



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**DETECCIÓN DE ADN MITOCONDRIAL EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS CON
GASTROENTERITIS**

Línea de investigación:

Biología molecular e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Sandoval De la cruz, Mishel Zender

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado:

Sáez Flores, Gloria María

Riveros Ramirez, Maribel Denisse

Mayanga Herrera, Ana Lucía

Lima - Perú

2024



DETECCIÓN DE ADN MITOCONDRIAL EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS CON GASTROENTERITIS

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	4%
3	1library.co Fuente de Internet	1%
4	patents.google.com Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	www.tdx.cat Fuente de Internet	<1%
7	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
8	oa.upm.es Fuente de Internet	<1%
9	ninive.uaslp.mx Fuente de Internet	



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**DETECCIÓN DE ADN MITOCONDRIAL EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS CON
GASTROENTERITIS**

Línea de investigación:

Biología molecular e inmunología

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Sandoval De la cruz, Mishel Zender

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado:

Sáez Flores, Gloria María

Riveros Ramirez, Maribel Denisse

Mayanga Herrera, Ana Lucía

Lima – Perú

2024

Dedicatoria

A mi Dios y a mi familia porque gracias a su apoyo incondicional puedo lograr muchas cosas.

Agradecimientos

Al Dr. Holger Maita por haberme permitido realizar esta investigación y acogerme en su laboratorio, por haber sido un mentor y amigo en todo este tiempo.

A la Dra. Mónica Pajuelo, la Dra. Manuela Verástegui y la Dra. Maritza Calderón quienes me abrieron las puertas de los laboratorios de Microbiología Molecular, Inmunología y Biología molecular, compartiendo conmigo sus conocimientos y su tiempo.

Al Mg. Ramsés Salas, quien ha sido un excelente maestro y gran profesional que me asesoro.

A mis amigos y colegas Alejandra Llican, Alejandra Ingunza, Mayra Ochoa, Macarena Vittet, Gerardo Sánchez, Diego Sardon, por su amistad, sus consejos, su apoyo, y por todos los extraordinarios momentos que compartimos juntos.

Al MD Robert Gilman por su apoyo en esta investigación un excelente mentor y profesional.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Descripción y formulación del problema.....	12
1.2 Antecedentes	12
1.3 Objetivos	16
1.3.1 <i>Objetivo general</i>	16
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	16
1.4 Justificación.....	17
1.5 Hipótesis.....	17
1.5.1 <i>Hipótesis alterna</i>	17
1.5.2 <i>Hipótesis nula</i>	17
II. MARCO TEÓRICO	18
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	18
2.1.1 <i>Estructura</i>	19
2.1.2 <i>Función del ADN mitocondrial en el sistema inmunitario</i>	20
2.1.3 <i>Dinámica Mitocondrial</i>	21
2.1.4 <i>Biomarcador</i>	24
III. MÉTODO	25
3.1 Tipo de investigación	25
3.2 Ámbito temporal y espacial.....	25
3.3 Variables	25

3.3.1	<i>Variables dependientes</i>	25
3.3.2	<i>Variables independientes</i>	25
3.4	Población y muestra	25
3.5	Instrumentos	26
3.6	Procedimientos	26
3.6.1	<i>Extracción de ADN Mitocondrial</i>	26
3.6.2	<i>Detección de ADN Mitocondrial por qPCR</i>	27
3.6.3	<i>Curva estándar para la cuantificación absoluta de ADN mitocondrial</i> ...	27
3.6.3.1	Construcción y obtención del plásmido conteniendo la región parcial de gen NAD5.	27
3.6.3.2	Confirmación de la clonación del plásmido recombinante.....	29
3.6.3.3	Extracción del plásmido recombinante.....	29
3.6.4	<i>Secuenciamiento</i>	29
3.6.5	<i>Mieloperoxidasa</i>	30
3.7	Análisis de datos.....	30
3.7.1	<i>Índices de prevalencia</i>	30
3.7.2	<i>Mann Whitney Wilcoxon</i>	30
3.7.3	<i>Flujograma de trabajo</i>	31
3.8	Consideraciones éticas	31
IV.	RESULTADOS	32
4.1	Gastroenteritis por sexo.....	32
4.2	Gastroenteritis por edad	33
4.3	Concentraciones de ADN mitocondrial y Mieloperoxidasa.....	34
4.3.1	<i>Concentración de ADN mitocondrial por gastroenteritis</i>	34
4.3.2	<i>Concentración de Mieloperoxidasa por gastroenteritis</i>	36

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
VI. CONCLUSIONES.....	40
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS.....	42
IX. ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>ADN mitocondrial humano</i>	18
Figura 2: <i>Ubicación de los nucleoides mitocondriales</i>	19
Figura 3: <i>El ADN mitocondrial y las diferentes vías de señalización que activan la respuesta inmune</i>	20
Figura 4: <i>Liberación del ADN mitocondrial por los canales activados por las proteínas BAK/BAX</i>	21
Figura 5: <i>Transferencia de ADN mitocondrial a través de uniones gap y exosomas</i>	23
Figura 6: <i>Trampa extracelular de los neutrófilos (NET)</i>	23
Figura 7: <i>Porcentaje de casos y controles (con y sin gastroenteritis) por género</i>	32
Figura 8: <i>Concentraciones de ADN mitocondrial por edad en casos y controles</i>	33
Figura 9: <i>Concentraciones de ADN mitocondrial en casos y controles</i>	35
Figura 10: <i>Concentraciones mayores a 1×10^6 copias de ADN mitocondrial en casos y controles</i>	35
Figura 11: <i>Concentraciones mayores a 20000 ng/ml de Mieloperoxidasa en casos y controles</i>	36
Figura 12: <i>Localización y ubicación de cebadores para la detección de ADN mitocondrial desarrollado en el programa UGENE</i>	49
Figura 13: <i>Plásmido vector TOPO-PCR 2.1</i>	50
Figura 14: <i>Clonas con el plásmido recombinante</i>	51
Figura 15: <i>Curva estándar para la cuantificación absoluta de ADN mitocondrial</i>	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Características de los niños menores de 2 años con gastroenteritis aguda.....</i>	32
Tabla 2: <i>Concentraciones de ADN mitocondrial y Mieloperoxidasa en casos y controles.....</i>	34
Tabla 3: <i>Secuencias de cebadores y sonda para la detección de ADN mitocondrial.....</i>	49

RESUMEN

Objetivo: Determinar la asociación entre la concentración de ADN mitocondrial en heces y la presencia de gastroenteritis en niños menores de 2 años. **Método:** El diseño del estudio es observacional (no experimental), tipo caso – control, que identifica una posible relación entre la concentración de ADN mitocondrial fecal humano y la presencia de gastroenteritis en niños menores de 2 años. En este estudio se procesaron un total de 142 muestras fecales procedentes de la Comunidad de OASIS del distrito de Villa el Salvador. **Resultados:** Del total de las muestras analizadas 139 fueron amplificadas mediante qPCR para la detección de ADNmt. Se observó altas carga de ADNmt y de Mieloperoxidasa tanto en el grupo de casos y controles. **Conclusión:** No se observó una asociación entre la gastroenteritis aguda (diarrea aguda) y la liberación de ADNmt.

Palabras clave: Gastroenteritis, ADN mitocondrial, biomarcador.

ABSTRACT

Objective: To determine the association between the mitochondrial DNA concentration of in feces and the presence of gastroenteritis in children under 2 years of age. **Method:** The study design was an observational (non-experimental) case-control study, which identifies a possible relationship between the concentration of human fecal mitochondrial DNA and the presence of gastroenteritis in children under 2 years of age. A total of 142 samples were processed from the OASIS Community of the district of Villa El Salvador. **Results:** Of all the samples analyzed by qPCR for mtDNA detection, 139 samples were successfully amplified. High loads of mtDNA and Myeloperoxidase activity were observed in both case and control groups. **Conclusion:** Gastroenteritis as acute diarrhea is not associated to the level of mtDNA release in feces.

Keywords: Gastroenteritis, mitochondrial DNA, biomarker.

I. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis es una de las enfermedades más comunes en todo el mundo, cada año se presentan unos 1700 millones de casos de enfermedades diarreicas infantiles. Lamentablemente, 525 000 niños mueren cada año, siendo ésta la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017). La gastroenteritis consiste en la inflamación de la mucosa del estómago y del intestino delgado o grueso causada por infecciones víricas, bacterianas o parasitarias (Fletcher et al., 2013). Usualmente ante estos agentes infecciosos, la respuesta inmune del huésped altera el intestino de una manera negativa incluso ante la ausencia de diarrea o enfermedad gastrointestinal aguda, afectando el estado de salud del hospedero (Kosek et al., 2017).

La enteropatía ambiental (EE), ahora más conocida como disfunción entérica ambiental (EED) es una condición clínica desfavorable de personas que viven en malas condiciones ambientales (Neto, 1996) y tiene como consecuencia la reducción del crecimiento lineal de los niños (Goudet et al., 2019). Existen diferentes vías a través de las cuales el EED puede causar crecimiento vacilante y el retraso del crecimiento (Prendergast y Kelly, 2016); y es que el aumento de la inflamación intestinal y el aumento de la permeabilidad intestinal, reduce la capacidad de absorción del intestino que implica la alteración del estado nutricional (Richard et al., 2019).

En América Latina, las enfermedades diarreicas continúan siendo un problema de salud pública; el incremento en su incidencia se ha mantenido relativamente constante en las tres últimas décadas (Herrera et al., 2018). En países de bajos y medianos ingresos, las tasas de mortalidad y morbilidad por enfermedades diarreicas son mayores (Fischer Walker et al., 2012), aunque, en los países de altos ingresos, las enfermedades diarreicas siguen siendo causa de un gran número de consultas de urgencia y/o hospitalizaciones, que generan costos sustanciales de atención médica (Tucker et al., 1998).

En algunas zonas del Perú, se ha reportado una incidencia de hasta 4,38 episodios de diarrea por niño al año (Kosek et al., 2008).

1.1 Descripción y formulación del problema

Los episodios frecuentes de diarrea, o incluso las infecciones asintomáticas, favorecen al desarrollo de un proceso inflamatorio intestinal crónico que afecta de forma negativa al crecimiento de los niños (Herrera et al., 2018). Debido a que la gastroenteritis es un cuadro común en poblaciones pediátricas y posee consecuencias relevantes en el desarrollo de los individuos, es muy importante y necesario identificar un marcador no invasivo que permita su detección, a fin de realizar y mejorar las intervenciones tempranas (Peterson et al., 2013).

Las mitocondrias tienen una relación directa con la activación del sistema inmune innato (West et al., 2011). Se han identificado más proteínas ancladas a las mitocondrias que están relacionadas al sistema inmune (Meylan et al., 2005). Además, el ADN mitocondrial y los péptidos formilo que se liberan por daño mitocondrial desencadenan procesos inflamatorios (Zhang et al., 2010) ¿Existe alguna relación entre la gastroenteritis y las concentraciones de ADN mitocondrial fecal humano? responder esta pregunta es muy importante para detectar a tiempo una inflamación desfavorable y que la población a quien va dirigida este estudio alcance un buen desarrollo y crecimiento en esta etapa fundamental del ser humano.

1.2 Antecedentes

De acuerdo con la base de datos de Global Burden of Disease publicado por el Institute for Health Metrics (IHME), en 2019 aproximadamente 1,5 millones de personas de diferentes edades murieron por causa de enfermedades diarreicas y se estima que medio millón de estas muertes fueron en niños (Dattani et al., 2023). Según el estudio Global Burden of Diarrheal Diseases Collaborators, la diarrea fue una de las principales causas de muerte entre los niños menores de 5 años (499 000 muertes), siendo rotavirus la principal causa de muertes por diarrea

(199 000), seguido de *Shigella*, *Salmonella* y *Cryptosporidium*. El número de muertes por diarrea disminuyó en un 20.8% entre 2005 y 2015 (Troeger et al., 2017).

Las infecciones entéricas frecuentes tienen un impacto adverso en la activación del sistema inmune, además de alterar la permeabilidad del intestino; como se demuestra en el estudio realizado por Kosek et al. (2017) que incluyó 8 países y en el que se evaluaron 1253 niños de 0 a 2 años con frecuentes infecciones entéricas, analizando el número total de patógenos detectados en heces. Los patógenos enteroinvasivos con altas cargas han sido asociados a concentraciones elevadas de mieloperoxidasa, alfa-1-antitripsina y neopterinina fecales, biomarcadores de permeabilidad e inflamación intestinal (Kosek et al., 2017).

En un estudio realizado en la región del Amazonas, en la provincia de Chachapoyas, durante los años 2000 a 2017 (Chotón, 2019), se observó que la tasa de prevalencia de las enfermedades infecciosas en niños menores de cinco años tuvo recientemente una tendencia decreciente, pasando de 71165.7 episodios por cada 1000 infantes en el 2014 a 43102.7 episodios por cada 1000 infantes en el año 2017, cifras que aún sigue siendo altas.

En un estudio realizado en el servicio de pediatría del Hospital Hipólito Unanue de Tacna durante los años 2013 al 2017 (Choque, 2018), se demostró que los casos frecuentes de gastroenteritis aguda ocurren en los niños entre 1 a 2 años (36,32% de casos), mientras que el 22,87 % de los casos correspondió a niños menores de un año. El 58,30 % de los niños presentó reacción inflamatoria positiva; y del total de pacientes con reacción inflamatoria positiva, el 54.17 % presentó coprocultivo positivo.

Así como los patrones moleculares asociados a patógenos microbianos (PAMP) activan los inmunocitos innatos a través de receptores de reconocimiento de patrones, una lesión celular puede liberar patrones moleculares asociados al "daño" endógeno (DAMP) que activan la inmunidad innata (Zhang et al., 2010). En el trabajo realizado por Zhang et al. (2010), se demostró que el daño celular libera DAMP mitocondriales (MTD) que incluyen péptidos de

formilo y ADN mitocondrial. los cuales activan los neutrófilos polimorfonucleares humanos (PMN) a través del receptor de péptido de formilo-1 y el receptor Toll-like (TLR) 9, respectivamente. También se mostró que los DAMP mitocondriales promueven el flujo de Ca²⁺ de PMN y la fosforilación de las quinasas de la proteína activada por mitógeno (MAP), lo que conduce a la migración y desgranulación de PMN in vitro e in vivo.

La liberación de ADN extracelular se encuentra asociada a varias afecciones patológicas, que incluyen enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tal como se mostró en el estudio realizado por (Duvvuri et al., 2018). En este estudio, se investigó la utilidad clínica del ADNmt libre como biomarcador no invasivo en pacientes con Lupus eritematoso sistémico (LES); sus resultados mostraron que los pacientes con LES tenían niveles significativamente elevados de ADNmt (36781 copias / ml de plasma). Además, los niveles de ADNmt fueron particularmente elevados en pacientes con evidencia de NETosis (proceso de muerte celular de neutrófilos que puede provocar una segregación selectiva de ADN mitocondrial inflamatorio) en comparación con pacientes sin NETosis ($p < 0.01$, 227404 vs. 124422 copias / ml de plasma). También se demostró que los niveles de ADNmt se asocian con la presencia de inflamación mediada por el biomarcador mieloperoxidasa y con la actividad de la enfermedad, que corresponde a la sedimentación de eritrocitos.

De acuerdo con el estudio realizado por Abd et al. (2018), el ADN libre de células (cfDNA), como el ADNmt, son marcadores de daño celular; mientras que la molécula CD38 expresada en las células inmunes está implicada en la activación y señalización de supervivencia. En este estudio, se evaluó si los niveles de cfDNA plasmático y células T “helpers” (Ths) expresados CD38 en la enfermedad artritis reumatoide (RA) podrían servir como biomarcadores para la actividad de la enfermedad, demostrándose que la concentración de cfDNA fue significativamente mayor en el grupo con enfermedad activa ($p < 0.001$). En ese sentido, se concluyó que la regulación positiva del cfDNA de plasma y la regulación negativa

de T_Hs que expresan CD38 pueden servir como indicadores de la actividad de RA. (Abd et al., 2018).

El estrés mitocondrial, es decir, la alteración de las estructuras nucleoides mitocondriales provoca la liberación de ADN mitocondrial (ADNmt) en el citosol y regula la inmunidad innata, tal como se evidencia en el trabajo realizado por Bao et al. (2019). En este estudio se analizó la relación entre la expresión de la proteína relacionada con la dinamina reguladora (Drp1), clave de la fisión mitocondrial, con la infiltración de los macrófagos asociados a tumores (TAM) en tejidos de carcinoma hepatocelular (CHC), así como el efecto de la sobreexpresión de Drp1 en células de CHC. Los resultados mostraron que el aumento de la expresión de Drp1 se correlacionó positivamente con la infiltración de TAM en tejidos de CHC y la sobreexpresión de Drp1 indujo estrés mitocondrial liberando ADNmt al citosol y mediante el receptor TLR9 promovió el reclutamiento y diferenciación de TAM, demostrándose que el ADNmt induce la infiltración de TAM en CHC.

Uno de los inductores para la liberación del ADNmt es la interleucina-1 β (IL-1 β) que actúa como un mediador pleiotrópico de la inflamación y el ADNmt liberado activa el sistema inmune innato a través de una estimulación de genes de interferón a través del reconocimiento de ADNmt citosólico por guanósina monofosfato cíclico (GMP)-AMP sintasa (cGAS-STING) impulsando la activación de IRF3 en células mieloides, fibroblastos y células epiteliales humanas, así lo informa el estudio realizado por Aarreberg et al. (2019), donde el tratamiento con IL-1 β estimula la producción de interferón (IFN) para dirigir una potente respuesta inmune innata en contra de la infección por el virus del dengue. Este estudio da a conocer una nueva función para la IL-1 β , con una función relevante para cGAS-STING en la señalización inflamatoria y para la defensa del huésped.

En un estudio realizado en el noroeste de Brasil por Prata et al. (2016), se analizaron muestras fecales de 78 niños (edad media $15,2 \pm 5,3$ meses) provenientes de un estudio de

casos y controles de desnutrición infantil, evaluaron el rendimiento y la correlación de los biomarcadores fecales que miden inflamación: mieloperoxidasa (MPO), la lactoferrina (FL), la calprotectina (FC) y la lipocalina-2 (Lcn-2), sus resultados demostraron que los biomarcadores se correlacionaron significativamente ($P < 0.01$). Hubo correlaciones más fuertes entre MPO fecal, lactoferrina fecal y calprotectina, y una correlación menor pero estadísticamente significativa con Lcn-2. Además, sus resultados mostraron que la correlación existente es independiente del estado de la lactancia materna, proporcionando así un biomarcador común disponible para la comparación de estudios en niños menores de 2 años.

La existencia de una relación directa entre la liberación de ADN mitocondrial y la activación del sistema inmune innato y de proteínas ancladas a la membrana de las mitocondrias, como consecuencia de la presencia de diferentes agentes infecciosos causantes de enfermedades diarreicas, nos lleva a plantear la siguiente pregunta de investigación:

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar la asociación entre la concentración de ADN mitocondrial en heces y la presencia de gastroenteritis en niños menores de 2 años.

1.3.2 Objetivos específicos

- Detectar ADN mitocondrial fecal amplificando el gen NAD 5 (Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa subunidad 5) mediante la prueba de PCR en Tiempo Real.

- Determinar la concentración absoluta de ADN mitocondrial fecal usando una curva estándar mediante la prueba de PCR en Tiempo Real.

- Comparar las concentraciones de AND mitocondrial y Mieloperoxidasa (marcador de inflamación intestinal).

1.4 Justificación

El presente estudio determinó si existe una asociación entre la concentración de ADN mitocondrial fecal y la presencia de inflamación intestinal, para este fin se midió la concentración de un marcador de inflamación como es la mieloperoxidasa y la concentración de ADN mitocondrial (ADNmt) en muestras de heces provenientes de niños menores de 2 años que presentan episodios de diarreas. Este estudio sería el primer paso para establecer si los cambios en la concentración de ADNmt pueden ser empleados como un biomarcador fecal, que alerte una inflamación desfavorable y que la población a quien va dirigida este estudio pueda disponer de una prueba no invasiva, rápida y sensible que detecte una inflamación perjudicial que puede desencadenar consecuencias desfavorables en su crecimiento.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis alterna

La concentración de ADN mitocondrial en heces está asociado a la presencia de gastroenteritis en niños menores de 2 años.

1.5.2 Hipótesis nula

No existe asociación alguna entre la concentración de ADN mitocondrial fecal y la presencia de gastroenteritis en niños menores de 2 años.

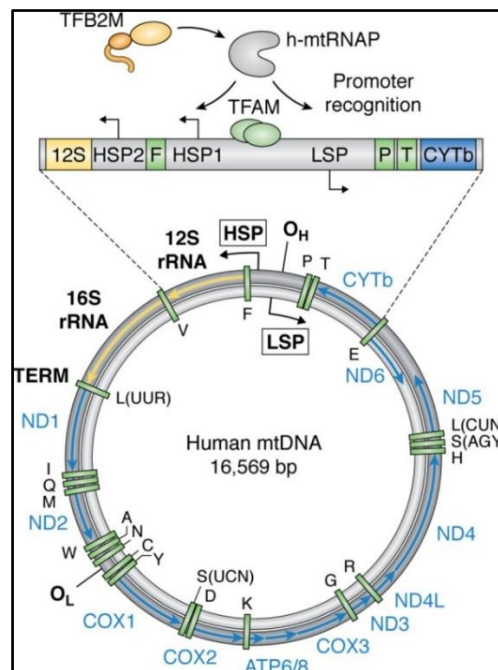
II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

El ADNmt humano carece de intrones (secuencias no informativas que fragmentan los genes), y consta de dos cadenas de nucleótidos las cuales forman una doble hélice circular, de aproximadamente 16.5 Kb, estas cadenas se diferencian según la cantidad de GC que contienen, denominándose así una cadena ligera y la otra una cadena pesada, ambas cadenas codifican los ARNr, los ARNm y los ARNt (genes mitocondriales) a excepción de la región de bucle D, la cual no se codifica. El promotor LPS de la cadena ligera y los promotores HSP de la cadena pesada se unen a los promotores TFB2M y h-mtRNAP para iniciar la transcripción (Basu et al., 2020) ver Figura 1.

Figura 1.

ADN mitocondrial humano



Nota. Mapa genético del ADN mitocondrial humano que muestra ambas cadenas: la cadena ligera y pesada con sus respectivos genes que codifican y que forman una doble hélice circular con sus promotores para la transcripción y replicación. Tomado de “Estructura, mecanismo y

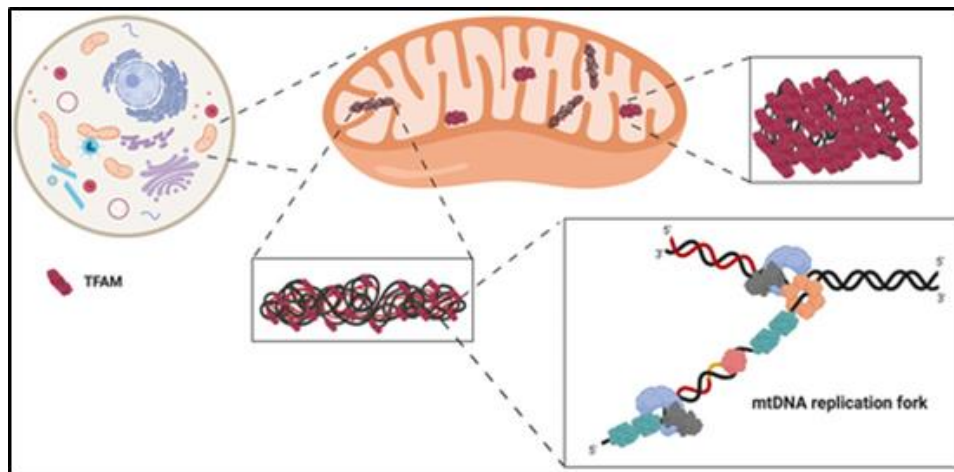
regulación del inicio de la transcripción del ADN mitocondrial”, por Basu et al., 2020, *The Journal of biological chemistry*, 295(52), 18406–18425

2.1.1 Estructura

En una célula existe varias copias de ADN mitocondrial, las proteínas denominadas nucleoides revisten una copia de ADN mitocondrial formando así los nucleoides mitocondriales que tienen un diámetro aproximado de 100 nm, contienen principalmente el factor de transcripción mitocondrial (TFAM). Los nucleoides mitocondriales pueden encontrarse en 2 estados: compactado o relajado dependiendo del contenido de TFAM, a mayor TFAM el ADN mitocondrial está empaquetado y a menor contenido de TFAM el ADN mitocondrial se encuentra en estado relajado y es accesible para su replicación (Filograna et al., 2021) ver Figura 2.

Figura 2.

Ubicación de los nucleoides mitocondriales



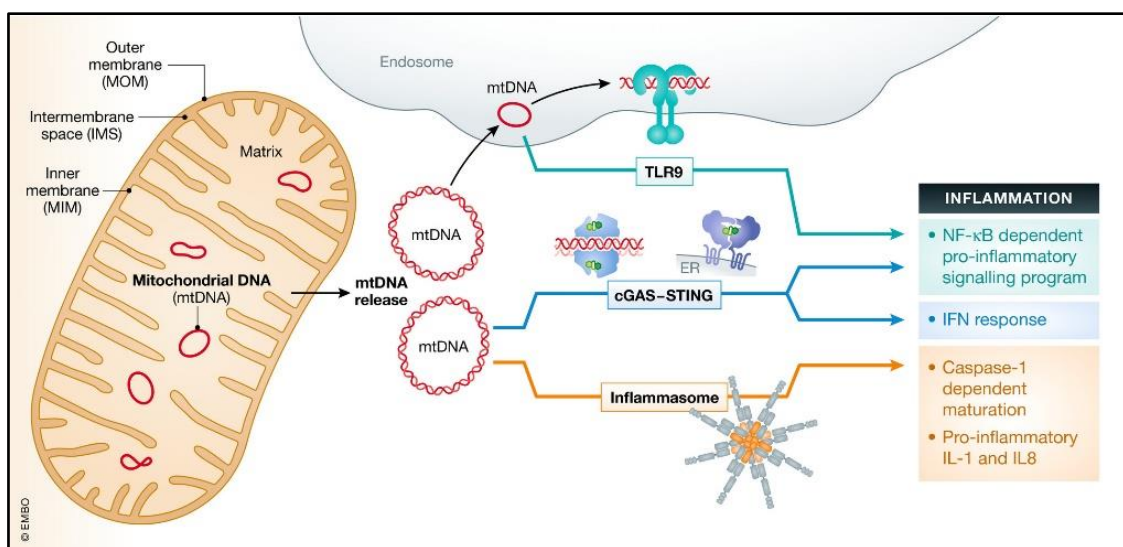
Nota. El ADN mitocondrial se encuentra compactado por la proteína TFAM que regula su replicación y transcripción y empaqueta el ADN mitocondrial en nucleoides mitocondriales, en la imagen inferior izquierda se muestra el estado relajado de un nucleoide mitocondrial listo para su replicación. Tomado de “Número de copias del ADN mitocondrial en enfermedades humanas”, por Filograna et al., 2021, *FEBS letters*, 595(8), 976–1002.

2.1.2 Función del ADN mitocondrial en el sistema inmunitario.

La hipometilación del ADN mitocondrial hace que se vea “extraño” y pueda ser captado por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que generalmente detectan patógenos porque reconocen ciertos patrones específicos asociados a patógenos (PAMP), cuando se detecta dichos patrones los PRR desencadenan una respuesta inmune por diferentes vías de señalización. La liberación de ADN mitocondrial es un potente activador de una respuesta inmune y se da por diferentes vías de señalización proinflamatorias como el TLR9 que se une al ADN mitocondrial en el endosoma provocando la activación de los NF- κ B (factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas). Otra vía es cGAS-STING en ésta el cGAS se une al ADN mitocondrial en el citosol y activa el STING ubicado en el retículo endoplasmático que desencadena la producción de interferón. Por otro lado se encuentra la vía por inflamasoma citosólico que estimula la maduración dependiente de la caspasa-1 o IL-1 E IL-8 quimocinas que entre otras funciones son capaces de promover la adhesión de los monocitos y neutrófilos (Riley y Tait, 2020) ver Figura 3.

Figura 3.

El ADN mitocondrial y las diferentes vías de señalización que activan la respuesta inmune.



Nota. La activación de la respuesta inmune por la liberación del ADN mitocondrial se da por diferentes vías de señalización una de ellas parte superior de la figura, se da en el endosoma cuando TLR9 se une al ADN mitocondrial e inicia un programa proinflamatorio dependiente NF- κ B, en el medio de la figura esta la vía de señalización mediada por cGAS que se acopla al ADN mitocondrial y activa STING y abajo la vía de señalización modulada por inflamasoma. Tomado de “Mitochondrial DNA in inflammation and immunity”, por Riley y Tait, 2020, *EMBO reports*, 21(4), e49799.

2.1.3 Dinámica Mitocondrial

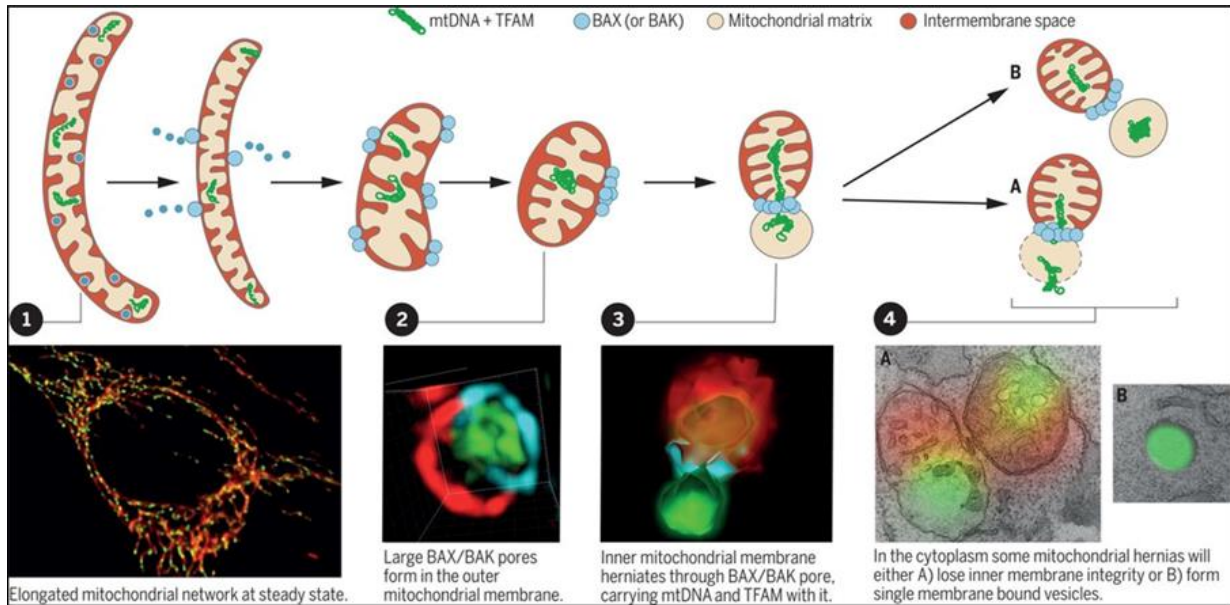
El ADN mitocondrial puede pasar de estar en la mitocondria a estar en el citosol celular y de una célula a otra. Para cambiar de ubicación puede tomar diferentes rutas dependiendo del tipo de célula y el tipo de estímulo que conlleve a esta translocación (Oliva et al., 2022)

Una ruta por la cual el ADNmt pasa de la mitocondria al citosol es por la permeabilización de la membrana interna y externa de la mitocondria mediadas por las proteínas BAK/BAX que forman macroporos de transporte que contienen ADNmt y otros componentes mitocondriales y son liberados fuera de la mitocondria (McArthur et al., 2018)

Ver Figura 4.

Figura 4.

Liberación del ADN mitocondrial por los canales activados por las proteínas BAK/BAX.

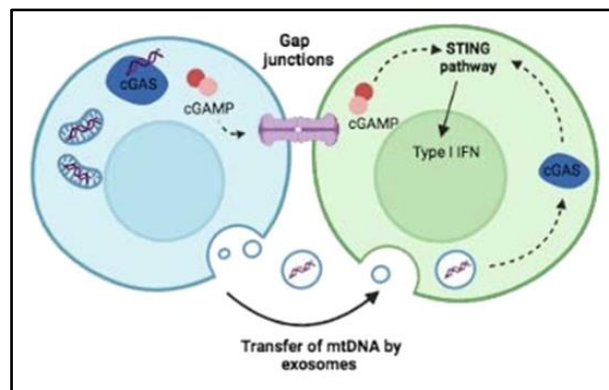


Nota. Las imágenes muestran como las proteínas Bax/Bax permeabilizan la membrana de la mitocondria y se formen macroporos que llevan dentro componentes de la matriz mitocondrial, incluido el genoma mitocondrial, imágenes capturadas por microscopía de lámina de luz reticular, microscopía de iluminación estructurada y microscopía óptica. Tomado de “BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis”, por McArthur et al., 2018, *Science New York, N.Y.*, (vol. 359,6378).

Otra manera en la que ocurre la liberación del ADNmt es mediante uniones gap. El ADN mitocondrial transportado al citosol se une a cGas generando cGamp, que puede pasar de una célula a otra por uniones gap que son conexiones que hacen posible el paso directo del citoplasma de una célula a otra y el cGas actúa como un mensajero que puede activar STING en la célula diana; además, durante las uniones intercelulares como las sinapsis, el ADN mitocondrial se puede transferir de una célula a otra por medio de la secreción de vesículas extracelulares (EV) como los exosomas, que son estructuras en forma de bolsas que llevan dentro moléculas bioactivas y material genético como el ADNmt, este último elemento activa la vía de señalización cGAS-STING (Oliva et al., 2022) Ver Figura 5.

Figura 5.

Transferencia de ADN mitocondrial a través de uniones gap y exosomas.

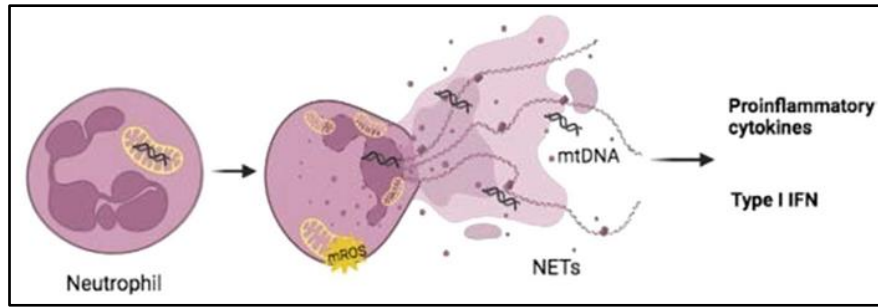


Nota. A través de las uniones gap y por exosomas el ADNmt se transporta de una célula a otra, al unirse al citosol de la célula diana, cGAS reconoce el ADNmt y concluye con la activación de STING. Tomado de “Mitochondrial function and dysfunction in innate immunity” por Oliva et al., 2022, *Current Opinion in Physiology*, (Volume 28).

Las trampas extracelulares originadas por los neutrófilos (NET), y a veces también por otras células inmunitarias como los macrófagos, son mecanismos de defensa que suceden cuando son estimulados por patógenos y consiste en la formación de cromatina con proteínas bactericidas. A través de las trampas extracelulares de neutrófilos, el ADNmt es expulsado y estimula la secreción de interferones tipo I y citocinas proinflamatorias desencadenando la respuesta inmunológica (Oliva et al., 2022), la formación de NET es crucial en la defensa de la mucosa intestinal contra infecciones y la excesiva formación de esta defensa puede incrementar la respuesta inflamatoria intestinal anormal (Drury et al., 2023). Ver Figura 6.

Figura 6.

Trampa extracelular de los neutrófilos (NET)



Nota. La trampa extracelular de los neutrófilos contiene ADNmt que al ser expulsado hacia el exterior que conlleva a la secreción de citoquinas proinflamatorias e interferones tipo I. Tomado de “Mitochondrial function and dysfunction in innate immunity” por Oliva et al., 2022, *Current Opinion in Physiology*, (Volume 28).

2.1.4 Biomarcador

Se define como biomarcador (BM) a una molécula con la capacidad de medir de forma precisa, específica y sistemática un proceso normal o identificar un proceso anormal (patológico) determinado por sus niveles establecidos en una muestra biológica (Jiménez et al., 2014).

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

El presente estudio se considera un estudio de tipo observacional no experimental porque no se realizaron intervenciones en la población de estudio, no se manipulo ninguna variable, solo se observó cómo se desarrolló de forma natural y después se analizó dichas variables, ya que el objetivo era identificar una posible relación entre la concentración de ADN mitocondrial fecal humano y gastroenteritis en niños menores de 2 años.

3.2 Ámbito temporal y espacial

Se obtuvo el permiso del laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para utilizar muestras procedentes de un estudio de seguimiento de una cohorte de la comunidad de OASIS del distrito de Villa el Salvador, estas muestras se recolectaron en el intervalo de 3 meses desde sus primeros días de nacidos hasta antes de cumplir 2 años.

3.3 Variables

3.3.1 *Variables dependientes*

Concentración de ADN mitocondrial, concentración de mieloperoxidasa.

3.3.2 *Variables independientes*

Gastroenteritis en niños menores de 2 años.

3.4 Población y muestra

La población del presente estudio estuvo conformada por 18 niños menores de 2 años, se procesaron en total 142 muestras de los cuales 62 muestras fueron casos y 80 fueron controles, las muestras consideradas *casos* son de niños con episodios diarreicos y las muestras consideradas *controles* son de niños que no presentaron episodios de diarrea.

Las muestras que fueron consideradas casos son heces no diarreicas que fueron seleccionadas 7 días antes o 7 días después de un episodio de diarrea. Se definió como diarrea a la presencia de mínimo 3 deposiciones líquidas en un periodo de 24 horas.

El material biológico fue almacenado a -80 °C y fue procesado en el área de Virología Molecular del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.5 Instrumentos

Se usaron los siguientes instrumentos, materiales y reactivos para el procedimiento y análisis de las muestras:

- kit de Qiagen QIAamp Fast DNA cat. No. 51604
- kit TOPO TA cloning cat. No. 450641
- kit QIAprep spin miniprep cat. No. 27104
- LightCycler 480 Probes Master Mix cat. No. 04707494001
- Termociclador ProFlex PCR System cat. No.4484073
- Termociclador LightCycler 480 II cat. No.05015278001
- Incubadora Modelo symphony 5.3 A.
- Centrifuga Eppendorf 5424 con rotor modelo FA-45-24-11
- Microcentrífuga para placas de 96 pozos

3.6 Procedimientos

3.6.1 Extracción de ADN Mitocondrial

Para la extracción de ADN mitocondrial se preparó una alícuota 200µl de heces que se empleó en el protocolo de aislamiento de ADN que se basa en el kit de Qiagen QIAamp Fast DNA mini para heces (cat. No. 51604) con una leve modificación para aumentar el aislamiento de ADN de muestras complejas manteniendo el ADN en buena calidad, la modificación más importante es la homogenización con Beads de sílica 0.1mm (Research products international,

EEUU) para facilitar la lisis celular según (Knudsen et al., 2016) los siguientes pasos de extracción que se siguió para la extracción de ADN mitocondrial fueron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen, 2014).

3.6.2 Detección de ADN Mitocondrial por qPCR

Para la detección de ADN mitocondrial se amplificó el gen NAD 5 y se empleó la técnica de qPCR utilizando los siguientes cebadores Sentido: 5' CAGCAGCCATTCAAGCAATGC 3', Antisentido: 5' GGTGGAGACCTAATTGGGCTGATTAG 3' y la sonda TaqMan CY5 5' TATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCG 3' diseñados por Caldwell y Levine (2009) para amplificar una región de 194 pares (Anexo A).

La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl. El tubo de reacción estaba compuesto de 1X de Master Mix probes 480 (cat. No. 04707494001 (Roche Germany, 2017), 0.3 µm de cada primer, 0.24 µm de sonda TaqMan y 3 µl de muestra (ADNmt). Para la amplificación se empleó las siguientes condiciones de reacción: 95°C por 5 minutos (min), seguido de 45 ciclos, cada ciclo consistente de 95°C 10 segundos (seg), 61°C 30 seg, 72°C 1 seg. En cada placa se utilizó 12 pozos como blancos (Mix sin ADNmt) y 21 pozos para la curva estándar que comprendían de 7 puntos (diluciones) por triplicado. Los resultados fueron analizados empleando el software del equipo LightCycler 480 II Software (Tellmann y Geulen, 2006).

3.6.3 Curva estándar para la cuantificación absoluta de ADN mitocondrial

Para realizar la curva estándar se utilizó una dilución seriada (1:10) del plásmido TOPO-PCR 2.1 (Anexo B), que contiene como inserto una región parcial del gen NAD5.

3.6.3.1 Construcción y obtención del plásmido conteniendo la región parcial de gen NAD5. El plásmido recombinante se obtuvo a partir de la amplificación de una muestra con alta carga de ADN mitocondrial mediante PCR convencional. Se utilizó los siguientes

cebadores (Caldwell y Levine, 2009) sentido: 5' CAGCAGCCATTCAAGCAATGC 3', anti sentido: 5' GGTGGAGACCTAATTGGGCTGATTAG 3' que amplificaron la región parcial de NAD5 de 194 pares de bases, cada reacción con un volumen final de 25 µl compuesto de 0.3µm de cada cebador, Buffer 1x, 0.3mM dNTPs, 2mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimerasa Recombinante cat. No. 10342053 (Life Technologies, 2014) y 3ul de ADNmt y se corrió en las siguientes condiciones: 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos cada uno de 94°C por 45 seg, 60°C 30 seg y 72°C por 20 seg, y un paso final a 72°C por 10 min. Todos los ciclos de amplificación se realizaron en el Termociclador ProFlex PCR System (cat. No.4484073, Life Technologies, 2017). El producto final de amplificación de la prueba de PCR convencional se analizó mediante electroforesis empleando un gel de agarosa al 1.5% en TAE 0.5X con 0.01ug/ml de bromuro de etidio a 100V por 1h 20 min. La presencia de amplificación se visualizó empleando un transluminador de luz UV que capturo la imagen con una cámara digital Kodak. Las clonas con el plásmido recombinante presentaron una banda de amplificación de 194 pares de bases (Anexo C).

El producto de amplificación se insertó en el plásmido vector TOPO-PCR 2.1 empleando el kit TOPO TA cloning (cat. No. 450641 Life Technologies, California, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación del plásmido TOPO-PCR 2.1 recombinante (con el inserto del gen NAD5), se utilizó células *Escherichia coli* DH5 α competentes, previamente preparadas con 0.1M de CaCl₂ y glicerol frio. La transformación se realizó mediante shock térmico, este proceso consistió en la incubación de 100µl de células competentes *Escherichia coli* DH5 α con 3µl de plásmido TOPO-PCR 2.1 recombinante en hielo durante 35 min, luego un shock térmico a 42°C durante 45 seg, y nuevamente en hielo durante 2 min. Luego del shock térmico se añadió 1 ml de medio S.O.C (caldo súper óptimo con represión de catabolitos) y se incubo a 37°C en agitación (200 rpm) durante 1 hora. Finalmente, se sembró 50 µl de bacterias

transformadas en placas de agar LB con IPTG, X gal y Kanamicina 50 µg/ml (Life Technologies, 2015) las placas se incubaron a 37°C durante la noche.

3.6.3.2 Confirmación de la clonación del plásmido recombinante. Se recolectó el ADN de 7 colonias para confirmar mediante PCR convencional las clonas con el plásmido recombinante. La confirmación de la presencia del inserto se realizó mediante PCR convencional, como se describe líneas arriba para la construcción del plásmido recombinante.

3.6.3.3 Extracción del plásmido recombinante. Las colonias con el plásmido recombinante confirmados por PCR convencional se sembraron en 4 ml de caldo LB con Kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C en agitación durante la noche. Para la extracción del plásmido recombinante se empleó el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN, 2020) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se centrifugo 2 ml de caldo con bacterias a 13000 rpm durante 5 min, después, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 250 µl de Buffer P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100ug/ml RNase A), 250ul de Buffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS) y 300µl de Buffer N3 (0.9 M potassium acetate, pH 4.8). Seguidamente, el tubo conteniendo la mezcla se centrifugo a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a una columna de silica y se centrifugo a 13000 rpm por un min. Luego se lavó la columna con 500 µl de buffer PB y se centrifugo a 13000 rpm, seguido de 750ul de Buffer PE, nuevamente se centrifugo a 13000 rpm. Finalmente, el plásmido se eluyó por centrifugación a 13000 rpm por un min en 50uL de Buffer de elución (EB).

3.6.4 Secuenciamiento

Se secuenciaron los productos que presentaron una banda de amplificación de 194 pares de bases, los productos se amplificaron por PCR convencional, método ya descrito con una leve modificación, se utilizó Taq Platinum 1x cat. No. 10966018 (Thermo Fisher, 2015), los resultados confirmaron que la secuencia parcial de NAD5 se clono correctamente. Este plásmido se empleó para realizar la curva estándar (Anexo D).

3.6.5 *Mieloperoxidasa*

El análisis de la actividad de mieloperoxidasa se realizó como parte de un estudio en paralelo (datos aun no publicados), el análisis en muestras de heces correspondió al mismo episodio de gastroenteritis de la misma población de este estudio, sin embargo, estas no corresponden a las mismas muestras o alícuotas que se utilizó para determinar la concentración de ADN mitocondrial. Por ello, estos datos solo reflejan que había inflamación intestinal (en caso la muestra sea positiva) en el momento en que se analizó las muestras para este estudio, pero no se puede correlacionar entre estas concentraciones porque no corresponden a las mismas muestras o alícuotas.

3.7 **Análisis de datos**

3.7.1 *Índices de prevalencia*

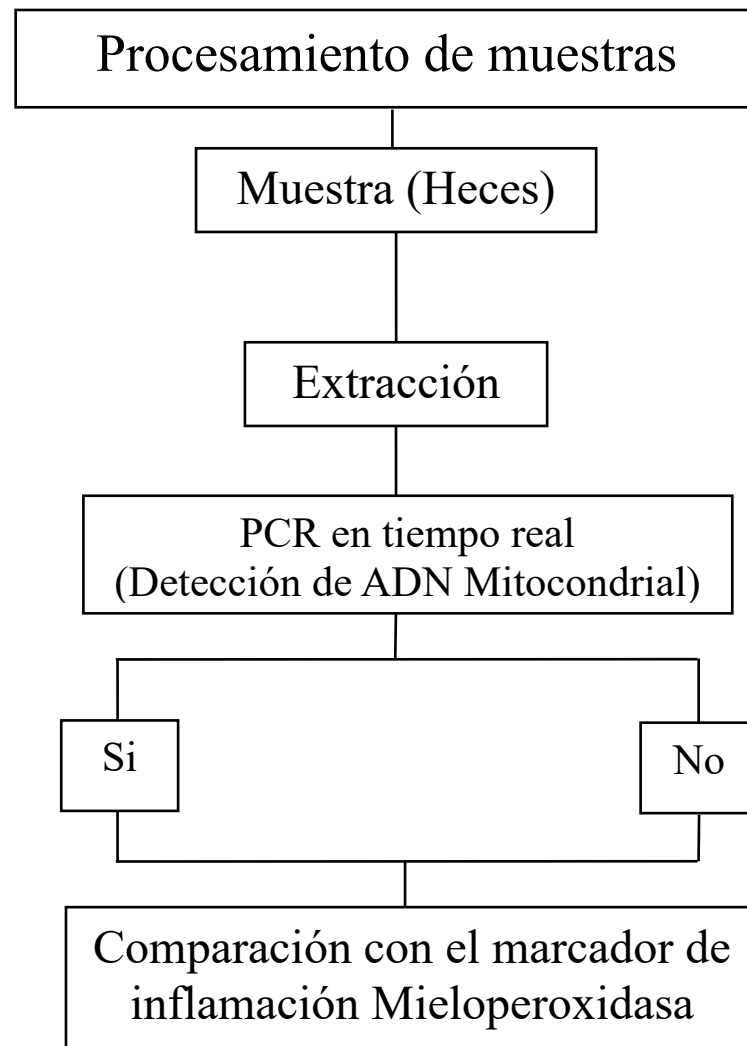
La prevalencia de concentración de ADN mitocondrial en la población se determinó empleando la siguiente formula:

$$P = \frac{\text{Número de casos con alta concentración de ADNmt}}{\text{Número total de casos y controles}} \times 100$$

3.7.2 *Mann Whitney Wilcoxon*

La prueba de Mann Whitney Wilcoxon es una prueba no paramétrica, se utilizó para evaluar si había diferencia estadística de la media y determinar si existe una diferencia en la variable dependiente para los grupos casos y controles, esta prueba se determinó mediante el programa RStudio.

3.7.3 Flujograma de trabajo



3.8 Consideraciones éticas

Las muestras analizadas en el presente estudio, conto con la autorización de uso de las muestras de los pacientes, la cual esta consignada al estudio Natural infection of Norovirus and Sapovirus in a Birth Cohort in a Peruvian Periurban community aprobado por el comité de ética y registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación de la UPCH con código de registro 65178.

IV. RESULTADOS

Se analizaron un total de 142 muestras de heces 62 casos y 80 controles de niños menores de 2 años de la comunidad de OASIS del distrito de Villa el Salvador en la ciudad de Lima- Perú. Las características básicas de los casos y controles se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Características de los niños menores de 2 años con gastroenteritis aguda.

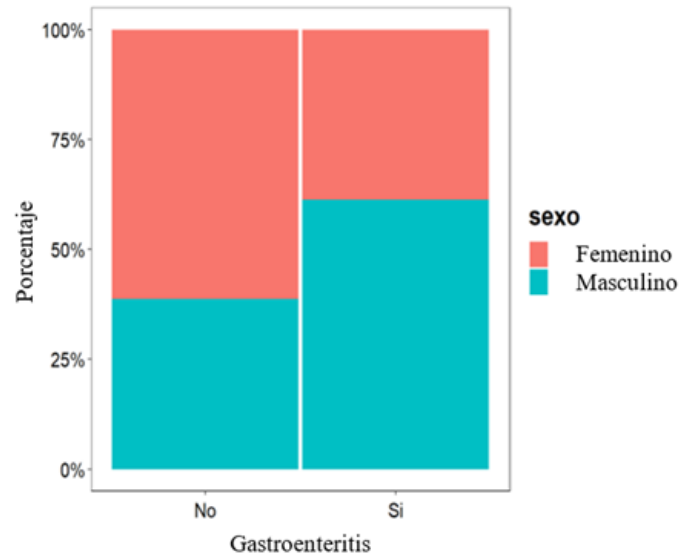
Características básicas	Casos	Controles
	N (%)	N (%)
Género		
Femenino	24(38.70)	49(61.25)
Masculino	38(61.29)	31(38.75)
Edad		
≤ 3 meses	13(20.96)	19(23.75)
> 3 meses a ≤ 6 meses	10(16.12)	11(13.75)
> 6 meses a ≤ 1 año	15(24.19)	19(23.75)
> 1 año	24(38.70)	31(38.75)

4.1 Gastroenteritis por sexo

En el grupo de casos un total de 38 (61.29%) fueron niños y 24 (38.70%) fueron niñas, mientras que en el grupo de controles un total de 31 (38.75%) fueron niños y 49 (61.25%) fueron niñas, se observó mayor número de casos (gastroenteritis) en el género masculino, ver Figura 7.

Figura 7.

Porcentaje de casos y controles (con y sin gastroenteritis) por género.



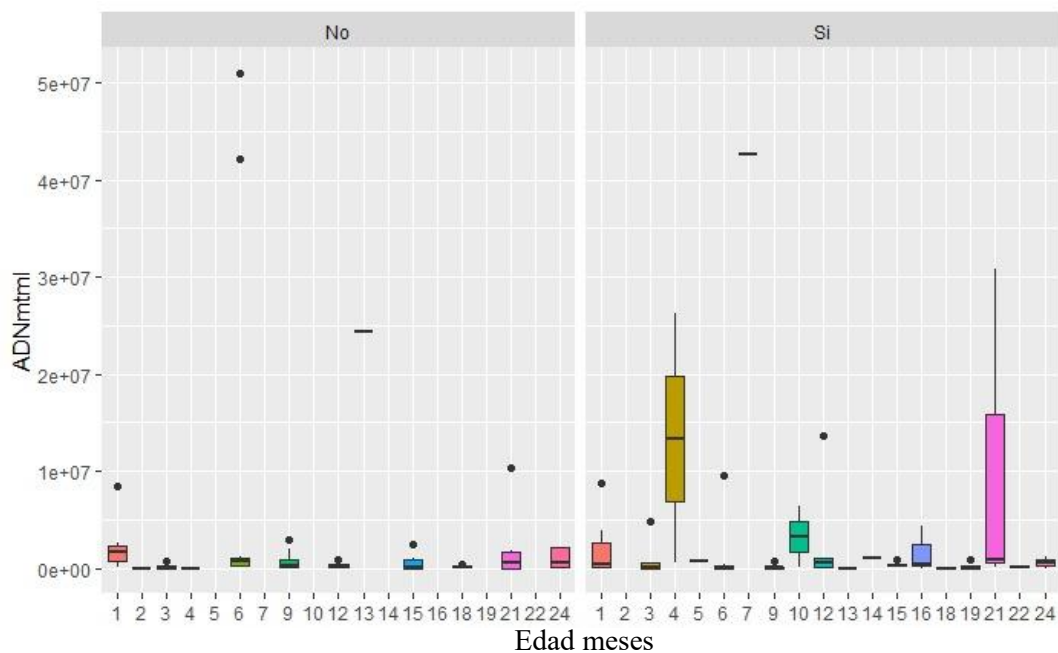
Nota. El eje X representa los niños con y sin gastroenteritis mientras que el eje Y representa el porcentaje específico de género para el femenino en color rojo y para masculino en azul (*imagen desarrollada en R-Studio*).

4.2 Gastroenteritis por edad

Del total de muestras evaluadas, las concentraciones más elevadas de ADN mitocondrial se observaron en la edad de 4 y 21 meses, ver figura 8.

Figura 8.

Concentraciones de ADN mitocondrial por edad en casos y controles.



Nota. El eje X representa la edad de los niños con y sin gastroenteritis mientras que el eje Y representa la concentración de ADN mitocondrial cuantificado por qPCR.

4.3 Concentraciones de ADN mitocondrial y Mieloperoxidasa

Se realizó una cuantificación absoluta por qPCR para determinar el número de copias exacto por medio de una curva estándar de concentraciones conocidas y también se obtuvo los datos de las concentraciones de Mieloperoxidasa (Tabla 2)

Tabla 2.

Concentraciones de ADN mitocondrial y Mieloperoxidasa en casos y controles.

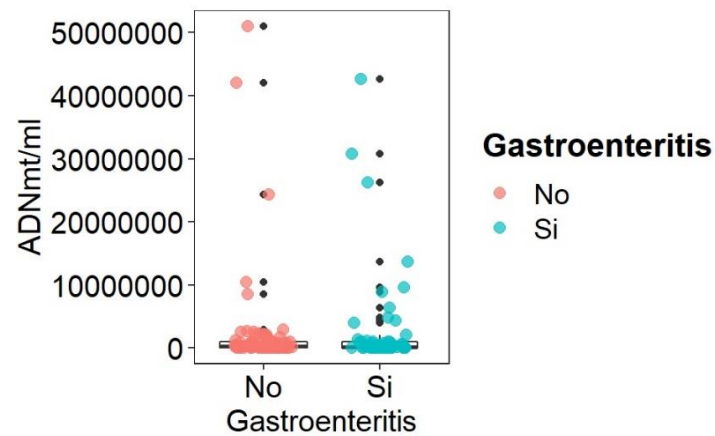
Concentraciones	Casos	Controles
	N (%)	N (%)
ADN Mitocondrial copias/ml		
≤ 1x 10 ⁵	27 (43.54)	28 (35.00)
> 1x 10 ⁵ a ≤ 1x 10 ⁶	21 (33.87)	32 (40.00)
> 1x 10 ⁶	14 (22.58)	20(25.00)
Mieloperoxidasa ng/ml		
≤ 3000	32 (51.61)	37 (46.25)
> 3000 a ≤ 20000	21 (33.87)	27 (33.75)
> 20000	9 (14.51)	16 (20.00)

4.3.1 Concentración de ADN mitocondrial por gastroenteritis

Se detecto ADN mitocondrial en ambos grupos casos y controles ver Figura 9, se aplicó la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon para determinar si las concentraciones de ADN mitocondrial son iguales o diferentes entre casos y controles y se corroboró que no existe diferencias relevantes a nivel estadístico ($P = 0.6084$) por lo tanto las concentraciones de ADN mitocondrial en niños con gastroenteritis como en los niños sin gastroenteritis son iguales.

Figura 9.

Concentraciones de ADN mitocondrial en casos y controles.

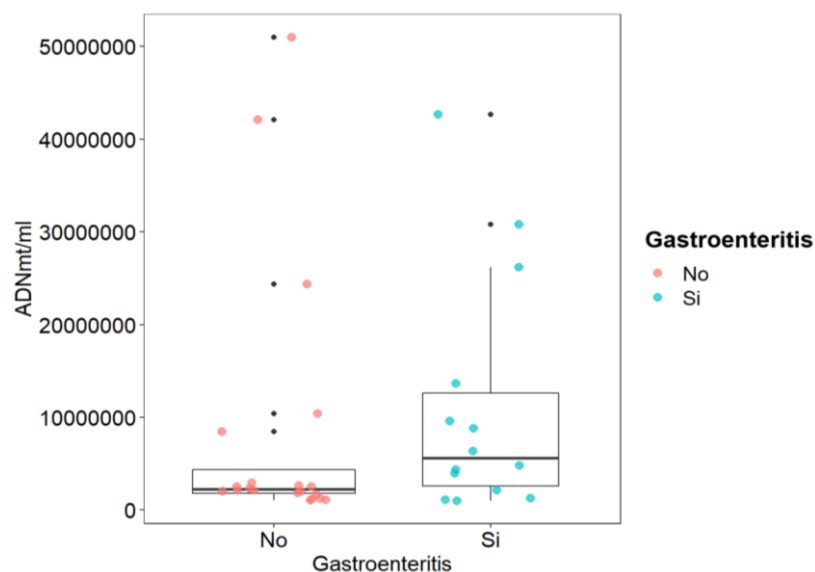


Nota: El eje X representa a los niños con y sin gastroenteritis mientras que el eje Y representa la concentración de ADN mitocondrial cuantificado por qPCR.

Tomando como referencia los puntos más altos de la curva que se usó para cuantificar el ADN mitocondrial, se observó que la mediana de las concentraciones mayores a 1×10^6 de copias de ADN mitocondrial, fue ligeramente mayor en el grupo casos comparado con el grupo de controles sin embargo estadísticamente no son diferentes, resultado de la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon ($P=0.2015$) ver Figura 10.

Figura 10.

Concentraciones mayores a 1×10^6 copias de ADN mitocondrial en casos y controles.



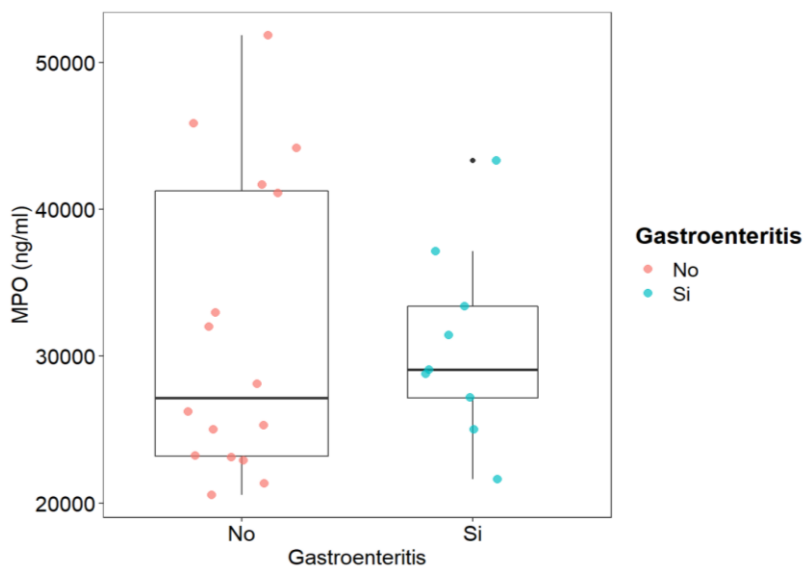
Nota: Concentraciones mayores 1×10^6 de copias de ADN mitocondrial en ambos grupos (casos y controles). Las líneas horizontales en el recuadro señalan la ubicación de los percentiles 25, 50 y 75, y las líneas verticales denominadas “bigotes” indican el valor máximo o mínimo de los datos.

4.3.2 Concentración de Mieloperoxidasa por gastroenteritis

La prevalencia de las concentraciones mayores de 20000 ng/ml de Mieloperoxidasa en fue del 18% (25/142). Las concentraciones mayores de 20000 ng/ml de Mieloperoxidasa en las muestras provenientes de los casos fue de 14.5% (9/62) y en los controles fue de 20% (16/80). Se observó una leve diferencia entre las medianas, siendo levemente mayor en el grupo casos comparando con los controles sin embargo a nivel estadístico no son diferentes, prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon ($P=0.8028$) ver Figura 11.

Figura 11.

Concentraciones mayores a 20000 ng/ml de Mieloperoxidasa en casos y controles.



Nota: Concentraciones mayores a 20000 ng/ml de Mieloperoxidasa en ambos grupos (casos y controles). Las líneas horizontales en el recuadro señalan la ubicación de los percentiles 25, 50 y 75, y las líneas verticales denominadas “bigotes” indican el valor máximo o mínimo de los datos.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio es uno de los primeros trabajos que intenta comprender si existe una asociación entre las concentraciones altas de ADN mitocondrial, un activador del sistema inmune, y la gastroenteritis en niños menores de 2 años comparando con las concentraciones de Mieloperoxidasa, debido a que la presencia de enteropatógenos cambia la concentración de este biomarcador de inflamación (Prata et al., 2016).

Las muestras analizadas del grupo “casos” es decir los niños menores de 2 años que presentaron diarrea, se recolectaron dentro de un periodo de 7 días antes o 7 días después del inicio de diarrea, tomando como modelo el estudio de desnutrición y enfermedades entéricas llamada MAL-ED, un estudio de cohorte de nacimiento donde se incluyó 8 países entre ellos Perú, en este estudio se realizó un seguimiento de niños desde su nacimiento hasta los 2 años de vida para evaluar la presencia de enteropatógenos y la relación con las concentraciones fecales de enzimas que miden inflamación intestinal entre ellas la mieloperoxidasa, enzima que se usó en este estudio. El estudio de MAL-ED analizo muestras no diarreicas debido a que la diarrea provoca la dilución de las heces y puede afectar los valores de los biomarcadores de inflamación. En esta población de estudio los niños presentaron constantes infecciones entéricas y niveles altos de inflamación intestinal incluso en ausencia de diarrea (Kosek et al., 2017).

En este estudio, el 61.29% de casos fueron niños, comparable con el reciente estudio de Mapeo de la carga mundial, regional y nacional de enfermedades diarreicas atribuibles al agua contaminada donde la carga de enfermedades diarreicas atribuibles al agua contaminada fue mayor en el género masculino (Chen et al., 2023).

Para determinar las concentraciones de ADN mitocondrial y relacionarlo con una enfermedad como la gastroenteritis es necesario realizar la cuantificación es decir determinar el número de copias por medio de una curva estándar de concentraciones conocidas de ADNmt.

Para este fin se clono la región de interés de ADNmt en un plásmido (TOPO A). El secuenciamiento demostró que la secuencia clonada fue la correcta. Basado en la curva empleando este plásmido, se observó concentraciones mayores a 1×10^6 copias de ADNmt en ambos grupos: casos y controles, estudios demuestran que el ADN mitocondrial activa la vía cGAS-STING (Riley y Tait, 2020), y un estudio reciente demuestra que esta vía cumple un papel importante para la respuesta del interferón contra los norovirus, uno de los patógenos más comunes de gastroenteritis y como este se ve relacionado con el aumento de ADN mitocondrial en las células infectadas con norovirus (Jahun et al., 2023), nuestros resultados mostraron concentraciones mayores a 1×10^6 copias de ADNmt en niños con y sin gastroenteritis esto es comparable con otros estudios donde demuestran que la presencia de enteropatógenos como norovirus están presentes incluso en la ausencia de diarrea (Huang et al., 2021), actualmente se cuenta con mayor información sobre la replicación del ADN mitocondrial sin embargo aún sigue siendo incierto el número de copias de ADN mitocondrial y como se ajusta este a nivel celular, existe pocos estudios donde se cuantifica el ADN mitocondrial de manera absoluta, hoy en día los protocolos más usados determinan el número relativo de copias de ADNmt, por ello la comparación con otros estudios se hace muy difícil (Filograna et al., 2021).

Las concentraciones más altas de ADN mitocondrial, se observó en la edad de 6 meses y de 21 meses, este hecho podría estar relacionado con la obtención de respuesta inmune efectiva debido a los cambios en hábitos alimenticios y conductas que son generalmente la fuente de contagio, en los niños de esta edad (Yalda, 2014).

Para determinar una asociación de inflamación intestinal y el ADN mitocondrial se comparó con las concentraciones de mieloperoxidasa, ya que esta enzima es un componente principal de los azurófilos, que están presentes en los neutrófilos. Su función como enzima es catalizar la oxidación de iones haluro para formar sustancias reactivas (Prokopowicz et al.,

2012). Por ello las concentraciones elevadas de mieloperoxidasa son directamente proporcional a las concentraciones elevadas de neutrófilos presentes en el contenido fecal con inflamación intestinal (Saiki, 1998). Los datos obtenidos para mieloperoxidasa muestran que concentraciones mayores a 20000 ng/ml de mieloperoxidasa estaban presente en niños con y sin gastroenteritis al momento que se midió el ADN mitocondrial. Lamentablemente en este estudio no se evaluó una relación entre las concentraciones de ADN mitocondrial y mieloperoxidasa debido a que, a pesar de que la mieloperoxidasa se midió en el mismo episodio de diarrea, la muestra empleada no correspondió a la muestra empleada en la determinación del ADN mitocondrial. Estos datos solo reflejan si había inflamación intestinal (en caso la muestra sea positiva) en el momento en que se analizó las muestras para este estudio, pero no se puede correlacionar entre estas concentraciones porque no corresponden a las mismas muestras o alícuotas.

Un aspecto importante que no se consideró en este estudio es que no se evaluó una relación directa entre la concentración de ADN mitocondrial y los patógenos relevantes presentes en la muestra, como norovirus, rotavirus, protozoos y helmintos o bacterias, donde tal vez si se podría haber obtenido una asociación como es el caso del estudio realizado por Zhu et al. (2022) en el que observaron ADN mitocondrial fecal elevado en muestras procedentes de infecciones sintomáticas por norovirus, y por ultimo para relacionar el ADN mitocondrial con la inflamación intestinal solo se comparó con mieloperoxidasa, lo que podría ser insuficiente, considerando que hoy en día existe diferentes tipos de biomarcadores enzimáticos que se evalúan en conjunto para evaluar el daño epitelial intestinal además de la inflamación intestinal, como la calprotectina, lactoferrina y lipocalina-2 (Prata et al., 2016).

VI. CONCLUSIONES

- 6.1 No se observó una asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones de ADN mitocondrial con la gastroenteritis con la metodología empleada en este estudio sin embargo la mediana de las concentraciones mayores a 1×10^6 de copias de ADN mitocondrial, fue ligeramente mayor en el grupo casos comparado con el grupo de controles.
- 6.2 Se detecto ADN mitocondrial fecal amplificando el gen NAD 5 (Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa 5) mediante la prueba de PCR en Tiempo real en el 97.9% de las 142 muestras analizadas.
- 6.3 Se determino la concentración absoluta del ADN mitocondrial fecal humano usando una curva estándar por el cual se determinó que de todas las muestras analizadas el 24.5% mostraron alta carga de ADN mitocondrial (1×10^6 de copias) en casos y controles.
- 6.4 Se detecto Mieloperoxidasa fecal en el 100% de las muestras analizadas, y se observó concentraciones mayores de 20000 ng/ml (inflamación) en el 17.6% de toda la población, de este número el 20% corresponden a las muestras de ADN mitocondrial mayor a 1×10^6 de copias.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Determinar si existe una asociación entre la severidad de la gastroenteritis y la presencia de marcadores de inflamación intestinal.
- 7.2 Evaluar si existe asociación en diferentes grupos de muestras positivas a patógenos con síntomas o asintomáticos en relación con altas concentraciones de ADN mitocondrial.
- 7.3 Estimar si existe asociación en diferentes grupos de muestras positivas a patógenos con síntomas o asintomáticos en relación con altas concentraciones de mieloperoxidasa marcador de inflamación intestinal.

VIII. REFERENCIAS

- Aarreberg, L. D., Esser-Nobis, K., Driscoll, C., Shuvarikov, A., Roby, J. A., and Gale, M. (2019). Interleukin-1 β Induces mtDNA Release to Activate Innate Immune Signaling via cGAS-STING. *Molecular Cell*, 74(4), 801-815.e6. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.02.038>
- Abd, M., Rahman, E. L., Hammad, R. H. M., Kotb, H. G., Eldesoky, N. A., and Elabd, H. A. (2018). Cell Free DNA and CD38 Expression on T helper Cells as Biomarkers of Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *American Journal of Biochemistry* 2018, 8(3): 60-68, 8(3), 60–68. <https://doi.org/10.5923/j.ajb.20180803.03>
- Basu, U., Bostwick, A. M., Das, K., Dittenhafer-Reed, K. E., and Patel, S. S. (2021). Structure, mechanism, and regulation of mitochondrial DNA transcription initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 18406–18425. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011202>
- Caldwell, J. M., and Levine, J. F. (2009). Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.007>
- Chen, L., Jiao, J., Liu, S., Liu, L., and Liu, P. (2023). Mapping the global, regional, and national burden of diarrheal diseases attributable to unsafe water. *Frontiers in public health*, 11, 1302748. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1302748>
- Choque, E. (2018). *Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de la gastroenteritis aguda infecciosa en pacientes de 1 mes a 14 años de edad hospitalizados en el servicio de pediatría del hospital Hipólito Unanue de Tacna. 2013 -2017* [Universidad Privada de Tacna]. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j>
- Chotón, R. (2019). Tendencia de la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de cinco años de edad en la Región Amazonas - Perú, 2000 - 2017. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Sociales y Humanidades*, 2(1), 37–41.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.25127/rcsh.20192.464>

- Drury, B., Chuah, C. S., Hall, R., Hardisty, G. R., Rossi, A. G., and Ho, G.-T. (2023). Neutrophil-dependent Mitochondrial DNA Release Associated with Extracellular Trap Formation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastro Hep Advances*, 2(6), 788–798. <https://doi.org/10.1016/J.GASTHA.2023.03.022>
- Duvvuri, B., Moore, R., Lood, C., and Rheumatology, D. (2018). Cell-Free Mitochondrial DNA As a Novel Biomarker in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatology*, 7, 70, 1200–1201. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/art.40700>
- Filograna, R., Mennuni, M., Alsina, D., and Larsson, N. G. (2021). Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Letters*, 595(8), 976–1002. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14021>
- Fischer Walker, C. L., Perin, J., Aryee, M. J., Boschi-Pinto, C., and Black, R. E. (2012). Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: A systematic review. In *BMC Public Health* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-220>
- Fletcher, S. M., McLaws, M.-L., and Ellis, J. T. (2013). Prevalence of gastrointestinal pathogens in developed and developing countries: systematic review and meta-analysis. *Journal of Public Health Research*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.4081/jphr.2013.e9>
- Goudet, S. M., Bogin, B. A., Madise, N. J., and Griffiths, P. L. (2019). Nutritional interventions for preventing stunting in children (birth to 59 months) living in urban slums in low- and middle-income countries (LMIC). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011695.pub2>
- Herrera, I., Comas, A., y Mascareñas, A. (2018). Impacto de las enfermedades diarreicas agudas en América Latina. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 31(9), 8–16. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000e126>

- Huang, Z., He, Z., Wei, Z., Wang, W., Li, Z., Xia, X., Qin, D., Zhang, L., Guo, J., Li, J., Diao, B., Zhan, Z., Zhang, J., Zeng, M., and Kan, B. (2021). Correlation between prevalence of selected enteropathogens and diarrhea in children: A case-control study in China. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(10). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab445>
- Jahun, A. S., Sorgeloos, F., Chaudhry, Y., Arthur, S. E., Hosmillo, M., Georgana, I., Izuagbe, R., and Goodfellow, I. G. (2023). Leaked genomic and mitochondrial DNA contribute to the host response to noroviruses in a STING-dependent manner. *Cell reports*, 42(3), 112179. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112179>
- Julián-Jiménez, A., Candel-González, F. J., y González Del Castillo, J. (2014). Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(3), 177–190. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2013.01.005>
- Kosek, M. N., Ahmed, T., Bhutta, Z. A., Caulfield, L., Guerrant, R. L., Houpt, E., Kang, G., Lee, G., Lima, A. A. M., McCormick, B. J. J., Platts-Mills, J., Seidman, J. C., Blank, R. R., Gottlieb, M., Knobler, S. L., Lang, D. R., Miller, M. A., Tountas, K. H., Checkley, W., ... Trigoso, D. R. (2017). Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. *EBioMedicine*, 18, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.02.024>
- Kosek, M., Peñataro Yori, P., Pan, W. K., Paredes Olortegui, M., Gilman, R. H., Perez, J., Banda Chavez, C., Meza Sanchez, G., Burga, R., and Hall, E. (2008). Epidemiology of Highly Endemic Multiply Antibiotic-Resistant Shigellosis in Children in the Peruvian Amazon HHS Public Access. *Pediatrics*, 122(3), 541–549. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0458>
- Life Technologies, I. (2014). *Taq DNA Polymerase, recombinant Protocol*. Invitrogen.
- Life Technologies, I. (2015). *TOPO® TA Cloning® Kit User Guide (Pub. no MAN0000047,*

Rev A.0). 1–36.

Life Technologies, I. (2017). *Appliedbiosystems GUIDE PCR Starter Kit. 4485765.*

McArthur, K., Whitehead, L. W., Heddleston, J. M., Li, L., Padman, B. S., Oorschot, V., Geoghegan, N. D., Chappaz, S., Davidson, S., Chin, H. S., Lane, R. M., Dramicanin, M., Saunders, T. L., Sugiana, C., Lessene, R., Osellame, L. D., Chew, T. L., Dewson, G., Lazarou, M., ... Kile, B. T. (2018). BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science*, 359(6378).
<https://doi.org/10.1126/science.aao6047>

Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437(7062), 1167–1172.
<https://doi.org/10.1038/nature04193>

Neto, F. (1996). *Enteropatia Ambiental*. Scielo.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000065&pid=S0103-4014200300020001200006&lng=pt

Oliva, A., Meroño, C., and Traba, J. (2022). Mitochondrial function and dysfunction in innate immunity. *Current Opinion in Physiology*, 28, 100571.
<https://doi.org/10.1016/J.COPHYS.2022.100571>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (01 de junio de 2017). *Enfermedades diarreicas*.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>

Peterson, K. M., Buss, J., Easley, R., Yang, Z., Korpe, P. S., Niu, F., Ma, J. Z., Olorategui, M. P., Haque, R., Kosek, M. N., and Petri, W. A. (2013). REG1B as a predictor of childhood stunting in Bangladesh and Peru. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 1129–1133. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.048306>

Prata, M. de M. G., Havt, A., Bolick, D., Pikerton, R., Lima, A., and Guerrant, R. (2016).

- Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.15761/JTS.1000130>.
- Prendergast, A. J., and Kelly, P. (2016). Interactions between intestinal pathogens, enteropathy and malnutrition in developing countries. In *Current Opinion in Infectious Diseases* (Vol. 29, Issue 3, pp. 229–236). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000261>
- Prokopowicz, Z., Marcinkiewicz, J., Katz, D. R., and Chain, B. M. (2012). Neutrophil myeloperoxidase: Soldier and Statesman. In *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Vol. 60, Issue 1, pp. 43–54). Arch Immunol Ther Exp (Warsz). <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0156-8>
- QIAGEN. (2020). *QIAprep® Miniprep Handbook*. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02749.x>
- Richard, S. A., McCormick, B. J. J., Murray-Kolb, L. E., Lee, G. O., Seidman, J. C., Mahfuz, M., Ahmed, T., Guerrant, R. L., Petri, W. A., Rogawski, E. T., Houpt, E., Kang, G., Mduma, E., Kosek, M. N., Lima, A. A. M., Shrestha, S. K., Chandyo, R. K., Bhutta, Z., Bessong, P., and Caulfield, L. E. (2019). Enteric dysfunction and other factors associated with attained size at 5 years: MAL-ED birth cohort study findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110(1), 131–138. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz004>
- Riley, J. S., and Tait, S. W. (2020). Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Reports*, 21(4), e49799. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201949799>
- Roche Germany, L. (2017). *LightCycler® 480 Probes Master*. 1–17.
- Saiki, T. (1998). Myeloperoxidase concentrations in the stool as a new parameter of inflammatory bowel disease. *The Kurume Medical Journal*, 45(1), 69–73.

<https://doi.org/10.2739/KURUMEMEDJ.45.69>

Saloni Dattani, Fiona Spooner, Hannah Ritchie and Max Roser (2023) - "Diarrheal Diseases".

Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from:

'<https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases>' [Online Resource]

Tellmann, G., and Geulen, O. (2006). *LightCycler® 480 Real-Time PCR System: Innovative Solutions for Relative Quantification. 4*, 16–18.

Thermo Fisher, I. (2015). *Platinum Taq DNA Polymerase. 10966*.

Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Reiner, R. C., Fullman, N., Thompson, R. L., Abajobir, A., Ahmed, M., Alemayohu, M. A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Antonio, C. A., Asayesh, H., Avokpaho, E., Awasthi, A., Bacha, U., Barac, A., ... Mokdad, A. H. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(9), 909–948.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)

Tucker, A. W., Haddix, A. C., Bresee, J. S., Holman, R. C., Parashar, U. D., and Glass, R. I. (1998). Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States. *Journal of the American Medical Association*, 279(17), 1371–1736.
<https://doi.org/10.1001/jama.279.17.1371>

West, P., Shadel, G., and Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *National Institutes of Health*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Yalda, L. A. (2014). Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 463–472.
[https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70063-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70063-X)

Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C. J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses

to injury. *Nature*, 464(7285), 104–107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>

Zhu, K. J., Suttner, B., Knee, J., Capone, D., Moe, C. L., Stauber, C. E., Konstantinidis, K. T., Wallach, T. E., Pickering, A. J., and Brown, J. (2022). Elevated Fecal Mitochondrial DNA from Symptomatic Norovirus Infections Suggests Potential Health Relevance of Human Mitochondrial DNA in Fecal Source Tracking. *Environmental science & technology letters*, 9(6), 543–550. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00140>

IX. ANEXOS

Anexo A.

Descripción de los cebadores y sonda para la detección de ADN mitocondrial.

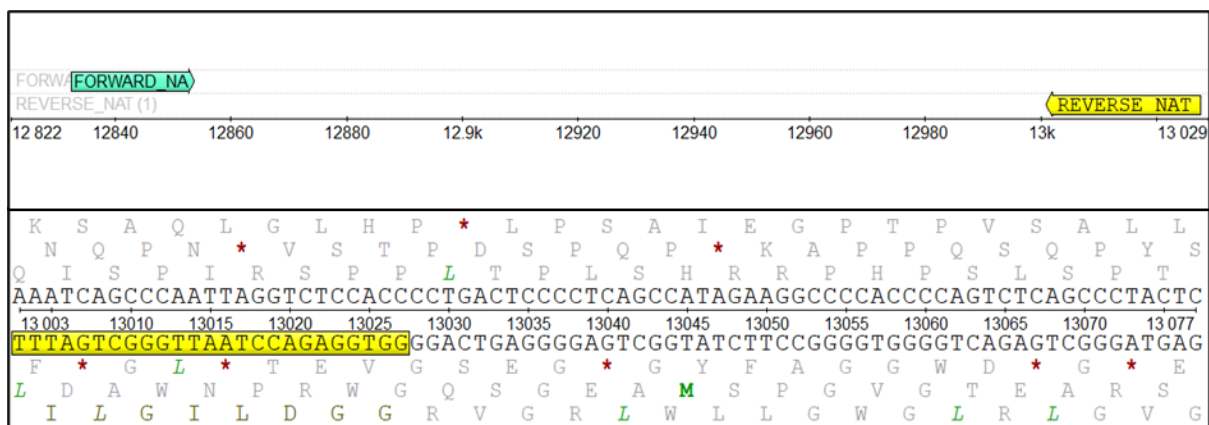
TABLA 3

Secuencias de cebadores y sonda para la detección de ADN mitocondrial

Nombre del cebador	Secuencia 5' --> 3'	Región que amplifica	Tamaño del producto
Primer, forward	5'-CAG CAG CCA TTC AAG CAA TGC-3'	5'-NAD5	194pb
Primer, reverse	5'-GGT GGA GAC CTA ATT GGG CTG ATT AG-3'		
Sonda	ND5P 5'- CY5- TAT CGG CGA TAT CGG TTT CAT CCT CG-3' BHQ-1		

Figura: 12

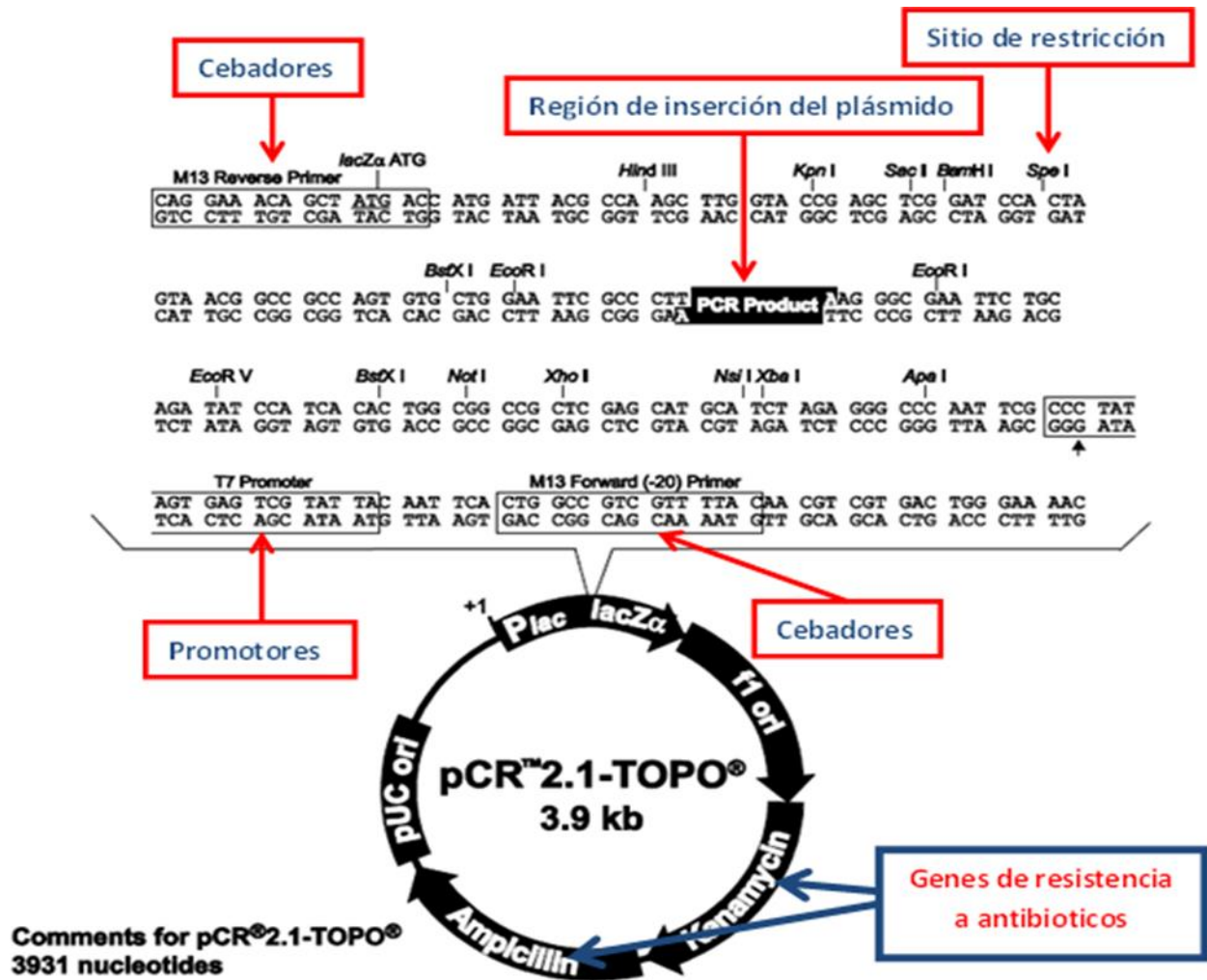
Localización y ubicación de cebadores para la detección de ADN mitocondrial desarrollado en el programa UGENE.



Anexo B.

Figura: 13

Plásmido vector TOPO-PCR 2.1.

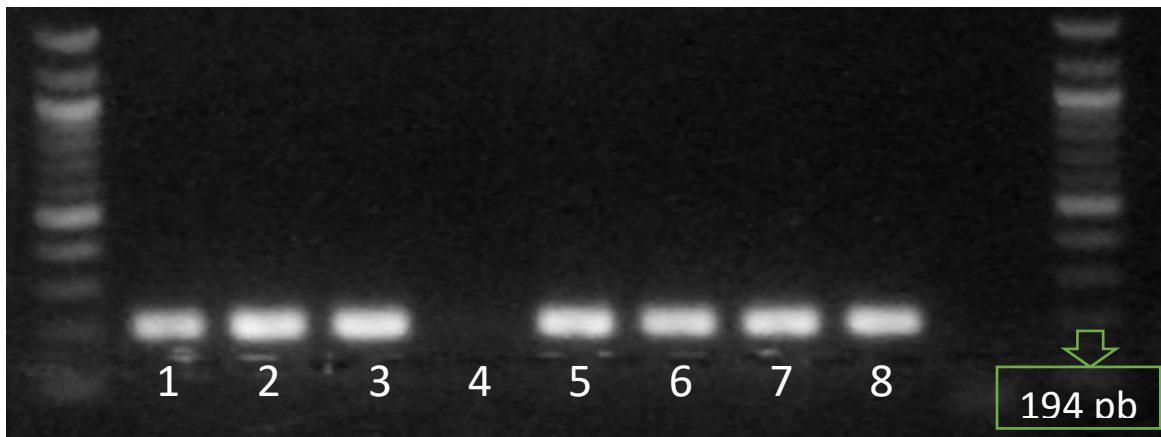


Nota. Descripción del plásmido vector TOPO-PCR 2.1 (Life Technologies, California, EEUU).

Anexo C.

Figura: 14

Clonas con el plásmido recombinante

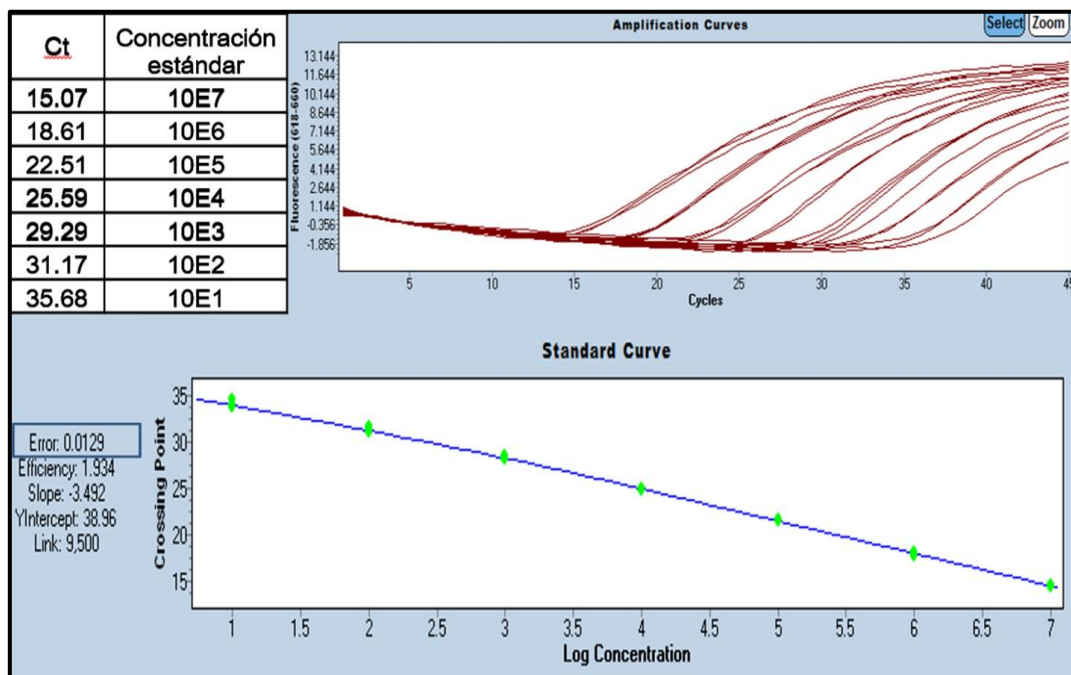


Nota. De las 8 clonas, solo en la clona 4 la secuencia del plásmido recombinante no se insertó correctamente, las otras 7 clonas presentaron una banda de amplificación de 194 pares de bases.

Anexo D.

Figura: 15

Curva estándar para la cuantificación absoluta de ADN mitocondrial.



Nota. La curva estándar tuvo una eficiencia de 1.934, una pendiente de -3.492, un error de 0.0129 y un intercepto de 38.96.