Componentes de la cadena transportadora de electrones (Cadena respiratoria mitocondrial, CRM); ATPasa de membrana y el translocador de nucleótidos de Adenina (ANT).

El ADNmt humano es una molécula circular de 16.569 pares de bases. El número de moléculas de ADNmt por célula varía entre unos pocos cientos en los espermatozoides a unas 200.000 copias en el oocito, pero en la mayor parte de los tejidos el rango está comprendido entre unas 1.000 y 10.000 copias por célula, con 2 - 10 moléculas de ADN por mitocondria. Este genoma contiene información para 37 genes:

- Genes que codifican las 2 subunidades 12S y 16S del ARNr (ARN ribosomal) de la matriz mitocondrial.
- Los genes para los 22 ARNt (ARN transferente), requeridos para la síntesis de proteínas mitocondriales en la misma matriz mitocondrial.
- Genes que codifican 13 polipéptidos que forman parte de los complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS.

En concreto, en el genoma mitocondrial se codifican 7 subunidades del Complejo I, 1 subunidad del Complejo III, 3 subunidades del Complejo IV, y 2 subunidades de la ATPasa (Complejo V). Es importante no perder de vista que el resto de las subunidades polipeptídicas de estos complejos, así como el Complejo II completo, están codificados en el genoma nuclear, de manera que no todas las enfermedades mitocondriales están necesariamente causadas por alteraciones en el ADN mitocondrial.

La característica estructural más sorprendente del ADNmt es que los genes se encuentran situados uno a continuación del otro. Al contrario que el genoma nuclear, en el que las regiones no codificantes son mayoritarias, el ADN mitocondrial sólo posee un 3% de secuencias no codificantes. Veintiocho de los genes mitocondriales (2 ARNr, 14 ARNt y 12 polipéptidos) se encuentran en una de las cadenas (cadena H ó pesada), mientras que los 9 genes restantes (1 polipéptido y 8 ARNt) están en la cadena complementaria (cadena L ó ligera).

El ADN mitocondrial fue descubierto por Margit Nass y SylvanmNass, utilizando microscopía electrónica y un marcador sensitivo al ADN mitocondrial. Este ADN mitocondrial es un pequeño trozo de ADN que se encuentra en las estructuras fuera del núcleo, recibiendo estas estructuras el nombre de mitocondrias. Estas son en realidad antiguas bacterias que entraron en las células tempranas cuando aún eran células vivas individuales (hace aproximadamente unos tres millones de años), las cuales han formado una relación simbiótica en las que las mitocondrias viven a modo de bacterias dentro de nuestras

células. Una vez que estas bacterias tienen su propio sistema de información, que es el ADN, convierten esta información en las estructuras en forma de ARN y luego en proteínas. Pero como comenta el genetista molecular Douglas Wallace, «Lo importante es que la mitocondria y el ADN mitocondrial no se transmiten a lo largo de los  cromosomas  que se encuentran en la mayoría de los genes de las células, pero se pasan por el  óvulo  de la madre en la fertilización. Esto es debido a que el óvulo tiene alrededor de 200.000 mitocondrias, mientras que los espermatozoides poseen sólo unos pocos, y los que consiguen entrar en el óvulo son destruidos. Por lo tanto, la mitocondria y su ADN se heredan exclusivamente de la madre.» Sabiendo esto establecimos una metodología para obtener ADNmitocondrial de leucocitos humanos y seguimos la técnica de PCR en tiempo real para medir el número de copias generadas y se contrasta con el parámetro de  $\beta$ -Globina como control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Extracción de ADN

El número de copias de ADN mitocondrial se calculó con base en las mediciones del número de copias de una secuencia del gen mitocondrial, y el gen nuclear de la hemoglobina ( $\beta$ -Globina). La determinación se basó en la fluorescencia, aplicando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), para así determinar el número de copias de ADNmt en los leucocitos.

Primero se realizó la extracción de ADN de sangre completa de paquete leucocitario con detergente doméstico y se revisa la calidad del mismo midiendo la Absorbancia a 260/280 nm; CM (siguiendo la metodología de García-Sepúlveda et al. 2010). La relación entre la cantidad absorbida de la muestra a 260 nm sobre 280nm nos da el rango de calidad, que se toma como aceptable de 1.4 a 2 [CM =  $(\Delta 260 \text{ nm}) / (\Delta 280 \text{ nm})$ ].

Luego se eligió del total de muestras una cantidad representativa para llevar a CC de 7ng/ $\mu$ L, esto para proceder a la determinación molecular. Se preparan los mix de reacción; uno para ADNmit y otro para  $\beta$ -Globina según la tabla 1.

Mix de rxn para ADNmitocondrial		Mix de rxn para Beta-Globina	
Enzima Evagreen Super Mix 2X	5 $\mu$ L	Enzima Evagreen Super Mix 2X	5 $\mu$ L
Oligo Mit R (250nM)	0.4 $\mu$ L	Oligo Bg1 R (250nM)	0.5 $\mu$ L
Oligo Mit F (250nM)	0.5 $\mu$ L	Oligo Bg2 F (250nM)	0.5 $\mu$ L
Agua grado BM	1.1 $\mu$ L	Agua grado BM	1 $\mu$ L
Vol.	7 $\mu$ L	Vol.	7 $\mu$ L

Tabla 1. Mix de reacción, 7  $\mu$ L por reacción de mix.

### Pool de ADN y Curva de Calibración

Se prepara un Pool con un vol. De 1 ml y una CC de 50 ng/mL y se realizan diluciones seriadas del Pool para generar los estándares (Vol. 60  $\mu$ L) que se indican en la tabla 2.

Estándar	Volumen del pool de ADN ( $\mu$ L)	Volumen de Agua ( $\mu$ L)	Concentración (ng/ $\mu$ L)
1	26.4	33.6	22
2	30	30	11
3	30	30	5.5
4	30	30	2.75
5	30	30	1.375
6	30	30	0.6875

Tabla 2. Estándares

### PCR en tiempo real

En una placa de 96 pozos para PCR se colocan 7  $\mu$ L del mix de reacción y 3  $\mu$ L de ADN en cada pozo (realizar para cada curva). Las muestras y estándares van por triplicado en la placa y al terminar de colocarlos se tapa la placa con una membrana auto adherible para evitar que se evaporen. Colocar la placa en el termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System con las siguientes condiciones de reacción:

- o 3 minutos a 95°C
- o 35 ciclos a 98° C por 15 segundos
- o 1 minuto a 58 °C
- o 15 segundos a 95 °C

- o 15 segundos a 60 °C
- o y 15 segundos a 45 °C.

Nota: seguir los pasos que indica el equipo

#### Análisis Estadístico

El análisis de los datos se realiza en el software de detección CFX96 de Bio-Rad. La curva generada por qPCR debe cumplir con:

- o  $r^2 = 0.99$
- o pendiente (m) = -3.4
- o Eficiencia = 90 – 105%

Nota: las muestras y estándares van por triplicado por lo que la desviación estándar del Cq no debe ser mayor 0.25

Finalmente se calculan los promedios de amplificación, o FRU (unidades de fluorescencia relativa), las cuales son proporcionales a la cantidad del producto amplificado, con esto se calcula la relación M/S (gen mitocondrial /gen  $\beta$ -Globina).

13	0	25.35	4.242
14	0.14798649	25.32	4.284
15	0.2055075	25.58	3.927
16	0.02081666	25.50	4.035
17	0.01414214	25.61	3.892
18	0.07094599	25.54	3.979
19	0.140119	24.23	6.135
20	0.02309401	25.37	4.212
21	0.17502381	25.38	4.208
22	0.04725816	25.32	4.289
23	0.14640128	25.54	3.991
24	0.07211103	25.79	3.669
25	0.09539392	25.95	3.48

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 3. Resultados de  $\beta$ -Globina**

Muestra	Dev. Estandar	Promedio $\beta$ -G	CC
1	0.11846237	27.10	2.382
2	0.02	25.17	4.504
3	0.08082904	25.76	3.71
4	0.15011107	25.50	4.043
5	0.02081666	25.99	3.432
6	0.13228757	26.19	3.216
7	0.13316656	25.43	4.129
8	0.03785939	24.75	5.181
9	0.07234178	26.09	3.32
10	0.19756855	25.63	3.873
11	0.16522712	25.49	4.051
12	0.02516611	25.30	4.319

**Tabla 4. Resultados de ADNmitocondrial**

	Dev. Estandar	Promedio ND1	CC
1	0.09	20.61	1.97
2	0.0057735	17.64	4.53
3	0.05196152	18.33	3.74
4	0.09291573	17.96	4.15
5	0.15011107	18.89	3.19
6	0.0212132	18.96	3.13
7	0.12096832	18.33	3.74
8	0.02886751	17.48	4.75
9	0.07505553	19.09	3.02
10	0.18330303	17.56	4.64
11	0.18009257	17.62	4.56
12	0.06557439	17.62	4.56
13	0.07211103	18.24	3.83
14	0.08082904	17.42	4.83

15	0.1040833	17.77	4.38
16	0.05859465	18.13	3.96
17	0.17039171	17.81	4.32
18	0.08888194	18.44	3.62
19	0.26870058	15.79	7.63
20	0.0321455	18.50	3.56
21	0.03464102	18.39	3.67
22	0.01732051	17.42	4.83
23	0.03785939	18.07	4.02
24	0.08082904	18.50	3.56
25	0.10115994	19.01	3.08

## CONCLUSIONES

Las unidades de correlación M/S son la relación del producto de la amplificación de la qPCR del fragmento del gen ND1 con respecto al gen nuclear de copia única  $\beta$ -G. Los resultados que arrojan las muestras analizadas van desde 0.8 hasta 1.3. También realizamos una electroforesis que nos permitió observar el gen amplificado, esto sólo como medio de comprobación visual.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alegría por la invitación, el apoyo en el trabajo y la estancia en San Luis Potosí.

A la M.C. Lizeth por la ayuda prestada en la estancia en el laboratorio LIMÓN así como las experiencias regaladas.

A mis compañeras Dany Álvarez y Zeltzin Mendoza, porque sin ellas el Verano no hubiera sido lo mismo.

A la UG, mi alma mater, que con estos proyectos hacen de nuestra experiencia académica inolvidable.

## REFERENCIAS

-IZAGUIRRE, N.; DURAN, N.L; DE LA RUA, C., "Genética y Arqueología: Análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos". Revista Munibe, nº50, San Sebastián, 1998. DNA Interactive. [www.dnai.org](http://www.dnai.org)

-VALERA, T.A., AÍNSUA, R.L., FARIÑA, J., "El ADN mitocondrial y las relaciones filogenéticas de los últimos estadios del género homo", Revista Real Academia Galega de Ciencias, Volumen XXVIII, Pág. 103-118, 2009.

-CRESPILLO MÁRQUEZ, M.; BAÑÓN GONZÁLEZ, R.; VALVERDE DE VILLAREAL, J.L., "Aprendizaje y reflexiones de la identificación de cadáveres mediante marcadores genéticos monoparentales (ADNmt, cromosoma Y). A propósito de un caso", Revista Española de Medicina Legal, nº 37 (1), 17-21, 2011.

-ADN Antiguo, Universidad Complutense de Madrid. <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genforen/tecnicas1.htm>

-GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W. M., Genética, Séptima edición, McGraw-Hill-Interamericana.