

GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES DEL ADN MITOCONDRIAL

Julio Montoya^{1,2,3}, Ester López-Gallardo^{1,2,3}, María Dolores Herrero-Martín^{1,2,3}, Magdalena Carreras^{1,2,3},
Iñigo Martínez-Romero^{1,2,3}, Aurora Gómez-Durán^{1,2,3}, David Pacheu^{1,2,3}, Taha Rhouda^{1,2,3},
Manuel J. López-Pérez^{1,2,3}, Eduardo Ruiz-Pesini^{1,2,3,4}.

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013-Zaragoza.

²CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER). ISCIII.

³Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

⁴Fundación ARAGÓN I+D.

Summary

Title: Genetics of the mitochondrial DNA diseases

The mitochondrial diseases or diseases of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) consist of a group of disorders originated by a deficient synthesis of ATP. OXPHOS is composed of proteins codified in the two genetic systems of the cell, the nuclear and the mitochondria genomes and, therefore, the mode of inheritance could be either mendelian or maternal. Due to the central role that mitochondria plays in the cellular physiology, these diseases are, nowadays a social and health problem of great importance, and, although individually they are classified among the rare diseases, all together constitute a large variety of genetic disorders. Beside this, it is considered that the mitochondria are involved, directly or indirectly, in a large percentage of the human diseases. In this review we will be mainly focussed to describe, from a genetic point of view, the diseases caused by mitochondrial DNA damage, to show the special characteristics of the mitochondrial genetic system, the different methods that are necessary to utilize for their correct diagnoses, remarking the difficulties to study these pathologies, and the possible implication of the genetic variability of the genome in the development of these diseases. At the end, a brief mention to the diseases caused by nuclear defects will also be made.

Introducción

El sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS), se encuentra localizado en la membrana interna mitocondrial, está formado por los complejos multienzimáticos de la cadena respiratoria y la ATP sintasa, y constituye la ruta final del metabolismo energético mitocondrial que conduce a la síntesis de ATP. Sin embargo, este sistema es mucho más que la ruta principal productora de energía de la célula. Así, a través de la generación de un gradiente electroquímico, el sistema OXPHOS participa también en la producción de calor, en el transporte de proteínas a la mitocondria, en la regulación de la apoptosis, en el mantenimiento de los niveles de calcio celular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). ROS, calcio y ATP son compuestos que pueden disparar numerosas rutas bioquímicas y alterar el estado homeostático celular. De este modo, podemos decir que en el sistema OXPHOS acaba integrándose toda la información proveniente del exterior, ya sea en forma de nutrientes o de oxígeno y, finalmente, puede modificar los niveles de ciertos mensajeros celulares y enviar señales al núcleo.

Las células humanas contienen dos genomas bien diferenciados: el nuclear (ADNn) o mayoritario por el núme-

ro de proteínas que codifica, y el mitocondrial (ADNmt) que, por estar en un orgánulo subcelular, presenta una serie de caracteres que lo diferencian claramente del anterior. La inmensa mayoría de proteínas que forman parte de la célula están codificadas en el ADNn. Solamente el sistema OXPHOS y el ribosoma mitocondrial dependen de la expresión coordinada de ambos genomas, constituyendo un caso único en la célula. Este sistema está constituido por alrededor de 100 proteínas estructurales; 13 de ellas están codificadas en el ADNmt y el resto en el ADNn. Además, son necesarias muchas más proteínas y ARNs para mantener y expresar el ADNmt, expresar e importar las proteínas mitocondriales que están codificadas en el núcleo, ensamblar los complejos OXPHOS en la membrana interna mitocondrial, etc. Así pues, la biosíntesis del sistema OXPHOS está bajo el control de los dos sistemas genéticos de la célula y las enfermedades que se puedan originar por un mal funcionamiento del mismo, pueden estar causadas por mutaciones en ambos ADNn y, por tanto, mostrar patrones de herencia diferentes, materno o mendeliano.

El término **patología mitocondrial** abarca, teóricamente a cualquier trastorno que tiene su origen en una de las muchas rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria, pero tradicionalmente, y debido a que las prime-

ras mutaciones se descubrieron en el ADNmt, se ha utilizado para significar aquellas enfermedades causadas por defectos en el sistema OXPHOS, única ruta metabólica en la que participan polipéptidos codificados en el ADNmt. Las primeras mutaciones asociadas al mal funcionamiento de este sistema y que generaban enfermedades, se descubrieron en el ADNmt en 1988¹⁻⁴. Desde entonces, el número de mutaciones descritas en este genoma ha crecido enormemente si bien algunas de ellas sólo se han presentado en un único paciente. Asimismo, se han descubierto muchas mutaciones en genes mitocondriales codificados en el ADNn que participan en el mantenimiento y expresión del ADNmt y en la composición y formación del sistema OXPHOS⁵. Sin embargo, dada la complejidad de procesos en los que este sistema participa, los mecanismos fisiopatogénicos son prácticamente desconocidos, lo que impide el desarrollo de terapias racionales y, hoy en día, prácticamente no hay tratamiento efectivo para ninguna enfermedad OXPHOS.

Debido al papel central que juega la mitocondria en la fisiología celular, las enfermedades mitocondriales son un problema social y sanitario de primera magnitud y, aunque son individualmente raras, en su conjunto agrupan una amplia variedad de trastornos genéticos. Además, hoy en día se considera que la mitocondria, sea en forma primaria o secundaria, está implicada en más de la mitad de las enfermedades humanas⁶.

Las enfermedades mitocondriales responden a una gran variabilidad fenotípica, con manifestaciones clínicas que afectan a distintos órganos y tejidos por lo que su estudio requiere la participación de especialistas de muy diverso origen que aporten datos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos que permitan un diagnóstico correcto. Las características genéticas del ADNmt, su modo de herencia materna, el elevado número de copias presentes en las células y la segregación mitótica, confieren a estas enfermedades propiedades muy particulares.

Con este trabajo se pretende resumir los conocimientos más actuales que se tienen sobre las enfermedades debidas a alteraciones en el ADNmt y los diversos aspectos de su diagnóstico, así como algunos detalles de mutaciones nucleares que afectan al sistema OXPHOS, dentro de lo que se podría llamar medicina mitocondrial.

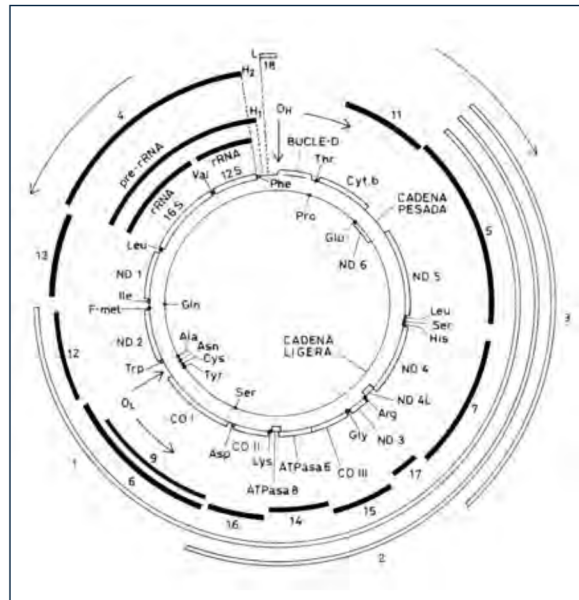
El ADN mitocondrial humano

La existencia del ADNmt se describió por primera vez en los años 60. Sin embargo, no fue hasta los 80 cuando se descubrieron los caracteres moleculares básicos del sistema genético mitocondrial humano⁷⁻¹⁵. Desde entonces, aunque se han ido descubriendo proteínas que participan en los pro-

cesos de mantenimiento y expresión del ADNmt, realmente no se ha avanzado mucho en el conocimiento de su regulación e intercomunicación con el núcleo. El ADNmt humano es circular, consta de 16.569 pares de bases y contiene información para 37 genes: 24 que participan en la maquinaria de síntesis de las proteínas codificadas en el propio genoma (dos ARNr (12S y 16S) y 22 ARNt), y 13 polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS:

- Siete polipéptidos (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) son componentes del complejo I o NADH: ubiquinona oxido-reductasa;
- Uno (cyt b) pertenece al complejo III o ubiquinol: citocromo c oxido-reductasa;
- Tres (COI, II, III) pertenecen al complejo IV o citocromo c oxidasa;
- Dos pertenecen a la ATP sintasa (complejo V) (Figura 1).

FIGURA 1. Mapa genético y de transcripción del ADNmt humano.



Los círculos internos muestran el mapa del ADNmt con los genes que codifican: ARNr (ARNr 12S y 16S), ARNt, mostrados con la abreviatura del aminoácido que les corresponde, y secuencias codificadoras de proteínas (ND: subunidades del complejo I; cyt b: subunidad del complejo III; CO: subunidades del complejo IV; ATPasa 6 y 8: complejo V). Los círculos exteriores muestran los ARNs transcritos de la cadena pesada, derivados de las unidades de transcripción H1 y H2, respectivamente (barras negras), y de la ligera (barras abiertas). OH y OL representan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera, según indican las flechas que están a su lado, de acuerdo con el modelo clásico de replicación. H1, H2 y L indican los sitios de iniciación de las tres unidades de transcripción. Las flechas exteriores indican la dirección de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

El resto de los polipéptidos componentes del sistema OXPHOS, así como todo el complejo II, están codificados en el ADN nuclear. Por ello, la biogénesis de este sistema constituye un caso único en la célula, ya que para su síntesis se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos celulares.

Una de las características más llamativas del ADNmt es que los genes que codifica se encuentran unos a continuación de los otros sin nucleótidos intermedios ni intrones, y que los genes de los ARNt se encuentran esparcidos entre los genes de los ARNr y los codificantes de proteínas, una disposición que tendrá consecuencias muy importantes para el procesamiento o maduración de los precursores de los ARNs como se mostrará más adelante. Asimismo, y curiosamente, los genes codificados en el ADNmt están distribuidos entre ambas hebras del ADN. La mayor parte (2 ARNr, 14 ARNt y 12 polipéptidos) están codificados en una de ellas (cadena H), mientras que los 9 restantes (un polipéptido y 8 ARNt) lo están en la cadena complementaria (cadena L). En el ADNmt solamente existe una pequeña zona que no codifica ningún gen, región denominada bucle D, donde se encuentran localizados el origen de replicación de la cadena H, los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión del ADN.

Desde finales de los años 1970, se consideraba que la replicación del ADNmt se verificaba de un modo especial, unidireccional y asimétrico, utilizando para ello dos orígenes de replicación diferentes (O_H y O_L). De acuerdo con este modelo, la síntesis del ADN se inicia en O_H por acción de la ADN polimerasa gamma, específica de la mitocondria, que alarga un ARN iniciador originado por procesamiento de un transcrito primario que se sintetiza a partir del promotor L. La replicación continúa unidireccionalmente hasta alcanzar el segundo origen de replicación (O_L), momento en el cual comienza la síntesis de la segunda cadena alargando también un pequeño cebador de ARN sintetizado por una primasa¹⁶⁻¹⁸. Sin embargo, en los últimos años, se ha cuestionado mucho este modelo de replicación y se ha propuesto que el ADNmt se replica de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza con el ADN bacteriano^{19,20}. Hoy en día todavía no se ha dirimido la cuestión, pero los modelos parece que convergen en cierta manera²¹.

Otra de las características peculiares del ADNmt es que las dos cadenas se transcriben completamente, mediante tres unidades de transcripción, a partir de tres puntos de iniciación, H_1 y H_2 para la cadena pesada y L para la cadena ligera, que originan tres moléculas policistrónicas. Posteriormente, estas moléculas precursoras, que se cortan en los extremos 5' y 3' de las secuencias de los ARNt, dando lugar (Figura 1) a los ARNr, ARNt y ARNm maduros (modelo de

puntuación por el ARNt)^{9-12,22}. Los ARNt situados entre los genes de ARNr y codificantes de proteínas, como se ha indicado anteriormente, actúan como señales de reconocimiento para los enzimas que participan en el procesamiento de las moléculas de ARN policistrónicas precursoras. Es importante destacar, por la importancia que tendrá en la regulación de los distintos tipos de ARN que se van a sintetizar, que las dos unidades de transcripción de la cadena H se solapan en la región de los ARNt. La primera de las unidades, se transcribe muy frecuentemente, comienza en H_1 , delante del gen para el ARNt^{Phe}, termina en el extremo 3' de la región codificante de los ARNr, y es responsable de la síntesis de los ARNr 12S y 16S, del ARNt^{Phe} y del ARNt^{Val}. La terminación de esta unidad de transcripción está provocada por un factor de terminación (mTERF), que se une a una secuencia situada en el gen del ARNt^{Leu}^{23,24}. La segunda unidad se inicia en H_2 , cerca del extremo 5' del gen del ARNr 12S, y transcribe, con una frecuencia mucho menor que la anterior, prácticamente la totalidad de la cadena pesada. El ARN policistrónico que se origina se procesa dando lugar a los ARNm de 12 péptidos y a los 14 ARNt codificados en esta cadena. Como se puede deducir de lo anteriormente expuesto, el punto de iniciación juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y explica el modo de síntesis diferencial de ARNr y ARNm¹². En el caso de la cadena ligera, la transcripción comienza en el sitio L, cercano al extremo 5' del ARN 18 y da lugar al ARN iniciador de la replicación del ADN, a 8 ARNt, y a un ARNm. Para llevar a cabo este proceso de transcripción se necesita una ARN polimerasa específica (h-mtRPOL)^{25,26}, tres factores de transcripción implicados en la iniciación (mtTFA y mtTFB1 y mtTFB2)²⁷⁻²⁹, y uno de terminación (mTERF)^{23,24,30}, todos ellos codificados en el ADNn. Muy posiblemente, la fosforilación o desfosforilación del factor de terminación puede ser una indicación de parada o continuación de la transcripción al final de la zona de los ARNr³¹.

Como ya se ha indicado, el ADNmt codifica 13 proteínas cuya síntesis se verifica en ribosomas específicos de la mitocondria, cuyos componentes están codificados tanto en el ADNmt (ARNr 12S y 16S), como en el genoma nuclear (~78 proteínas ribosómicas)³². Para la síntesis de estas proteínas, la mitocondria utiliza un código genético que difiere en algún detalle del código genético universal. Así, el codón UGA codifica triptófano en vez de ser un codón de terminación, los codones AUA y AUU se utilizan también como codones de iniciación, y AGA y AGG son codones de terminación en lugar de codificar para arginina. Asimismo, en el ADNmt están codificados solamente 22 ARNt, sin embargo, parece que son suficientes para leer los codones de los ARNm mitocondriales utilizando para ello un sistema de apareamiento codón-anticodón más sencillo que

el del código genético universal. Todos los polipéptidos codificados y sintetizados en la mitocondria interactúan con los componentes del sistema OXPHOS que están codificados en el ADNn, sintetizados en el citosol y que se importan a la mitocondria. Así, la biogénesis del sistema OXPHOS depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear.

Características de la genética mitocondrial

La localización del ADNmt en un orgánulo citoplasmático implica que la herencia de este genoma difiera de la del ADNn. Así, el núcleo y el ADN celular se duplican originando una copia idéntica antes de cada división celular de forma que las células hijas reciban una misma dotación genética. Sin embargo, esto no ocurre exactamente así con la mitocondria y su ADN; además, la organización genética tan compacta, sin nucleótidos intermedios ni intrones, el alto número de copias de ADNmt que contiene cada célula, y su alta vulnerabilidad, proporcionan unos caracteres genéticos que los diferencian claramente de los del ADN nuclear, como se indica a continuación.

1.- *Modo de herencia:* El ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna. La madre transmite el genoma mitocondrial a todos sus hijos, hombres o mujeres, pero sólo éstas lo transmiten de nuevo a la siguiente generación. Esto se debe al elevado número de copias de ADNmt que contienen los óvulos y a que las mitocondrias del espermatozoide se eliminan por un proceso activo en los primeros estadios de división celular³³.

2.- *Poliplasmia:* El número de moléculas de ADNmt varía mucho de unos tejidos a otros. Así, podemos encontrar desde un número muy bajo en las plaquetas, hasta unas 100.000 copias en el oocito. En cualquier caso, la mayor parte de los tejidos contienen entre 1.000 y 10.000 copias por célula, y cada mitocondria entre 2 y 10 moléculas de ADN, organizadas en nucleoides. En un principio todas las moléculas de ADNmt de un individuo son iguales (homoplasmia). Sin embargo, la aparición de una mutación puede llevar a la existencia de dos poblaciones de ADNmt, normal y mutada (heteroplasmia).

3.- *Segregación mitótica:* Cuando existe una heteroplasmia, las moléculas de ADNmt segregarán al azar entre las células hijas durante la división celular pudiendo dar lugar a tres posibles genotipos: homoplásmico normal y mutante y heteroplásmico, con porcentajes variables de ADNmt mutado. En consecuencia, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje y naturaleza del ADN mutado que contenga. Como estas células son el origen de los tejidos y órganos desarrollados, una de las caracte-

cas de las enfermedades mitocondriales es que suelen ser multisistémicas.

4.- *Expresión umbral:* Mientras un tejido tenga un porcentaje de copias de ADNmt normal, éste podrá funcionar perfectamente al producir la cantidad necesaria de ATP para su funcionamiento. Sin embargo, cuando los niveles de ADNmt mutado sobrepasen un nivel determinado, diferente para cada tejido, la producción de ATP estará por debajo de los mínimos necesarios, la producción de ATP se verá afectada, y, por debajo de un nivel umbral, podrán aparecer las manifestaciones de la enfermedad.

No todos los tejidos tienen las mismas necesidades energéticas, por lo que no todos se afectarán al pasar los niveles umbrales de producción de ATP. Los que se ven afectados preferentemente son el sistema nervioso y el muscular, aunque se puede afirmar que cualquier tejido puede verse afectado. Además, pueden tener niveles de heteroplasmia distintos, a menudo mayores en tejidos postmitóticos como el cerebro o el músculo (ambos de difícil acceso), y menores en tejidos mitóticos, como la sangre, que no son fiables para el diagnóstico de muchas patologías mitocondriales.

5.- *Alta tasa de mutación:* El ADNmt es muy vulnerable, presentando una tasa de mutación espontánea que es unas 10-20 veces superior a la del ADN nuclear. Una de las posibles explicaciones a este hecho es la acumulación de radicales libres de oxígeno, que se producen constantemente en la mitocondria, y que dañan a un ADN con información genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y con mecanismos de reparación menos eficaces. Por tanto, en cualquier individuo se podría estar produciendo continuamente a lo largo de la vida, una pequeña heterogeneidad en el ADNmt como consecuencia de las mutaciones que se están originando en sus células somáticas. Este daño mitocondrial pudiera ser la causa de la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar en el envejecimiento. En el año 1999, el grupo de Attardi encontró evidencias que apoyan esta teoría al demostrar que las mitocondrias acumulan determinadas mutaciones con la edad³⁴.

Diagnóstico de las enfermedades del ADNmt

Como se ha mencionado anteriormente, el ADNmt codifica solamente proteínas que forman parte exclusiva del sistema OXPHOS, por tanto, las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt constituyen un grupo de patologías que tienen como característica común el estar producidas por una deficiencia en la síntesis de ATP. De este modo, dentro de las enfermedades debidas a de-

fectos en el metabolismo mitocondrial, son enfermedades originadas concretamente por defectos que afectan a los componentes de los complejos multienzimáticos I, III, IV y/o V. Desde 1998, cuando las primeras mutaciones en el ADNmt se asociaron a enfermedades humanas, el número de mutaciones y el espectro de enfermedades asociadas ha crecido de modo espectacular. Conviene volver a recordar que el sistema OXPHOS está compuesto también por otras muchas proteínas que están codificadas en el genoma nuclear y que, después de ser sintetizadas por los ribosomas citoplásmicos y de importarse al interior de la mitocondria, se ensamblan con las proteínas codificadas y sintetizadas en el interior del orgánulo. Aunque fundamentalmente, nos centraremos en el diagnóstico y enfermedades causadas por daños en el ADNmt, muchas de las aseveraciones que se hagan servirán también para las patologías originadas por daños en el ADNn codificante de proteínas mitocondriales.

Como se ha podido deducir de lo anteriormente dicho, las manifestaciones clínicas de las enfermedades del sistema OXPHOS varían mucho y pueden afectar a una gran diversidad de órganos y tejidos, ya que la síntesis de ATP se produce en todos ellos y a cualquier edad. De este modo se puede encontrar un amplio espectro de síntomas clínicos, con una gran variedad de presentaciones clínicas diferentes. Esto hace que sea muy complicado poder hacer una clasificación muy clara de las mismas, si bien, algunas de ellas presentan una serie de aspectos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos muy determinados que permite encuadrarlas en síndromes bien definidos. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, principalmente en la infancia, los síntomas son muy poco informativos por no haberse desarrollado completamente, y solamente la presencia de alguna alteración neurológica, acompañada en ocasiones de aumento de ácido láctico y de otros síntomas secundarios que afectan a diversos órganos, nos orientan sobre la naturaleza mitocondrial de estas enfermedades. Su principal característica es el incremento progresivo de tejidos afectados durante el curso de la enfermedad, estando el sistema nervioso central casi siempre involucrado en los estadios avanzados. La confirmación de una enfermedad mitocondrial exige, además de la presencia de los síntomas clínicos característicos, un estudio muy profundo que implica necesariamente a expertos de muy diversas áreas.

1.- Manifestaciones clínicas

Como ya se ha mencionado, las enfermedades del ADNmt son multisistémicas, pudiendo afectar prácticamente a ca-

si cualquier órgano y tejido, pero fundamentalmente a aquellos que más dependen de la energía mitocondrial (como los sistemas nervioso y muscular), dando lugar a síndromes muy heterogéneos. Se podría generalizar diciendo que pueden originar cualquier síntoma, en cualquier órgano o tejido y a cualquier edad (Tabla 1). Sin embargo, también se encuentran fenotipos en los que sólo un tejido está afectado, como ocurre en LHON (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber) y en la sordera mitocondrial (células cocleares). La posibilidad de encontrarnos frente a una enfermedad mitocondrial se debe considerar cuando un paciente presenta una asociación de síntomas bastante inexplicable, con un curso de la enfermedad rápido y progresivo, e implicando órganos no relacionados. Las manifestaciones clínicas más comunes se resumen en la Tabla 1. En algunos casos es posible asignar una serie de síntomas a síndromes concretos pero, en general, es muy complicado delimitarlos con precisión, porque el solapamiento de síntomas es muy frecuente y el curso y gravedad de los mismos varía en los diferentes individuos. Una buena lista de perfiles clínicos desde neonatos hasta adultos, puede encontrarse en magníficas revisiones de DiMauro y Munnich^{35,36}.

2.- Análisis de laboratorio

La manifestación bioquímica más común de las enfermedades mitocondriales, aunque no general ni específica, es la aparición de acidemia láctica. Esta, junto a piruvato y su relación molar, se deben de determinar en plasma y a ser posible en líquido cerebro-espinal. La elevación de lactato puede o no ir acompañada de otras alteraciones bioquímicas como hiperamonemia, elevación de la concentración plasmática de algunos aminoácidos (alanina, prolina), elevación de los cuerpos cetónicos, ácidos orgánicos (metabolitos del ciclo de Krebs, 3-metil-glutaconato), cetoácidos, ácidos grasos libres, con disminución de la carnitina total y libre, folato, coenzima Q10, etc., También es muy importante realizar estudios nutricionales y pruebas hematológicas. Es muy importante evaluar todos los datos bioquímicos en conjunto, ya que la elevación del lactato en sangre es muy frecuente en pediatría por causas diferentes a una alteración mitocondrial, o bien secundaria a ciertos fármacos. Por ello, el estudio del resto de metabolitos reafirma la posible existencia de una acidemia láctica primaria, aumentando la especificidad de las pruebas bioquímicas. Por otro lado, algunos pacientes con enfermedad mitocondrial cursan con lactatos en sangre normales, pero pueden presentar alguno de los otros metabolitos alterados, lo que aumenta la sensibilidad de estas pruebas. En la orina también se deben realizar análisis bioquímicos automatizados, ami-

TABLA 1

**ALGUNOS CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO
DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR MUTACIONES
EN EL ADNmt**

ÓRGANO/TEJIDO	MANIFESTACIONES CLÍNICAS/ CARACTERES
Sistema Nervioso	Encefalopatía Accidentes cerebro vasculares Epilepsia Ataxia cerebelar Convulsiones Mioclonías Retraso mental y/o psicomotor Migraña Ceguera cortical Neuropatía periférica
Músculo	Miopatía progresiva Intolerancia al ejercicio Debilidad Oftalmoplegia Ptosis Mioglobinuria
Sangre	Anemia sideroblástica
Ojo	Atrofia óptica Retinitis pigmentaria Cataratas
Oído	Sordera
Corazón	Cardiomiopatía Defectos en conducción cardiaca
Sistema endocrino	Diabetes mellitus Diabetes insipidus Hipoparatiroidismo Hipotiroidismo Baja estatura
Intestino	Pseudo obstrucción intestinal Vómitos
Páncreas	Disfunción pancreática exocrina
Hígado	Fallo hepático
Riñón	Síndrome de Fanconi Fallo renal
Morfología muscular	Fibras rojo-rasgadas en biopsias musculares Inclusiones paracristalinas en mitocondria
Histoquímica	Fibras COX negativas
Bioquímica	Disminución de actividad de complejos respiratorios y/o de enzimas respiratorias en biopsias musculares, fibroblastos, etc. Defecto de ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS. Disminución de niveles de ATP
Laboratorio	Acidosis láctica en sangre y/o líquido cerebroespinal Hipoglucemia
Genética	Herencia materna o esporádico
Modelos celulares (cíbridos)	Defectos bioquímicos producidos por la mutación en el ADNmt

noácidos y ácidos orgánicos. Para casos de deficiencia de coenzima Q10, es muy importante su determinación en biopsias musculares y en fibroblastos.

Es igualmente posible que estas anomalías bioquímicas no se presenten en el paciente no descompensado si se halla en condiciones basales, por lo que la selección de pacientes con sospecha clínica de enfermedad mitocondrial requiere, a veces, la realización de pruebas dinámicas que pongan de manifiesto la alteración del metabolismo energético. Dichas pruebas deben de estar estandarizadas y se deben seguir exactamente los protocolos para su realización, de forma que la interpretación de los resultados sea correcta³⁷. La recogida de muestras biológicas en descompensación es fundamental, ya que puede evitar la realización de pruebas dinámicas, las cuales no están exentas de riesgo, son difíciles de realizar correctamente y son costosas.

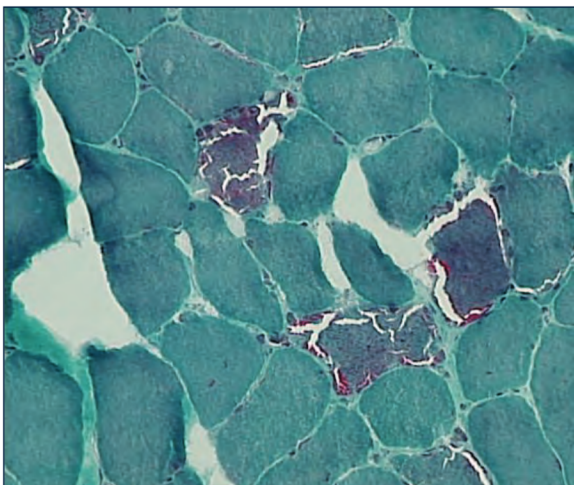
Dependiendo de las señales de enfermedad que se vayan encontrando, se tiene que considerar la realización de estudios oftalmológicos, de neuroimagen, pruebas neurofisiológicas, audiometría, endoscopia, ensayos de función renal, agudeza visual, electrocardiogramas, ecocardiogramas, y espectroscopía de resonancia magnética para determinar el metabolismo energético de cerebro y músculo *in vivo*, etc.

3.- Estudios morfológicos e histoquímicos

Lógicamente, el tejido mas afectado es el ideal para realizar cualquier estudio histoquímico, bioquímico y genético, ya que el porcentaje de heteroplasmia suele ser más elevado y poseen signos más claros que indican el padecimiento de enfermedad mitocondrial. Aunque el músculo es uno de los tejidos más frecuentemente afectados en la patología mitocondrial, en el diagnóstico genético pueden usarse biopsias de otros tejidos, como sangre, raíces de pelos, semen, células de la mucosa bucal y las células epiteliales presentes en la orina, en orden decreciente de invasividad.

El estudio histoquímico de biopsias musculares es de gran importancia para la detección de alteraciones mitocondriales. Una de las características morfológicas mas típicas de las enfermedades mitocondriales es la presencia de fibras rojo-rasgadas (RRF), en biopsias musculares teñidas con tricromo de Gomori modificado, o con la reacción para succinato deshidrogenasa (SDH). La forma tan característica que tienen se deben a una acumulación de mitocondrias anómalas en la zona subsarcolémica y entre fibras musculares (Figura 2), que posiblemente se origina para intentar compensar el déficit energético.

FIGURA 2. Ejemplo de fibras rojo-rasgada obtenida mediante la tinción tricromo de Gomori modificada, a partir de una biopsia muscular de un caso de síndrome de Kearns-Sayre.



También es muy frecuente realizar análisis de marcadores histoquímicos para enzimas oxidativas, en particular se trata de detectar la presencia de fibras no reactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa (COX negativas) que indica la gravedad de la deficiencia enzimática. Los resultados, a veces, son contradictorios. Aunque un modelo con mayoría de fibras rojo-rasgadas deficientes en COX es altamente sugerente de enfermedad por mutación heteroplásmica en el ADNmt, se encuentran muchos pacientes con biopsias musculares normales o fibras musculares con proliferación mitocondrial pero actividad COX normal.

La microscopía electrónica puede revelar la presencia de inclusiones paracrísticas o de mitocondrias con forma y tamaño alterados, aunque no es de mucho valor en el diagnóstico mitocondrial³⁸.

4.- Estudios bioquímicos

Una de las pruebas más concluyentes de padecimiento de una enfermedad del sistema OXPHOS se obtiene mediante la determinación de la actividad enzimática de los complejos respiratorios mitocondriales. Estas pueden realizarse midiendo el consumo de oxígeno, mediante estudios polarográficos, o por análisis espectrofotométricos que miden las actividades de los enzimas respiratorios por separado.

En el primer caso, el consumo de oxígeno se debe de determinar en fracciones enriquecidas en mitocondrias, obtenidas de biopsias musculares, utilizando un electrodo de oxígeno (electrodo de Clark). Estos estudios pueden realizarse también en linfocitos, o en células en cultivo (fibroblastos) permeabilizadas. El principal problema que presentan, es que estas pruebas se deben de realizar en material fresco, recién recogido, sin haber pasado un periodo de congelación y con controles recogidos en las mismas condiciones.

Los análisis espectrofotométricos, más habituales y fáciles de realizar, se realizan en homogenizados de tejidos. Por consiguiente, requiere menor cantidad de material de partida y puede haberse mantenido congelado hasta su estudio. Los pacientes con mutaciones en el ADNmt muestran un rango muy variable de actividades enzimáticas como normales, defectos aislados en un complejo, o defectos múltiples. Los últimos, dan una orientación casi definitiva sobre el siguiente paso del diagnóstico mitocondrial, el estudio genético. En el caso de afectación de un único complejo respiratorio se entiende que hay un defecto en alguna de las subunidades proteicas de dicho complejo. Si son varios los complejos respiratorios que presentan una deficiencia en actividad enzimática, es muy probable que nos encontremos con defectos en genes codificantes de ARNt, ARNr, deleciones o depleción del ADNmt. Sin embargo, se han descrito casos con mutaciones en genes ARNt en los que sólo un complejo respiratorio está afectado³⁹ o, por el contrario, una mutación en un gen codificante de proteínas puede afectar a la actividad de más de un complejo⁴⁰. En general, el tejido que debe ser analizado es aquel en el que se expresa la enfermedad y, si no es posible, al menos se deben realizar biopsias de piel para estudios en células en cultivo.

5.- Estudios de ensamblaje de complejos OXPHOS

Desde hace unos años, se viene aplicando una técnica que permite analizar los complejos OXPHOS sin disociarlos en sus constituyentes polipeptídicos (*blue native polyacrylamide gel electrophoresis*)⁴¹. Además, estos complejos permanecen en su forma activa en el gel. Esta técnica ha sido aprovechada para cuantificar los niveles de los complejos OXPHOS perfectamente ensamblados en relación con diversas mutaciones que provocan enfermedades mitocondriales⁴². Aunque esta técnica no se puede aplicar directamente para diagnóstico, sí que merece la pena citarla porque puede aportar indicios claros del tipo de daño que padecen los complejos, fundamentalmente para el ensamblaje de las muchas subunidades proteicas que los componen.

6.- Caracteres genéticos y análisis genético-moleculares.

Las enfermedades del ADNmt suelen presentar una herencia materna. Sin embargo, pueden aparecer de forma esporádica, somáticas, etc. Además, y como ya se ha mencionado, las enfermedades del sistema OXPHOS, pueden presentarse tanto con un tipo de herencia mendeliana como materna, debido al doble origen genético de este sistema. Sin duda, y como en todas las enfermedades genéticas, el estudio familiar puede orientarnos, ya que las enfermedades debidas a defectos en el ADNmt, objeto de esta revisión, presentan fundamentalmente una herencia materna cuando están producidas por mutaciones puntuales. Por tanto, la historia familiar y el análisis del pedigrí puede ser fundamental para un diagnóstico de estas patologías. El médico, ante un posible caso de enfermedad del ADNmt, debe preguntar si hay miembros en la familia que presenten síntomas, aunque sean secundarios, característicos de estas enfermedades. En el caso de que la mutación esté presente en otros miembros de la familia, pero en un porcentaje muy bajo, puede hacer que no expresen toda la sintomatología y que sólo, al aumentar el porcentaje de la mutación en generaciones posteriores, aparezca el síndrome completo. Este seguimiento, como se puede deducir, es muy importante en niños con sospecha de enfermedad mitocondrial.

En el caso de deleciones, duplicaciones y depleciones, a pesar de que existe un daño sobre el ADNmt, la causa del mismo puede deberse a defectos en proteínas codificadas en el ADNn implicadas en el mantenimiento del sistema genético mitocondrial. En estos casos, al igual que con las proteínas del sistema OXPHOS que están codificadas en el ADNn y las que participan en su ensamblaje, pueden presentar un modo de herencia: autosómico recesivo, autosómico dominante o incluso ligada a sexo. No se debe de olvidar, en cualquier caso, que también se han descrito deleciones con herencia materna.

La heterogeneidad de manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas de estas enfermedades hace necesario un análisis genético-molecular para la confirmación y mejor clasificación de los síndromes. Para ello, es muy importante que los resultados de las investigaciones previas guíen los estudios genéticos que se deben de realizar.

Las enfermedades del genoma mitocondrial pueden deberse a tres tipos de daño en el ADNmt: 1) Mutaciones puntuales en genes de ARNt, de ARNr y codificantes de proteínas; 2) deleciones; y 3) depleción o disminución del número de copias del ADNmt. En el primer caso, la determinación de mutaciones asociadas a síndromes clínicos bien definidos o a otros más difusos, como sucede principalmente en

la edad pediátrica, se puede realizar de una manera sencilla utilizando ADN extraído de células sanguíneas. No obstante, el tejido de elección debe de ser siempre el más afectado ya que pueden darse mutaciones somáticas. Sin embargo, recientemente se están utilizando otros tejidos accesibles de forma poco invasiva (células epiteliales obtenidas de la orina, de la saliva, mucosa bucal, raíz de pelo fundamentalmente de cejas, etc.), que presentan la mutación en porcentajes incluso superiores a la sangre, y que están dando muy buenos resultados. Todo esto ha supuesto un gran avance dada la dificultad de realización de biopsias, la negativa de muchos padres a que se lleven a cabo en los niños pequeños, y, sobre todo, para estudios familiares.

Hasta ahora se han descrito más de 150 mutaciones puntuales pero sólo un número pequeño de ellas (Tabla 2) se encuentran con frecuencia en las distintas patologías. El resto solamente se han descrito en algunos casos y, la mayoría, una sola vez. ¿Que mutaciones hay que estudiar fundamentalmente? Si los pacientes han sido evaluados con precisión, el análisis puede restringirse a unas pocas mutaciones que representan la mayor parte de los casos. Solamente, ante la presencia de defectos concretos en la actividad de la cadena respiratoria, se debe de iniciar un estudio de otras mutaciones. Hoy en día, con el avance de las técnicas y dado el tamaño del ADNmt, es factible su secuenciación completa y el descubrimiento de nuevas mutaciones.

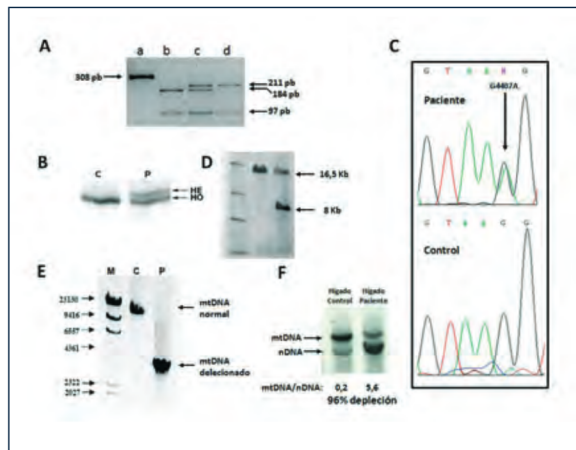
El método más común para la determinación de las mutaciones puntuales es el de amplificación del DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión con enzimas de restricción para determinar los polimorfismos en la longitud de los fragmentos producidos por estos enzimas (RFLP). La tinción con bromuro de etidio o la autorradiografía, en el caso de haberse marcado el ADN, indicará la presencia de la mutación y el porcentaje de heteroplasma (Figura 3A). Este es el caso de mutaciones patogénicas que producen los síndromes de LHON, NARP (Neuropatía, Ataxia, Retinitis Pigmentosa), Leigh, MELAS (Miopatía Mitocondrial, Encefalopatía y Acidosis Láctica), MERRF (Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojo-Rasgadas), y alguna otra. En el caso de fenotipos no muy claros y que nunca se han asociado a una mutación en concreto, es muy conveniente analizar genes completos. Esto se puede realizar mediante técnicas de cribaje como CSGE (Figura 3B), etc., que permiten una exploración rápida y simultánea de varios genes, o por secuenciación directa como se ha indicado anteriormente (Figura 3C). En cualquier caso, y como ya se ha comentado, se debe utilizar el tejido más afectado ya que no se puede descartar la existencia de mutaciones somáticas.

En el caso de patologías producidas por deleciones del ADNmt, es fundamental que el estudio de las mismas se realice en el tejido más afectado, en la mayor parte de los

casos se utilizan biopsias musculares. Raramente se encuentran deleciones en células sanguíneas, pero este hecho no excluye su presencia en otros tejidos. Según la experiencia de nuestro laboratorio, en un mismo tipo de síndrome, hemos encontrado deleciones sólo en músculo, en músculo y sangre pero en muy baja proporción, y en ambos tejidos en proporción equivalente y alta.

El método mejor y más fiable para detectar deleciones en el ADNmt es el de la hibridación Southern (ver Cuadro 1).

FIGURA 3. Análisis genético-molecular de la presencia de mutaciones puntuales, deleciones y depleciones en el DNA mitocondrial.



Panel A.- Detección de la mutación puntual T9176C causante del síndrome de Leigh. Electroforesis en geles de agarosa mostrando: a) fragmento de ADNmt amplificado de 308 pb. Al digerir el amplificado con el enzima de restricción Scr FI produce fragmentos de restricción de b) 184, 97 y 27 pb en presencia de la mutación (homoplasmia para el DNA mutado) (el más pequeño no se ve por salir del gel); c) de 211, 184, 97 y 27 pb (heteroplasmia, coexistencia de moléculas normales y mutadas); d) de 211 y 97 pb (homoplásmico normal). Panel B.- Análisis por la técnica de CSGE (*conformation sensitive gel electrophoresis*) de la presencia de mutaciones. La doble banda (heteroduplexes) indica la existencia de una mutación en el fragmento analizado. (C, control; P, paciente; HE, heteroduplexes; HO, homoduplexes). Panel C.- Electroferograma obtenido por secuenciación automática del fragmento del panel B que contiene una mutación. El doble pico del panel superior (paciente) indica la presencia de la mutación G4407A en heteroplasmia. Panel D.- Detección de deleciones por la técnica de hibridación Southern. El DNA total, digerido por el enzima de restricción Pvu II, se sometió a electroforesis, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda de ADNmt. Las bandas de 16,5 kb y de 8 kb representan una molécula de ADNmt normal y delecionada en 8,5 Kpb, respectivamente. Panel E.- Detección de deleciones por la técnica de PCR largo. M, marcador de pesos moleculares; C, control (mostrando una banda de ADNmt normal); P, paciente (con una banda de ADNmt delecionado) Panel F.- Análisis de depleción de ADNmt por la técnica de hibridación Southern. La técnica se realiza igual que en el panel E pero hibridando simultáneamente con dos sondas, una de ADNmt y otra específica del gen nuclear del rARN 18S. Las dos sondas hibridan con dos bandas distintas señaladas como ADNmt y ADNn, respectivamente. El porcentaje de depleción se determina calculando la relación ADNmt/ADNn en control y paciente.

El análisis genético-molecular del ADNmt debería llevarse a cabo después de que los ensayos clínicos, morfológicos, bioquímicos, etc., indiquen la presencia de una enfermedad mitocondrial. Sin embargo, hoy en día, dada la rapidez con que se pueden realizar los análisis moleculares, es bastante frecuente que éstos se hagan después de que una exploración clínica indique indicios de una enfermedad mitocondrial, y antes de que se hayan podido estudiar otros parámetros, sobre todo en la infancia. Esta práctica, aunque muy común, sobre todo cuando se piensa en la presencia de mutaciones comunes, lleva a numerosos resultados negativos y a posteriores reorientaciones en la búsqueda de mutaciones a medida que la sintomatología se va haciendo más determinada.

Se podría concluir que la complejidad del diagnóstico diferencial de estas enfermedades se debe esencialmente a que ni la presentación clínica, ni las alteraciones bioquímicas detectadas por el análisis de metabolitos en fluidos biológicos, son orientativas del origen del defecto metabólico, dada la gran heterogeneidad y superposición de ambas. La existencia de deficiencias enzimáticas parciales y/o múltiples contribuye a dificultar el diagnóstico y la especificidad tisular de la expresión bioquímica añade un problema más, ya que los resultados normales en un tejido no implican la normalidad en otros. Esto hace que el diagnóstico bioquímico y la localización del defecto genético sólo se consiga en muchos casos tras una larga serie de estudios bioquímicos y moleculares en diferentes tejidos, especialmente los más afectados clínicamente. En cualquier caso, el correcto diagnóstico de las enfermedades mitocondriales requiere la utilización de servicios hospitalarios muy diversos y de personas altamente especializadas.

Cuadro 1
Método de hibridación Southern para la detección de deleciones y depleciones:

El ADN total se digiere con un enzima de restricción (Pvu II o Bam HI) que corta el ADNmt en un único punto linearizándolo. A continuación separan los fragmentos obtenidos por electroforesis en geles de agarosa y se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa. La detección del ADNmt se realiza mediante hibridación con una sonda de ADNmt marcada con radiactividad o con moléculas no radiactivas (digoxigenina) y finalmente se visualiza por impresión fotográfica directa o previa inmunodetección de las moléculas. La imagen obtenida mostrará una banda de tamaño igual al del ADN normal (16.569 pares de bases) y, en el caso de presencia de deleciones, otras bandas de menor tamaño (Figura 3D). La densitometría del autorradiograma permite determinar el nivel de heteroplasmia. Las deleciones siempre se encuentran en forma heteroplásmica ya que su presencia implica la eliminación de genes completos del ADNmt que hacen inviable al individuo. El problema fundamental de esta técnica es que requiere cantidades elevadas de ADN que no siempre son

TABLA 2

FENOTIPOS MITOCONDRIALES MAS FRECUENTES Y MUTACIONES EN EL ADNmt ASOCIADAS A LAS MISMAS

ENFERMEDAD (SÍNDROME). CARACTERES CLÍNICOS	MUTACIÓN	GEN
LHON - Neuropatía óptica hereditaria de Leber. Pérdida de visión aguda o subaguda por atrofia óptica severa bilateral. - Neuropatía retiniana. - Fondo de ojo con edema del disco óptico y tortuosidad de los vasos retinianos. Además, pueden presentarse: síndrome piramidal y/o cerebeloso, neuropatía periférica, alteración de la conducción cardíaca.	G3460A	ND1 ^{43, 44}
	G11778A	ND4 ¹
	T14484C	ND6 ⁴⁵
NARP.- Neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria. Más combinación variable de: Retraso desarrollo psicomotor, demencia, epilepsia, debilidad muscular proximal, retraso mental.	T8993G	ATP6 ⁴⁶
	T8993C	ATP6 ⁴⁷
Leigh (MILS).- Enfermedad neurodegenerativa muy severa, que aparece en el primer año de vida, debida a un fallo grave en la producción de energía en el cerebro en desarrollo. Caracterizada por: brotes con regresión de adquisiciones psicomotoras, alteraciones respiratorias (hiperpnas, apneas) y de tronco cerebral; TAC/RMN cerebral con alteraciones simétricas de los núcleos de la base, tálamo, tronco cerebral y astas posteriores de la médula espinal. Además, puede presentar: vómitos y rechazo alimentos, parálisis oculomotoras, nistagmus, atrofia óptica, alteraciones de la deglución y/o movimientos involuntarios y/o síndrome extrapiramidal, parálisis facial, síndrome piramidal a veces con ROT's abolidos, hiperproteïnorraquia con disminución de velocidad de conducción nerviosa, leucodistrofia, lesiones espongioformas con desmielinización, proliferación vascular y astrocitosis.	T8993G	ATP6 ^{48, 49}
	T8993C	ATP6 ⁴⁷
	T9176C	ATP6 ⁵⁰
	T9176G	ATP6 ⁵¹
MELAS.- Encefalopatía mitocondrial, ácidosis láctica y episodios "stroke-like". Pueden coexistir con FRR. Además, dos de los siguientes: crisis epilépticas focales o generalizadas, demencia, cefaleas tipo migrañas, vómitos. De forma variable aparece: sordera neurosensorial, baja estatura, proteínas aumentadas en LCR, calcificaciones de los ganglios basales, polineuropatía, demencia.	A3243G	ARN ^{tLeu(UUR)} 52
	Hot spot	ARN ^{tLeu(UUR)} 5
MERRF.- Epilepsia mioclónica y miopatía con FRR. Además, puede ir acompañada de demencia, sordera neurosensorial, neuropatía sensitiva, atrofia óptica, baja estatura, lipomas múltiples en cuello y tronco, y proteínas aumentadas en LCR.	A8344G	ARN ^{tlys} 53
	G8363A	ARN ^{tlys} 54
	Hot spot	ARN ^{tlys} 5
Diabetes y Sordera	A3243G	ARN ^{tLeu(UUR)} 55
Sordera inducida por aminoglucósidos	A1555G	ARN ^r 12S ⁵⁶
	C1494T	ARN ^r 12S
Sordera neurosensorial	Hot spot	ARN ^{tSer(UCN)} 57
Lipomatosis múltiple simétrica	Hot spot	ARN ^{tlys} 58
Intolerancia al ejercicio.- Intolerancia progresiva al ejercicio, debilidad de miembros proximales, a veces acompañados de ataques de mioglobinuria. Presencia de FRR. Suelen ser casos esporádicos, sin historia familiar y las mutaciones sólo afectan al músculo. Estas mutaciones parece, por tanto, que son somáticas.	G12334A	ARN ^{tLeu(CUN)} 59
	Hot spot	Citocromo b ⁶⁰
Necrosis Bilateral del estriado	T14487C	ND6 ⁶¹
Distonía	G14459A	ND6 ⁶²
Pearson.- Anemia macrocítica refractaria asociada o no a neutropenia y trombocitopenia (vacuolización de precursores eritroides y mieloides, hemodilución y sideroblastos en anillo en médula). Disfunción pancreática exocrina, acidosis láctica, talla baja, mayor o menor grado de hidrops fetal.	Delección única	Falta de varios genes ⁶³
CPEO.- Oftalmoplegia externa crónica progresiva:oftalmoplegia, ptosis bilateral de los párpados y miopatía. Además, suele ir acompañada de intolerancia al ejercicio y debilidad de las extremidades. FRR en biopsias musculares COX negativas. Benigna.	Delección única	Falta de varios genes ^{64, 65}
	Delecciones múltiples	Falta de varios genes ⁶⁶⁻⁶⁹
	A3243G	ARN ^{tLeu(UUR)} 70
Kearns-Sayre.- Inicio antes de los 20 años. Caracterizada por CPEO, retinitis pigmentaria atípica y bloqueo de la conducción cardíaca. Suele ir acompañado de síndrome cerebeloso, ataxia, miopatía mitocondrial, niveles de proteína LCR (> 100mg/L), sordera, demencia, fallos endocrinos y renales. La biopsia muscular muestra FRR COX negativas.	Delección única	Falta de varios genes ^{4, 71, 72}
MNGIE.- Encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal. Diarreas intermitentes, miopatía mitocondrial, neuropatía periférica, encefalopatía.	Delecciones múltiples	Falta de varios genes ⁷³⁻⁷⁶
DIDMOAD (si es de inicio precoz, S. de Wolfram).- Diabetes Mellitus, diabetes insípida, atrofia óptica, sordera neurosensorial.	Delecciones múltiples	Falta de varios genes ⁷⁷⁻⁷⁹
Toni-Debré-Fanconi.- Nefritis tubulo-intersticial que conduce a un fallo renal. Encefalomiopatía con leucodistrofia. Episodios de diarrea líquida, raquitismo, hiperpigmentación cutánea de áreas expuestas a luz.	Delección	Falta de varios genes ^{80, 81}
Depleción del ADNmt.- Disminución considerable de los niveles de ADNmt. Espectro clínico muy variado. Se están identificando diversas formas: miopática, hepato-cerebral, etc.	Depleción de ADNmt	Genes nucleares implicados en metabolismo de nucleótidos ⁸²⁻⁸⁷
Alpers.- Polidistrofia rápidamente progresiva con pérdida neuronal, astrocitosis y espongiosis. Regresión psicomotora y crisis mioclónicas. Microcefalia adquirida. Asimismo, puede estar asociado a: Insuficiencia hepatocelular, tubulopatía tipo Fanconi, Miopatía.	Depleción de ADNmt	DNA polimerasa gamma ^{88, 89}

Se puede encontrar una lista actualizada de mutaciones asociadas a distintos fenotipos en MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, 2005 <http://www.mitomap.org>. Muchas mutaciones, no citadas en esta tabla, solamente han sido descritas una vez.

posible de obtener de las muestras de que se parte. Para superar este problema se utiliza con frecuencia la técnica de PCR largo. Esta técnica consiste en la amplificación del ADNmt completo, utilizando una ADN polimerasa especial que permite la amplificación de fragmentos grandes de ADN y utilizando cebadores situados en la misma región pero en dirección opuesta. El resultado es la síntesis de una o varias moléculas lineales según las deleciones que estén presentes (Figura 3 panel E). Este método es también muy útil para mapear la zona donde se encuentra la deleción y definir los límites de la misma. El análisis de depleción de ADNmt puede realizarse tanto por la técnica de hibridación Southern descrita anteriormente utilizando sondas específicas para ADNmt y para el ADNn, o, actualmente, por la técnica de PCR cuantitativo a tiempo real, un método mucho más rápido y que exige mucha menor cantidad de ADN. En el primer caso, la relación de las bandas de ADNmt con respecto a las de ARNr nuclear indicará la posible presencia de la depleción (Figura 3F). El estudio de depleción por PCR-cuantitativo en tiempo real se realiza con una sonda de ADNmt para una región conservada del genoma que nunca se ha encontrado delecionada, y otra sonda nuclear que normaliza el número de células presentes en la muestra. De esta forma se pueden relacionar copias mitocondriales/copias nucleares. Este tipo de análisis es muy delicado y los valores obtenidos dependen de muchos factores, como sexo, edad, tejido, etc. por lo que se debe de realizar siempre con controles de las mismas características que la muestra del paciente.

7.- Nuevas mutaciones puntuales en el ADNmt y criterios de patogenicidad

Como ya se ha indicado, el número de mutaciones puntuales que se han descrito en el ADNmt asociadas a distintos fenotipos es muy grande y, la mayor parte sólo se han descrito una vez relacionadas con algún fenotipo muy concreto o común. Esto hace materialmente imposible estudiar cada una de las mutaciones de forma individual. Además, existe una alta probabilidad de que existan fenotipos en los que todavía no se ha logrado encontrar la mutación que los causa. Por todo ello, es bastante común que se proceda a una secuenciación directa del ADNmt; bien de genes concretos, si se conoce la deficiencia de un complejo determinado, o de la totalidad del ADN, ya que su pequeño tamaño permite hacerlo de forma relativamente rápida y los costes son asequibles. En cualquier caso, y como ya se ha dicho, no hay que olvidar que al tratarse del ADNmt, se debe secuenciar el ADN del tejido más afectado.

En todo caso, el descubrimiento de una nueva mutación en el ADNmt necesita cumplir una serie de criterios para que pueda ser considerada como patogénica, lo que no es una tarea fácil. Desde el principio se establecieron una serie de

criterios, inicialmente muy sencillos (no aparecer en individuos control, segregación con el fenotipo, etc.), que luego se han ido ampliando. En el Cuadro 2, se hace una descripción de los mismos, si bien hay que dejar muy claro que no siempre una mutación patológica llega a cumplir todos ellos y, sin embargo, no puede descartarse su patogenicidad.

Enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt

Como ya se ha indicado anteriormente, las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy variadas. En algunos casos pueden encuadrarse en síndromes bien definidos, otras veces presentan solapamiento de síntomas y, hay que estar preparados para encontrar fenotipos muy diversos que estén producidos por mutaciones en el ADNmt. El número de trastornos que podemos encontrarnos es muy grande, por eso, en esta revisión, mostraremos, de forma esquemática, sólo los más frecuentes indicando las mutaciones comúnmente asociadas a los mismos o genes "hot spot" donde se han encontrado, aunque sea con baja frecuencia, mutaciones relacionadas con dichas patologías (Tabla 2).

Además, en las enfermedades mitocondriales encontramos cosas muy curiosas, como que un mismo fenotipo puede estar causado por distintas mutaciones, o que una misma mutación puede originar distintos fenotipos. Así, la mutación A3243G en el gen ARN^{tLeu(UUR)}, se ha encontrado (Tabla 2) en MELAS, sordera y diabetes, diabetes aislada, neuropatía periférica, fallo cardíaco congestivo, estatura corta y ataques, esquizofrenia, enfermedad renal, lipomas y oftalmoplegia progresiva externa crónica (CPEO), poli-microgiria, dismotilidad gástrica, nefropatía progresiva y miopatía aislada. La mutación A3243G se encuentra habitualmente en forma heteroplásmica y es muy probable que el porcentaje de heteroplasmia y la segregación replicativa puedan ser la razón para la multitud de fenotipos en los que se ha observado. Lo mismo ocurre con la mutación T8993G, que en baja heteroplasmia (80-90%) se asocia a NARP mientras que a niveles superiores se encuentra relacionada con el síndrome de Leigh. Asimismo, también hay fenotipos concretos que están producidos por mutaciones localizadas en genes muy diferentes.

El espectro de fenotipos relacionados con mutaciones en el ADNmt es seguramente mucho mayor y aumentará en el futuro. Del mismo modo, se está estudiando el papel que puede jugar el daño en el ADNmt en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, e incluso en cáncer, entre otras patologías.

Cuadro 2**Criterios que deben cumplirse para que una mutación pueda considerarse patogénica.**

1. La mutación debe de estar presente en pacientes y ausente en individuos control. Sin embargo, hay muchas mutaciones que claramente son patológicas pero que presentan una penetrancia incompleta, por lo que pueden encontrarse en miembros sanos del mismo pedigrí. Lo contrario también podría ser cierto, mutaciones que se han definido en estudios poblacionales podrían ser potencialmente patológicas.
2. La mutación debe de encontrarse en haplogrupos mitocondriales (variantes genéticas) diferentes, indicando, de esta forma, una asociación independiente con el fenotipo. Este criterio es imposible de cumplir para nuevas mutaciones. Existencia de correlación entre el porcentaje de la mutación y el fenotipo. Como se ha indicado, el número de moléculas de ADNmt es muy elevado y la aparición de una mutación lleva a la existencia de dos poblaciones de ADNmt, normal y mutada (heteroplasmia), que segregarán al azar entre las células hijas durante la división celular (segregación mitótica). En consecuencia, el fenotipo de una célula heteroplásmica dependerá de la naturaleza de la mutación y del porcentaje de ADNmt mutado que tenga. Cuando el número de copias de ADN mutado sobrepasa un umbral, la función OXPHOS estará comprometida, disminuirá la síntesis de ATP y se desarrollará la enfermedad. Heteroplasmia no es necesariamente sinónimo de patogenicidad. Cualquier variante homoplásmica en el ADNmt ha atravesado un estado heteroplásmico antes de fijarse en la población como tal. Este criterio no es aplicable, lógicamente, a mutaciones homoplásmicas. La mutación debe afectar a nucleótidos muy conservados evolutivamente. Cuanta mayor importancia funcional tenga una posición nucleotídica determinada, ésta tendrá una alta conservación evolutiva. Sin embargo, también nos podemos encontrar mutaciones patológicas que, aunque no estén muy conservadas evolutivamente, presenten mutaciones compensatorias.
3. La mutación debe afectar a dominios funcionales importantes. Este es un punto de mucha importancia, sin embargo, todavía no se conocen la estructura y función de algunas subunidades OXPHOS, ni los dominios funcionales en los ARNr o ARNt. Antes de calificar como patológica a una mutación determinada, es recomendable hacer una consideración muy rigurosa de todas las mutaciones que se encuentren en el ADNmt de un paciente. De alguna manera, estamos incidiendo en la importancia de la secuenciación completa del genoma mitocondrial. A veces, encontramos una mutación y, si más o menos cumple los criterios antes mencionados, la damos como patológica. Sin embargo, la posterior secuenciación de la molécula de ADNmt completa ha llevado al descubrimiento de otras mutaciones que pueden ser mejores candidatas. Además, aunque durante mucho tiempo se ha considerado que era imposible la coexistencia de más de una mutación patológica en el mismo ADNmt, ya se han descrito pacientes con dos mutaciones patológicas⁹⁰.
4. Es bastante habitual que se descarten como patológicas las mutaciones que se localizan en la región de control del ADNmt. En esta región se encuentran zonas del ADNmt que juegan un papel importantísimo en la regulación de la replicación y de la transcripción aunque su función sea prácticamente desconocida. Sin embargo, no deja de ser llamativo el hecho de que un genoma que presenta una gran economía de espacio (no tiene secuencias intrónicas, sin apenas nucleótidos no codificantes entre los genes, con genes solapantes, con codones de terminación no codificados en el ADNmt, con ARNr y ARNt más pequeños que los citosólicos o procarióticos), mantengan segmentos en la región de control sin función aparente. Asimismo, mutaciones sinónimas en los genes codificantes de proteínas, que no producen cambio de aminoácido, podrían alterar potenciales elementos de respuesta a las hormonas y afectar la regulación de la expresión del genoma. Finalmente, es muy posible que alguno de los nucleótidos no codificantes de las regiones codificantes puedan afectar el procesamiento de los ARNs policistrónicos que se originan a partir de las tres unidades de transcripción. Por todo ello, es muy aconsejable la secuenciación del genoma mitocondrial entero para una determinación exacta de la patogenicidad.
5. Cíbridos transmitocondriales: Con todos los inconvenientes descritos anteriormente, es fácil comprender que son necesarias pruebas funcionales directas para el establecimiento seguro del carácter patogénico de una mutación. Sin embargo, esta demostración no es una tarea fácil, ya que los fondos genéticos mitocondriales o nucleares, así como el ambiente, pueden actuar como factores modificadores y la capacidad para detectar los efectos funcionalmente relevantes de las mutaciones pueden ser altamente dependientes del contexto del sistema experimental utilizado. Así, con el fin de poder establecer si una mutación en el ADNmt interfiere a nivel molecular con la fisiología celular, se han desarrollado modelos celulares formados por células carentes de ADNmt (células rho⁰), a las que se les han introducido mitocondrias de pacientes con mutaciones en el ADNmt^{91,92}. Estos cíbridos transmitocondriales resultantes de la fusión de las células rho⁰ con plaquetas del paciente, que carecen de ADN nuclear, contendrán mitocondrias con ADNmt mutado en un medio núcleo-citoplásmico "teóricamente" normal y permitirán caracterizar, tanto a nivel bioquímico como molecular, los mecanismos moleculares dañados que son responsables de la patogenicidad. Asimismo, y con el objetivo de tener modelos animales con enfermedades mitocondriales, se ha empezado a preparar ratones *knock-out* de genes nucleares que pueden afectar al mantenimiento del ADNmt. Por el momento existen muy pocos modelos animales con mutaciones en el ADNmt. Entre ellos, uno es un ratón con una mutación en el ARNr 16S⁹³, otro porta una delección en el ADNmt⁹⁴, y otro tiene una mutación en la subunidad I de la citocromo oxidasa^{95,96}. Una explicación bastante probable para esta escasez de modelos de ratón, es que las mutaciones del ADNmt más severas parece que se eliminan de la línea germinal femenina⁹⁷. En todo caso, se debe mencionar que, por el momento, no existe ningún modelo animal con mitocondrias que posean mutaciones humanas.

Influencia de haplogrupos mitocondriales y ambientales sobre la enfermedad

Como consecuencia de la actividad de la cadena respiratoria, la mitocondria es la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno. Al estar el ADNmt localizado muy próximo a la membrana interna mitocondrial su tasa de mutación es mucho más elevada que la del ADN nuclear. Muchas de estas mutaciones serán causa de enfermedad como ya se ha mencionado y, algunas podrían ser tan dañinas que hacen inviables a los individuos que las poseen. Sin embargo, muchas mutaciones pueden ser más inocuas y fijarse en la población. Cada nueva mutación que se introduce producirá un genotipo mitocondrial o haplotipo ligeramente diferente del original, dando lugar a una nueva línea mitocondrial. El conjunto de haplotipos mitocondriales estrechamente relacionados se conoce como haplogrupo.

Las variantes genéticas que definen los haplogrupos afectan a todos los tipos de genes y podrían ser factores de susceptibilidad para el desarrollo de determinados fenotipos. Así, tras el descubrimiento de las mutaciones G11778A y T14484C, se hizo evidente que un porcentaje elevado de los pacientes con LHON pertenecía al haplogrupo mitocondrial J y se piensa que esta variante genética incrementa la penetrancia de estas dos mutaciones causantes de LHON⁹⁸. Así, variantes desacoplantes más mutaciones patológicas provocarían una menor capacidad productora de energía⁹⁹. Este mismo haplogrupo se ha encontrado sobre-representado en individuos centenarios¹⁰⁰, y subrepresentado entre pacientes con enfermedad de Parkinson¹⁰¹. Del mismo modo, el haplogrupo T predomina en pacientes con astenozoospermia moderada, mientras que el H es más frecuente en individuos con buena motilidad espermática¹⁰². En los últimos años ha habido una explosión de resultados ligando la variación en el ADNmt al cáncer¹⁰³, envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad^{104, 105}, etc. Sin embargo, no siempre se puede asociar un haplogrupo determinado a un fenotipo concreto¹⁰⁶.

La explicación del hecho de que un mismo haplogrupo mitocondrial pueda ser unas veces fuente de susceptibilidad para determinadas enfermedades y, a la vez, de resistencia contra otras, puede venir dada por el papel dual y antagónico del sistema OXPHOS: generación de energía por un lado y de calor por otro. De este modo, las variantes desacoplantes producirían menos energía, menos especies reactivas de oxígeno, pero una mayor generación de calor. La disminución en la eficacia productora de energía aumentaría la penetrancia de las mutaciones patológicas⁹⁹. Por otra parte, una cadena respiratoria desacoplada mantendría en un estado más oxidado a los intermediarios portadores de electrones, reduciendo la producción de especies reactivas

de oxígeno y comportándose como un factor de resistencia frente a los fenotipos dependientes del daño oxidativo como el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad¹⁰⁷.

A menudo, la sordera mitocondrial se produce por el tratamiento de pacientes con aminoglucósidos (Tabla 2). Así, se han descrito dos mutaciones asociadas con este tipo de sordera. La primera, y más común, es la mutación A1555G en el ARNr 12S y la segunda en la posición C1494T del mismo gen, que forma un apareamiento no canónico con la anterior⁵⁷. Cualquiera de estas dos mutaciones establece un nuevo par Watson-Crick que facilita la unión de los aminoglucósidos a esta región del ARNr 12S, importante para la decodificación, dañando la síntesis de proteínas mitocondriales. Así, factores ambientales pueden interactuar con genotipos determinados y modificar la expresión de mutaciones patológicas.

Asesoramiento genético y diagnóstico prenatal

El asesoramiento genético y diagnóstico prenatal de enfermedades del ADNmt de herencia materna, es muy complejo y arriesgado debido a las características de la genética mitocondrial (segregación mitótica, niveles de heteroplasmia, efecto umbral e influencia de factores genéticos y ambientales como modificadores fenotípicos), por lo que es desaconsejable con el estado actual de nuestros conocimientos. Cuando una madre posee un ADNmt en heteroplasmia, es imposible predecir qué porcentaje de las moléculas mutadas heredarán sus hijos y en qué porcentaje estarán presentes en cada uno de los tejidos. Nunca se puede descartar que una mutación que está ausente en biopsias coriónicas o en amniocitos, utilizadas para el diagnóstico prenatal, no pueda estar presente en otros tejidos del feto y causar una enfermedad.

Enfermedades del sistema OXPHOS causadas por defectos en genes nucleares de proteínas mitocondriales: regreso a la genética mendeliana

Como se ha mencionado en la introducción, de las más de 100 proteínas que forman el sistema OXPHOS, sólo trece están codificadas en el ADNmt. El resto de subunidades proteicas, que incluyen todos los factores implicados en su transporte a la mitocondria, procesamiento, modificación y ensamblaje en los complejos, así como todos los enzimas y factores necesarios para el mantenimiento y ex-

presión del genoma mitocondrial, están codificados en el ADNn. Por ello, cabría esperar que la mayoría de enfermedades causadas por la deficiencia de este sistema sean debidas a mutaciones en el ADNn y se transmitan con un modo de herencia mendeliano¹⁰⁸. En general, las mutaciones en genes nucleares producirían mitocondriopatías más graves y de aparición más temprana.

Los genes nucleares candidatos más obvios para producir enfermedades mitocondriales son los que codifican componentes del sistema OXPHOS. Así, se han descrito mutaciones en diferentes genes estructurales del complejo I⁵, aunque con menor frecuencia de lo esperado, y una mutación en el complejo II¹⁰⁹. Sin embargo, no se han descrito mutaciones en genes nucleares estructurales del complejo III y IV. La ausencia de mutaciones en estos genes puede ser debida a su naturaleza potencialmente letal, como se ha sugerido por los fenotipos extremadamente graves que presentaban los pacientes³⁹.

Otros genes que pueden causar estas enfermedades son los que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje de estos complejos⁵, en el transporte de proteínas a la mitocondria¹¹⁰⁻¹¹² y, por último, mutaciones en todos los genes nucleares codificantes de proteínas implicadas en la replicación, y transcripción del ADNmt, en el procesamiento de ARN y en la traducción del mensaje genético. Así, se ha visto una gran implicación de la ADN polimerasa gamma en distintas enfermedades⁸⁷, y de otros genes relacionados con la producción del síndrome de depleción del ADNmt⁸⁶.

La posibilidad de que la mayoría de las mutaciones causantes de enfermedades mitocondriales estuvieran localizadas en genes nucleares, hizo que se abandonase un poco la búsqueda de mutaciones en el ADNmt. Sin embargo, los avances en secuenciación del ADN han revitalizado el campo, permitiendo el descubrimiento de nuevas mutaciones, de nuevos fenotipos para mutaciones conocidas y la posible participación de la variación genética del ADNmt en las enfermedades multifactoriales.

Como vemos, las dificultades con las que nos encontramos en el campo de las enfermedades mitocondriales, son muchísimas, lo que hace que no se tenga todavía un gran conocimiento de los mecanismos patogénicos y que no exista prácticamente ninguna estrategia terapéutica.

Agradecimientos

Parte de los trabajos aquí descritos han sido subvencionados por el Instituto de Salud Carlos III (FIS:PI04-0009, PI070045; CIBERER-CB06/07/0043), Diputación General de Aragón (Grupo Consolidado B33). El CIBER de Enfermedades Raras es una iniciativa del ISCIII.

Referencias

- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, II LJE, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988; 242: 1427-1430.
- Wallace DC, Zheng X, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, Hopkins LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, Pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*. 1988; 55: 601-610.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon E, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*. 1988; 38: 1339-1346.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988; 331: 717-719.
- Ruiz-Pesini E, Lopez-Gallardo E, Dahmani Y, Herrero MD, Solano A, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez M, Montoya J. Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Rev Neurol*. 2006; 43: 416-424.
- Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2003; 68: 479-486.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. The Putative mRNA per Subunit II of Human Cytochrome c Starts Directly at the translation initiation codon. *Nature*. 1980; 287: 79-82.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Brujin MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier HP, Smith AJH, Stader R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290: 427-465.
- Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*. 1981; 290: 465-470.
- Ojala D, Merkel C, Gelfand R, Attardi G. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*. 1980; 22: 393-403.
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. Identification of Initiation Sites for Heavy Strand and Light Strand Transcription in Human Mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79: 7195-7199.
- Montoya J, Gaines GL, Attardi G. The Pattern of Transcription of the Human Mitochondrial rRNA Genes Reveals Two Overlapping Transcription Units. *Cell*. 1983; 34: 151-159.
- Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Doolittle RF, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Attardi G. Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA. In: Quagliariello E, Slater EC, Plamieri F, Saccone C, Kroon AM, eds. *Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research*. Vol. II. Biogenesis. Amsterdam: Elsevier Sciences, 1985: 259-275.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23: 147.
- Montoya J, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757: 1179-1189.
- Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Ann Rev Biochem*. 1974; 43: 695-719.

17. Kasamatsu H, Robberson DL, Vinograd J. A novel closed-Circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68: 2252-2257.
18. Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 1982; 28: 693-705
19. Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50961-50969.
20. Yasukawa T, Yang MY, Jacobs HT, Holt IJ. A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell*. 2005; 18: 651-662.
21. Brown TA, Clayton DA. Genesis and Wanderings: Origins and Migrations in Asymmetrically Replicating Mitochondrial DNA. *Cell Cycle*. 2006; 5: 917-921.
22. Martin M, Cho J, Cesare AJ, Griffith JD, Attardi G. Termination Factor-Mediated DNA Loop between Termination and Initiation Sites Drives Mitochondrial rRNA Synthesis. *Cell*. 2005; 123: 1227-1240.
23. Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*. 1989; 58: 391-397.
24. Fernández-Silva P, Martínez-Azorin F, Micol V, Attardi G. 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*. 1997; 16: 1066-1079.
25. Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Racchi M, Zeviani M. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPO) by cyberscreening of the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet*. 1997; 6: 615-625.
26. Prieto-Martín A, Montoya J, Martínez-Azorín F. A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein. *Febs Lett*. 2001; 503: 51-55.
27. Fisher RP, Clayton DA. A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem*. 1985; 260: 11330-11338.
28. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*. 2002; 31: 289-294.
29. McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS. A human mitochondrial transcription factor is related to ARN adenine methyltransferases and binds s-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 1116-1125.
30. Daga A, Micol V, Hess D, Aebersold R, Attardi G. Molecular Characterization of the Transcription Termination Factor from Human Mitochondria. *J Biol Chem*. 1993; 268: 8123-8130.
31. Prieto-Martín A, Montoya J, Martínez-Azorín F. Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 2059-2068.
32. O'Brien TW. Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life*. 2003; 55: 505-513.
33. Sutovsky P, Neuber E, Schatten G. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev*. 2002; 61: 406-413.
34. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*. 1999; 286: 774-779.
35. Munnich A, Rotig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP, Saudubray JM, Rustin P. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inherited Metab Dis*. 1996; 19: 521-527.
36. DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial Encephalomyopathies. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, eds. *The Molecular and Genetic Basis of neurological diseases*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1998: 201-235.
37. Artuch R, Vilaseca MA, Farre C, Ramon F. Determination of lactate, pyruvate, beta-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyser. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1995; 33: 529-533.
38. Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull DM. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14: 237-245.
39. Loeffen JLCM, Smeitink JAM, Trijbels JMF, Janssen AJM, Triepels RH, Sengers RCA, vandenHeuvel LP. Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat*. 2000; 15: 123-134.
40. Budde SMS, vandenHeuvel LPWJ, Janssen AJ, Smeets RJP, Buskens CAF, DeMeirleir L, VanCoster R, Baethmann M, Voit T, Trijbels JMF, Smeitink JAM. Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 275: 63-68.
41. Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 1991; 199: 223-231.
42. Schagger H, Bentlage H, Ruitenbeek W, Pfeiffer K, Rotter S, Rother C, Bottcherpurkl A, Lodemann E. Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: Technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation. *Electrophoresis*. 1996; 17: 709-714.
43. Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, Turnbull DM. Leber hereditary optic neuropathy: Identification of the same mitochondrial NDI mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 939-950.
44. Houponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML. A new mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1147-1153.
45. Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 187: 1551-1557.
46. Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*. 1990;46:428-433.
47. Devries DD, Vanengelen BGM, Gabreels FJM, Ruitenbeek W, Vanoost BA. A Second Missense Mutation in the Mitochondrial ATPase-6 Gene in Leigh's Syndrome. *Ann Neurol*. 1993; 34: 410-412.
48. Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, Devivo DC, Dimauro S. The Mutation at Nt 8993 of Mitochondrial DNA is a Common Cause of Leighs Syndrome. *Ann Neurol*. 1993; 34: 827-834.
49. Tatuch Y, Robinson BH. The Mitochondrial DNA Mutation at 8993 Associated with NARP Slows the Rate of ATP Synthesis in Isolated Lymphoblast Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 192: 124-128.
50. Thyagarajan D, Shanske S, Vazquezmemije M, Devivo D, Dimauro S. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol*. 1995; 38: 468-472.
51. Carrozzo R, Tessa A, VazquezMemije ME, Piemonte F, Patrono C, Malandrini A, DionisiVici C, Vilarinho L, Villanova M, Schagger H,

- Federico A, Bertini E, Santorelli F. The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology*. 2001; 56: 687-690.
52. Goto Y-i, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial phalomyopathies. *Nature*. 1990; 348: 651-653.
 53. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell*. 1990; 61: 931-937.
 54. Ozawa M, Nishino I, Horai S, Nonaka I, Goto Y. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: A G-to-A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tARN(Lys) in two families. *Muscle & Nerve*. 1997; 20: 271-278.
 55. vandenOuweland JMW, Lemkes HHPJ, Gerbitz KD, Maassen JA. Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD): A distinct subtype of diabetes associated with mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene point mutation. *Muscle & Nerve*. 1995; 53: S124-S130.
 56. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu XD, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischelghod-sian N. Mitochondrial Ribosomal RNAMutation Associated with Both Antibiotic-Induced and Non-Syndromic Deafness. *Nat Genet*. 1993; 4: 289-294.
 57. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. 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*. 2004; 74: 139-152.
 58. Gamez J, Playán A, Andreu AL, Bruno C, Navarro C, Cervera C, Arbós MA, Schwartz S, Enriquez JA, Montoya J. Familial multiple symmetric lipomatosis associated with the A8344G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology*. 1998; 51: 258-260.
 59. Vives-Bauza C, Gamez J, Roig M, Briones P, Cervera C, Solano A, Montoya J, Andreu AL. Exercise intolerance resulting from a muscle-restricted mutation in the mitochondrial tRNA(Leu (CUN)) gene. *Ann Med*. 2001; 33: 493-496.
 60. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, MorganHughes J, DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1037-1044.
 61. Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Henández-Pena J, Garcia-Arumi E, Playan A, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol*. 2003; 54: 527-530.
 62. Jun AS, Brown MD, Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 6206-6210.
 63. Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM, Munnich A. Mitochondria DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet*. 1989; 1: 902-903.
 64. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New Engl J Med*. 1989; 320: 1293-1299.
 65. Carod-Artal FJ, Lopez-Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Ruiz-Pesini E, Montoya J. Deletions of the mitochondrial DNA associated to chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers in 2 Brazilian patients. *Med Clin (Barc)*. 2006; 126: 457-460.
 66. Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature*. 1989; 339: 309-311.
 67. Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Bordoni A, Pannacci M, Amati P, Moggio M, Servidei S, Scarlato G, DiDonato S. Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: A new autosomal dominant disease. *Am J Hum Genet*. 1990; 47: 904-914.
 68. Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lonnqvist J, Savontaus ML, Peltonen L. Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest*. 1992; 90: 61-66.
 69. Bohlega S, Tanji K, Santorelli FM, Hirano M, Aljishi A, DiMauro S. Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy. *Neurology*. 1996; 46: 1329-1334.
 70. Hammans SR, Sweeney MG, Hanna MG, Brockington M, Morganhughes JA, Harding AE. The mitochondrial DNA transfer RNA(Leu(UUR)) A->G((3243)) mutation - A clinical and genetic study. *Brain*. 1995; 118: 721-734.
 71. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*. 1998; 51: 1525.
 72. Carod-Artal F, Lopez Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Herrero M, Montoya J. Mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurologia*. 2006; 21: 357-364.
 73. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science*. 1999; 283: 689-692.
 74. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscular Disord*. 2001; 11: 7-10.
 75. Vissing J, Ravn K, Danielsen ER, Duno M, Wibrand F, Wevers RA, Schwartz M. Multiple mtDNA deletions with features of MNGIE. *Neurology*. 2002; 59: 926-929.
 76. Papadimitriou A, Comi GP, Hadjigeorgiou GM, Bordoni A, Sciacco M, Napoli L, Prella A, Moggio M, Fagiolaro G, Bresolin N, Salani S, Anastasopoulos I, Giassakis G, Divari R, Scarlato G. Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology*. 1998; 51: 1086-1092.
 77. Barrientos A, Volpini V, Casademont J, Genis D, Manzanares JM, Ferrer I, Corral J, Cardellach F, Urbanomarez A, Estivill X, Nunes V. A nuclear defect in the 4p16 region predisposes to multiple mitochondrial DNA deletions in families with Wolfram syndrome. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1570-1576.
 78. Seyrantep V, Topaloglu H, Simsek E, Ozguc M, Yordam N. Mitochondrial DNA studies in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet*. 1996; 347: 695-696.
 79. Hofmann S, Bezold R, Jaksch M, Kaufhold P, ObermaierKusser B, Gerbitz KD. Analysis of the mitochondrial DNA from patients with Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Mol Cell Biochem*. 1997; 174: 209-213.
 80. Niaudet P, Heidet L, Munnich A, Schmitz J, Bouissou F, Gubler MC, Rotig A. Deletion of the mitochondrial DNA in a case of de Toni-Debre-Fanconi syndrome and Pearson syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1994; 8: 164-168.
 81. Solano A, Russo G, Playan A, Parisi M, DiPietro M, Scuderi A, Palumbo M, Renis M, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. De Toni-Debre-Fanconi syndrome due to a palindrome-flanked deletion in mitochondrial DNA. *Pediatr Nephrol*. 2004; 19: 790-793.

82. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprile JR, Andreetta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S. mtDNA depletion with variable tissue expression: genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet.* 1991; 48: 492-501.
83. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet.* 2001; 29: 342-344.
84. Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, Anbinder Y, Berkowitz D, Hartman C, Barak M, Eriksson S, Cohen N. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 2001; 29: 337-341.
85. Spinazzola A, Viscomi C, Fenández-Vizarrá E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, DiMauro S, Rotig A, Gasparini P, Ferrero I, Mothá VK, Tiranti V, Zeviani M. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2006; 38: 570-575.
86. Alberio S, Mineri R, Tiranti V, Zeviani M. Depletion of mtDNA: syndromes and genes. *Mitochondrion.* 2007; 7: 6-12.
87. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 131-146.
88. Naviaux RK, Nyhan WL, Barshop BA, Poulton J, Markusic D, Karpinski NC, Haas RH. Mitochondrial DNA polymerase gamma deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann Neurol.* 1999;45:54-58.
89. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol.* 2004; 55: 706-712.
90. Brown MD, Allen JC, Van Stavern GP, Newman NJ, Wallace DC. Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *Am J Med Genet.* 2001; 104: 331-338.
91. King MP, Attardi G. Injection of mitochondria in human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell.* 1988; 52: 811-819.
92. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 1989; 246: 500-503.
93. Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, Allard P, Dillehay DL, Nusinowitz S, Heckenlively JR, MacGregor GR, Wallace DC. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNA from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 14461-14466.
94. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet.* 2000; 26: 176-181.
95. Kasahara A, Ishikawa K, Yamaoka M, Ito M, Watanabe N, Akimoto M, Sato A, Nakada K, Endo H, Suda Y, Aizawa S, Hayashi JI. Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNA with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Hum Mol Genet.* 2006; 15: 871-881.
96. Kasahara T, Kubota M, Miyauchi T, Noda Y, Mouri A, Nabeshima T, Kato T. Genetically modified mice harboring mitochondrial DNA defects show aberrant cyclic change in wheel-running activity, which is improved by lithium. *Mol Psychiatry.* 2006; 11: 523.
97. Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, Vannan MA, Narula J, Macgregor GR, Wallace DC. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science.* 2008; 319: 958-962.
98. Brown MD, Sun FZ, Wallace DC. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 381-387.
99. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science.* 2004; 303: 223-226.
100. DeBenedictis G, Rose G, Carrieri G, DeLuca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S, Mari D, Mattace R, Franceschi C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J.* 1999; 13: 1532-1536.
101. vanderWalt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, PericakVance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 804-811.
102. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Diez-Sanchez C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Diaz M, Urries A, Montoro L, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 682-696.
103. Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005; 70: 363-374.
104. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005; 39: 359-407.
105. Wallace DC. Why Do We Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu Rev Biochem.* 2006; 76: 781-821.
106. Torroni A, Campos Y, Rengo C, Sellitto D, Achilli A, Magri C, Semino O, Garcia A, Jara P, Arenas J, Scozzari R. Mitochondrial DNA haplogroups do not play a role in the variable phenotypic presentation of the A3243G mutation. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1005-1012.
107. Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: Longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *PNAS.* 2003; 100: 2174-2176.
108. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31: 91-123.
109. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet.* 1995; 11: 144-149.
110. Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H, Andreasson S, Ponjavic V, Dahl A, Stevenson RE, May M, Arena F, Barker D, et al. A new X-linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet.* 1995; 32: 257-263.
111. Tranebjaerg L, Jensen PK, van Ghelue M. X-linked recessive deafness-dystonia syndrome (Mohr-Tranebjaerg syndrome). *Adv Otorhinolaryngol.* 2000;56:176-180
112. Blesa JR, Solano A, Briones P, Prieto-Ruiz JA, Hernández-Yago J, Coria F. Molecular Genetics of a Patient with Mohr-Tranebjaerg Syndrome due to a New Mutation in the DDP1 Gene. *Neuromolecular Med.* 2007; 9: 285-291.