

diagnóstico y tratamiento de las  
**enfermedades metabólicas hereditarias**

5ª EDICION

Editores

Mª Luz Couce

Luis Aldámiz-Echevarría

Mª Concepción García-Jiménez

Domingo González-Lamuño

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, [www.cedro.org](http://www.cedro.org)) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

© 2022 M<sup>a</sup> Luz Couce, Luis Aldámiz-Echevarría, M<sup>a</sup> Concepción García-Jiménez, Domingo González-Lamuño  
Edita: ERGON. C/ Arboleda, 1. 28221 Majadahonda (Madrid)

ISBN: 978-84-18576-47-8  
Depósito Legal: M-32824-2021



# Índice

## A. GENERALIDADES

### A1. Introducción

1. Introducción a las enfermedades metabólicas hereditarias: sospecha clínica 1  
*María Concepción García Jiménez, Raquel Pérez Delgado, Esperanza Castejón Ponce*
2. Introducción a las enfermedades metabólicas hereditarias: estudios y sospecha bioquímica 15  
*Antonia Ribes Rubió*
3. Enfermedades metabólicas hereditarias: clasificación basada en la fisiopatología 25  
*Àngels García-Cazorla, Jean-Marie Saudubray*
4. Diagnóstico prenatal de las enfermedades metabólicas 33  
*Carmen Ayuso García, Ana Bustamante Aragonés, Marta Rodríguez de Alba*
5. Cribado neonatal de los errores congénitos del metabolismo 43  
*Jose Ángel Cocho de Juan, Daisy Castiñeiras Ramos, José Luis Marín Soria*
6. Base genética de las enfermedades metabólicas hereditarias. Técnicas de secuenciación 69  
*Belén Pérez González, Lourdes R. Desviat*
7. Errores congénitos del metabolismo en el periodo neonatal 81  
*María Luz Couce Pico, Ivo Baric*
8. Enfermedades metabólicas hereditarias en el paciente adulto 91  
*Montserrat Morales Conejo, Elena Arranz Canales, Jesús González de la Aleja*
9. Embarazo y enfermedades metabólicas hereditarias 111  
*Álvaro Hermida Ameijeiras*
10. Asesoramiento genético en las enfermedades metabólicas hereditarias 119  
*María Ramos Cáceres, Feliciano Jesús Ramos Fuentes*

### A2. Afectación de órganos/sistemas en las enfermedades metabólicas hereditarias

11. Patología hepática en las enfermedades metabólicas hereditarias 125  
*María Legarda Tamara, Javier Blasco Alonso*
12. Afectación cardiovascular en enfermedades metabólicas 133  
*Carlos Alcalde Martín*
13. Patología neurológica en las enfermedades metabólicas hereditarias 151  
*María Concepción García Jiménez, Raquel Pérez Delgado, Francisco Javier López Pisón*
14. Patología ocular en las enfermedades metabólicas hereditarias 163  
*Paula Sánchez Pintos*

15. Patología renal en las enfermedades metabólicas hereditarias	181
<i>Gema Ariceta Iraola, Domingo González-Lamuño Leguina, Guillem Pintos Morell</i>	
16. Manifestaciones hematológicas en los errores innatos del metabolismo. Aspectos generales	205
<i>Domingo González-Lamuño Leguina, Miguel Ángel Cortés Vázquez, María José Muruzábal Sitges</i>	
17. Patología cutánea en los errores innatos del metabolismo	215
<i>Javier Jesús Domínguez-Cruz, María del Amor Bueno Delgado</i>	
18. Dismorfología en las enfermedades metabólicas hereditarias	223
<i>Ana Teresa Serrano Antón, María Juliana Ballesta Martínez, Encarna Guillén Navarro</i>	
<b>A3. Tratamiento y prevención en las enfermedades metabólicas hereditarias</b>	
19. Tratamiento de urgencias de los errores innatos del metabolismo	233
<i>María del Amor Bueno Delgado, Ana Muñoz Alonso, Luis Aldámiz-Echevarría Azuara</i>	
20. Nutrición y dieta en las enfermedades metabólicas hereditarias	249
<i>Anne Daly, Anita MacDonald, Julio César Rocha</i>	
21. Dieta cetogénica	273
<i>Consuelo Pedrón Giner, Jana Ruiz Herrero, Elvira Cañedo Villarroya</i>	
22. Trasplante de progenitores hematopoyéticos en los errores congénitos del metabolismo	281
<i>Luis González Gutiérrez-Solana, Blanca Molina Angulo, Verónica Cantarín Extremera</i>	
23. Trasplante de órganos sólidos en las enfermedades metabólicas hereditarias	305
<i>Carmen Camarena Grande, Jesús Quintero Bernabeu</i>	
24. Terapia celular avanzada	313
<i>José Víctor Álvarez González, Francisco Javier Otero Espinar, Shunji Tomatsu</i>	
25. Terapia génica en las enfermedades metabólicas hereditarias	321
<i>Gloria González Aseguinolaza, Sheila Maestro Galilea, Nerea Zabaleta Lasarte</i>	
<b>B. TRASTORNOS RELACIONADOS CON EL METABOLISMO Y TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y VITAMINAS</b>	
<b>B1. Trastornos del metabolismo de aminoácidos</b>	
26. Hiperfenilalaninemia	335
<i>Jaume Campistol Plana, Nilo Lambruschini Ferri<sup>†</sup>, Rosa Gassió Subirachs, Camila García Volpe, Alejandra Gutiérrez Sánchez, Aida Ormazábal Herrero, Silvia Meavilla Olivas, Cristina Sierra March</i>	
27. Trastornos del metabolismo de la tirosina. Tirosinemia tipo I, II, III, hawkinsinuria, alcaptonuria y deficiencia de maleilacetoacetato isomerasa	357
<i>María Luz Couce Pico, Luis Aldámiz-Echevarría Azuara</i>	
28. Trastornos del metabolismo de los aminoácidos azufrados	367
<i>María Luz Couce Pico, Emiliano González Vioque, Carlo Dionisi-Vici</i>	
29. Hiperglicinemia no cetósica	377
<i>Raquel Pérez Delgado, María Concepción García Jiménez, Francisco Javier López Pisón</i>	
30. Enfermedad de la orina de jarabe de arce	387
<i>Patricia Correcher Medina, Dolores Rausell Félix, Isidro Vitoria Miñana</i>	
31. Trastornos del metabolismo de la prolina y serina	401
<i>David Gil Ortega, Inmaculada Vives Piñera</i>	
32. Defectos del ciclo de la urea	411
<i>Johannes Häberle, Fernando Andrade Lodeiro, María Luz Couce Pico</i>	
33. Trastornos del metabolismo de la ornitina	425
<i>Camila García Volpe, Guillem Pintos Morell</i>	

34. Trastornos del metabolismo de la histidina, triptófano, lisina <i>Luis Peña Quintana, Eduardo López Laso</i>	431
<b>B2. Trastornos del metabolismo de ácidos orgánicos</b>	
35. Acidemias propiónica y metilmalónica <i>Luis Aldámiz-Echevarría Azuara, Ana Moráis López, Fernando Andrade Lodeiro</i>	439
36. Alteraciones en el catabolismo de la leucina. Acidemia isovalérica <i>Verónica Etayo Etayo, Elena Aznal Sainz, Félix Sánchez-Valverde</i>	459
37. Otras acidurias orgánicas del metabolismo de aminoácidos ramificados <i>Mercedes Gil Campos, Mónica Ruiz Pons, Celia Pérez-Cerdá Silvestre</i>	465
38. Aciduria glutárica tipo 1. Aciduria glutárica tipo 3. Acidurias 2-hidroxiglutáricas. Enfermedad de Canavan <i>Pilar Quijada Fraile, Marcello Bellusci, Delia Barrio Carreras</i>	475
<b>B3. Defectos del transporte de aminoácidos</b>	
39. Cistinuria <i>Gema Ariceta Iraola, Virginia Nunes Martínez</i>	491
40. Defectos del transporte de aminoácidos: lisinuria con intolerancia a proteínas, enfermedad de Hartnup, iminoglicinuria, síndrome de Lowe <i>Luis Aldámiz-Echevarría Azuara, Fernando Andrade Lodeiro</i>	501
<b>B4. Trastornos congénitos del metabolismo de las vitaminas y algunos metales</b>	
41. Defectos del metabolismo de la cobalamina y del folato <i>María Concepción García Jiménez, Domingo González-Lamuño Leguina</i>	519
42. Alteraciones del metabolismo de la biotina y de los transportadores de la riboflavina <i>Celia Pérez-Cerdá Silvestre</i>	533
43. Enfermedad de Wilson. Trastornos del metabolismo del hierro y del manganeso <i>Iñaki Irastorza Terradillos, Silvia Martínez Velasco</i>	541
44. Trastornos del metabolismo y transporte de la tiamina <i>María Concepción García Jiménez, Raquel Pérez Delgado, Francisco Javier López Pisón</i>	557
45. Trastornos del metabolismo del cobre. Enfermedad de Menkes <i>Salvador Ibáñez Micó</i>	567
46. Metabolismo del calcio y fósforo <i>Domingo González-Lamuño Leguina, Sandra Llorente Pelayo</i>	575
<b>C. TRASTORNOS DEL METABOLISMO DEL PIRUVATO, CICLO DE KREBS, TRASTORNOS DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA MITOCONDRIAL, DEFICIENCIAS DE ÁCIDO LIPOICO Y DE LA SÍNTESIS DE LOS CLÚSTERES DE SULFURO DE HIERRO</b>	
47. Acidemias lácticas. Hiperlactacidemia. Déficit de piruvato deshidrogenasa <i>Mireia del Toro Riera, Ana Felipe Rucian</i>	585
48. Trastornos del metabolismo del piruvato y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos <i>Marcello Bellusci, María Teresa García Silva</i>	595
49. Las enfermedades de la fosforilación oxidativa (OXPHOS): sintomatología y diagnóstico clínico <i>María Teresa García Silva, Pilar Quijada Fraile, Miguel Ángel Martín Casanueva</i>	607
50. Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial <i>Julio Montoya Villarroja, Ester López-Gallardo, Sonia Emperador Ortiz</i>	647
51. Tratamiento de las enfermedades mitocondriales <i>Abraham José Paredes-Fuentes, María del Mar O'Callaghan Gord, Rafael Artuch Iriberrí</i>	665

## **D. TRASTORNOS DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS, OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y CUERPOS CETÓNICOS**

### **D1. Trastornos del metabolismo de los carbohidratos**

52. Deficiencias de ácido lipoico y de la síntesis de los clústeres de sulfuro de hierro 675  
*Frederic Tort Escalé, Antonia Ribes Rubió*
53. Concepto y diagnóstico diferencial de hipoglucemias 687  
*Judit García Villoria, Miguel Ángel Martínez Olmos, Antía Fernández Pombo*
54. Enfermedades por almacenamiento de glucógeno y trastornos relacionados 701  
*José Manuel Moreno Villares, Raquel Núñez Ramos*
55. Errores congénitos del metabolismo de la galactosa 717  
*María Forga Visa, Dolores Bóveda Fontán, Hugo Rocha*
56. Errores congénitos del metabolismo de la fructosa 729  
*Mónica Ruiz Pons, Javier de las Heras Montero, Luis Aldámiz-Echevarría Azuara*
57. Hiperinsulinismo persistente en el neonato 741  
*Luis Castaño González, Amaia Vela Desojo, Rosa Martínez Salazar, Laura Saso Jiménez*

### **D2. Trastornos del metabolismo lipídico, oxidación de ácidos grasos y cuerpos cetónicos**

58. Alteraciones de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y del sistema carnitina 753  
*Luis Peña Quintana*
59. Trastornos de la cetogénesis y cetolisis 777  
*Guillem Pintos Morell, José Antonio Arranz Amo*
60. Defectos de la biosíntesis del colesterol 793  
*Rosaura Leis Trabazo, Juan José Díaz Martín*
61. Defectos congénitos de la síntesis de ácidos biliares 805  
*María Begoña Ruiz Larrea, José Ignacio Ruiz Sanz*

## **E. ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LISOSOMAL**

62. Concepto y diagnóstico de la patología lisosomal 819  
*Cristóbal Colón Mejeras, Mireia del Toro Riera, Laura Gort Mas*
63. Enfermedad de Gaucher 829  
*Pilar Giraldo Castellano, Montserrat Morales Conejo*
64. Enfermedad de Fabry 843  
*Miguel Ángel Torralba Cabeza, Miguel Ángel Barba Romero, Jorge Francisco Gómez Cerezo*
65. Enfermedad de Niemann-Pick tipos A, B y C 855  
*Mercè Pineda Marfá, María José Coll Rosell*
66. Gangliosidosis GM1 y GM2 867  
*Luis González Gutiérrez-Solana, Laura López Marín*
67. Enfermedad de Krabbe. Leucodistrofia metacromática. Deficiencia múltiple de sulfatasas. Enfermedad de Farber 883  
*Raquel Yahyaoui Macías, Montserrat Gonzalo Marín*
68. Deficiencia de lipasa ácida lisosomal 897  
*Javier de las Heras Montero, Iñaki Irastorza Terradillos, Luis Aldámiz-Echevarría Azuara*
69. Oligosacaridosis y mucopolisacáridosis 903  
*Carolina Fischinger Moura de Souza, Ida Vanessa Doederlein Schwartz, Nataniel Ludwig, Francyne Kubaski, Roberto Giugliani*
70. Mucopolisacaridosis tipo I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IVA, IVB, VI, VII y IX 915  
*María José de Castro López, Olatz Villate Bejarano, Maurizio Scarpa*
71. Lipofuscinosis cerioidea neuronal 927  
*Jaume Campistol Plana, Jesús Eirís Puñal*
72. Enfermedad de Pompe. Glucogenosis tipo II 947  
*Antonio González-Meneses López*

## **F. ENFERMEDADES PEROXISOMALES Y TRASTORNOS RELACIONADOS CON LOS LÍPIDOS**

73. Diagnóstico de las enfermedades peroxisomales 951  
*Norma Spécola*
74. Adrenoleucodistrofia ligada a X 961  
*José Luis Peña Segura, Miguel Lafuente Hidalgo*
75. Espectro del síndrome de Zellweger 975  
*Enrique Galán Gómez, María Pilar Méndez Pérez, Lourdes Galán Ledesma*

## **G. TRASTORNOS DE LA GLICOSILACIÓN Y DEL TRÁFICO INTRACELULAR**

76. Defectos congénitos de la glicosilación 981  
*Blai Morales Romero, Mercedes Serrano Gimare*
77. Defectos congénitos de autofagia 993  
*Belén Pérez González, Pilar Rodríguez-Pombo*

## **H. TRASTORNOS DE LOS NEUROMODULADORES Y DE OTRAS MOLÉCULAS PEQUEÑAS**

78. Enfermedades de los neurotransmisores 1003  
*Àngels García Cazorla*
79. Errores congénitos del metabolismo del glutatión 1011  
*Elena Martín Hernández, Silvia Chumillas Calzada*
80. Trimetilaminuria y deficiencia de dimetilglicina deshidrogenasa 1025  
*Carolina Arias Péfaur, Verónica Cornejo Espinoza*
81. Defectos en el transporte celular de glucosa 1035  
*Leticia Pías-Peleteiro, Dèlia Yubero Siles, María del Mar O'Callaghan Gord*
82. Errores congénitos del metabolismo de la vitamina B<sub>6</sub> 1049  
*Elena Martín Hernández, Silvia Chumillas Calzada, Delia Barrio Carreras*
83. Porfirias 1063  
*Manuel Méndez Alba, María José Morán-Jiménez, Rafael Enríquez de Salamanca*
84. Defectos del metabolismo de la creatina 1075  
*Laura Vilarinho, Elisa Leão Teles*
85. Trastornos del metabolismo de las purinas 1087  
*Rosa Torres Jiménez*
86. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades relacionadas con alteraciones en el metabolismo de las pterinas 1105  
*Amaya Bélanger Quintana, Francisco Arrieta Blanco, Sinziana Stanescu*

## **I. REFLEXIONES PRÁCTICAS**

87. Estudios metabólicos para realizar en algunas situaciones clínicas frecuentes (retraso psicomotor, lactante hipotónico, fallo de medro) 1117  
*Domingo González-Lamuño Leguina, Analia Cabrera, Leticia Belmont-Martínez*
88. Enfermedades raras de difícil diagnóstico 1125  
*Francisc Palau Martínez, Janet Hoenicka Blanco*
89. Botiquín farmacológico metabólico 1137  
*Irene Zarra Ferro, Goretti Durán Piñeiro, María Jesús Lamas Díaz*
90. Autopsia metabólica 1147  
*María Concepción García Jiménez, Raquel Pérez Delgado, Yolanda González Irazábal*

## **ÍNDICE ALFABÉTICO**

1153

# Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial

Julio Montoya Villarroya, Ester López-Gallardo, Sonia Emperador Ortiz

## 1. INTRODUCCIÓN

Con el nombre de enfermedades mitocondriales se conocen un amplio grupo de trastornos caracterizados, fundamentalmente, por un defecto de funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), que conduce a una deficiente síntesis de ATP. Aunque en conjunto representan uno de los tipos relativamente comunes de enfermedades metabólicas hereditarias, estas enfermedades están encuadradas dentro de las llamadas enfermedades raras y, cada una de ellas, en particular, se presentan en una proporción muy baja. Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos que están presentes en todas las células humanas, excepto en los eritrocitos y, por tanto, un mal funcionamiento de las mismas puede presentarse con una variabilidad clínica sin precedentes. En la mayor parte de los casos son multisistémicas, afectando a órganos con alta demanda de energía como el cerebro, músculo esquelético, corazón, etc., pero también pueden afectar a órganos aislados y pueden manifestarse a cualquier edad (en el periodo neonatal, infancia y en el adulto)<sup>(1)</sup>.

Las mitocondrias participan en una gran cantidad de funciones, pero lo que las hace ser muy particulares es que son el lugar donde se produce la mayor parte de la energía que requieren las células para su funcionamiento, lo que ha hecho que se les denomine muy frecuentemente como la “planta energética de la célula”. En efecto, en la membrana interna de estos orgánulos se encuentra el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), ruta final del metabolismo energético mitocondrial que conduce a la síntesis de ATP. La fosforilación oxidativa requiere el transporte de electrones al oxígeno molecular mediante la cadena respiratoria mitocondrial (también conocida como cadena de transporte de electrones), que consta de cuatro complejos multienzimáticos (complejo I al IV) y dos transportadores de electrones móviles: ubiquinona (también conocida como coenzima Q<sub>10</sub>, coenzima Q o CoQ) y citocromo c. La actividad de la cadena respiratoria genera un gradiente de protones transmembrana que es aprovechado por el complejo V o ATP sintasa para sintetizar ATP. Pero, además de ser las productoras de la mayor parte de la energía en forma de ATP, está implicada en otros procesos diferentes tales como: el metabolismo de aminoácidos, de lípidos, en la biosíntesis del grupo hemo, en la homeostasis del calcio, en la producción de especies reactivas de oxígeno, apoptosis, etc. Más de 1.158 proteínas están involucradas en la función de la mitocondria (<https://www.broadinstitute.org/files/shared/metabolism/mitocarta/human.mitocarta2.0.html>), con sus genes repartidos entre los dos sistemas genéticos de la célula (37 en el ADN mitocondrial y el resto en el nuclear).

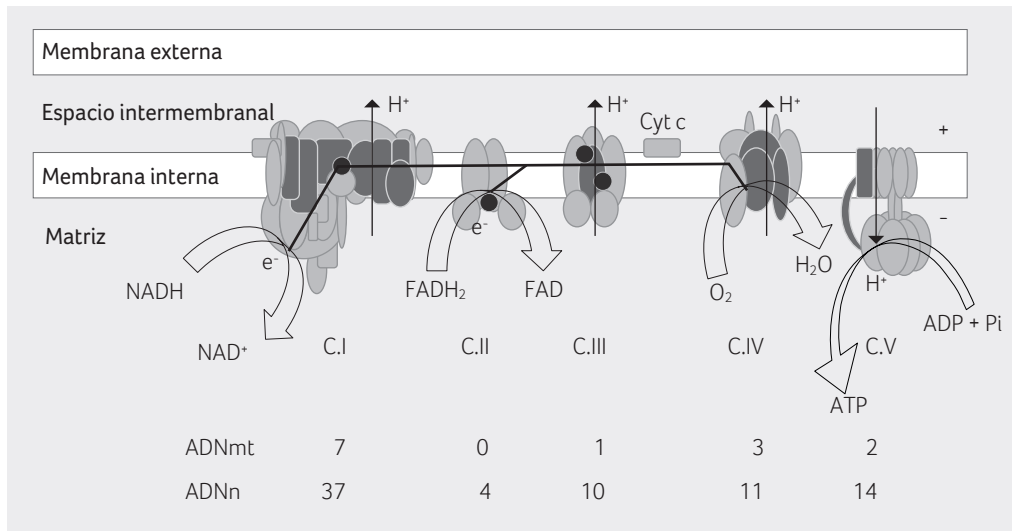
Las mitocondrias contienen su propio ADN (ADN mitocondrial o ADNmt), lo que las liga a su origen endosimbiótico y mantiene muchos vestigios de su ancestro bacteriano. Los cinco complejos multienzimáticos que forman OXPHOS están integrados por más de 90 polipéptidos, de los cuales, solamente 13 están codificados en el ADNmt. El resto de las proteínas componentes de OXPHOS, así como la gran mayoría de proteínas que forman estos orgánulos, están codificados en el ADN nuclear (ADNn). La implicación de los dos sistemas genéticos celulares en la biogénesis de las mitocondrias tiene como consecuencia que, las enfermedades mitocondriales, se puedan presentar con cualquier tipo de herencia: esporádica, materna, autosómico recesiva, autosómico dominante o ligadas al cromosoma X<sup>(2)</sup>. También, se pueden originar *de novo* durante la embriogénesis. Por ello, se pueden considerar como el tipo de enfermedades más heterogéneas en el campo de la genética humana.

En este capítulo nos centraremos en el ADNmt y en las enfermedades que causan mutaciones en los mismos. El término enfermedad mitocondrial o mitocondriopatía se ha utilizado normalmente para designar aquellas enfermedades causadas por defectos en OXPHOS, porque es el único sistema en el que participa el ADNmt como codificante de proteínas. De hecho, se definían como un grupo de trastornos que tienen en común el estar producidos por una deficiencia en la biosíntesis de ATP. Sin embargo, más recientemente se está utilizando para nombrar cualquier trastorno producido por defectos en una de las muchas rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria, ya que a veces están producidas por daños en proteínas que solo muy indirectamente están implicadas en la producción de ATP.

Las primeras mutaciones asociadas a un mal funcionamiento del OXPHOS, y que generaban enfermedades, se descubrieron en el ADNmt en 1988<sup>(3-6)</sup>. Desde entonces, el número de mutaciones encontradas en este genoma ha crecido enormemente, si bien alguna de ellas solo se ha presentado en un único paciente<sup>(7,8)</sup>. Asimismo, se han descrito muchas mutaciones en genes mitocondriales codificados en el ADNn que participan en el mantenimiento y expresión del ADNmt, en la composición y formación del sistema OXPHOS y en otras funciones.

La prevalencia de estas enfermedades no es fácil de determinar en la población general debido a la alta heterogeneidad clínica y genética con que se presentan, pero ha sido estimada entre 1 caso cada 5.000<sup>(9)</sup>. La mayor parte de las enfermedades mitocondriales de aparición temprana (infancia) suelen estar causadas por mutaciones autosómico-recesivas en el ADNn y tan solo un 20-30% lo son por





**FIGURA 1.** Esquema del sistema de fosforilación oxidativa. En gris oscuro se representan las subunidades codificadas en el ADN mitocondrial y en gris claro, las codificadas en el ADN nuclear. Puntos negros: coenzima Q. C.I a C.V: complejos I al 5. En la parte inferior figura el número de subunidades codificadas en uno u otro genoma.

mutaciones en el ADNmt. Sin embargo, en el adulto, aproximadamente un 80% de las enfermedades están causadas por mutaciones en el genoma mitocondrial. Dado el papel central que juega la mitocondria en la fisiología celular, las enfermedades mitocondriales constituyen un problema social y sanitario de primera magnitud. Aunque son individualmente raras, en su conjunto agrupan una amplia variedad de trastornos genéticos y llegan a ser bastante comunes entre todos los errores congénitos del metabolismo, originando manifestaciones clínicas muy diversas que dan lugar a fenotipos muy distintos. Además, hoy en día se considera la implicación de la mitocondria, de forma primaria o secundaria, en más de la mitad de las enfermedades humanas<sup>(10)</sup>.

La gran variabilidad fenotípica con que se presentan, con manifestaciones clínicas que afectan a distintos órganos y tejidos, exige la implicación de especialistas de muy diverso origen que aporten datos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos que permitan un diagnóstico correcto. Esta complejidad hace que el diagnóstico de pacientes con sospecha de padecer una de estas enfermedades sea muy complicado. A veces, el diagnóstico clínico puede dar una idea clara del genotipo del mismo, pero en la mayor parte de los casos y, fundamentalmente en niños en los que la sintomatología no se ha manifestado completamente, es muy conveniente realizar la secuenciación completa del ADNmt.

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. 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 como una medicina mitocondrial.

## 2. SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL HUMANO

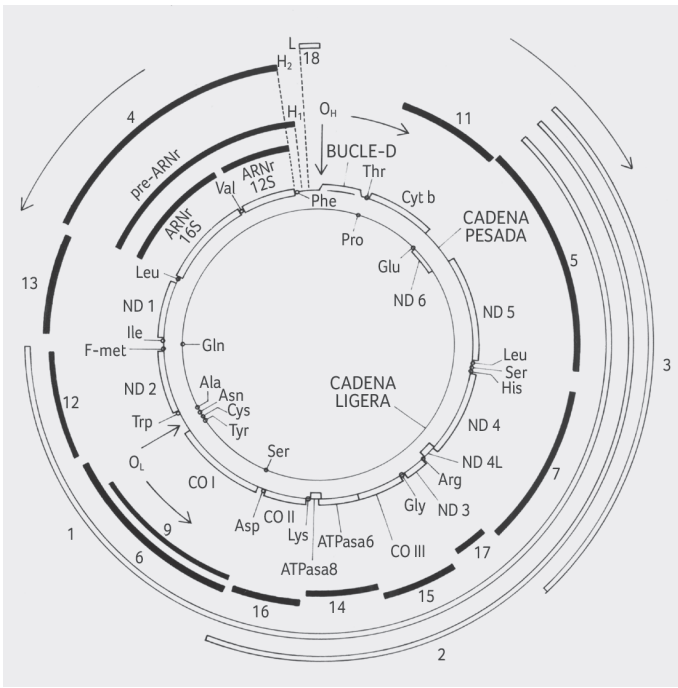
Los caracteres moleculares básicos del sistema genético mitocondrial humano se describieron con gran detalle al inicio de los años 80<sup>(11-18)</sup>. Desde entonces, y aunque se han ido descubriendo proteínas que participan en los procesos de mantenimiento y expresión del ADNmt, no se ha avanzado mucho en el conocimiento de su regulación e intercomunicación con el núcleo.

El ADNmt humano es una molécula circular de 16.569 pares de bases que codifica 37 genes: dos ARN ribosómicos (ARNr) y 22

ARN de transferencia (ARNt), que participan en la síntesis proteica intramitocondrial; y 13 polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS. Siete de estos polipéptidos (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6) son componentes del complejo I o NADH: ubiquinona óxido-reductasa; uno (cyt b) pertenece al complejo III o ubiquinol: citocromo c óxido-reductasa; tres (CO I, II, III) al complejo IV o citocromo c oxidasa; y dos a la ATP sintasa (complejo V) (Figs. 1 y 2). El resto de los polipéptidos, así como todo el complejo II, están codificados en el ADN nuclear. La biogénesis del sistema OXPHOS constituye un caso único en la célula, ya que para su síntesis se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos.

Los genes en el ADNmt se encuentran unos a continuación de los otros sin casi nucleótidos intermedios ni intrones. La mayor parte de los genes (2 ARNr, 14 ARNt y 12 polipéptidos) están codificados en una de las cadenas (cadena H), mientras que los 9 restantes (un polipéptido y 8 ARNt) lo están en la cadena complementaria (cadena L). En una pequeña zona del ADN que no codifica ningún gen, denominada región control, se encuentran el origen de replicación de la cadena H, los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión de este ADN. Los genes de los ARNt se encuentran esparcidos entre los genes de los ARNr y los codificantes de proteínas (Fig. 2). Esta disposición tiene consecuencias muy importantes para la maduración del ARN como se mostrará más adelante.

El modo de replicación del ADNmt se conoce desde finales de los años 1970. Según este modelo tradicional, la replicación se verifica en forma unidireccional y asimétrica, utilizando para ello dos orígenes de replicación diferentes ( $O_H$  y  $O_L$ ). Así, la síntesis del ADNmt 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 primasa<sup>(19)</sup>. De acuerdo con este modelo, la replicación del ADNmt se llevaría a cabo sin la síntesis de fragmentos de Okazaki. Este modelo de replicación se ha cuestionado a principios de los años 2000 y se ha propuesto que el ADNmt se replica de un modo unidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza con el ADN bacteriano<sup>(20,21)</sup>.



**FIGURA 2.** Mapa genético y de transcripción del ADN mitocondrial humano. Los círculos internos muestran el mapa del ADN mitocondrial con los genes que codifican: ARNr (12S y 16S), ARNt, y secuencias codificadoras de proteínas (ND: subunidades de la NADH deshidrogenasa; cyt b: apocitocromo b; CO: subunidades de la citocromo c oxidasa). Los círculos exteriores muestran el mapa de transcripción de la cadena pesada (barras negras) y ligera (barras abiertas).  $O_H$  y  $O_L$  representan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera.  $H_1$ ,  $H_2$  y  $L$  indican los sitios de iniciación de la transcripción.

Este modelo requiere la síntesis de diversos cebadores de ARN. Hoy en día, todavía no se ha resuelto la cuestión, pero parece que, en cierta manera, los modelos tienden a converger<sup>(22)</sup>. Sin embargo, el modelo clásico es el que explica mejor numerosas características de este genoma.

Las dos cadenas del ADNmt se transcriben completamente a partir de tres puntos de iniciación,  $H_1$  y  $H_2$  para la cadena pesada y  $L$  para la cadena ligera, originando tres moléculas policistrónicas que se cortan posteriormente en los extremos 5' y 3' de las secuencias de los ARNt, para dar lugar a los ARNr, ARNt y ARNm maduros (modelo de puntuación por el ARNt) (Fig. 2)<sup>(13,15,16,23)</sup>. Los ARNt situados entre los genes de ARNr y codificantes de proteínas actúan como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento de las moléculas policistrónicas. Las dos unidades de transcripción de la cadena H se solapan en la región de los ARNr. La primera unidad de transcripción, que se produce muy frecuente, comienza en  $H_1$ , delante del gen para el ARNt<sup>Phe</sup>, 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<sup>Phe</sup> y del ARNt<sup>Val</sup>. Un factor de terminación (mTERF), que se une a una secuencia situada en el gen del ARNt<sup>Leu</sup><sup>(24,25)</sup>, provoca la terminación de esta unidad de transcripción. 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, la casi totalidad de la cadena pesada. El ARN policistrónico, que se origina, se procesando dando lugar a los ARNm de 12 péptidos y los 12 ARNt codificados en esta cadena. Este modelo permite deducir que el punto de iniciación de la transcripción juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y explica el modo de síntesis diferencial de ARNr y

ARNm<sup>(16)</sup>. Por otro lado, la transcripción de la cadena ligera comienza en  $L$ , cerca del extremo 5' del ARN 18 y da lugar a 8 ARNt, un ARNm y al ARN iniciador de la replicación del ADN (ARN7S, una versión del ARN 18 sin poliadenilar). Para llevar a cabo el proceso de transcripción se necesita una ARN polimerasa específica (h-mtRPOL), codificada en el ADNn (cromosoma 19p13.3)<sup>(26,27)</sup>, tres factores de transcripción implicados en la iniciación (mtTFA y mtTFB1 y mtTFB2)<sup>(28-30)</sup>, y uno de terminación (mTERF)<sup>(24,25,31)</sup>, 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 ARNr<sup>(32)</sup>.

Como ya se ha indicado, el ADNmt codifica 13 proteínas que se sintetizan en ribosomas específicos de la mitocondria, cuyos componentes están codificados tanto en el ADNmt (ARNr 12S y 16S), como en el genoma nuclear (~80 proteínas ribosómicas)<sup>(33)</sup>. Para la síntesis de estas proteínas, la mitocondria utiliza un código genético que difiere en algún detalle del código 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. Aunque solamente están codificados en el ADNmt 22 ARNt, parece que son suficientes para leer todos los codones de los ARNm mitocondriales, utilizando para ello un sistema de apareamiento codón-anticodón más sencillo que el del código genético universal.

Los polipéptidos sintetizados en la mitocondria interactúan con otras proteínas codificadas en el ADNn, sintetizadas en el citosol e importados a la mitocondria, para constituir el sistema OXPHOS. Así, la biogénesis de este sistema depende, como se ha mencionado anteriormente, de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear.

### 3. CARACTERES DIFERENCIALES DE LA GENÉTICA MITOCONDRIAL

La localización del sistema genético mitocondrial en un orgánulo citoplasmático implica que la herencia de este genoma difiera de la del ADNn. Así, el núcleo y el ADNn se duplican originando una copia idéntica antes de cada división celular, de forma que las células hijas puedan recibir una misma dotación genética. Sin embargo, esto no ocurre así con la mitocondria y el ADN que porta. La organización genética tan compacta, sin nucleótidos intermedios ni intrones, el tipo de herencia, el alto número de copias de ADNmt que contiene cada célula, y su alta vulnerabilidad, proporcionan unos caracteres genéticos que los diferencian de los del ADNn. Así:

- **Modo de herencia:** el ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna<sup>(34)</sup>. La madre transmite el genoma mitocondrial a todos sus hijos, pero solo las mujeres 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 celular<sup>(35)</sup>.
- **Poliplasmia:** el número de moléculas de ADNmt es, en general, muy elevado y varía entre unas pocas en las plaquetas, a unas 150.000 copias en el oocito. La mayor parte de los tejidos contienen entre unas 1.000 y 10.000 copias por célula, con 2 a 10 moléculas de ADN por mitocondria, organizadas en nucleoides. En un principio, todas las células de un individuo normal tienen el mismo tipo de ADNmt (homoplasmia). Sin embargo, debido a la alta tasa de mutación del ADNmt, como veremos más adelante, es probable que aparezca una mutación y que puedan

**TABLA 1.** Mutaciones del ADN mitocondrial más frecuentes y enfermedades asociadas.

Enfermedad	Mutación	Gen	Referencias
LHON	m.3460G>A	ND1	(92,93)
	m.11778G>A	ND4	(3)
	m.14484T>C	ND6	(94)
NARP	m.8993T>G/C	ATP6	(95,96)
Leigh (MILS)	m.8993T>G/C	ATP6	(96-98)
	m.9176T>G/C	ATP6	(99,100)
MELAS	m.3243A>G	ARN <sup>tLeu(UUR)</sup>	(101)
	Hot spot	ARN <sup>tLeu(UUR)</sup>	(7)
MERRF	m.8344A>G	ARN <sup>tLys</sup>	(102)
	Hot spot	ARN <sup>tLys</sup>	(7)
Diabetes y sordera	m.3243A>G	ARN <sup>tLeu(UUR)</sup>	(103)
Sordera no sindrómica inducida por aminoglucósidos	m.1555A>G	ARNr12S	(104)
CPEO	Delección única	Varios genes	(105,106)
	Delecciones múltiples		(107-110)
Kearns-Sayre	Delección única		(6,111,112)
Pearson	Delección única		(113)

LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber; MELAS: encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebro vasculares; MERRF: epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas; MILS: síndrome de Leigh de herencia materna; CPEO: oftalmoplejía progresiva externa crónica.

Una lista actualizada de mutaciones asociadas a distintos fenotipos puede encontrarse en MITOMAP: a human mitochondrial genome database. En: <http://www.mitomap.org>

coexistir dos poblaciones de ADNmt, una normal y otra mutada (heteroplasmia).

- **Segregación mitótica:** cuando existe una heteroplasmia, las moléculas de ADNmt segregan 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. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje y naturaleza del ADN mutado que contenga. Como los diferentes tejidos y órganos se forman a partir de un grupo de estas células, una de las características de las enfermedades mitocondriales es que suelen ser multisistémicas.
- **Expresión umbral:** mientras un tejido tenga un porcentaje de copias de ADNmt normal, este podrá funcionar perfectamente al producir la cantidad necesaria de ATP para su funcionamiento. Sin embargo, cuando el número de copias de ADNmt mutado sobrepase un nivel determinado, que será diferente para cada tejido, la producción de ATP se verá afectada y, por debajo de un nivel umbral, aparecerán las manifestaciones de la enfermedad. No todos los tejidos tienen las mismas necesidades energéticas, por lo que no todos se verán afectados del mismo modo al pasar los niveles umbrales de producción de ATP. Los tejidos que se ven más afectados son el sistema nervioso y el muscular, aunque realmente, cualquier órgano o tejido puede verse implicado. Asimismo, los niveles de heteroplasmia pueden variar de un tejido al otro siendo superior en general en los posmitóticos como el cerebro o el músculo, ambos de difícil acceso, y menores en tejidos mitóticos como la sangre, haciendo a este último una muestra no fiable para el diagnóstico de muchas patologías mitocondriales.
- **Alta tasa de mutación:** el ADNmt es muy vulnerable y presenta una tasa de mutación espontánea que es de 10-20 veces superior a la del ADNn. Este hecho puede ser consecuencia de la alta producción de radicales de oxígeno que se originan constantemente en la mitocondria y que dañan a un ADN con información

genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y en el que los mecanismos de reparación parecen ser insuficientes.

#### 4. ENFERMEDADES CAUSADAS POR MUTACIONES EN EL ADN MITOCONDRIAL

El ADNmt contiene solamente 37 genes, 13 codifican proteínas componentes del sistema OXPHOS, y 2 ARNr y 22 ARNt que participan en la biosíntesis de las mismas. En consecuencia, las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt tienen en común el estar producidas por una deficiente síntesis de ATP.

Como se ha indicado anteriormente, las mitocondrias son componentes fundamentales de todas las células del organismo (excepto de los eritrocitos) por lo que, en general, estas enfermedades serán de afectación multisistémica y podrán originar un amplio espectro de fenotipos. En algunos casos, los síntomas de la enfermedad podrán encuadrarse en síndromes bien definidos, pero, en la mayoría de los casos, se presentan con solapamiento de síntomas o, como sucede en los niños, estos no quedan muy claramente definidos por no haberse desarrollado del todo. Asimismo, a veces, estas enfermedades pueden afectar solamente a un tejido específico como el nervio óptico en la neuropatía óptica hereditaria de Leber o a las células cocleares en un tipo de sordera mitocondrial<sup>(6)</sup>.

Como el número de trastornos y de mutaciones en el ADNmt es muy grande (se han descrito más de 260 mutaciones puntuales y numerosas delecciones diferentes), en esta revisión, nos referiremos solamente a los fenotipos más característicos y las mutaciones o zonas *hot spot* que más comúnmente se han asociado a los mismos (Tabla 1), dejando de lado un número muy grande de mutaciones que, en general, han sido descritas solamente en casos aislados. En todo caso, habrá que tener en cuenta que nos podemos encontrar con que mutaciones que están ligadas a un fenotipo concreto, puedan ser la causa de nuevos fenotipos (una misma mutación puede dar origen a síndromes muy diversos) y de que un síndrome determinado pueda estar causado por mutaciones localizadas en distintos genes.

En este relato de trastornos mitocondriales, los clasificaremos de acuerdo con las características genético-moleculares de las mutaciones más que con respecto a los síntomas clínicos. Así, las enfermedades producidas por daños en el ADNmt se pueden dividir en tres grandes grupos según estén asociadas a: 1) mutaciones puntuales, 2) deleciones, 3) depleción de ADNmt (disminución de número de copias).

#### **4.1. Enfermedades causadas por mutaciones puntuales en el ADNmt**

El alto índice de mutación del ADNmt hace que sea posible encontrar un gran número de mutaciones puntuales, sin embargo, no todas van a ser patológicas, ya que la mayoría representan polimorfismos que se han fijado en la población. ¿Cuándo se debe considerar a una mutación como patogénica? Para resolver esta duda se han descrito una serie de criterios, pero la aplicación de los mismos depende mucho de cuán exigente se es a la hora de considerarlos. Así, muchas mutaciones que, en su momento, se consideraron patológicas, han resultado ser simples variaciones polimórficas y, en otros casos, la secuenciación completa del ADNmt ha dado como resultado la presencia de otras segundas mutaciones con mayor posibilidad de ser patogénicas<sup>(36,37)</sup>. En todo caso, no es fácil que todas las mutaciones cumplan todos estos criterios, por lo que hay que aplicarlos con cierta flexibilidad.

Hasta el momento, se han descrito más de 260 mutaciones puntuales causantes de enfermedades distribuidas a lo largo de los 37 genes que codifica el ADNmt. Estas mutaciones responden casi siempre a un tipo de herencia materna. Algunas de estas mutaciones aparecen frecuentemente asociadas a algunos síndromes concretos (mutaciones comunes) y se describen en la Tabla 1. El resto de las mutaciones solo se han encontrado en casos puntuales. Un listado de mutaciones, que se han asociado a patologías determinadas y que se consideran patogénicas, se pueden encontrar en la base de datos de MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) o en una reciente revisión<sup>(8,38)</sup>. ¿Qué mutaciones hay que estudiar ante un caso de enfermedad mitocondrial? 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 una fuerte sospecha de tratarse de una enfermedad mitocondrial, sin presentar alguna de las mutaciones comunes, conviene secuenciar todo el ADNmt.

##### **4.1.1. Enfermedades causadas por mutaciones puntuales en genes codificantes de proteínas**

El ADNmt codifica trece proteínas que forman parte de cuatro de los cinco complejos del sistema OXPHOS. Las secuencias codificantes de estas proteínas ocupan la mayor parte del ADNmt y, por tanto, son la diana principal para un gran número de mutaciones. Sin embargo, el número de mutaciones deletéreas encontradas en estos genes no es muy elevado. Este hecho puede deberse, a que la mayor parte de sustituciones de nucleótidos son silenciosas, a que el cambio es tan suave que no afecta de una manera grave a la estructura y función del péptido que codifica, o a que muchas de las mutaciones puedan ser somáticas y todavía no se han detectado. La mayor parte de las mutaciones deletéreas producirán proteínas con cambios en un aminoácido que afectará a su estructura. Los tejidos afectados muestran una disminución de la actividad del complejo del que forma parte el péptido dañado.

Entre las patologías más importantes causadas por mutaciones puntuales en genes codificantes de proteínas podemos citar:

##### **4.1.1.1. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)**

La neuropatía óptica hereditaria de Leber se caracteriza clínicamente por neuropatía óptica bilateral aguda o subaguda con atrofia óptica, pérdida repentina de la visión central, edema del disco óptico, microangiopatía y un defecto grande del campo visual central. Suele aparecer en la segunda o tercera década de la vida, y afecta más a hombres que a mujeres. Normalmente solo la visión está afectada, pero hay casos en los que también aparecen trastornos en la conducción cardíaca, neuropatía periférica y ataxia cerebelar (LHON+). Normalmente, solo tres mutaciones se consideran como causantes del 90% de los pacientes que sufren esta enfermedad, m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C localizadas en los genes de ND1, ND4 y ND6, respectivamente. La m.11778G>A es la que provoca la forma más grave de la enfermedad y es la responsable del 50% de los casos. La mayor parte de las veces, estas mutaciones se presentan en homoplasmia en los individuos afectados. Recientemente se han detectado otras mutaciones que se consideran patológicas, aunque el número de pacientes en los que se ha encontrado es muy bajo (<http://www.mitomap.org>).

Estas mutaciones presentan baja penetrancia, ya que la mayoría de los familiares de los pacientes son asintomáticos a pesar de poseer también la mutación. Esto hace pensar en que factores: ambientales, como la exposición a tabaco y alcohol, o genéticos, mutaciones en el ADNmt o incluso en el ADNn, pueden ejercer una influencia en la aparición de la enfermedad. Se ha descrito que los familiares asintomáticos, que presentan la mutación en homoplasmia, presentan un mayor número de copias del ADNmt<sup>(39,40)</sup>. La prevalencia de la enfermedad en hombres ha llegado a sugerir que los estrógenos presentan cierta protección a las mujeres<sup>(41)</sup>.

##### **4.1.1.2. Síndrome de neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria (NARP)**

El síndrome de NARP, de aparición en la infancia o en adultos jóvenes, está caracterizado por debilidad muscular neurogénica, neuropatía sensorial, ataxia, retinopatía pigmentaria, convulsiones, demencia, retraso en el desarrollo, con un curso lento de la enfermedad. La biopsia muscular no muestra la presencia de fibras rojo-rasgadas. Los estudios de RMN revelan generalmente una atrofia del cerebelo y del tronco cerebelar. Esta enfermedad está asociada al cambio m.8993T>G/C en el gen codificante de la subunidad 6 de la ATP sintasa. La mutación se encuentra en heteroplasmia en un rango inferior al 90% en todos los tejidos estudiados: leucocitos, fibroblastos, músculo, riñón y cerebro, aunque en nuestro laboratorio hemos encontrado pacientes con un porcentaje de la mutación cercano al 95%. Existe una alta correlación entre el contenido de ADNmt mutado y la severidad de la enfermedad.

##### **4.1.1.3. Síndrome de Leigh de herencia materna (MILS)**

El síndrome de Leigh es una enfermedad neurodegenerativa multisistémica muy grave, que suele aparecer en el primer año de vida y que parece que es debida a una caída muy importante en la producción de energía en el cerebro en desarrollo. Las manifestaciones clínicas más evidentes son disfunciones del tallo cerebral y de los ganglios basales, desmielinización, regresión psicomotora, retraso en el desarrollo, convulsiones, ataxia, neuropatía periférica, hipotonía, mioclonías, atrofia óptica, dificultades en la alimentación, vómitos, etc. Los niveles de lactato y piruvato están muy elevados en sangre y líquido cerebro-espinal. El diagnóstico se confirma por neuroimagenología que muestra la presencia de lesiones necróticas cerebrales focales en el tálamo, tallo cerebral y núcleo dentado.

Esta enfermedad se produce por daños en genes tanto mitocondriales como nucleares y puede presentar diferentes tipos de herencia: materna (mitocondrial), autosómica recesiva, o ligada al cromosoma X. La forma que se hereda por vía materna (MILS), está causada fundamentalmente por la mutación m.8993T>G, en el gen de la subunidad 6 de la ATP sintasa del ADNmt, la misma que causa el síndrome de NARP, pero, en este caso, aparece con un porcentaje superior al 90%. Existen otras formas de la enfermedad que se han asociado otras mutaciones (Tabla 1).

#### 4.1.2. Enfermedades causadas por mutaciones puntuales en genes de ARNt

Los ARNt son las moléculas que actúan en la adaptación del lenguaje de los ácidos nucleicos al de las proteínas. Estos ARN transportan el aminoácido que va a formar parte de las proteínas y reconocen los codones de los ARNm por su anticodón. Además, como se han indicado anteriormente, los ARNt juegan un papel esencial en la síntesis de los ARNr y de los ARNm maduros, al actuar como señal de reconocimiento para el procesamiento de los ARN precursores primarios. Cambios en su secuencia puede interferir con ambas funciones y dañar la síntesis de proteínas en los ribosomas mitocondriales interfiriendo en el proceso de traducción del mensaje genético (en cantidad o calidad). En todos los casos, la síntesis global de proteínas se ve afectada y, por tanto, pueden estar afectados varios complejos del sistema OXPHOS.

##### 4.1.2.1. Síndrome de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebro-vasculares)

El síndrome de MELAS está caracterizado por encefalomiopatía, acidosis láctica, y por accidentes cerebro-vasculares recurrentes y transitorios, producidos a edad temprana, que provocan una disfunción cerebral subaguda y cambios en la estructura cerebral con acompañamiento de hemiparesia y ceguera cortical. Además, otros caracteres comunes son: convulsiones generalizadas, migraña, sordera, demencia, vómitos, debilidad en las extremidades. La biopsia muscular suele presentar fibras rojo-rasgadas, pero suelen ser reactivas a la reacción de la citocromo c oxidasa.

Este síndrome está causado, en más del 80% de los casos, por la mutación (m.3243A>G), localizada en el gen  $ARNt^{Leu(UUR)}$ , pero también se han encontrado otras mutaciones en el mismo ARNt, que parece ser muy propenso a sufrir mutaciones patogénicas, y, con menor incidencia, en otros genes del ADNmt. Todas las mutaciones están en forma heteroplásmica y presentan una clara herencia materna, aunque raramente más de un miembro de la familia está afectado. La presencia de estas mutaciones en ARNt daña la síntesis de proteínas en la mitocondria.

La mutación principal, en la posición m.3243A>G, se ha relacionado también con otras enfermedades muy distintas como oftalmoplegia progresiva externa, cardiomiopatías e incluso con diabetes mellitus y sordera, por lo que la relación genotipo-fenotipo no es muy fija. La alta frecuencia con que aparece esta mutación hace que sea de análisis obligatorio cuando estamos ante enfermedades de no muy clara sintomatología.

##### 4.1.2.2. Síndrome de MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas)

El síndrome de MERRF se presenta con epilepsia mioclónica, debilidad muscular, ataxia, convulsiones generalizadas y miopatía mitocondrial, con presencia de fibras rojo-rasgadas no reactivas a la citocromo c oxidasa. Otros síntomas menos comunes que pueden

acompañar a los anteriores son: demencia, sordera, neuropatía, atrofia óptica, fallo respiratorio, cardiomiopatía, y algunos pacientes tienen lipomas múltiples en cuello y tronco. Puede aparecer tanto en la infancia como en adultos y es de curso progresivo. La mayoría de los casos de MERRF (80%) están causados por la mutación m.8344A>G, localizada en el gen del  $ARNt^{Lys}$ , pero también se han encontrado otras mutaciones más minoritarias en el mismo gen. Todas las mutaciones están en forma heteroplásmica y el porcentaje de ADNmt dañado necesario para la afectación varía entre individuos.

##### 4.1.2.3. Diabetes de herencia materna y sordera

Además de la diabetes dependiente y no dependiente de insulina, se ha descrito un nuevo tipo, asociada a sordera, que no encuadra dentro de esta clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Este tipo de diabetes, de herencia materna, representa aproximadamente un 1,5% de la población diabética total y está producida por la mutación m.3243A>G en el gen del  $ARNt^{Leu(UUR)}$ , la misma descrita para el síndrome de MELAS. Por otra parte, cabe mencionar que la diabetes es uno de los síntomas que suele acompañar a otros síndromes mitocondriales como MELAS, CPEO, Kearns-Sayre, Pearson y Wolfrang.

#### 4.1.3. Enfermedades causadas por mutaciones puntuales en genes de ARNr

El tercer tipo de genes del ADNmt sobre los que se pueden producir mutaciones son los de los ARNr. Estos ARN forman parte de los ribosomas y participan en numerosas funciones en el proceso de biosíntesis de proteínas por lo que, mutaciones en su secuencia, pueden provocar fallos en la síntesis global de los péptidos codificados en el ADNmt.

##### 4.1.3.1. Sordera inducida por aminoglicósidos y sordera neurosensorial

Al igual que las mutaciones en el  $ARNt^{Ser(UCN)}$  descritas anteriormente, la sordera neurosensorial no sindrómica puede estar producida también por una mutación m.1555A>G, localizada en el ARNr 12S mitocondrial. Asimismo, esta mutación es la causa de una sordera no sindrómica inducida por aminoglicósidos, tales como estreptomina, gentamicina y kanamicina. Parece que estos antibióticos actúan sobre los ribosomas mitocondriales de la cóclea, incrementando su unión al ARNr 12S y aumentando su susceptibilidad a producir defectos en la traducción por estabilización de ARNt incorrectos.

#### 4.1.4. Otras enfermedades asociadas a mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial

Además de las presentaciones patológicas y mutaciones puntuales descritas anteriormente, se han encontrado otras muchas asociadas a diversos síndromes o a combinaciones de síntomas que no se encuadran en un síndrome determinado. Entre ellos podemos citar: la sordera neurosensorial, que es una de las manifestaciones clínicas secundarias comunes de varios síndromes mitocondriales, pero que también se presenta como sordera aislada asociada a varias mutaciones en el ADNmt, en particular en el  $ARNt^{Ser(UCN)}$ ; el síndrome de intolerancia al ejercicio, que se ha asociado fundamentalmente a mutaciones en el gen codificante del citocromo b<sup>(42)</sup>; cardiomiopatías de herencia materna, relacionadas con mutaciones en el  $ARNt^{Ile}$ ; LHON y distonía; miopatías de herencia materna unidas a mutaciones en diversos ARNt; anemia sideroblástica; deficiencia fatal de la cadena respiratoria infantil; necrosis bilateral del estriado, etc. Sin

ninguna duda, el espectro de fenotipos relacionados con mutaciones en el ADNmt es mucho mayor y aumentará en el futuro gracias a la secuenciación completa del ADNmt. En todos estos casos, y en muchos otros que puedan presentarse y que no están asociados a un tipo de mutación concreta, es muy conveniente, y quizá más rápido, secuenciar el ADNmt completo en lugar de ir buscando mutaciones o genes concretos.

## 4.2. Enfermedades causadas por deleciones del ADNmt

Otro tipo de enfermedades producidas por defectos en el ADNmt se deben a la presencia de deleciones (pérdida de parte del ADN). Al igual que las producidas por mutaciones puntuales afectan a la biogénesis del sistema OXPHOS y, por tanto, a la síntesis de ATP. Actualmente hay descritas numerosas deleciones distintas si bien, una de ellas, la deleción común de 4.977 pares de bases se encuentra mucho más frecuentemente. Se ha descrito una amplia variedad de síndromes clínicos relacionados con deleciones del ADNmt, algunos se describen a continuación.

### 4.2.1. Síndrome de oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO)

Esta enfermedad está caracterizada por oftalmoplejía, ptosis bilateral de los párpados y miopatía. Además, suele ir acompañada de intolerancia al ejercicio y debilidad de las extremidades. En biopsias musculares se encuentran fibras rojo-rasgadas COX negativas.

En general, es una enfermedad benigna que suele aparecer en la adolescencia o en adultos jóvenes. Se ha asociado fundamentalmente a deleciones grandes y únicas en ADNmt que aparecen de forma espontánea sin historia familiar. En particular, en nuestro laboratorio, un 60% de pacientes con CPEO presentan la deleción común.

Asimismo, esta enfermedad se ha relacionado con deleciones múltiples de herencia autosómica recesiva o dominante y a mutaciones puntuales de herencia materna, incluida la mutación m.3243A>G causante de MELAS.

### 4.2.2. Síndrome de Kearns-Sayre (KS)

El síndrome de Kearns-Sayre, muy relacionado con el anterior, es una enfermedad multisistémica progresiva caracterizada clínicamente por CPEO, retinopatía pigmentaria, y bloqueo de la conducción cardíaca, que aparece antes de los 20 años de edad, y que va acompañado además de alguno de los siguientes síntomas: ataxia, miopatía mitocondrial, elevados niveles de proteína CSF, sordera, demencia, fallos endocrinos y renales. La biopsia muscular muestra fibras rojo-rasgadas y COX negativas. Los individuos que padecen esta enfermedad suelen morir antes de los 40 años. Esta enfermedad está causada por la presencia de deleciones grandes únicas en el ADNmt de aparición espontánea.

### 4.2.3. Síndrome de Pearson

El síndrome de médula ósea-páncreas de Pearson es una enfermedad que afecta a la hematopoiesis y a la función pancreática exocrina que aparece en los primeros años de vida. Sus caracteres clínicos más comunes son anemia sideroblástica con vacuolización de precursores de la médula ósea, que se manifiesta con una anemia macrocítica, trombocitopenia y neutropenia. Los niños que la padecen suelen morir antes de los tres años de vida y, los que sobreviven, gracias a numerosas transfusiones de sangre, suelen desarrollar más tarde un fenotipo de Kearns-Sayre. Este síndrome está causado por deleciones grandes únicas del ADNmt de aparición esporádica.

Estos tres síndromes, CPEO, Kearns-Sayre y Pearson, tienen en común el estar causados por la presencia de grandes deleciones (de 2 a 9 kb) en el ADNmt, que suelen aparecer de forma esporádica. La mayor parte de las deleciones encontradas son únicas, aunque también se han descrito deleciones múltiples, están localizadas en el arco grande comprendido entre los orígenes de replicación del ADN, manteniendo siempre las secuencias requeridas para la replicación y los promotores de la transcripción, y están flanqueadas por repeticiones directas de longitud variable (3-13 nt), lo que sugiere que se producen por errores en el proceso de replicación<sup>(43)</sup>. Una de ellas, la deleción de 4.977 pb (deleción común), aparece con mayor frecuencia que las demás. Esta deleción elimina los genes comprendidos entre los nucleótidos 8483 (subunidad 8 de la ATPasa) y 13460 (ND5) del ADNmt (Fig. 2). Esta pérdida de genes implica que los genomas no se puedan traducir y, por tanto, son dependientes de complementación con moléculas de ADNmt normales en la misma mitocondria. Por ello, las deleciones se presentan siempre en heteroplasmia, aunque pueden llegar a constituir un porcentaje muy alto de la población de ADNmt. La homoplasmia sería incompatible con la vida. El umbral patológico se suele alcanzar cuando el porcentaje de moléculas delecionadas supera el 60%. No existe una clara relación entre el fenotipo y el tipo, tamaño o porcentaje del ADN delecionado, ya que la misma deleción puede dar lugar a fenotipos diferentes.

## 4.3. Enfermedades asociadas a depleción de ADN mitocondrial

Por último, el genoma mitocondrial puede causar enfermedades no por la presencia de mutaciones propiamente dichas en su molécula, sino por una disminución considerable de los niveles de ADNmt (depleción de ADNmt). Los síndromes de depleción mitocondrial (MDS) son un grupo clínicamente y genéticamente muy heterogéneo, de herencia autosómico-recesiva, que están caracterizados por una fuerte reducción del número de copias de ADNmt específica de tejido. No se ha identificado ninguna mutación en el ADNmt, lo que sugiere que estos síndromes están producidos por defectos en genes codificados en el ADNn implicados en la maquinaria de mantenimiento del ADNmt (fallos de replicación o desequilibrio en los niveles de nucleótidos). Actualmente, se distinguen cuatro tipos diferentes de formas de presentación: miopática, encefalomiopática, hepatocerebral, y cerebrenal<sup>(44,45)</sup>. Se considera que existe una depleción mitocondrial cuando los niveles de ADNmt están por debajo de 30% con respecto a controles emparejados por edad y sexo<sup>(46,47)</sup>. Sin embargo, en los casos graves se llega hasta valores por debajo de 5%. La mayoría de ellos mueren en su infancia temprana, aunque algunos alcanzan hasta la pubertad e incluso mucho más<sup>(48)</sup>. Se han asociado varios genes a las distintas formas de síndrome de depleción. La forma *miopática* se caracteriza por una atrofia muscular proximal grave, debilidad, hipotonía, dificultad para alimentación. La creatina cinasa (CK) suele estar muy aumentada en suero. Suele aparecer durante el primer año de vida y suelen morir pronto, aunque algunos niños llegan hasta la adolescencia. Esta forma se ha asociado a mutaciones en el gen timidina cinasa-2 (*TK2*), una desoxirribonucleótido cinasa específica de la mitocondria que fosforila timidina, desoxicidina y desoxiuridina<sup>(49,50)</sup>. La forma *encefalomiopática* está caracterizada por retraso psicomotor grave, hipotonía muscular y convulsiones generalizadas. Se ha relacionado con mutaciones en el gen que codifica la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintasa, formadora de ADP (SUCLA2)<sup>(51)</sup>, una enzima de matriz mitocondrial que cataliza la síntesis reversible de succinil-CoA a partir de succinato y CoA; con

SUCLG1, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la succinato-CoA ligasa; con la timidina fosforilasa y con RRM2B, ribonucleótido reductasa. La forma hepatocerebral aparece muy temprano con vómitos, fallo del desarrollo, hipotonía e hipoglucemia. El síndrome de Alpers se considera como una forma de síndrome de depleción. El hígado muestra degeneración grasa, fibrosis, desestructuración y proliferación de conductos biliares<sup>(52)</sup>. Esta forma de depleción se ha asociado a mutaciones en los genes codificantes de desoxiguanosina cinasa (DGUOK)<sup>(53)</sup>, ADN polimerasa  $\gamma$ <sup>(54)</sup>, MPV17 y C10orf2 (*twinkle*)<sup>(55,56)</sup>. La primera fosforila desoxurribonucleótidos purínicos; la segunda participa en la replicación del ADN mitocondrial, y MPV17 es de función desconocida. Recientemente se han detectado otros genes que causan síndrome de depleción, entre ellos se encuentran RRM2B (en la forma cerebrorenal), que codifica la subunidad pequeña de ribonucleótido reductasa inducible por el p53 citosólico<sup>(57)</sup>, SUCLG1, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la succinato-CoA ligasa, y PEO1, gen de la helicasa mitocondrial *twinkle*<sup>(58,59)</sup>.

## 5. CRITERIOS DE PATOGENICIDAD DE MUTACIONES NUEVAS EN EL ADN MITOCONDRIAL

El número de mutaciones descritas en el ADNmt es muy grande, por lo que cabría pensar que se habría llegado ya al límite de cambios en dicho ADN que puedan originar enfermedades. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el genoma mitocondrial presenta una alta tasa de mutación y, es muy posible que todavía se puedan encontrar otras muchas mutaciones patogénicas que estén relacionadas con síndromes específicos o con nuevos fenotipos. Además, debido a la alta variabilidad fenotípica, es probable que fenotipos muy suaves pasen desapercibidos. Así, en nuestro laboratorio hemos descrito una nueva mutación en el gen codificante de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa asociada a un retraso mental moderado con debilidad y fatigabilidad<sup>(60)</sup> y varias relacionadas con LHON<sup>(61)</sup>. Además, la probabilidad de detectar una nueva mutación ha aumentado con la posibilidad de la secuenciación completa del ADNmt. En cualquier caso, no hay que olvidar que, tratándose del ADNmt, se debe secuenciar el ADN del tejido más afectado, ya que no se puede descartar la presencia de mutaciones somáticas.

En todo caso, para que una nueva mutación en el ADNmt pueda considerarse patogénica necesita cumplir una serie de criterios que se describen a continuación. Estos criterios, muy sencillos en un principio, se establecieron de forma precoz, cuando se empezaron a describir mutaciones puntuales, pero que luego se han ido ampliando o modificando. No todas las mutaciones patogénicas llegan a cumplir todos y cada uno de estos criterios, por lo que hay que ser extremadamente cuidadoso en su aplicación y tener una mente abierta a la hora de determinar como patogénica a una mutación, con el fin de que pueda avanzar la medicina mitocondrial<sup>(36)</sup>. Estos son:

### 5.1. La mutación debe de estar presente en pacientes y ausente en individuos control

Una mutación patogénica no debe de encontrarse en individuos normales, sin embargo, hay muchas mutaciones claramente patológicas pero que presentan una penetrancia incompleta, y pueden encontrarse en miembros sanos del mismo pedigrí en forma homoplásmica (LHON). Hoy en día hay cerca de 51.192 secuencias del ADNmt, lo que representa un buen número para comprobar si la mutación ha sido descrita o no anteriormente. Asimismo, también podría ser cierto que mutaciones definidas en estudios poblacionales podrían ser potencialmente patológicas.

### 5.2. La mutación debe de encontrarse en fondos genéticos diferentes

Este criterio implica una asociación independiente con el fenotipo y es imposible de cumplir en nuevas mutaciones.

### 5.3. 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, por lo que pueden llegar a coexistir moléculas normales con mutadas (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.

### 5.4. La mutación debe de ser la mejor candidata a ser patogénica

Con la secuenciación completa del ADNmt es posible que aparezcan varios cambios en su secuencia, por lo que habrá que discernir cuál de todas es la patológica. A veces, se encuentran mutaciones nuevas y, si más o menos cumple los criterios antes mencionados, se dice que es patológica. Sin embargo, la posterior secuenciación del ADNmt 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 patológicas<sup>(62)</sup>.

Por otro lado, 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 las secuencias que juegan un papel importantísimo en la regulación de la replicación y de la transcripción, aunque su función sea prácticamente desconocida. 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 pueda afectar el procesamiento de los ARN policistrónicos que se originan a partir de las tres unidades de transcripción.

### 5.5. La mutación debe afectar a nucleótidos muy conservados evolutivamente

El grado de conservación de un nucleótido determinado en el ADN depende, muy frecuentemente, de la importancia funcional que tenga la posición que ocupa. Por ello, es normal que una mutación patológica afecte a posiciones muy conservadas.

### 5.6. La mutación debe afectar a dominios funcionales importantes de las proteínas

Este punto es un poco consecuencia del anterior y tiene mucha importancia. Por ello es imprescindible el conocimiento de la estructura y función de las subunidades del sistema OXPHOS. Asimismo, la mutación puede afectar a dominios funcionales en los ARNr o ARNt con pérdida de su función.

### 5.7. La transferencia de un ADNmt con una mutación a líneas celulares sin ADNmt, debe de ir acompañada de una transferencia del defecto molecular y/o celular: construcción de híbridos transmitocondriales

Con todos los inconvenientes descritos anteriormente, es fácil comprender que son necesarias pruebas funcionales directas para el establecimiento 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 defectos funcionalmente relevantes de las mutaciones pueden depender del contexto del sistema experimental utilizado. En este sentido, hoy en día se considera que la mejor prueba para ver que una mutación en el ADNmt es patológica, es la construcción de líneas celulares transmitocondriales. Estas consisten en la fusión de líneas celulares humanas con otro fondo nuclear, y a las que se ha eliminado su ADNmt (células rho 0), con plaquetas de un paciente que porten la mutación en el ADNmt a analizar<sup>(63,64)</sup>. Los híbridos con la nueva mutación y un control tendrán el mismo fondo nuclear y, por tanto, se podrá estudiar si hay cambios significativos. La transferencia del fenotipo funcional del paciente a estos híbridos representa la mejor evidencia de implicación del ADNmt mutado en la enfermedad. Esta técnica se ha usado mucho en los laboratorios de genética mitocondrial para determinar la patogenicidad de una mutación.

Una de las metas para comprender mejor las enfermedades mitocondriales, es la obtención de animales de laboratorio con mutaciones en el ADNmt. Sin embargo, por el momento existen muy pocos modelos animales con este tipo de mutaciones. Una explicación bastante probable, para esta escasez de modelos de ratón, es que las mutaciones del ADNmt más graves se eliminen de la línea germinal femenina<sup>(65)</sup>. En todo caso, se debe mencionar que, por el momento, no existe ningún modelo animal con mitocondrias que posean mutaciones humanas.

### 6. INFLUENCIA DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES 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. La localización del ADNmt, muy próxima a la membrana interna mitocondrial y sin protección por histonas, hace que su tasa de mutación sea mucho más elevada que la del ADN. Las mutaciones que se produzcan podrán ser causa de enfermedad, y algunas podrían ser tan dañinas que harían inviables a los individuos que las poseen. Sin embargo, muchas de las mutaciones pueden ser más inocuas y fijarse en la población como polimorfismos. 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 patológicas m.11778G>A y m.14484T>C, se hizo evidente que un porcentaje elevado de los pacientes con LHON pertenecía al haplogrupo mitocondrial J y que esta variante genética incrementa la penetrancia de estas dos mutaciones<sup>(66)</sup>. Este mismo haplogrupo está sobrerrepresentado en individuos centenarios<sup>(67)</sup>, y subrepresentado en pacientes con enfermedad de Parkinson<sup>(68)</sup>. Del mismo modo, el haplogrupo T predomina en pacientes con astenozoospermia moderada, mientras que el H es

más frecuente en individuos con buena motilidad espermática<sup>(69)</sup>. Asimismo, en los últimos años ha habido una explosión de resultados ligando la variación en el ADNmt al cáncer<sup>(70)</sup>, envejecimiento y enfermedades ligadas a la edad<sup>(71)</sup>, etc., lo que amplía el campo de la patología mitocondrial humana. Sin embargo, no siempre es posible asociar un haplogrupo determinado a un fenotipo concreto<sup>(72)</sup>.

La explicación del hecho de que el mismo haplogrupo mitocondrial sea un agente de susceptibilidad, frente a determinadas enfermedades y a la vez uno de resistencia contra otros fenotipos, se encuentra en el papel dual y antagónico del sistema OXPHOS: la generación de energía por un lado y la de calor en el otro. Así, las variantes desacoplantes provocarían una menor capacidad productora de energía, pero una mayor generación de calor y menor de especies reactivas de oxígeno (ROS). La pérdida en la eficacia productora de energía aumentaría la penetrancia de mutaciones patológicas<sup>(73)</sup>. Por otra parte, una cadena desacoplada mantendría los intermediarios portadores de electrones en un estado más oxidado, reduciendo la probabilidad de producir especies reactivas de oxígeno y, por tanto, comportándose como un factor de resistencia frente a los fenotipos dependientes del daño oxidativo, como el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad<sup>(74)</sup>.

### 7. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

El diagnóstico de pacientes con sospecha de padecer una enfermedad mitocondrial supone todo un desafío debido a que, tanto el conocimiento del espectro clínico como el número de defectos genético-moleculares, están continuamente en expansión<sup>(75-79)</sup>. Las manifestaciones clínicas de las enfermedades mitocondriales son muy variadas 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. Algunas de estas enfermedades presentan una serie de aspectos clínicos, morfológicos y bioquímicos muy específicos que permite encuadrarlas en síndromes bien definidos pero, en otros muchos casos, fundamentalmente en la infancia, los síntomas son muy poco informativos y solamente la presencia de alguna anomalía neurológica, acompañada en ocasiones de aumento de ácido láctico y de otros síntomas secundarios que afectan a diversos órganos, proporciona alguna orientación sobre la naturaleza mitocondrial de estas enfermedades. De este modo, se puede encontrar un amplio espectro de síntomas, con una gran variedad de presentaciones clínicas diferentes. La presencia de uno o más de los síntomas característicos de estas enfermedades exige a continuación un estudio morfológico, histoquímico y bioquímico de las fibras musculares para asegurar la naturaleza de estas enfermedades. Así, con mucha frecuencia se encuentran fibras rojo-rasgadas, fibras no reactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa, y defectos en uno o varios complejos de la cadena respiratoria. La heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas de estas enfermedades hace imprescindible hoy en día un estudio genético de los pacientes y familiares. 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.

¿Qué tejido se debe utilizar para los estudios de estas enfermedades? Como norma general habría que decir que el tejido más afectado, sin embargo, esto no es siempre posible. La biopsia muscular ha sido el tejido de preferencia durante muchos años y es imprescindible para los estudios morfológicos, de actividad de la cadena respiratoria, de ensamblaje de los complejos y para análisis genético-moleculares de delección y depleción del ADNmt. Las mutaciones puntuales de



herencia materna pueden analizarse perfectamente en sangre, orina, pelos, mucosa bucal, etc. La orina se ha mostrado también muy eficaz en la detección de deleciones. Los fibroblastos son también muy útiles para los estudios enzimáticos.

### 7.1. Manifestaciones clínicas

Como ya se ha mencionado, la característica más común de las enfermedades del ADNmt es la de ser trastornos multisistémicos que pueden afectar prácticamente a cualquier órgano y tejido, pero fundamentalmente a aquellos que más dependen de la energía mitocondrial como son el sistemas nervioso y muscular, dando lugar a síndromes muy heterogéneos (Tabla 2). Sin embargo, también se encuentran fenotipos en los que solo un tejido está afectado, como ocurre en LHON (nervio óptico) y en la sordera mitocondrial (células cocleares).

La posibilidad de existencia de enfermedad mitocondrial se debe de tener en cuenta cuando un paciente presenta una asociación de síntomas bastante inexplicable con un rápido y progresivo curso de la enfermedad implicando órganos o tejidos no relacionados entre sí. Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran una o varias de las siguientes: encefalopatía, desórdenes motores, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, demencia, retraso mental, miopatía, intolerancia al ejercicio, ptosis, oftalmoplejía, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera, cardiomiopatía, defectos en la conducción cardíaca, disfunciones hepáticas y pancreáticas, diabetes, defectos de crecimiento, anemia sideroblástica, pseudo-obstrucción intestinal, nefropatías, acidosis metabólica y otros más secundarios. En algunos casos se pueden asociar una serie de síntomas con síndromes determinados, pero, en general, no se puede delimitar con precisión porque el solapamiento de síntomas es muy frecuente y el curso y severidad 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<sup>(8,80,81)</sup>.

### 7.2. Análisis de laboratorio

Una de las manifestaciones bioquímicas más comunes de las enfermedades mitocondriales, aunque no de forma general ni específica, es la elevación de lactato por encima de 2,5 mM. Este, junto a piruvato y su relación molar, se debe de determinar en plasma y a ser posible en líquido cefalorraquídeo. Para evitar resultados falsos, estos análisis se tienen que realizar en condiciones predeterminadas, las muestras tienen que desproteinizarse y congelarse inmediatamente.

Al mismo tiempo se deben de estudiar los niveles de coenzima Q, folato, cuerpos cetónicos, glucosa, aminoácidos, carnitina, creatinina, urea, ácidos grasos no esterificados, y niveles de hormonas cuando esté clínicamente indicado. Estos datos bioquímicos se deben evaluar 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. Para casos de deficiencia de coenzima Q<sub>10</sub>, es muy importante su determinación en biopsias musculares y en fibroblastos. Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de determinar los niveles de folato en sangre y en líquido cerebro-espinal, puesto que se ha visto que

**TABLA 2.** Criterios diagnósticos en enfermedades causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial.

Órgano/tejido	Manifestaciones clínicas/caracteres
Sistema nervioso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Encefalopatía</li> <li>• Ataxia cerebelar</li> <li>• Convulsiones</li> <li>• Mioclonías</li> <li>• Accidentes cerebrovasculares</li> <li>• Retraso mental y psicomotor</li> <li>• Demencia</li> <li>• Migraña</li> <li>• Ceguera cortical</li> <li>• Depresión</li> <li>• Epilepsia</li> <li>• Neuropatía periférica</li> </ul>
Músculo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Miopatía progresiva</li> <li>• Intolerancia al ejercicio</li> <li>• Debilidad</li> <li>• Oftalmoplejía</li> <li>• Ptosis</li> <li>• Mioglobinuria</li> </ul>
Sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia sideroblástica</li> <li>• Acidosis láctica</li> <li>• Pancitopenia</li> </ul>
Ojo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atrofia óptica</li> <li>• Retinitis pigmentaria</li> <li>• Cataratas</li> <li>• Diplopía</li> </ul>
Oído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sordera</li> </ul>
Corazón	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cardiomiopatía</li> <li>• Defectos en conducción cardíaca</li> </ul>
Sistema endocrino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• Diabetes <i>insipidus</i></li> <li>• Hipoparatiroidismo</li> <li>• Hipotiroidismo</li> <li>• Baja estatura</li> </ul>
Intestino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pseudoobstrucción intestinal</li> <li>• Vómitos</li> </ul>
Páncreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disfunción pancreática exocrina</li> </ul>
Hígado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fallo hepático</li> </ul>
Riñón	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Fanconi</li> <li>• Fallo renal</li> </ul>
Morfología muscular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibras rojo-rasgadas en biopsias musculares</li> <li>• Inclusiones paracristalinas en mitocondria</li> </ul>
Histoquímica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibras COX negativas</li> </ul>
Bioquímica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de actividad de complejos respiratorios y/o de enzimas respiratorias en biopsias musculares</li> </ul>
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidosis láctica en sangre</li> <li>• Acidosis láctica en líquido cerebroespinal</li> <li>• Hipoglucemia</li> </ul>

algunas enfermedades mitocondriales, en particular el síndrome de Kearns-Sayre, cursan con una deficiencia de folato cerebral<sup>(82,83)</sup>.

También es posible que estas anomalías bioquímicas no se presenten en el paciente no descompensado, si se halla en condiciones basales. Por ello, 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. Estas pruebas deben de estar estandarizadas y se de-

ben seguir exactamente los protocolos para su realización, de forma que sea correcta la interpretación de los resultados<sup>(84)</sup>. 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 tienen 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.

### 7.3. Estudios anatomopatológicos

La muestra de elección para la realización de estudios histoquímicos, bioquímicos y genéticos es el tejido más afectado por la enfermedad, ya que el porcentaje de heteroplasmia suele ser más elevado y posee signos más claros que indican el padecimiento de enfermedad mitocondrial. Entre ellos, el músculo es uno de los tejidos más frecuentemente afectados en la patología mitocondrial.

El análisis histoquímico de biopsias musculares es uno de los más importantes para la detección de anomalías mitocondriales. Así, una de las características morfológicas más típicas de estas enfermedades 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) (Fig. 3). Las RRF reflejan una acumulación de mitocondrias anormales en tamaño y número en la zona subsarcolémica y entre fibras musculares, que posiblemente se origina para intentar compensar el déficit energético. La disfunción mitocondrial puede medirse también mediante la utilización de marcadores histoquímicos para enzimas oxidativas, en particular la presencia de fibras no reactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa (COX negativas), permite observar la severidad de la deficiencia enzimática. Aunque hay que tener precaución en la interpretación de los resultados, un modelo en mosaico de actividad COX con mayoría de fibras rojo-rasgadas deficientes en COX es altamente sugerente de enfermedad por mutación heteroplásmica en el ADNmt. Sin embargo, muchos pacientes pueden tener biopsia normal o fibras musculares con proliferación mitocondrial, pero actividad COX normal. El ensayo SDH detectará pacientes con mutaciones en el complejo II (completamente codificado en el ADN nuclear), pero todavía no hay ensayos para valorar histoquímicamente las actividades del complejo I y III, por lo que muchos pacientes pueden quedar como no diagnosticados.

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

### 7.4. Estudios bioquímicos

Unas 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 mediante estudios polarográficos que calculan el consumo de oxígeno o espectrofotométricos que miden las actividades de las enzimas respiratorias por separado. En el primer caso, el consumo de oxígeno se determina en fracciones enriquecidas en mitocondrias obtenidas de biopsias musculares utilizando para ello un electrodo de oxígeno (electrodo de Clark). Estos estudios pueden realizarse también en linfocitos, o a partir



FIGURA 3. Fibras rojo-rasgadas (RRF) obtenidas en biopsias musculares mediante la tinción tricromo de Gomori modificada. Esta acumulación de mitocondrias anormales en la zona subsarcolémica, o espacio intermiofibrilar, es una de las manifestaciones características que más frecuentemente aparecen en las enfermedades mitocondriales.

de células en cultivo (fibroblastos) permeabilizadas. El problema de esta determinación es que se deben 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 fáciles de realizar, se pueden llevar a cabo en homogenados de tejidos, que requiere menor cantidad de material de partida y pueden haberse mantenido congelados. Los pacientes con mutaciones en el ADNmt muestran un rango de actividades enzimáticas: normales, defectos aislados en un complejo, o defectos múltiples. Estos últimos se suelen encontrar en pacientes con deleciones o mutaciones en genes ARNt que llevan a defectos en la traducción del mensaje genético. Los dos últimos casos pueden orientar en el siguiente paso del diagnóstico mitocondrial, el estudio genético. Sin embargo, se han descrito casos con mutaciones en genes ARNt en los que solamente está afectado uno de los complejos respiratorios<sup>(85)</sup> o, por el contrario, una mutación en un gen codificante de proteínas puede afectar más de un complejo<sup>(86)</sup>. En general, el tejido que debe ser analizado es aquel en el que se expresa la enfermedad; como el músculo suele estar siempre afectado, este será el tejido de preferencia. Si no es posible, al menos se debe de realizar biopsias de piel para estudios en fibroblastos en cultivo.

El análisis de la actividad del sistema OXPHOS puede ser una guía muy importante para poder continuar con los estudios genético-moleculares. Sin embargo, a veces estas actividades son completamente normales y no se puede excluir una enfermedad mitocondrial por lo que se debe de realizar también estudios moleculares.

### 7.5. Estudios de ensamblaje de complejos OXPHOS

El ensamblaje de los complejos que forman parte del sistema OXPHOS se puede estudiar mediante electroforesis en geles nativos de poli(acrilamida) (*blue native polyacrylamide gel electrophoresis*), sin disociarlos en sus constituyentes polipeptídicos<sup>(87)</sup>. Esta técnica permite cuantificar los niveles de los complejos OXPHOS perfectamente ensamblados y puede ser de gran ayuda a la hora de decidir hacia donde enfocar los estudios moleculares. Así, algunas de las proteínas componentes de los complejos u otras especializadas,

participan en el ensamblaje de los complejos y mutaciones en las mismas pueden originar diversas enfermedades mitocondriales<sup>(88)</sup>. Además, estos complejos permanecen en su forma activa en el gel y se puede determinar la actividad de los mismos<sup>(89)</sup>.

## 7.6. Análisis del pedigrí y genético-moleculares

El estudio familiar puede dar pistas acerca del posible modo de herencia de la enfermedad. Como ya se ha mencionado, las enfermedades del sistema OXPHOS, pueden presentarse tanto con un tipo de herencia mendeliana (autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X) o materna, debido al doble origen genético de este sistema. Las enfermedades debidas a defectos en el ADNmt, objeto de esta revisión, presentan fundamentalmente una herencia materna cuando están producidas por mutaciones puntuales. Sin embargo, las mutaciones en el ADNmt pueden aparecer de forma esporádica, ser somáticas, etc. La historia familiar y el análisis del pedigrí puede ser uno de los principales indicios para un diagnóstico de patología debida a mutaciones en el genoma mitocondrial. Es muy importante preguntar por padecimiento de síntomas, aunque sean secundarios, en familiares ya que, puede darse el caso de que la mutación esté presente en otros miembros de la familia, pero en un porcentaje muy bajo, de modo que no se haya expresado toda la sintomatología y que solo, al aumentar el porcentaje de la mutación en generaciones posteriores, aparezca el síndrome completo. Este seguimiento es muy importante en niños con sospecha de enfermedad mitocondrial.

En el caso de deleciones múltiples y depleción, a pesar de que existe un daño sobre el ADNmt, la causa puede ser debida a la acción de otras proteínas codificadas en el ADNn implicadas en el mantenimiento del sistema genético mitocondrial. En estos casos, y al igual que con las proteínas componentes del sistema OXPHOS que están codificadas en el ADNn, las que participan en su ensamblaje, y muchas otras presentan un modo de herencia mendeliana. En la parte final del capítulo se hablará un poco de este tipo de mutaciones.

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

¿En qué tejido se deben de estudiar las mutaciones en el ADNmt? La regla general indica que las mutaciones se deben analizar en el tejido más afectado, ya que estas pueden aparecer en un único tejido (somáticas). En el caso de mutaciones puntuales es muy normal realizar el estudio en ADN extraído de células sanguíneas de las que se puede extraer una gran cantidad de ADN, hecho importante cuando hay que realizar muchos análisis en búsqueda de una mutación. Recientemente se están utilizando otros tejidos de acceso fácil y no invasivo y que presentan la mutación en porcentajes incluso superiores a la sangre. Así, se están encontrando muy buenos resultados en células epiteliales obtenidas de la orina, en la saliva, mucosa bucal, raíz de pelo (fundamentalmente de cejas), etc., si bien la cantidad de ADN que se puede obtener es relativamente baja. 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 260 mutaciones puntuales, pero solo un número pequeño de ellas (Tabla 1) se encuentran asociadas frecuentemente a síndromes concretos. El resto solamente se han descrito en algunos casos y, la mayoría, una sola vez. ¿Qué

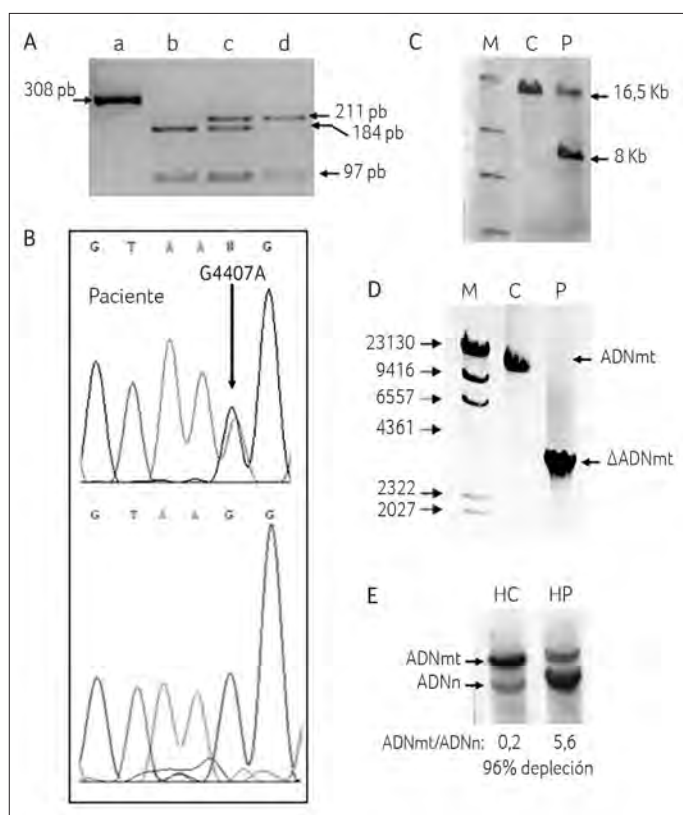
mutaciones hay que estudiar? Si los pacientes han sido evaluados con precisión, el análisis puede restringirse a unas pocas mutaciones que representan la mayor parte de los casos. Solamente, ante la presencia de defectos concretos en la actividad de la cadena respiratoria, se debe de iniciar un estudio de otras mutaciones. Hoy en día, con el avance de las técnicas moleculares, y dado el tamaño del ADNmt, es muy conveniente su secuenciación completa que permite estudiar mutaciones que solo se han descrito una vez y el descubrimiento de nuevas mutaciones.

El método más común para la determinación de las mutaciones puntuales comunes es el de amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión con enzimas de restricción. De este modo, se originan polimorfismos en la longitud de los fragmentos producidos por estas enzimas (RFLP) que se pueden analizar por electroforesis en geles de agarosa. La tinción con bromuro de etidio o la autorradiografía, en el caso de haberse marcado radioactivamente el ADN, indicará la presencia de la mutación y el porcentaje de heteroplasmia (Fig. 4A). Este es el caso de mutaciones patogénicas que producen los síndromes concretos como LHON, NARP, Leigh, MELAS, MERRF, y algún otro. En el caso de no encontrar ninguna de las mutaciones comunes o en caso de fenotipos no muy claros, que nunca se han asociado a una mutación en concreto, es muy conveniente secuenciar el ADNmt completo (Fig. 4B). En cualquier caso, se debe de utilizar el tejido más afectado, ya que no se puede descartar la presencia de mutaciones somáticas.

El estudio de deleciones del ADNmt se realiza habitualmente en biopsias musculares, ya que raramente se encuentran en células sanguíneas. Solamente se detectan deleciones en sangre en el síndrome de Pearson.

El método mejor y más fiable para detectar las deleciones es el de la hibridación *southern*. Para ello, el ADN total se digiere con un enzima de restricción (Pvu II o Bam HI) que corta el ADNmt en un único punto linearizándolo. Los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis en geles de agarosa y se transfieren a una membrana de nailon 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 ADNmt normal (16.569 pares de bases) y, en el caso de presencia de deleciones, otras bandas de menor tamaño (Fig. 4C). La densitometría del autorradiograma permite determinar el nivel de heteroplasmia. El problema fundamental de esta técnica es que requiere cantidades elevadas de ADN que no siempre es posible obtener de las pequeñas biopsias de las que se parte. Por otro lado, esta técnica es muy laboriosa y lenta. 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 (Fig. 4D). El problema es que no indica el porcentaje de moléculas delecionadas. Para esto, habría que realizarse la técnica de *southern blot* o, más rápidamente, por qPCR. Si se utiliza la orina para la determinación de deleciones hay que hacerlo por la técnica de PCR largo debido a la baja cantidad de ADN que se obtiene.

El análisis de depleción de ADNmt se puede realizar también por la técnica de hibridación *southern* descrita anteriormente, pero



**FIGURA 4.** Análisis molecular de mutaciones puntuales, deleciones y depleción en el ADNmt. **A)** Detección de la mutación puntual T9176C causante del síndrome de Leigh. Electroforesis en gels de agarosa mostrando: a) fragmento de ADNmt amplificado de 308 pb. Digestión del amplificado con la enzima de restricción *ScrFI* que produce fragmentos de restricción de b) 184, 97 y 27 pb en presencia de la mutación (homoplasmia para el ADN mutado) (el fragmento de 27 pb no se ve por haber salido 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). **B)** Electroferograma obtenido por secuenciación automática del fragmento de ADN que contiene una mutación. El doble pico del panel superior (paciente) indica la presencia de la mutación m.4407G>A en heteroplasmia. **C)** Detección de deleciones por la técnica de hibridación *southern*. El ADN total, digerido por la enzima de restricción *PvuII*, se sometió a electroforesis, se transfirió a una membrana de nailon 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. M, marcador de pesos moleculares. **D)** 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,  $\Delta$ ADNmt). **E)** Análisis de depleción de ADNmt por la técnica de hibridación *southern*. La técnica se realiza igual que en D), pero hibridando simultáneamente con dos sondas, una de ADNmt y otra específica del gen nuclear para el ARNr 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.

hibridando la membrana que contiene los fragmentos de ADN con sondas específicas para ADNmt y para el ARNr 18S nuclear. La relación ADNmt/ADNr nuclear indicará la posible presencia de la depleción (Fig. 4E). Actualmente se ha desechado prácticamente este método y la presencia de depleción se suele determinar de un modo mucho más rápido y que exige mucha menor cantidad de ADN, por

la técnica de PCR cuantitativo a tiempo real. Esta técnica se realiza con una sonda de ADNmt correspondiente a 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, sexo, edad, tejido, etc., por lo que se debe de realizar siempre con controles de las mismas características que la muestra del paciente. Este hecho representa una gran dificultad, ya que es muy difícil encontrar controles de individuos sanos, en particular de niños muy pequeños que son los mayores candidatos a padecer del síndrome de depleción del ADNmt.

El análisis genético-molecular del ADNmt se debería llevar a cabo cuando los ensayos clínicos, morfológicos, bioquímicos, etc., indiquen el padecimiento de una enfermedad de este tipo. Sin embargo, hoy en día, dada la rapidez con que se pueden realizar los análisis moleculares, es muy frecuente que, ante una sospecha de enfermedad mitocondrial, se secuencie completamente el ADN o se estudien solamente mutaciones concretas.

### 7.7. Diagnóstico prenatal y consejo genético

El diagnóstico prenatal y consejo genético de enfermedades causadas por defectos en el 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). Cuando una madre posee un ADNmt en heteroplasmia, es imposible predecir qué porcentaje de las moléculas mutantes heredarán sus hijos y en qué porcentaje estará presente en cada uno de los tejidos. Esto se debe a que la mutación segrega al azar a lo largo de la línea germinal materna en la que, además, se producirá un cuello de botella de forma que finalmente solo un número muy pequeño de moléculas de ADNmt darán lugar a las 150.000 que tiene el óvulo maduro. De este modo, es posible que encontremos, en una madre con heteroplasmia, óvulos con un porcentaje de moléculas dañadas que puede ir del 0 al 100%. Según el óvulo que sea fecundado, la proporción de heteroplasmia variará. Por otro lado, las mitocondrias se distribuirán entre las células hijas, que derivan del cigoto, totalmente al azar por lo que el porcentaje de moléculas mutadas también variará en los tejidos que de ellas se forman. Por ello, aunque se transmita una mutación a los hijos no se puede predecir si tendrán un fenotipo patológico. La presencia o ausencia de una mutación en vellosidades coriónicas y/o amniocitos, utilizadas para el diagnóstico prenatal, no permite deducir el porcentaje de la mutación en cerebro u otro tipo de tejidos del feto, por lo que es imposible predecir el padecimiento de la enfermedad. Por todo esto, con el estado actual de nuestros conocimientos, es desaconsejable realizar análisis prenatales.

En todo caso, cuando se ha tenido un hijo con una enfermedad mitocondrial debida a mutaciones en el ADNmt, se debe aconsejar no tener otro más. Aunque se haya tenido previamente un hijo totalmente sano, el riesgo de tener otro afectado es muy elevado.

### 8. POSIBILIDAD DE PREVENCIÓN DE TRANSMISIÓN DE MUTACIONES EN EL ADNmt ¿CON QUÉ CONTAMOS AHORA?

Cuando una mujer es portadora de una mutación patológica en el ADNmt y quiere tener más hijos, se le ofrecen una serie de posibilidades:

### 8.1. Donación de óvulos

La mujer puede entrar en un programa de donación de óvulos. Lo común es que la donadora sea sana, pero siempre sería conveniente secuenciar el ADNmt para descartar posibles mutaciones.

### 8.2. Diagnóstico prenatal o preimplantacional

En el apartado 7.7, hemos descrito los problemas que plantea el diagnóstico prenatal por las características de la genética mitocondrial. En el caso de preimplantacional, los problemas serían semejantes, el que una célula no tenga una mutación, no quiere decir que otras la tengan.

### 8.3. Trasplante de núcleos a óvulos donados (técnica de los tres padres)

La técnica consiste en obtener un óvulo de la que quiere ser madre y es portadora de una mutación en el ADNmt, extraerle el núcleo por aspiración y conservarlo. Recordemos que el ADNn será normal. Por otro lado, se obtiene un óvulo de una donadora sana, se elimina su núcleo por el mismo método y se le introduce el núcleo de la portadora de mutaciones. El resultado será un óvulo híbrido con un núcleo normal y con las mitocondrias normales de la donadora. A continuación, se fecunda este óvulo. Esta técnica se probó que funcionaba utilizando monos y, en los últimos años, ha sido aprobada por el Parlamento Británico para ser aplicada en humanos, aunque no tenemos conocimiento de que se haya utilizado, en el resto de los países está prohibida. La única vez que se ha puesto en práctica ha sido en México, donde no había legislación sobre el tema, y donde un médico americano la puso en práctica con una familia jordana que había tenido varios hijos con el síndrome de Leigh y que todos habían fallecido. Como resultado de la misma nació un niño que, hasta donde se sabe, es totalmente sano, aunque tiene un porcentaje bajo de la mutación en el ADNmt. Claramente, la técnica habrá que mejorarla para poder eliminar por completo todas las mitocondrias que se puedan arrastrar durante la aspiración del núcleo.

### 8.4. Expresión alotópica

Esta técnica consiste en diseñar *in vitro* una versión normal del gen mutado e introducirlo en el núcleo de las células afectadas. Este gen, al que se le habrá añadido una secuencia que indique que es una proteína mitocondrial y que, por lo tanto, tiene que dirigirse a la mitocondria, se expresará en el núcleo, la proteína se sintetizará en ribosomas citoplásmicos y se dirigirá a la mitocondria gracias a la secuencia señal. De esta manera, las mitocondrias dañadas podrían sustituir la proteína mutada por una normal.

Esta técnica se ha utilizado solamente en cultivos celulares dando resultados ambiguos.

## 9. GENES NUCLEARES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

Como hemos visto en este artículo, de las más de 1.158 proteínas que forman la mitocondria (MITOCARTA), solamente trece están codificadas en el ADNmt, y forman parte de OXPHOS. El resto están codificadas por el ADNn. En los últimos años, y gracias a la secuenciación de nueva generación (NGS), se han ido encontrando una serie de estos genes que causan enfermedades mitocondriales (244 hasta 2016)<sup>(90)</sup>. Estos genes han revelado nuevas rutas biológicas esenciales implicadas en enfermedades de la cadena respiratoria mitocondrial. Las consecuencias patológicas de mutaciones en el ADNn que afectan a la mitocondria son: 1) subunidades de OXPHOS;

2) mantenimiento y expresión del ADNmt; 3) biogénesis y regulación del sistema de fosforilación oxidativa (incluyendo la biosíntesis de cofactores relevante); 4) síntesis y transporte de nucleótidos; 5) composición y dinámica de las membranas; 6) defectos en las reacciones que generan sustratos (por delante de OXPHOS). Aún así, un gran grupo de estos genes no tienen todavía una función molecular definida.

El análisis de muestras de pacientes será un gran método para caracterizar e identificar nuevos genes causantes de enfermedades. Por ello, cabe esperar que la mayoría de las enfermedades mitocondriales se deban a mutaciones en este genoma y que se transmitan con un modo de herencia mendeliano. Hay también algunas enfermedades que pueden estar causadas por mutaciones tanto en el ADNm como en el nuclear. Así, a modo de ejemplo, el síndrome de Leigh puede estar producido por mutaciones en 80 genes diferentes<sup>(91)</sup>.

Otros capítulos de este libro se dedican a enfermedades mitocondriales originadas por mutaciones en genes codificados en el ADNn.

Como hemos visto, 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.

## 10. ASPECTOS RELEVANTES A TENER EN CUENTA

Se describe el sistema genético mitocondrial humano, sus características genéticas, enfermedades debidas a mutaciones en el mismo, los criterios de patogenicidad de nuevas mutaciones y posible prevención de transmisión de las mutaciones.

## 11. AGRADECIMIENTOS

Parte de los trabajos aquí descritos han sido subvencionados por: el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI17-00021; PI17-00166); Fundación Mutua Madrileña MMA17/01; Programa de *crowdfunding* Precipita-FECYT (PR194); Gobierno de Aragón (Grupos Consolidados B33\_17R) y FEDER 2014-2020 "Construyendo Europa desde Aragón"; Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI) y Asociación Todos con Javier; CIBERER es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III. Agradecemos a Santiago Morales la preparación de las figuras.

## BIBLIOGRAFÍA

- Craven L, Alston CL, Taylor RW, Turnbull DM. Recent advances in mitochondrial disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2017; 18: 257-75.
- Suomalainen A, Battersby BJ. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19: 77-92.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 1988; 242:1427-30.
- Wallace DC, Zheng X, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, Pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell.* 1988; 55: 601-10.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon E, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology.* 1988; 38: 1339-46.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 1988; 331: 717-9.

7. Ruiz-Pesini E, López-Gallardo E, Dahmani Y, Herrero MD, Solano A, Díez-Sánchez C, et al. Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Rev Neurol*. 2006; 43: 416-24.
8. DiMauro S, Hirano M, Schon EA. *Mitochondrial medicine*. Abingdon, Oxon, UK: Informa Health Care; 2006. p. 348.
9. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, et al. Prevalence of nuclear and mtDNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*. 2015; 77: 753-9.
10. Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2003; 68: 479-86.
11. Ojala D, Montoya J, Attardi G. The Putative mRNA per Subunit II of Human Cytochrome c Oxidase Starts Directly at the translation initiation codon. *Nature*. 1980; 287: 79-82.
12. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Brujin MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290: 427-65.
13. Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*. 1981; 290: 465-70.
14. Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*. 1981; 290: 470-4.
15. 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: 7195-9.
16. Montoya J, Gaines GL, Attardi G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell*. 1983; 34: 151-9.
17. Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Doolittle RF, Matsuno-Yagi A. Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA. In: Quagliariello E, Slater EC, Plamieri F, et al., eds. *Achievements and perspectives of mitochondrial research*. Amsterdam: Elsevier Sciences; 1985. p. 259-75.
18. Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757: 1179-89.
19. Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 1982; 28: 693-705.
20. Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, et al. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50961-9.
21. 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: 651-62.
22. Brown TA, Clayton DA. Genesis and wanderings: origins and migrations in asymmetrically replicating mitochondrial DNA. *Cell Cycle*. 2006; 5: 917-21.
23. 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: 1227-40.
24. 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: 391-7.
25. Fernández-Silva P, Martínez-Azorín 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: 1066-79.
26. Tiranti V, Savoia A, Forti F, Dapolito MF, Centra M, Racchi M, et al. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet*. 1997; 6: 615-25.
27. 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: 51-5.
28. Fisher RP, Clayton DA. A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem*. 1985; 260: 11330-8.
29. 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: 289-94.
30. McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds s-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 1116-25.
31. 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: 8123-30.
32. 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: 2059-68.
33. O'Brien TW. Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life*. 2003; 55: 505-13.
34. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1980; 77: 6715-9.
35. 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: 406-13.
36. Montoya J, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787: 476-83.
37. Montoya J, López-Gallardo E, Herrero-Martín MD, Martínez-Romero I, Gómez-Durán A, Pacheu D, et al. Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 652: 47-67.
38. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2008; 31: 91-123.
39. Bianco A, Bisceglia L, Russo L, Palese LL, D'Agruma L, Emperador S, et al. High mitochondrial DNA copy number is a protective factor from vision loss in heteroplasmic Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 58: 2193-7.
40. Bianco A, Martínez-Romero I, Bisceglia L, D'Agruma L, Favia P, Ruiz-Pesini E, et al. Mitochondrial DNA copy number differentiates the Leber's hereditary optic neuropathy affected individuals from the unaffected mutation carriers. *Brain*. 2016; 139 (pt1): e1.
41. Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, et al. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011; 134: 220-34.
42. Andreu A, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1037-44.
43. Solano A, Gámez J, Carod FJ, Pineda M, Playan A, López-Gallardo E, et al. Characterisation of repeat and palindrome elements in patients harbouring single deletions of mitochondrial DNA. *J Med Genet*. 2003; 40: e86.
44. Elpeleg O. Inherited mitochondrial DNA depletion. *Pediatr Res*. 2003; 54: 1-7.
45. Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20: 429-37.
46. Vu TH, Sciacco M, Tanji K, Nichter C, Bonilla E, Chatkupt S, et al. Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion. *Neurology*. 1998; 50: 1783-90.
47. Morten KJ, Ashley N, Wijburg F, Hadzic N, Parr J, Jayawant S, et al. Liver mtDNA content increases during development: A comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion*. 2007; 7: 386-95.
48. Lee NC, Dimmock D, Hwu WL, Tang LY, Huang WC, Chinault AC, et al. Simultaneous detection of mitochondrial DNA depletion and single-exon deletion in the deoxyguanosine gene using array-based comparative genomic hybridisation. *Arch Dis Child*. 2009; 94: 55-8.

49. 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: 342-4.
50. Mancuso M, Salvati L, Sacconi S, Otaegui D, Camano P, Marina A, et al. Mitochondrial DNA depletion - Mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology.* 2002; 59: 1197-202.
51. Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, Bitner-Glindzic M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, et al. Deficiency of the ADP-Forming Succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet.* 2005; 76: 1081-6.
52. Mazziotta MRM, Ricci E, Bertini E, Vici CD, Servidei S, Burlina AB, et al. Fatal infantile liver failure associated with mitochondrial DNA depletion. *J Pediatr.* 1992; 121: 896-901.
53. Mandel H, Hartman C, Berkowitz D, Elpeleg ON, Manov I, Iancu TC. The hepatic mitochondrial DNA depletion syndrome: Ultrastructural changes in liver biopsies. *Hepatology.* 2001; 34: 776-84.
54. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol.* 2004; 55: 706-12.
55. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, et al. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet.* 2006; 38: 576-82.
56. Spinazzola A, Viscomi C, Fernández-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, et al. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2006; 38: 570-5.
57. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, et al. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2007; 39: 776-80.
58. Hakonen AH, Isohanni P, Paetau A, Herva R, Suomalainen A, Lonnqvist T. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain.* 2007; 130: 3032-40.
59. Sarzi E, Goffart S, Serre V, Chretien D, Slama A, Munnich A, et al. Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol.* 2007; 62: 579-87.
60. Herrero-Martin MD, Pineda M, Briones P, López-Gallardo E, Carreras M, Benac M, et al. A new pathologic mitochondrial DNA mutation in the cytochrome oxidase subunit I (MT-CO1). *Hum Mutat.* 2008; 29: e103-11.
61. Martínez-Romero I, Herrero-Martin MD, Llobet L, Emperador S, Martín-Navarro A, Narberhaus B, et al. New MT-ND1 pathologic mutation for Leber hereditary optic neuropathy. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2014; 42(9): 856-64.
62. 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: 331-8.
63. King MP, Attardi G. Injection of mitochondria in human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell.* 1988; 52: 811-9.
64. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 1989; 246: 500-3.
65. Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, et al. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science.* 2008; 319: 958-62.
66. 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: 381-7.
67. DeBenedictis G, Rose G, Carrieri G, DeLuca M, Falcone E, Passarino G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J.* 1999; 13: 1532-6.
68. Van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Amer J Hum Genet.* 2003; 72: 804-11.
69. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Álvarez E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 682-96.
70. Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005; 70: 363-74.
71. 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.
72. Torroni A, Campos Y, Rengo C, Sellitto D, Achilli A, Magri C, et al. Mitochondrial DNA haplogroups do not play a role in the variable phenotypic presentation of the A3243G mutation. *Amer J Hum Genet.* 2003; 72: 1005-12.
73. 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: 223-6.
74. Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: Longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *PNAS.* 2003; 100: 2174-6.
75. Dimauro S, Garone C. Historical perspective on mitochondrial medicine. *Dev Disabil Res Rev.* 2011; 16: 106-13.
76. Koene S, Smeitink J. Mitochondrial medicine. *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34: 247-8.
77. Suomalainen A. Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34: 277-82.
78. Rodenburg RJ. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34: 283-92.
79. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet.* 2012; 13: 878-90.
80. Munnich A, Rotig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP, et al. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inherited Metab Dis.* 1996; 19: 521-7.
81. DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, eds. *Boston The molecular and genetic basis of neurological diseases.*: Butterworth-Heinemann; 1998. p. 201-35.
82. Pineda M, Ormazábal A, López-Gallardo E, Nascimento A, Solano A, Herrero MD, et al. Cerebral folate deficiency and leukoencephalopathy caused by a mitochondrial DNA deletion. *Ann Neurol.* 2006; 59: 394-8.
83. García-Cazorla A, Quadros EV, Nascimento A, García-Silva MT, Briones P, Montoya J, et al. Mitochondrial diseases associated with cerebral folate deficiency. *Neurology.* 2008; 70: 1360-2.
84. 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: 529-33.
85. Loeffen JLCM, Smeitink JAM, Trijbels JMF, Janssen AJM, Triepels RH, Sengers RCA, et al. Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat.* 2000; 15: 123-34.
86. Budde SMS, van den Heuvel LPWJ, Janssen AJ, Smeets RJP, Buskens CAF, De Meirleir L, et al. Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275: 63-8.
87. Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* 1991; 199: 223-31.
88. Schagger H, Bentlage H, Ruitenbeek W, Pfeiffer K, Rotter S, Rother C, et al. 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: 709-14.
89. Grandier-Vazeille X, Guerin M. Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal Biochem.* 1996; 242: 248-54.
90. Mayr JA, Haack TB, Freisinger P, Karall D, Makowski C, Koch J, et al. Spectrum of combined respiratory chain defects. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38: 629-40.

91. Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol*. 2015; 79: 190-203.
92. Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, et al. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial NDI mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet*. 1991; 49: 939-50.
93. 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: 1147-53.
94. Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 187: 1551-7.
95. Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*. 1990; 46: 428-33.
96. 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: 410-2.
97. Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, Devivo DC, Dimauro S. The mutation at Nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Ann Neurol*. 1993; 34: 827-34.
98. 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: 124-8.
99. Thyagarajan D, Shanske S, Vázquez Memije M, Devivo D, Dimauro S. A novel mitochondrial ATPase 6-point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol*. 1995; 38: 468-72.
100. Carrozzo R, Tessa A, Vázquez Memije ME, Piemonte F, Patrono C, Malandrini A, et al. The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology*. 2001; 56: 687-90.
101. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathies. *Nature*. 1990; 348: 651-3.
102. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) are associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu</sup> mutation. *Cell*. 1990; 61: 931-7.
103. Van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Gerbitz KD, Maassen JA. Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD): a distinct subtype of diabetes associated with mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene point mutation. *Muscle Nerve*. 1995; 18: 324-30.
104. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu XD, Oztas S, Qiu WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*. 1993; 4: 289-94.
105. 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: 1293-9.
106. Carod-Artal FJ, López-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: 457-60.
107. 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: 309-11.
108. Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Bordoni A, Pannacci M, Amati P, et al. Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: A new autosomal dominant disease. *Am J Hum Genet*. 1990; 47: 904-14.
109. Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lonqvist J, Savontaus ML, et al. 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: 61-6.
110. 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: 1329-34.
111. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*. 1998; 51: 1525.
112. Carod-Artal F, López-Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Herrero M, Montoya J. Mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurología*. 2006; 21: 357-64.
113. Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM, et al. Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet*. 1989; 1: 902-3.



