



STVDIVM  
GENERALE  
CAESARAV-  
GVSTANAE  
CIVITATIS

COLECCIÓN PARANINFO  
SAN BRAULIO 2010



DEL GENOMA MITOCONDRIAL A LA ENFERMEDAD · JULIO MONTOYA VILLARROYA

# DEL GENOMA MITOCONDRIAL A LA ENFERMEDAD

Julio Montoya Villarroya



STVDIVM  
GENERALE  
CAESARAV-  
GVSTANAE  
CIVITATIS

  
Prensas Universitarias de Zaragoza





DEL GENOMA MITOCONDRIAL  
A LA ENFERMEDAD



DEL GENOMA MITOCONDRIAL  
A LA ENFERMEDAD

Julio Montoya Villarroya

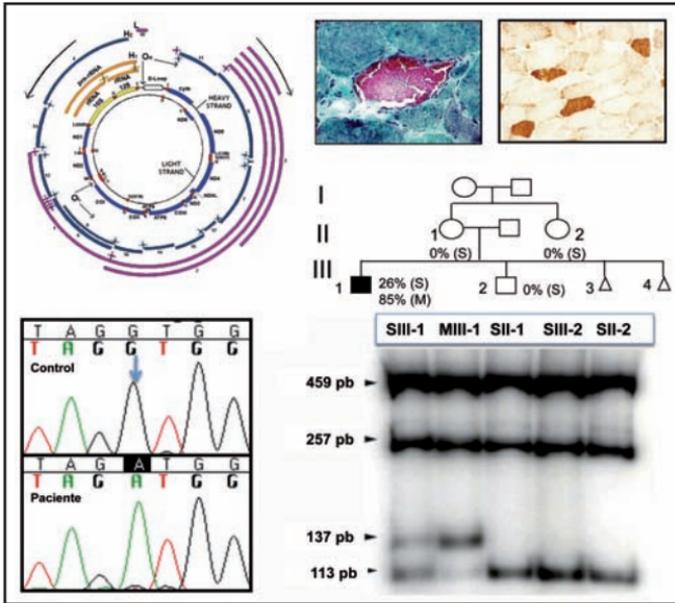


Prensas Universitarias de Zaragoza

- © Julio Montoya Villarroya
- © De la presente edición, Prensas Universitarias de Zaragoza  
1.ª edición, 2010

Prensas Universitarias de Zaragoza  
Edificio de Ciencias Geológicas  
c/ Pedro Cerbuna, 12 • 50009 Zaragoza, España  
Tel.: 976 761 330. Fax: 976 761 063  
puz@unizar.es <http://puz.unizar.es>

Impreso en España  
Imprime: INO Reproducciones  
ISBN: 978-84-92774-85-2  
Depósito legal: Z-855-2010



*Del genoma mitocondrial al diagnóstico de una enfermedad*

(Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E.

Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future.  
 Biochem Biophys Acta. 2006;1757:1179-89)



Cuando el Excelentísimo Sr. Rector de la Universidad de Zaragoza, Prof. Manuel J. López Pérez, me invitó a pronunciar la Alocución Laudatoria que, con motivo de la festividad de su patrón san Braulio, tiene lugar en el Paraninfo cada 26 de marzo, no tuve duda de que representaba una magnífica oportunidad de mostrar a las autoridades, compañeros de claustro, alumnos y ciudadanos presentes una visión de un tema de candente actualidad como es el genoma humano. En particular, sobre el genoma mitocondrial, del que desde 1983 se conocen todos los genes que codifica, su organización genética, modo de expresión, etc., y sobre el que nuestro grupo de investigación lleva más de treinta años trabajando.

El tema de la genética, y en concreto del genoma, produce posiciones encontradas en la sociedad: a unos les apasiona por la posibilidad de conocer las causas de las enfermedades genéticas y su eventual curación a través de la terapia génica, y a otros les asusta o preocupa grandemente por lo que supone el poder manipularlo en el laboratorio. En todo caso, creo que el tema interesa y que se debe informar de él.

A las enfermedades genéticas, de las que se conocen más de seis mil, se ha llegado por dos caminos diferentes

según el genoma que las produce. Así, en lo que se refiere al genoma nuclear, se conocían las enfermedades, pero, excepto en algunos casos concretos, no se sabía el gen ni las mutaciones que las producían; sin embargo, en el caso del genoma mitocondrial se llegó a conocer su secuencia completa, los genes que codifica y el modo de expresión varios años antes de que se encontrase una enfermedad que estuviese originada por daños en el mismo. El descubrimiento de una de las características más particulares del genoma mitocondrial, como es su herencia exclusivamente materna, permitió iniciar la búsqueda de enfermedades que presentaran este modo de herencia no mendeliana, y en 1988 se describieron, casi simultáneamente, tres enfermedades. Desde entonces se habla de una medicina mitocondrial por los caracteres peculiares que presentan las enfermedades debidas a daños en este genoma.

Asimismo, el genoma mitocondrial se está utilizando como herramienta para el estudio de la evolución humana, para la identificación de individuos y, últimamente, para estudios de farmacogenética.

# I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares derivados de la endosimbiosis de un organismo del grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias con un ancestro de las células eucariotas que contenía un núcleo. A lo largo de la evolución, la mayor parte de los genes de la protomitocondria original se transfirieron al núcleo y los únicos genes que han permanecido en la mitocondria están asociados a la función de síntesis de energía, en forma de trifosfato de adenosina (ATP), a través del sistema de fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS). Por ello, muy frecuentemente, se describe a las mitocondrias como «las centrales energéticas de la célula», puesto que en ellas se produce la mayor parte de ATP que necesita la célula y que se utiliza como fuente de energía química. Estos orgánulos subcelulares se encuentran en prácticamente todas las células eucariotas (1).

La presencia de las mitocondrias, con un sistema respiratorio muy especializado, es, además, una de las características que diferencian las células eucariotas de las procariontas. Como se ha indicado, la principal función de las mitocondrias es la fosforilación oxidativa mediante la cual se conserva en forma de ATP la energía química que se libera en la oxidación de las moléculas orgánicas com-

bustibles. La cadena respiratoria transporta electrones entre los complejos respiratorios para finalmente reducir el oxígeno a agua. A la vez, los protones se translocan desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico que será utilizado por la ATP sintasa, reconduciendo estos protones a la matriz, para producir ATP. Parte de la energía producida por el transporte de electrones se libera en forma de calor y una fracción de los electrones reacciona tempranamente con el oxígeno produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS).

Pero además de proporcionar la mayor parte de la energía que utiliza la célula, las mitocondrias participan también en otras muchas rutas metabólicas (biosíntesis de pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, hemo, urea y una gran variedad de metabolitos) (2) y en una serie de procesos, como la diferenciación celular, señalización, muerte celular, control del ciclo y crecimiento celular (3).

La característica más singular de las mitocondrias es la de poseer un sistema genético propio con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene en proteínas funcionales. Sin embargo, las mitocondrias no son del todo autónomas, ya que dependen en gran medida del sistema genético nuclear, tanto para la formación del orgánulo como para la expresión de su sistema genético. La mayoría de las proteínas componentes de la mitocondria, incluidas aquellas necesarias para la expresión de su genoma, están codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citoplasma, generalmente en forma de precursores, y finalmente se importan y procesan en el interior del orgánulo. Por el contrario, el genoma mitocondrial codifica solamente un pequeño

número de polipéptidos componentes del sistema OXPHOS y los RNA necesarios para la síntesis de los mismos. Así, la biogénesis de las mitocondrias, y en concreto del sistema OXPHOS, representa un caso muy particular en la célula, ya que su formación depende de la contribución de los sistemas genéticos, nuclear y mitocondrial.

Los primeros indicios de existencia de un sistema genético en el citoplasma, fuera del núcleo, datan de 1949 al descubrirse unos mutantes de levadura con deficiencias en las funciones respiratorias que se debían a un factor citoplásmico, no nuclear, y que era hereditario (4). Sin embargo, el DNA mitocondrial (mtDNA) no se descubrió hasta los años sesenta en células de pollo (5); unos años más tarde se describió su existencia en células humanas (6) y, pocos años después, Attardi demostró que era funcional, es decir, que se transcribía en RNA (7,8) y que este se traducía en proteínas en ribosomas mitocondriales (9,10), constituyendo, de este modo, el segundo sistema genético de la célula.

Los años ochenta fueron decisivos para el conocimiento de la estructura y función de este sistema genético (11,12). Así, se pudo comprobar que el genoma mitocondrial presenta una serie de características únicas, como son el modo de organización y de expresión génica, la utilización de un código genético modificado, su presencia en poliploidía, la herencia materna, una alta velocidad de mutación, etc. Todo este conocimiento sirvió de base para que en 1988 se descubrieran las primeras mutaciones que producían enfermedades genéticas mitocondriales (13-15). Desde este descubrimiento, el estudio de la bioenergética y genética mitocondrial ha adquirido nuevas dimensiones. Hoy en día se conoce un buen número de mutaciones en el

mtDNA que se han asociado con diversas enfermedades degenerativas producidas por deficiencias bioenergéticas, y se han relacionado también con el envejecimiento y enfermedades asociadas a la edad, dando lugar al nacimiento de lo que se conoce como «medicina mitocondrial» (16,17).

## EL SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL HUMANO

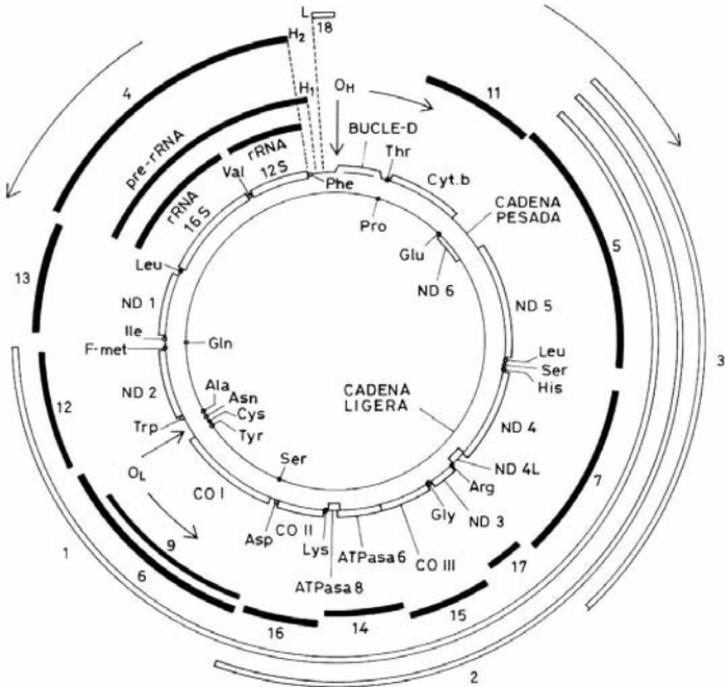
### 2.1. Organización genética

El DNA mitocondrial (mtDNA) humano está formado por moléculas de DNA circulares, cerradas y superenrolladas que están presentes en la matriz mitocondrial. Las células humanas contienen cientos de mitocondrias y cada una de ellas engloba de 2 a 10 moléculas de DNA (poliploidía) asociadas con proteínas que forman unos complejos conocidos como *nucleoides* (18,19). Sin embargo, el mtDNA constituye solamente entre un 0,3 y un 0,5 % del DNA celular total.

El mtDNA humano consta de 16569 pares de bases, cuya secuencia se conoce en su totalidad (20,21). Este DNA contiene información para solamente 37 genes: 2 RNA ribosómicos componentes de los ribosomas mitocondriales (rRNA 12S y 16S), 22 RNA de transferencia (tRNA) empleados en la traducción de los RNA mensajeros (mRNA) y 13 polipéptidos integrantes de los complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS: 7 (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6) de los 46 polipéptidos del complejo I o NADH:ubiquinona oxidoreductasa; 1 (cytb) de los 11 polipéptidos del complejo III o ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa; 3 (COI, II, III) de los 13 del complejo IV o citocromo c oxidasa; y 2 (ATP6 y 8) de los 16 de la ATP sintasa (complejo V) (figura 1).

Figura 1

MAPA GENÉTICO Y DE TRANSCRIPCIÓN DEL DNA MITOCONDRIAL HUMANO



Los dos círculos interiores representan las dos cadenas del DNA mitocondrial, en las que se indican los genes que codifican: rRNA (rRNA 12 S y 16 S), tRNA, mostrados con la abreviatura del aminoácido que les corresponde, y secuencias codificadoras de proteínas (ND: subunidades de NADH deshidrogenasa; cyt b: apocitocromo b; CO: subunidades de la citocromo C oxidasa). Los RNA que se transcriben se representan en los círculos exteriores con barras negras (transcritos de la cadena pesada) y con barras abiertas (transcritos de la cadena ligera).  $H_1$ ,  $H_2$  y L indican los lugares de iniciación de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente.  $O_H$  y  $O_L$  simbolizan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera, de acuerdo con el modelo de desplazamiento de hebra. Las flechas exteriores indican la dirección de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente, y las que están al lado de  $O_H$  y de  $O_L$  muestran la dirección de síntesis de la cadena pesada y ligera del DNA.

Una de las características más llamativas del mtDNA es la organización extremadamente compacta de los genes que codifica. Como se observa en la figura 1, donde se muestra el mapa genético y de transcripción del mtDNA humano, este se encuentra prácticamente ocupado por genes dispuestos en las dos cadenas. En particular, la cadena pesada (H) está saturada por genes que codifican los 2 rRNA, 14 tRNA y 12 polipéptidos, mientras que la cadena ligera (L) contiene información únicamente para 8 tRNA y un polipéptido (ND6). Solamente hay una pequeña zona no codificante, de aproximadamente 1200 bp, en la que se encuentran el origen de replicación de la cadena H ( $O_H$ ), los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión del mtDNA. A pesar de que los genes se disponen en ambas cadenas del DNA, no existe solapamiento entre ellos. Sin embargo, en la cadena pesada hay un solapamiento de los patrones de traducción de las subunidades 6 y 8 de la ATPasa (46 nt) y de ND4 y 4L (7 nt) (20).

El grado de compactación es tal que en la cadena pesada los genes se disponen uno a continuación del otro, sin o con solo 1 a 3 nucleótidos intermedios; carece, por tanto, de tramos no codificantes y de intrones. Además, la mayor parte de genes codificantes de proteínas carecen de un codón de terminación, que se formará, después de la transcripción, mediante la poliadenilación de la U o UA situadas en el extremo 3' de los mensajeros (11). De algún modo, se ha llegado a un modelo de extraordinaria economía donde lo superfluo se ha eliminado.

Otra de las características peculiares de la organización genética del DNA mitocondrial es la distribución más o menos homogénea de los genes de los tRNA a lo largo de la secuencia del DNA. En la cadena pesada, estos

se encuentran separando casi con absoluta regularidad los otros genes (tanto los rRNA como los codificantes de proteínas). Esta disposición tiene consecuencias muy importantes para el procesamiento del RNA, como indicaremos más adelante, e implica una doble función de los tRNA en este sistema genético.

## 2.2. Replicación del DNA mitocondrial

En los años setenta se propuso un modelo de replicación del mtDNA basado fundamentalmente en los resultados de microscopía electrónica obtenidos en el laboratorio de Jerome Vinograd (22,23). Este modelo ha estado en vigor durante más de treinta años hasta que recientemente se ha propuesto otro modelo, basado en técnicas electroforéticas en dos dimensiones, que estaría más próximo al descrito en bacterias. La controversia ha llegado hasta nuestros días, aunque parece que los defensores de cada uno de ellos están poniéndose de acuerdo.

a) *El modelo de desplazamiento de hebra.* De acuerdo con este modelo, la replicación del mtDNA es unidireccional y asimétrica. Las dos hebras del mtDNA se replicarían, de forma continua, a partir de dos orígenes de replicación diferentes, uno para la cadena pesada ( $O_H$ ), localizado en la región del bucle-D, y otro para la cadena ligera ( $O_L$ ), situado entre los genes de los tRNA<sup>Cys</sup> y tRNA<sup>Asn</sup>, dos tercios más allá del primero (24), desplazando una de las hebras del DNA parental durante la síntesis de la hebra H.

Este proceso comenzaría con la síntesis de un RNA por la acción de la RNA polimerasa mitocondrial (RNA-pol). Para que esta pueda acceder al DNA molde y comience la replicación del mtDNA, se requiere un cambio conformacional en la molécula de DNA, que consiste en su inclinación y desenrollado inducido por la unión

del factor de transcripción mtTFA (TFAM) al dúplex de DNA. Una topoisomerasa de tipo I, específica de organelo, relaja entonces el DNA superenrollado rompiendo temporalmente enlaces en el esqueleto del DNA, y la helicasa mitocondrial desenrolla la doble hebra, rompiendo los enlaces de hidrógeno que mantienen ambas cadenas juntas, para producir moldes de hebra única. Una proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB) mantiene la integridad de los intermediarios replicativos previniendo su renaturalización y acelera la velocidad de síntesis de DNA.

Para el cebado de la replicación, la RNAPol transcribe el DNA empezando en el promotor de la hebra L. La transición de síntesis de RNA a síntesis de DNA se produce en una región donde se encuentran tres elementos de secuencia conservada CSB1, 2 y 3 (25,26) e incluye la acción de una endorribonucleasa específica, RNasa MRP. Este enzima corta el RNA en unos lugares específicos originando un extremo 3' que actúa como sustrato para su extensión por la DNA polimerasa (DNAPol gamma – POLG).

En primer lugar se sintetiza un segmento corto de cadena H (DNA 7S de 680 nt) (27), que permanece unido al DNA molde, desplazando la cadena H y formando el bucle-D. Este segmento, que termina prematuramente en una secuencia conocida como *secuencia asociada a la terminación* (TAS), puede constituir un intermedio de la replicación sintetizado muy tempranamente o puede representar un producto abortado de la replicación. La mayor parte de las moléculas de DNA 7S no están implicadas en la replicación. No se sabe si la elongación de la replicación se produce prolongando estas moléculas preformadas de DNA o si requiere un nuevo inicio del ciclo. Parece que los niveles de terminación de

la replicación desempeñan un papel importante en la regulación del número de copias de mtDNA (Kai et al., 1999; Brown et al., 2002). La terminación prematura de la replicación provoca la aparición de una estructura conocida como *bucle de desplazamiento* (D-loop), que consta de la porción de DNA dúplex recién sintetizada más la hebra H parental desplazada.

Cuando la hebra H naciente es capaz de pasar a través de la región de terminación prematura, su elongación continúa de forma unidireccional hasta que, después de recorrer dos tercios de la molécula, encuentra el origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ). En este momento se desplaza una secuencia de la hebra H parental capaz de establecer una estructura lazo-tallo ( $O_L$ ), que sirve como región de reconocimiento de una primasa, específica de mitocondrias, que sintetizará un cebador corto de RNA. Posteriormente, la POLG alargará la cadena de forma unidireccional y en sentido contrario al de la hebra H naciente (23,24). Al final del proceso de replicación, la topoisomerasa de tipo II introduce los superenrollamientos que mantendrán la molécula en un estado funcional. En este modelo de replicación asimétrica, la síntesis de DNA es continua en ambas hebras y carece de fragmentos de Okazaki.

b) *El modelo de replicación bidireccional y simétrica.* La investigación sobre los procesos fundamentales que tienen lugar en la mitocondria no se puede dar por concluida. Recientemente se ha puesto en duda el modelo de replicación de desplazamiento de la hebra y, basándose en una técnica que utiliza geles bidireccionales, se ha propuesto que el mtDNA se replica de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza del DNA bacteriano (28,29). Este nuevo modelo, que está tomando bastante fuerza, no explica

todavía la mayoría de datos que hasta ahora se habían obtenido mediante interpretación del modelo anterior.

### **2.3. Transcripción del mtDNA humano**

El modo de expresión de la información codificada en el mtDNA fue establecido a comienzos de los ochenta en el laboratorio del Dr. Giuseppe Attardi en el Instituto de Tecnología de California. Así, mediante la aplicación de la técnica de protección a la nucleasa S1 y la secuenciación de todos los RNA mitocondriales, Montoya y Ojala construyeron un mapa detallado de transcripción del DNA mitocondrial humano y dieron a conocer un modelo de transcripción y de procesamiento de RNA por «puntuación por los tRNA» (30-35) (figura 1). El análisis del mapa muestra que la organización compacta de los genes en el DNA se vuelve a reflejar en la organización de los productos de transcripción. Todos los RNA son colineales con el DNA, lo que indica la ausencia de intrones, y, a excepción de la región del bucle-D, la cadena pesada del DNA se encuentra completamente ocupada por los rRNA, tRNA y mRNA.

De acuerdo con este modelo, la transcripción del mtDNA se inicia a partir de tres promotores diferentes (34), uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada ( $H_1$  y  $H_2$ ), que dan lugar a tres moléculas policistrónicas largas que se procesan por cortes endonucleolíticos precisos justo delante y detrás de los tRNA. Estos, actuando como señales de reconocimiento para los enzimas de procesamiento, al adquirir la configuración en hoja de trébol en las cadenas nacientes de RNA, dan lugar a los rRNA, tRNA y mRNA maduros (32-36) (figura 1).

Así, la cadena pesada se transcribe mediante dos unidades de transcripción solapadas en la región de los

rRNA (35). La primera, que se transcribe muy frecuentemente, comienza en el lugar de iniciación  $H_1$ , situado por delante del gen tRNA<sup>Phe</sup>, termina en el extremo 3' del gen para el rRNA 16S y es responsable de la síntesis de los rRNA 12S y 16S, del tRNA<sup>Phe</sup> y del tRNA<sup>Val</sup>. Un factor de terminación (mTERF) actúa uniéndose en el gen del tRNA<sup>Leu</sup>, en una secuencia inmediatamente posterior al gen del rRNA 16S (37-41). El segundo proceso de transcripción, mucho menos frecuente que el anterior, comienza en el punto de iniciación  $H_2$ , cerca del extremo 5' del gen rRNA 12S y a unos 90-100 pb del anterior, se extiende más allá del extremo 3' del gen rRNA 16S y produce un RNA policistrónico que corresponde a casi toda la cadena pesada. Los mRNA de los 12 péptidos y de 12 tRNA, codificados en esta cadena, se originan por procesamiento de este RNA policistrónico. Del mismo modo, la cadena ligera se transcribe mediante una única unidad de transcripción que empieza en el lugar de iniciación L, cerca del extremo 5' del RNA 7S (poli(A)-RNA 18) (42), dando lugar a 8 tRNA y al único mRNA (ND6) codificado en esa cadena. Como se ha indicado anteriormente, el inicio de la síntesis de DNA depende también de la actividad de esta unidad de transcripción que sintetiza el cebador de la replicación.

Para llevar a cabo el proceso de transcripción se necesita una RNA polimerasa específica (h-mtRPOL), codificada en el DNA nuclear (nDNA) (43,44), dos factores de transcripción implicados en la iniciación (mtTFA y mtTFB) (45,46), y uno de terminación (mTERF) (37,39-41), todos ellos codificados en el DNA nuclear. Asimismo, en el procesamiento de los RNA precursores deben estar implicadas, al menos, cuatro actividades enzimáticas: dos actividades que corten con precisión en los extremos 5' y 3' de los tRNA, una tercera que proporcione la

poliadenilación y finalmente una cuarta actividad enzimática que añade el triplete -CCA al extremo 3' de los tRNA. Dadas las características de los genes mitocondriales, los cortes endonucleolíticos se tienen que producir con extraordinaria precisión, exactamente en los extremos 5' y 3' de los tRNA, para que en el RNA anterior a dicho tRNA se origine por poliadenilación el codón de terminación, y para que el RNA posterior empiece por el codón de iniciación. Se ha aislado una actividad de RNasa P de células HeLa que actúa en el procesamiento de los transcritos generando el extremo 5' de los tRNA (47,48). Esta actividad, denominada *mt-RNasa P*, tiene un componente de RNA esencial para su función.

Como se deduce del modelo anterior, las dos cadenas del DNA se transcriben completa y simétricamente (figura 1), y los productos de transcripción del DNA mitocondrial humano aislados incluyen los 2 rRNA (rRNA 12S y 16S), su precursor, los 22 tRNA y 18 RNA poliadenilados en el extremo 3' (poli(A)-RNA), la mayoría de los cuales corresponden a los RNA mensajeros (mRNA) (35). La mayor parte de los RNA maduros corresponden a un único gen. Sin embargo, dos de ellos, los mRNA de los genes para las subunidades 6 y 8 de la ATP sintasa y ND4 y 4L, contienen dos genes cada uno con el marco de lectura solapado. Los tres poli(A)-RNA mayores (RNA 1, 2 y 3) y el menor (RNA 18), así como 8 tRNA, son productos de transcripción de la cadena ligera del DNA mitocondrial, mientras que el resto lo son de la cadena pesada (figura 1).

El análisis estructural de los RNA mitocondriales mostró características únicas. Así, los rRNA se caracterizan por estar metilados, aunque el grado de metilación es más bajo que el de los rRNA citoplásmicos, y por estar oligoadenilados en su extremo 3' con 1 a 10 adeninas no codificadas

en el DNA (42). Los tRNA, en general más pequeños que sus homólogos del citoplasma, tienen un tamaño que varía entre 59 y 75 nt y su estructura presenta numerosas desviaciones con respecto al modelo considerado como invariable de los sistemas no mitocondriales. De este modo, la mayoría de los tRNA carecen de los nucleótidos constantes y el tamaño del bucle «DHU» varía considerablemente, llegando incluso a desaparecer en el tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>. Aparte del -CCA del extremo 3', no codificado en el DNA, la única región que ha conservado las características generales de los tRNA es la región del anticodón. Con la excepción del tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>, todos los tRNA mitocondriales pueden plegarse en la característica hoja de trébol. Sin embargo, parece que estos tRNA se estabilizan con menos interacciones terciarias que los tRNA citoplásmicos.

Los 13 polipéptidos codificados en el mtDNA tienen un tamaño que varía entre 70 y 610 aminoácidos. Los mRNA que los codifican contienen exclusivamente la secuencia del patrón de traducción y una cola de unas 55 adenosinas en el extremo 3'. Los mRNA mitocondriales humanos comienzan directamente por el codón de iniciación AUG, AUA o AUU, o tienen muy pocos nucleótidos (1 a 3) delante de ellos. Carecen, por tanto, de uno de los caracteres típicos de los mRNA de otros sistemas, como es la presencia de un tramo no codificante en el extremo 5' (33). Tampoco contienen la capucha en el extremo 5'. Asimismo, el extremo 3' de la mayor parte de los mRNA carece de una región no codificante y finaliza U o UA, generándose el codón de terminación completo (UAA) por la poliadenilación postranscripcional (32). Estos mRNA carecen de una secuencia indicadora de poliadenilación.

El modelo de transcripción descrito muestra como la iniciación desempeña un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y explica el modo de

síntesis diferencial de los rRNA y mRNA (35). En esta regulación parece tener también un papel muy importante la fosforilación del factor de terminación mTERF (40,49).

#### **2.4. Traducción de los mRNA mitocondriales**

Los mRNA mitocondriales traducen su mensaje genético en el interior de las mitocondrias mediante un sistema de traducción propio. En humanos, los componentes de los ribosomas mitocondriales están codificados por los dos sistemas genéticos de la célula: los rRNA por el mtDNA y las proteínas por el genoma nuclear. Los ribosomas mitocondriales poseen un coeficiente de sedimentación de 55S, con subunidades de 28S y 39S, y mantienen aproximadamente la misma masa que los ribosomas bacterianos. El contenido en RNA es aproximadamente la mitad del de ribosomas de *E. coli*, pero se compensa con la incorporación de un mayor número de proteínas (52 en la subunidad grande y 33 en la pequeña) (50). La mitocondria no posee el rRNA 5S, común en otros tipos de ribosomas, pero en el extremo 3' de rRNA 16S humano hay una secuencia de 23 nt que presenta una homología del 48% con la secuencia del rRNA 5S de *Bacillus subtilis* (51). Por otra parte, el código genético utilizado por la mitocondria es algo diferente del código universal. Así, el codón UGA actúa como codificante de triptófano, en lugar de ser uno de los codones de terminación. Asimismo, además de AUG, la mitocondria humana utiliza AUA y AUU como codones de iniciación, mientras que AGA y AGG, codones de arginina en el código universal, son señales de terminación. Estas u otras alteraciones semejantes se han encontrado en las mitocondrias de todos los organismos estudiados.

Asimismo, la mitocondria presenta un modelo de reconocimiento de codones inusual, que permite la lectura del código genético con un número de tRNA menor del requerido para el código universal. El análisis de la secuencia completa del mtDNA humano ha mostrado la existencia de solo 22 genes para tRNA, que pueden, sin embargo, leer todo el código genético mitocondrial (20). El nuevo mecanismo implica la interacción de «dos de cada tres» bases entre el codón y el anticodón. De esta manera, cada una de las 8 familias del código con 4 codones para un aminoácido determinado se leería por un solo tRNA, y no por dos, como en el sistema de reconocimiento del código universal. En todos los casos, estos tRNA tienen una U en la primera posición del anticodón que puede emparejarse con las 4 bases de la tercera posición de los codones de cada familia. En las otras 6 familias se siguen utilizando 2 tRNA para leer los 4 codones, de forma que los del tipo  $\text{NNA}^{\text{A}}\text{G}$  son reconocidos por tRNA con una U modificada en la primera posición del anticodón, y los del tipo  $\text{NNU}^{\text{C}}$  lo son por los tRNA con una G en dicha posición del anticodón. De esta forma, bastarían 24 tRNA para traducir el código genético mitocondrial. La ausencia de los codones AGG y AGA y la falta de un tRNA para ellos, junto con el hecho de que un solo gen para el tRNA<sup>Met</sup> pueda originar también, mediante modificaciones secundarias, el tRNA<sup>F-Met</sup>, hacen que un total de 22 genes sean suficientes para todos los tRNA necesarios para la síntesis de proteínas codificadas en el orgánulo.

Para la traducción del mensaje genético, la mitocondria utiliza una serie de factores de traducción específicos, todos ellos codificados también en el núcleo.

Los polipéptidos sintetizados en los ribosomas mitocondriales forman parte del sistema OXPHOS y tienen

que interaccionar, ensamblarse, con las proteínas componentes de este sistema que están codificadas en el DNA nuclear (nDNA), y que, después de ser sintetizadas por ribosomas citoplásmicos, tienen que ser importadas al interior de la mitocondria para producir el sistema OXPHOS completo. Por lo tanto, la biogénesis de este sistema depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear, lo que representa un caso único en la célula.

## **2.5. Regulación de la expresión del mtDNA**

A pesar del amplio conocimiento que se ha llegado a adquirir sobre el mtDNA y su expresión, se tiene muy poca información acerca de la regulación de su expresión y de la coordinación con la expresión del genoma nuclear. Con el fin de avanzar en este conocimiento, nuestro grupo puso a punto una nueva aproximación metodológica utilizando mitocondrias aisladas intactas como modelo de trabajo *in vitro*. Esta técnica permitía trabajar con mitocondrias libres de la influencia del núcleo-citoplasma y, por tanto, estudiar la acción directa de distintos efectores sobre la transcripción mitocondrial. En primer lugar se comprobó que las mitocondrias aisladas transcriben el mtDNA y procesan el RNA de un modo similar a como sucede *in vivo*. Con este modelo se ha demostrado que las mitocondrias son capaces de mantener su capacidad transcripcional durante varias horas después de ser aisladas de su entorno celular, y de modular la transcripción en respuesta a situaciones fisiológicas tales como la demanda energética celular, la falta de aporte de factores citoplásmicos u hormonas (52,53). En particular, se ha demostrado que las hormonas tiroideas tienen un efecto directo sobre la transcripción mitocon-

drial regulando los niveles de mRNA y rRNA mediante la selección del lugar de iniciación de la transcripción en  $H_1$  o  $H_2$  (53). Asimismo, se ha visto que la regulación post-transcripcional de la expresión génica mitocondrial incluye el procesamiento de los transcritos primarios (52,54) y la estabilidad diferencial de los transcritos maduros (52,55). Como se ha indicado, la regulación transcripcional puede realizarse a nivel de iniciación, pero también a nivel de terminación del proceso. En este último aspecto, se ha demostrado que el control de la síntesis de rRNA se verifica también por fosforilación del factor de terminación mTERF y su posible unión a la zona de los promotores (40,49). Así, el factor estaría siempre unido a su secuencia de unión en el tRNA<sup>Leu</sup>, justo después de la región del rDNA, y provocaría la terminación de la unidad de transcripción pequeña cuando estuviera fosforilado, sintetizando fundamentalmente los rRNA. La desfosforilación del factor permitiría a la RNA polimerasa avanzar y transcribir la cadena H completa. La unión simultánea, o a través de otras proteínas, de mTERF a la zona de los promotores formando un bucle en el DNA haría que, en su forma fosforilada, provocase la iniciación en  $H_1$  y terminación en el extremo 3' de la zona de los rRNA; de este modo, la frecuencia de eventos de la unidad de transcripción pequeña sería más elevada que cuando comienza en  $H_2$  (40,41,49).

## CARACTERES DIFERENCIALES DE LA GENÉTICA MITOCONDRIAL

La localización del sistema genético mitocondrial en un orgánulo citoplasmático y el alto número de copias de mtDNA por célula le otorgan unas características genéticas propias que las diferencian de las del DNA nuclear. Así:

1. *Modo de herencia.* El mtDNA se hereda exclusivamente por vía materna (56). 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 mtDNA que contienen los óvulos y a que las mitocondrias del espermatozoide se eliminan por un proceso activo en los primeros estadios de división celular (57).

2. *Poliplasmia.* El número de moléculas de mtDNA es, en general, muy elevado y varía entre unas pocas en las plaquetas y unas 100 000 copias en el oocito. La mayor parte de los tejidos contienen entre unas 1000 y 10 000 copias por célula, con 2 a 10 moléculas de DNA por mitocondria. En un principio, todas las células de un individuo normal tienen el mismo tipo de mtDNA (homoplasmia). Sin embargo, debido a la alta tasa de mutación del mtDNA, como veremos más adelante, es probable que aparezca una mutación y que puedan coexistir dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplasmia).

3. *Segregación mitótica.* Cuando existe una heteroplasma, las moléculas de mtDNA 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 mtDNA mutado. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasma dependerá del porcentaje y naturaleza del DNA 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.

4. *Expresión umbral.* Un tejido funciona perfectamente mientras tiene un porcentaje de copias de mtDNA normal suficientes como para producir la cantidad necesaria de ATP para su funcionamiento. Sin embargo, cuando el número de copias de mtDNA mutado sobrepasa un nivel determinado, diferente para cada tejido, la producción de ATP se ve afectada, y, por debajo de un nivel umbral, aparecen 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 más afectados son el sistema nervioso y el muscular, aunque, realmente, cualquier órgano o tejido puede verse implicado. Asimismo, los niveles de heteroplasma pueden variar de un tejido al otro, siendo superior, en general, en los postmitóticos, como el cerebro o el músculo, ambos de difícil acceso, y menores en tejidos mitóticos, como la sangre, lo que provoca que esta última sea una muestra no fiable para el diagnóstico de muchas patologías mitocondriales.

5. *Alta tasa de mutación.* El mtDNA es muy vulnerable y presenta una tasa de mutación espontánea 10-20 veces superior a la del ADNn. Este hecho puede ser consecuen-

cia de la alta producción de radicales de oxígeno que se originan constantemente en la mitocondria y que dañan a un DNA con información genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y en el que los mecanismos de reparación parecen ser insuficientes. En un individuo determinado se estaría produciendo continuamente, a lo largo de la vida, una pequeña heterogeneidad en el mtDNA como consecuencia de las mutaciones que se están originando en sus células somáticas. Este daño mitocondrial pudiera ser la causa de la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar en el envejecimiento. Así, el grupo de Attardi encontró evidencias que apoyan esta teoría al demostrar que las mitocondrias acumulan determinadas mutaciones con la edad (58).



4

ENFERMEDADES CAUSADAS  
POR MUTACIONES  
EN EL DNA MITOCONDRIAL

Desde que se descubrió y se caracterizó el mtDNA se pensó en la posible existencia de enfermedades genéticas de origen mitocondrial que pudieran estar asociadas a defectos en la cadena respiratoria y que se presentaran con un modo de herencia materna. Sin embargo, no fue hasta 1988 cuando se describieron las primeras mutaciones en el mtDNA asociadas a enfermedades mitocondriales humanas (13-15). Desde entonces, el número de mutaciones y el espectro de enfermedades por ellas producidas ha crecido enormemente.

Una de las características que mejor define la patología mitocondrial es su complejidad. Las mitocondrias son componentes fundamentales de todos los tejidos y órganos, por lo que estas enfermedades son, en general, multisistémicas, muchos órganos o tejidos se ven afectados, y no es raro que una misma mutación dé lugar a fenotipos muy diferentes o que distintas mutaciones produzcan el mismo (tablas 1 y 2). En algunos casos, los síntomas de la enfermedad pueden encuadrarse en síndromes bien definidos; sin embargo, otras veces presentan solapamiento de síntomas o, como sucede en los niños, estos no quedan muy claramente definidos por

no haberse desarrollado del todo. Asimismo, las enfermedades mitocondriales 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 (59).

**Tabla 1**  
CRITERIOS DIAGNÓSTICOS EN ENFERMEDADES CAUSADAS  
POR MUTACIONES EN EL DNA MITOCONDRIAL

<b>Órgano/Tejido</b>	<b>Manifestaciones clínicas/Caracteres</b>
Sistema nervioso	Encefalopatía Ataxia cerebelar Convulsiones Mioclonías Accidentes cerebro-vasculares Retraso mental y psicomotor Demencia Migraña Ceguera cortical Depresión Epilepsia Neuropatía periférica
Músculo	Miopatía progresiva Intolerancia al ejercicio Debilidad Oftalmoplejia Ptosis Mioglobinuria
Sangre	Anemia sideroblástica Acidosis láctica Pancitopenia
Ojo	Atrofia óptica Retinitis pigmentaria Cataratas Diplopía
Oído	Sordera
Corazón	Cardiomiopatía Defectos en conducción cardíaca

**Tabla 1** (Continuación)  
 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS EN ENFERMEDADES CAUSADAS  
 POR MUTACIONES EN EL DNA MITOCONDRIAL

<b>Órgano/Tejido</b>	<b>Manifestaciones clínicas/Caracteres</b>
Sistema endocrino	<i>Diabetes mellitus</i> <i>Diabetes insípida</i> Hipoparatiroidismo Hipotiroidismo Baja estatura
Intestino	Pseudo-obstrucción intestinal Vómitos
Páncreas	Disfunción pancreática exocrina
Hígado	Fallo hepático
Riñón	Síndrome de Fanconi Fallo renal
Morfología muscular	Fibras rojo-rasgadas en biopsias musculares Inclusiones paracristalinas en mitocondria
Histoquímica	Fibras COX negativas
Bioquímica	Disminución de actividad de complejos respiratorios y/o de enzimas respiratorios en biopsias musculares
Laboratorio	Acidosis láctica en sangre Acidosis láctica en líquido cerebrospinal Hipoglucemia

El número de trastornos y de mutaciones en el mtDNA es muy grande (se han descrito más de 150 mutaciones puntuales y numerosas deleciones diferentes), por lo que aquí solo me referiré a los fenotipos más característicos y a las mutaciones o zonas *hot spot* que más comúnmente se han asociado a ellos (tabla 2), dejando de lado un núme-

**Tabla 2**  
**MUTACIONES DEL DNA MITOCONDRIAL MÁS FRECUENTES**  
**Y ENFERMEDADES ASOCIADAS**

<i>Enfermedad</i>	<i>Mutación</i>	<i>Gen</i>	<i>Referencias</i>
LHON	G3460A	ND1	(125,126)
	G11778A	ND4	(13)
	T14484C	ND6	(127)
NARP	T8993G/C	ATP6	(128,129)
Leigh (MILS)	T8993G/C	ATP6	(129-131)
	T9176G/C	ATP6	(132,133)
MELAS	A3243G	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	(134)
	<i>Hot spot</i>	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	(17)
MERRF	A8344G	tRNA <sup>Lys</sup>	(135)
	<i>Hot spot</i>	tRNA <sup>Lys</sup>	(17)
Diabetes y sordera	A3243G	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	(136)
Sordera no sindrómica inducida por aminoglucósidos	A1555G	rRNA 12S	(137)
Sordera neurosensorial	<i>Hot spot</i>	tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	(138)
CPEO	Delección única	Varios genes	(113,139)
	Delecciones múltiples		(140-143)
Kearns-Sayre	Delección única		(115,144,145)
Pearson	Delección única		(146)

*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: Oftalmoplejia progresiva externa crónica. Una lista actualizada de mutaciones asociadas a distintos fenotipos puede encontrarse en MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database <<http://www.mitomap.org>>.*

ro muy grande de mutaciones que, en general, se han descrito solo en casos aislados. De todas formas, 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 y 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 mtDNA se pueden dividir en tres grandes grupos según estén asociadas a 1) mutaciones puntuales, 2) deleciones, 3) depleción de mtDNA (disminución de número de copias).

El alto índice de mutación del mtDNA 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 una mutación como patogénica? Para resolver esta duda se han descrito una serie de criterios, pero su aplicación depende mucho de cuán exigente se sea 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 mtDNA ha dado como resultado la presencia de segundas mutaciones con mayor posibilidad de ser patogénicas (60). En todo caso, no es fácil que todas las mutaciones cumplan todos estos criterios, por lo que hay que aplicarlos con cierta flexibilidad. Más adelante se tratarán estos criterios de patogenicidad.

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

Hasta el momento, se han descrito más de 150 mutaciones puntuales patológicas distribuidas a lo largo de los 37 genes que codifica el mtDNA y que, en general, responden 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 2. El resto de mutaciones solo se han encontrado en casos puntuales. Las 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 (59,61).

¿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 la presencia de defectos concretos en la actividad de la cadena respiratoria se debe iniciar un estudio de la presencia de otras mutaciones descritas, o secuenciar la molécula completa de mtDNA, dada la facilidad con la que se puede obtener su secuencia.

La variedad de fenotipos que se han asociado a enfermedades mitocondriales es igualmente enorme, lo que hace imposible un tratamiento detallado de cada uno de ellos en una revisión de este tipo. Aquí citaremos solamente los más habituales.

Entre las enfermedades más frecuentes causadas por mutaciones puntuales en genes codificantes de proteínas nos encontramos con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), los síndromes de Leigh de herencia materna (MILS), de neuropatía periférica, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP), de intolerancia al ejercicio, y

otros. Las mutaciones puntuales en genes de los tRNA causan mayoritariamente los síndromes de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares), MERRF (encefalomiopatía mitocondrial con fibras rojo-rasgadas), cardiomiopatías, diabetes de herencia materna con sordera, etc. En los genes codificantes de los rRNA también se han encontrado mutaciones puntuales asociadas fundamentalmente a sordera inducida por aminoglicósidos y sensoneural. Todas estas mutaciones son habitualmente de herencia materna, aunque algunas veces son específicas del tejido.

#### **4.2. Enfermedades causadas por deleciones del mtDNA**

Otro tipo de enfermedades producidas por defectos en el mtDNA se debe a la presencia de deleciones (pérdida de parte del DNA). 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 4977 pares de bases, se encuentra mucho más frecuentemente. Deleciones del mtDNA se han encontrado en síndromes como CPEO (oftalmoplejia crónica progresiva externa), Kearns-Sayre, en el de médula y páncreas de Pearson, MNGIE (encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial), etc. Se desconoce cómo se producen estas deleciones, en la mayoría de los casos esporádicas, si bien en algunos casos se han encontrado de herencia materna y en otros parece que se deben a mutaciones en genes nucleares que afectan al metabolismo de nucleótidos mitocondriales. Recientemente, se ha hecho un esfuerzo en relacionar el tamaño y lugar de localización de las deleciones con el fenotipo que padecen (62).

### 4.3. Enfermedades causadas por depleción del mtDNA

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 mtDNA (depleción de mtDNA). Los síndromes de depleción mitocondrial (MDS) son un grupo clínica y genéticamente muy heterogéneo, de herencia autosómico recesiva, que están caracterizados por una fuerte reducción del número de copias de mtDNA específica de tejido. No se ha identificado ninguna mutación en el mtDNA, lo que sugiere que estos síndromes están producidos por defectos en genes codificados en el DNA nuclear implicados en la maquinaria de mantenimiento del mtDNA (fallos de replicación o desequilibrio en los niveles de nucleótidos). Actualmente, se distinguen tres tipos diferentes de formas de presentación: miopática, encefalomiopática y hepatocerebral (63). Se considera que existe una depleción mitocondrial cuando los niveles de mtDNA están por debajo del 30 % con respecto a controles emparejados por edad y sexo (64,65), pero en los casos graves se llega hasta valores por debajo del 5 %. La mayoría de ellos mueren en su infancia temprana, aunque algunos alcanzan hasta la pubertad e incluso mucho más (66). Se han asociado varios genes nucleares con el origen de las distintas formas de síndrome de depleción. Así, la forma *miopática* se ha asociado a mutaciones en el gen timidina kinasa-2 (TK2), una desoxirribonucleósido kinasa específica de la mitocondria que fosforila timidina, desoxicitidina y desoxiuridina (67,68); la forma *encefalomiopática*, al gen que codifica la subunidad b de la succinil-CoA sintasa formadora de ADP (SUCLA2) (69), un enzima de matriz mitocondrial que cataliza la síntesis reversible de succinil-CoA a partir de succinato y CoA; y la forma *hepatocerebral*, al

gen codificante de desoxiguanosina kinasa (DGUOK) (70). Asimismo, el síndrome de Alpers se considera como una forma de síndrome de depleción que se ha asociado a mutaciones en los genes codificantes de desoxiguanosina kinasa (DGUOK) (70), DNA polimerasa  $\gamma$  (71) y MPV17 (72,73). Recientemente se han detectado otros genes que causan síndrome de depleción; entre ellos se encuentran RRM2B, que codifica la subunidad pequeña de ribonucleótido reductasa inducible por el p53 citosólico (74), SUCLG1, que codifica la subunidad de la succinato-coenzima A ligasa, y PEO1, gen de la helicasa mitocondrial Twinkle (75,76).

Las enfermedades mitocondriales, tomadas en su conjunto, son uno de los tipos de enfermedades genéticas más frecuentes. En algún estudio se ha encontrado que uno de cada 6000 habitantes padece o es portador de una mutación en el mtDNA. A pesar del gran avance conseguido en estos 21 años en el diagnóstico de las mitocondriopatías, se conoce todavía muy poco sobre los mecanismos patogénicos y menos aún sobre las terapias a emplear.

#### **4.4. Nuevas mutaciones puntuales en el mtDNA y criterios de patogenicidad**

El número de mutaciones descritas en el mtDNA es muy grande, por lo que se podría pensar que se ha llegado ya al límite de cambios en dicho DNA 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 variabili-

dad fenotípica, es probable que fenotipos muy suaves pasen desapercibidos. Así, recientemente en nuestro laboratorio hemos descrito una nueva mutación en el gen codificante de la subunidad I de la citocromo c oxidasa asociada a un retraso mental moderado con debilidad y fatigabilidad (77). Además, la probabilidad de detectar una nueva mutación ha aumentado con la posibilidad de la secuenciación completa del mtDNA de tamaño pequeño y con un coste asequible. En cualquier caso, no hay que olvidar que, tratándose del mtDNA, se debe secuenciar el DNA del tejido más afectado, ya que no se puede descartar la presencia de mutaciones somáticas.

En todo caso, una nueva mutación en el mtDNA necesita cumplir una serie de criterios para que pueda ser considerada como patogénica. Esto no es una tarea fácil. Para ello, se establecieron varios criterios, al principio muy sencillos y que luego se han ido ampliando o modificando. Sin embargo, no todas las mutaciones patogénicas llegan a cumplir todos y cada uno de estos criterios, por lo que hay que ser extremadamente cuidadosos en su aplicación y tener una mente abierta a la hora de definir una mutación como patogénica, con el fin de que pueda avanzar la medicina mitocondrial (60). A continuación haremos una descripción de dichos criterios, si bien hay que dejar muy claro que no siempre una mutación patológica llega a cumplir todos, pese a lo cual no puede descartarse su patogenicidad. Estos criterios son los siguientes:

a) *La mutación debe estar presente en pacientes y ausente en individuos control.* Una mutación patogénica no debe encontrarse en individuos normales; sin embargo, hay muchas mutaciones claramente patológicas pero que presentan una penetrancia incompleta, por lo que pueden encontrarse en miembros sanos del mismo pedigrí

en forma homoplásmica (LHON). Hoy en día hay cerca de 4000 secuencias del mtDNA, 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 fueran potencialmente patológicas.

b) *La mutación debe encontrarse en fondos genéticos diferentes.* Este criterio implica una asociación independiente con el fenotipo y es imposible de cumplir en nuevas mutaciones.

c) *Existencia de correlación entre el porcentaje de la mutación y el fenotipo.* Como se ha indicado, el número de moléculas de mtDNA 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 mtDNA mutado que tenga. Cuando el número de copias de DNA mutado sobrepase 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 mtDNA ha atravesado un estado heteroplásmico antes de fijarse en la población como tal. Este criterio no es aplicable, lógicamente, a mutaciones homoplásmicas.

d) *La mutación debe ser la mejor candidata a ser patogénica.* Con la secuenciación completa del mtDNA es posible que aparezcan varios cambios en su secuencia, por lo que habrá que discernir cuál de todas es la patológica. De alguna manera, estamos dando mucha importancia a la secuenciación completa del genoma mitocondrial. 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 de la molécula de mtDNA completa ha llevado al descubrimiento de otras mutaciones que pueden ser mejores candidatas. Además, aunque durante mucho tiempo se ha considerado que era imposible la coexistencia de más de una mutación patológica en el mismo mtDNA, ya se han descrito pacientes con dos mutaciones patológicas (78).

Por otro lado, es bastante habitual que se descarten como patológicas las mutaciones que se localizan en la región de control del mtDNA. En esta región se encuentran las secuencias que desempeñan 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 RNA policistrónicos que se originan a partir de las tres unidades de transcripción.

e) *La mutación debe afectar a nucleótidos muy conservados evolutivamente.* El grado de conservación de un nucleótido determinado en el DNA 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.

f) *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 rRNA o tRNA con pérdida de su función.

g) *La transferencia de un mtDNA con una mutación a líneas celulares sin mtDNA debe ir acompañada de una transferencia del defecto molecular y/o celular: Construcción de híbridos trans-mitocondriales.* 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 puede depender del contexto del sistema experimental utilizado. En este sentido, hoy en día se considera que la mejor prueba para saber si una mutación 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 mtDNA (células rho 0) con plaquetas de un paciente que porten la mutación en el mtDNA a analizar (79,80). 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 mtDNA. Sin embargo, por el momento hay muy pocos modelos animales con este tipo de mutaciones. Entre ellos, existe un ratón con una mutación en el rRNA 16S (81), otro porta una delección en el mtDNA (82) y otro presenta una mutación en

la subunidad I de la citocromo oxidasa (83,84). Una explicación bastante probable para esta escasez de modelos de ratón es que las mutaciones del mtDNA más graves se eliminen de la línea germinal femenina (85). En todo caso, se debe mencionar que, por el momento, no existe ningún modelo animal con mitocondrias que posean mutaciones humanas.

#### **4.5. Criterios de diagnóstico de las enfermedades mitocondriales**

Como se ha indicado, 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. Tal circunstancia hace que el diagnóstico de estas enfermedades sea muy complejo y que se tenga que basar en una serie de aspectos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos muy determinados que permitan hacer pensar que estamos ante una de estas enfermedades. Todo ello exige un estudio muy profundo que implica necesariamente a expertos de áreas muy diversas.

a) *Manifestaciones clínicas.* La característica más común de las enfermedades del mtDNA 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 los sistemas nervioso y muscular, dando lugar a síndromes muy heterogéneos (tabla 1). 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 tener en cuenta cuando un paciente presenta una asociación

de síntomas bastante inexplicable con un rápido y progresivo curso de la enfermedad que implica a órganos no relacionados. 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, oftalmoplejia, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera, cardiomiopatía, defectos en la conducción cardiaca, disfunciones hepáticas y pancreáticas, diabetes, defectos de crecimiento, anemia sideroblástica, pseudo-obstrucción intestinal, nefropatías, acidosis metabólica y otras manifestaciones más secundarias. 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 gravedad de los mismos varía en los diferentes individuos (59,86,87).

b) *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 deben determinar en plasma y, a ser posible, en líquido cefalorraquídeo. Al mismo tiempo, se deben 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. Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de determinar los niveles de folato en sangre y en líquido cerebro-espinal, ya que algunas enfermedades mitocondriales, en particular el síndrome de Kearns-Sayre, cursan con una deficiencia de folato cerebral (88,89).

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

c) *Estudios anatomopatológicos*. El análisis histoquímico de biopsias musculares es uno de los más importantes para la detección de anomalías mitocondriales. 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). 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 gravedad de la deficiencia enzimática. La microscopía electrónica puede revelar la presencia de inclusiones paracristalinas o de mitocondrias con forma y tamaño anormales, aunque no es de mucho valor en el diagnóstico mitocondrial.

d) *Estudios bioquímicos*. Una de las pruebas más concluyentes de padecimiento de una enfermedad del sistema OXPHOS se obtiene mediante la determinación de la actividad enzimática de los complejos respiratorios mitocondriales. Los pacientes con mutaciones en el mtDNA muestran un rango de actividades enzimáticas: normales, defectos aislados en un complejo o defectos múltiples. 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 es el tejido habitualmente más utilizado. Si no es posible, al menos se deben realizar biopsias de piel para estudios en fibroblastos en cultivo.

e) *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 poliacrilamida (*blue native polyacrylamide gel electrophoresis*), sin disociarlos en sus constituyentes polipeptídicos (90). Esta técnica permite cuantificar los niveles de los complejos OXPHOS perfectamente ensamblados y puede ser de gran ayuda a la hora de decidir hacia dónde enfocar los estudios moleculares.

f) *Análisis del pedigrí y genético-moleculares.* El estudio familiar puede dar pistas acerca del posible modo de herencia de la enfermedad. Las enfermedades del sistema OXPHOS pueden presentarse tanto con un tipo de herencia mendeliana (autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X) como materna, debido al doble origen genético de este sistema. Las enfermedades debidas a defectos en el mtDNA presentan fundamentalmente una herencia materna cuando están producidas por mutaciones puntuales. Sin embargo, las mutaciones en el mtDNA 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.

En el caso de deleciones y depleciones, a pesar de que existe un daño sobre el mtDNA, la causa puede ser debida a la acción de otras proteínas codificadas en el DNA nuclear implicadas en el mantenimiento del sistema genético mitocondrial. Estos casos, al igual que sucede con las proteínas componentes del sistema OXPHOS que están codificadas en el DNA nuclear y las que participan

en su ensamblaje, presentan un modo de herencia mendeliana.

Por la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas de las enfermedades mitocondriales se hace necesario llevar a cabo un análisis genético-molecular que determine la mutación causante de la enfermedad. Los resultados de las investigaciones previas deberían guiar los estudios genéticos que se deben realizar.

El análisis genético-molecular del mtDNA solo debería llevarse 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, sobre todo en la infancia, que estos se hagan después de que una exploración clínica revele indicios de una enfermedad mitocondrial y antes de que se hayan podido estudiar otros parámetros.

#### **4.6. Diagnóstico prenatal y consejo genético**

El diagnóstico prenatal y consejo genético de enfermedades causadas por defectos en el mtDNA 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 mtDNA 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. 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 eso, 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 lo dicho, en el estado actual de nuestros conocimientos es desaconsejable realizar análisis prenatales.

#### **4.7. 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 mtDNA 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 nDNA. Muchas de las mutaciones que se produzcan serán causa de enfermedad, como ya se ha mencionado, y algunas podrían ser tan dañinas que harían inviables a los individuos que las poseyeran. 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 G11778A y T14484C, 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 (91). Este mismo haplogrupo está sobrerrepresentado en individuos centenarios (92) y subrepresentado en pacientes con enfermedad de Parkinson (93). 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 (94). Asimismo, en los últimos años ha habido una explosión de resultados que ligan la variación en el mtDNA al cáncer (95), envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad (96), 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 (97,98) (tabla 3).

La explicación del hecho de que el mismo haplogrupo mitocondrial sea un agente de susceptibilidad frente a determinadas enfermedades y a la vez 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, por otro. Así, las variantes desacoplates provocarían una menor capacidad productora de energía, pero una mayor generación de calor y una menor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La pérdida en la eficacia productora de energía aumentaría la penetrancia de mutaciones patológicas (99). Por otra parte, una cadena desacoplada

**Tabla 3**  
 ALGUNOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES  
 ASOCIADOS A DETERMINADOS FENOTIPOS

<i>Haplogrupos mtDNA</i>	<i>Fenotipo</i>
J	Longevidad (R) LHON (S) Parkinson (R) Osteoartritis de la rodilla (R) Maculopatía asociada a la edad (S)
T	DIDMOAD (S) Maculopatía asociada a la edad (S) Astenozoospermia (S) Alzheimer (R) Neuropatía periférica asociada a NRTI (S) Entrenamiento de resistencia
H	Demencia debida a cuerpos de Lewy (S)
H1	Accidente cerebro-vascular isquémico (R)
H5	Alzheimer (S) Sordera y migraña (S)
U	Alzheimer (S)
Uk	Longevidad (R) Parkinson (R) Esclerosis múltiple (S) Sordera asociada a la edad (S) LHON (S)
D	Longevidad (R) Infarto (R)
R	Sepsis (R)
N9a	Diabetes tipo 2 (R)

*S y R indican susceptibilidad y resistencia, respectivamente.*  
*NRTI: Nucleótidos inhibidores de la transcriptasa inversa.*

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 (100).

#### **4.8. Genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales: regreso a la genética mendeliana**

Como hemos visto, solamente 13 de las proteínas componentes del sistema OXPHOS están codificadas en el mtDNA. El resto de subunidades proteicas, además de todos los factores implicados en su importe a la mitocondria, procesamiento, modificación y ensamblaje en los complejos, así como todos los enzimas y factores necesarios para el mantenimiento y expresión del genoma mitocondrial, están codificados en el DNA nuclear. Por ello, cabe esperar que la mayoría de enfermedades mitocondriales se deban a mutaciones en este genoma y que se transmitan con un modo de herencia mendeliano. En los últimos años se han ido descubriendo e identificando mutaciones en estos genes que causan enfermedad mitocondrial (17). Así, a modo de ejemplo, el síndrome de Leigh está producido, como se ha indicado más arriba, por una mutación en el mtDNA con herencia materna. Sin embargo, esta enfermedad se transmite con más frecuencia por herencia autosómica recesiva, y se han encontrado e identificado mutaciones en el gen de la PDH (piruvato deshidrogenasa), en genes nucleares codificantes de subunidades del complejo I (101,102) y del complejo II (103) codificado enteramente en el núcleo. Asimismo, se han localizado mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas que, aunque no forman parte de los complejos respiratorios, son necesarios para su ensamblaje.

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 conozcan todavía en profundidad los mecanismos patogénicos y que no exista prácticamente ninguna estrategia terapéutica.

#### **4.9. Terapia de las enfermedades mitocondriales**

Es muy difícil resumir en pocas palabras el desafío que supone el tratamiento terapéutico de las enfermedades mitocondriales, puesto que, como se ha indicado, estas enfermedades están compuestas por un heterogéneo grupo de fenotipos que abarcan todos los tipos de especialidades médicas. A esto cabe añadir que el conocimiento que se tiene sobre el sistema OXPHOS es todavía muy parcial y que pueden llegar a descubrirse nuevas e impredecibles funciones para estas proteínas. Por todo ello, las estrategias terapéuticas deben ser muy diversas y específicas, siendo inconcebible que un «tratamiento mágico» pueda servir para tratar todas las enfermedades.

La mayoría de los tratamientos disponibles son solo sintomáticos y de apoyo. Los tratamientos sintomáticos se basan fundamentalmente en drogas, transfusiones de sangre, cirugía, medidas dietéticas y fisioterapia. El tratamiento farmacológico puede clasificarse en específico (tratamiento de la epilepsia, dolores de cabeza, síntomas extrapiramidales, episodios de accidentes cerebro-vasculares, o manifestaciones no neurológicas), no específico (antioxidantes, aceptores y donadores de electrones, cofactores, etc.) y restringido (evitar fármacos de conocida toxicidad hacia las funciones mitocondriales). El tratamiento debe ser individualizado por las características tan peculiares de la genética mitocondrial. A pesar de unas posibilidades tan limitadas, se deben ofrecer tratamientos sintomáticos, pues pueden tener un impacto sobre el curso y resultados de las enfermedades.

#### **4.10. La patología mitocondrial en España**

En 1988 se describieron las primeras mutaciones en el mtDNA. En 1990, y anticipando la importancia futura de

este campo en la medicina, creamos en nuestro laboratorio de la Universidad de Zaragoza la primera unidad en España de diagnóstico genético-molecular de enfermedades mitocondriales. Desde entonces este servicio ha crecido mucho, y actualmente se reciben muestras de diversos hospitales que abarcan una amplia zona geográfica de España, de Italia y de diversos países de América Latina y norte de África. En él se realiza el diagnóstico de rutina en patología mitocondrial analizando las mutaciones más comunes asociadas a cada una de las enfermedades. Cuando los resultados son negativos y se tienen todos los indicios de que se trata de una mitocondriopatía, se lleva a cabo un estudio de investigación con el fin de poder encontrar mutaciones nuevas que originen la enfermedad. El hallazgo de una mutación nueva implica la determinación de su patogenicidad. Como el índice de mutación del mtDNA es muy alto, es bastante posible encontrar un gran número de mutaciones puntuales; sin embargo, la mayoría son mutaciones silenciosas, polimorfismos, que no van a causar ningún tipo de defecto.

En muchos casos, para poder demostrar que la mutación tiene un efecto fenotípico, se procede a la utilización de modelos celulares con cíbridos transmitocondriales. Estas líneas celulares se construyen mediante fusión de células rho 0, que carecen de mtDNA, con plaquetas del paciente que portan mitocondrias con el mtDNA mutado. Después de una selección de las líneas de interés, se realizan estudios de medida de respiración, de actividades de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa, de crecimiento, etc., para ver si la mutación ha originado una deficiencia de actividad. Una mutación en un gen codificante de proteínas suele crear líneas celulares con defectos en el complejo del cual forma parte el polipéptido mutado. En el caso de mutaciones en los tRNA,

es la síntesis de proteínas mitocondriales la que se ve afectada, con una disminución de la síntesis total de dichas proteínas y la consiguiente disminución de la actividad de varios complejos respiratorios. Esta disminución de la síntesis de proteínas por mutaciones en los tRNA puede estar originada por muchas causas; entre ellas se ha descrito una disminución de la aminoacilación de los tRNA, es decir, de unión del aminoácido al extremo 3' del tRNA. Las mutaciones en los rRNA también afectarán a la síntesis de proteínas, pero esto está menos estudiado.

A pesar del gran avance conseguido en estos 31 años en el diagnóstico de las mitocondriopatías, se conoce todavía muy poco sobre los mecanismos patogénéticos y menos aún sobre las terapias a emplear.

En estos años, nuestro servicio ha analizado más de 3400 muestras, entre pacientes y familiares relacionados por vía materna, y se ha encontrado que solamente alrededor de un 16% presentan alguna de las mutaciones conocidas. Se trabaja intensamente en la búsqueda de nuevas mutaciones asociadas a enfermedades o nuevas enfermedades que puedan estar causadas por mutaciones en el mtDNA. Así, en nuestro laboratorio se han encontrado numerosas delecciones nuevas asociadas a los clásicos síndromes de CPEO, Kearns-Sayre y Pearson (62,104), y mutaciones puntuales nuevas como la T14487C asociada a necrosis bilateral del estriado y distonía, o mutaciones en el tRNA<sup>Lys</sup> asociadas a lipomatosis múltiple simétrica (105-107) o a otras enfermedades (17,60,62,77,88,107-121).

El apogeo de las enfermedades mitocondriales ha llevado a otros grupos en España, fundamentalmente en Madrid y Barcelona, a establecer sus propios centros de diagnóstico. El año 2002, estos y otros centros se reunieron en una red temática de investigación cooperativa

sobre enfermedades del sistema OXPHOS (Red Mitoespaña) con el fin de aunar esfuerzos, unificar protocolos de diagnóstico clínico, histoquímico, bioquímico y genético, y de, si es posible, proponer una terapia para estas enfermedades. Hoy en día pertenecemos a uno de los CIBER del Instituto de Salud Carlos III, en particular al CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER).

Además, desde finales de los años noventa se viene observando que la variación genética poblacional en el mtDNA es un factor importante en el desarrollo de las enfermedades multifactoriales asociadas a la edad y en la longevidad, y recientemente se están acumulando evidencias acerca del papel de las mutaciones en el mtDNA y el desarrollo del cáncer. Nuestro grupo también ha sido pionero en el desarrollo de este campo. Así, a mediados de los noventa se comenzó a estudiar la influencia de estos polimorfismos mitocondriales en distintos fenotipos y se pudo detectar que el haplogrupo T está sobrerrepresentado en la astenozoospermia moderada (94).

Nuestro trabajo de más de 19 años en mitocondriopatías y fenotipos multifactoriales nos está permitiendo plantear retos más ambiciosos, como la farmacogenómica mitocondrial y el sistema OXPHOS como diana farmacológica en las enfermedades multifactoriales y el cáncer (122).

## EL DNA MITOCONDRIAL EN ANÁLISIS FORENSES

El hecho de estar presente en un número de copias muy elevado, su alta velocidad de mutación, la ausencia de recombinación y la herencia materna hacen que el mtDNA sea un instrumento sumamente valioso en los análisis forenses. De este modo, se está utilizando de forma muy habitual en el análisis de huesos viejos, dientes, pelo y de otras muestras biológicas en las que la cantidad de DNA nuclear es muy baja. Su validez en análisis forenses, evolutivos y antropológicos está muy bien documentada y se ha utilizado con éxito en la identificación de las víctimas del atentado terrorista contra el World Trade Center en Nueva York, de los desaparecidos de la dictadura argentina, en la verificación de los restos del zar Nicolás II, etc. (123,124).



## BIBLIOGRAFÍA

1. Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*. 1987;326:332-3.
2. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of Mitochondria. *Ann Rev Cell Biol*. 1988;4:289-333.
3. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*. 2006;16:R551-60.
4. Ephrussi B, Hottinguer H, Tavlitzki J. Action de l'acriflavine sur les levures. II. Étude génétique du mutant «petite colonie». *Ann Ins Pasteur*. 1949;76:351-67.
5. Nass MMK, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol*. 1963;19:593-629.
6. Hudson B, Vinograd J. Catenated circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria. *Nature*. 1967;216:647-52.
7. Attardi B, Attardi G. A membrane-associated RNA of cytoplasmic origin in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967;58:1051-58.
8. Attardi G, Attardi B. Mitochondrial origin of membrane associated heterogeneous RNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968;61:261-8.
9. Attardi B, Cravioto B, Attardi G. Membrane-bound ribosomes in HeLa cells. I. Their proportion to total cell ribosomes and their association with messenger RNA. *J Mol Biol*. 1969;44:47-70.

10. Lederman M, Attardi G. In vitro protein synthesis in a mitochondrial fraction from HeLa cells: sensitivity to antibiotic and ethidium bromide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1970;40:1492-1500.
11. Montoya J, Attardi G. ADN Mitochondrial Humano. *Investigación y Ciencia.* 1986;118:60-9.
12. Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Doolittle RF, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Attardi G. Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA. En: Quagliariello E, Slater EC, Plamieri F, Saccone C, Kroon AM, editores. *Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA.* Amsterdam: Elsevier Sciences; 1985. p. 259-75.
13. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, II LJE, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 1988;242:1427-30.
14. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon E, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology.* 1988;38:1339-46.
15. Holt IJ, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet.* 1988; 1:1462.
16. Montoya J, Playán A, Solano A, Alcaine MJ, López-Pérez MJ, Pérez-Martos A. [Diseases of mitochondrial DNA]. *Rev Neurol.* 2000;31:324-33.
17. Ruiz-Pesini E, López-Gallardo E, Dahmani Y, Herrero MD, Solano A, Díez-Sánchez C, López-Pérez M, Montoya J. [Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system]. *Rev Neurol.* 2006;43:416-24.
18. Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A, Rojo M. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci.* 2004;13:2653-62.
19. Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Blik AM, Spelbrink JN. Composition and dynamics of

- human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell*. 2003; 14:1583-96.
20. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier HP, Smith AJH, Stader R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290:427-65.
  21. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999;23:147.
  22. Robberson DL, Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972;69:713-41.
  23. Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Ann Rev Biochem*. 1974;43:695-719.
  24. Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 1982;28:693-705.
  25. Walberg MW, Clayton DA. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-Loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 1981;9:5411-21.
  26. Walberg MW, Clayton DA. In vitro transcription of human mitochondrial DNA: identification of specific light strand transcripts from the displacement loop region. *J Biol Chem*. 1983;258:1268-75.
  27. Crews S, Ojala D, Posakony J, Nishiguchi J, Attardi G. Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature*. 1979;277:192-8.
  28. Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003;278:50961-9.
  29. 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.

30. 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.
31. Ojala D, Merkel C, Gelfand R, Attardi G. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*. 1980;22:393-403.
32. Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*. 1981;290:470-4.
33. Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*. 1981;290:465-70.
34. 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.
35. 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.
36. Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochem Biophys Acta*. 2006;1757:1179-89.
37. 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.
38. 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.
39. 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.

40. 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.
41. 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.
42. Dubin DT, Montoya J, Timko KD, Attardi G. Sequence Analysis and Precise Mapping of the 3'-ends of HeLa Cell Mitochondrial Ribosomal RNAs. *J Mol Biol.* 1982; 157:1-19.
43. Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Racchi M, Zeviani M. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet.* 1997;6:615-25.
44. 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.
45. Fisher RP, Clayton DA. A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem.* 1985;260:11330-8.
46. 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.
47. Doersen CJ, Guerrier-Takada C, Altman S, Attardi G. Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria: comparison with the cytosol RNase P activity. *J Biol Chem.* 1985;260:5942-9.
48. Puranam RS, Attardi G. The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol Cell Biol.* 2001;21:548-61.

49. Prieto-Martín A, Montoya J, Martínez-Azorín F. New DNA-Binding Activity of Rat Mitochondrial Transcription Termination Factor (mTERF). *J Biochem (Tokyo)* 2004;136: 825-30.
50. Matthews DE, Hessler RA, Denslow ND, Edwards JS, O'Brien TW. Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome. *J Biol Chem.* 1982;257:8788-94.
51. Nierlich DP. Fragmentary 5S rRNA gene in the human mitochondrial genome. *Mol Cell Biol.* 1982;2:207-9.
52. Enríquez JA, Fernández-Silva P, Pérez Martos A, López-Pérez MJ, Montoya J. The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP. *Eur J Biochem.* 1996; 237:601-10.
53. Enríquez JA, Fernández-Silva P, Garrido-Pérez N, López-Pérez MJ, Pérez-Martos A, Montoya J. Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Mol Cell Biol.* 1999;19:657-70.
54. Enríquez JA, López-Pérez MJ, Montoya J. Saturation of the Processing of Newly Synthesized rRNA in Isolated Brain Mitochondria. *FEBS Lett.* 1991;280:32-6.
55. Ostronoff LK, Izquierdo JM, Cuezva JM. mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217:1094-8.
56. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77:6715-9.
57. 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.
58. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science.* 1999;286:774-9.

59. DiMauro S, Hirano M, Schon EA. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon, Oxon (UK): Informa Health Care; 2006. 348 p.
60. 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. *Biochem Biophys Acta*. 2009;1787:476-83.
61. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:91-123.
62. López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. CPEO and KSS differ in the percentage and location of the mtDNA deletion. *Mitochondrion*. 2009;9:314-17.
63. Elpeleg O. Inherited Mitochondrial DNA Depletion. *Pediatr Res*. 2003;54:1-7.
64. Vu TH, Sciacco M, Tanji K, Nichter C, Bonilla E, Chatkupt S, Maertens P, Shanske S, Mendell J, Koenigsberger MR, Sharer L, Schon EA, DiMauro S, DeVivo DC. Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion. *Neurology*. 1998;50:1783-90.
65. Morten KJ, Ashley N, Wijburg F, Hadzic N, Parr J, Jayawant S, Adams S, Bindoff L, Bakker HD, Mieli-Vergani G, Zeviani M, Poulton J. 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.
66. Lee NC, Dimmock D, Hwu WL, Tang LY, Huang WC, Chinnault AC, Wong LJ. 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.
67. 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.
68. Mancuso M, Salviati L, Sacconi S, Otaegui D, Camano P, Marina A, Bacman S, Moraes CT, Carlo JR, García M, García Álvarez M, Monzón L, Naini AB, Hirano M, Bonilla E, Taratuto AL, DiMauro S, Vu TH. Mitochondrial DNA

- depletion – Mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology*. 2002;59:1197-1202.
69. Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, Pagnamenta A, Eshhar S, Saada A. 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.
  70. 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.
  71. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*. 2004;55:706-12.
  72. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA, Mootha VK. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet*. 2006;38:576-82.
  73. Spinazzola A, Viscomi C, Fernández-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, DiMauro S, Rotig A, Gasparini P, Ferrero I, Mootha VK, Tiranti V, Zeviani M. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 2006;38:570-5.
  74. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chretien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A, Rotig A. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 2007;39:776-80.
  75. Hakonen AH, Isohanni P, Paetau A, Herva R, Suomalainen A, Lonnqvist T. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain*. 2007;130:3082-40.

76. Sarzi E, Goffart S, Serre V, Chretien D, Slama A, Munnich A, Spelbrink JN, Rotig A. Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol.* 2007;62:579-87.
77. Herrero-Martín MD, Pineda M, Briones P, López-Gallardo E, Carreras M, Benac M, Ángel Idoate M, Vilaseca MA, Artuch R, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E, Montoya J. A new pathologic mitochondrial DNA mutation in the cytochrome oxidase subunit I (MT-CO1). *Hum Mutat.* 2008; 29:E103-E111.
78. 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.
79. 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.
80. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 1989;246:500-3.
81. Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, Allard P, Dillehay DL, Nusinowitz S, Heckenlively JR, MacGregor GR, Wallace DC. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:14461-6.
82. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet.* 2000;26:176-81.
83. Kasahara A, Ishikawa K, Yamaoka M, Ito M, Watanabe N, Akimoto M, Sato A, Nakada K, Endo H, Suda Y, Aizawa S, Hayashi JI. Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNA with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Hum Mol Genet.* 2006; 15:871-81.

84. Kasahara T, Kubota M, Miyauchi T, Noda Y, Mouri A, Nabeshima T, Kato T. Genetically modified mice harboring mitochondrial DNA defects show aberrant cyclic change in wheel-running activity, which is improved by lithium. *Mol Psychiatry*. 2006;11:523.
85. Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, Vannan MA, Narula J, Macgregor GR, Wallace DC. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*. 2008;319:958-62.
86. Munnich A, Rotig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP, Saudubray JM, Rustin P. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inher Metab Dis*. 1996;19:521-7.
87. DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial Encephalomyopathies. En: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, editores. *Mitochondrial Encephalomyopathies*. Boston: Butterworth-Heinemann; 1998. p. 201-35.
88. Pineda M, Ormazábal A, López-Gallardo E, Nascimento A, Solano A, Herrero MD, Vilaseca MA, Briones P, Ibáñez L, Montoya J, Artuch R. Cerebral folate deficiency and leukoencephalopathy caused by a mitochondrial DNA deletion. *Ann Neurol*. 2006;59:394-8.
89. García-Cazorla A, Quadros EV, Nascimento A, García-Silva MT, Briones P, Montoya J, Ormazábal A, Artuch R, Sequeira JM, Blau N, Arenas J, Pineda M, Ramaekers VT. Mitochondrial diseases associated with cerebral folate deficiency. *Neurology*. 2008;70:1360-2.
90. Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 1991;199:223-31.
91. 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.
92. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S,

- Mari D, Mattace R, Franceschi C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *Faseb J*. 1999;13:1532-6.
93. Van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, PericakVance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet*. 2003;72:804-11.
  94. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Álvarez E, Díaz M, Urríes A, Montoro L, López-Pérez MJ, Enríquez JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*. 2000;67:682-96.
  95. Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:363-74.
  96. 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.
  97. Torroni A, Campos Y, Rengo C, Sellitto D, Achilli A, Magri C, Semino O, García A, Jara P, Arenas J, Scozzari R. Mitochondrial DNA haplogroups do not play a role in the variable phenotypic presentation of the A3243G mutation. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1005-12.
  98. Domínguez-Garrido E, Martínez-Redondo D, Martín-Ruiz C, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Madero P, Tamparrillas M, Montoya J, von Zglinicki T, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ. Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology*. 2009;10:435-42.
  99. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*. 2004;303:223-6.

100. Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: Longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *PNAS*. 2003;100:2174-6.
101. Loeffen J, Smeitink A, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R, Trijbels F, Hamel B, Mullaart R, van den Heuvel L. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with leigh syndrome. *Am J Hum Genet*. 1998;63:1598-1608.
102. Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JL, Buskens CA, Smeets RJ, Rubio Gozalbo ME, Budde SM, Mariman EC, Wijburg FA, Barth PG, Trijbels JM, Smeitink JA. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol*. 1999;45:787-90.
103. Bourgerom T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*. 1995;11:144-9.
104. Solano A, Gámez J, Carod FJ, Pineda M, Playán A, López-Gallardo E, Andreu AL, Montoya J. Characterisation of repeat and palindrome elements in patients harbouring single deletions of mitochondrial DNA. *J Med Genet*. 2003;40:e86.
105. Gámez J, Playán A, Andreu AL, Bruno C, Navarro C, Cervera C, Arbós MA, Schwartz S, Enríquez JA, Montoya J. Familial multiple symmetric lipomatosis associated with the A8344G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology*. 1998;51:258-60.
106. Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Hernández-Pena J, García-Arumi E, Playán A, López-Pérez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol*. 2003;54:527-30.
107. Pineda M, Solano A, Artuch R, Andreu AL, Playán A, Vila-seca MA, Colomer J, Briones P, Casademont J, Montoya J. Peripheral Neuropathy with Ataxia in Childhood as a

- Result of the G8363A Mutation in Mitochondrial DNA. *Pediatr Res*. 2004;56:55-9.
108. Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P, Navarro-Sastre A, Gallardo E, Bornstein B, Herrero-Martín D, Rivera H, Martín MA, Martí R, García-Cazorla A, Montoya J, Navas P, Artuch R. Coenzyme Q(10) deficiency associated with a mitochondrial DNA depletion syndrome: A case report. *Clin Biochem*. 2009;42:742-5.
  109. López-Gallardo E, Solano A, Herrero-Martín MD, Martínez-Romero I, Castaño-Pérez MD, Andreu AL, Herrera A, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E, Montoya J. NARP syndrome in a patient harbouring an insertion in the MT-ATP6 gene that results in a truncated protein. *J Med Genet*. 2009;46:64-7.
  110. García-Cazorla A, Duarte S, Serrano M, Nascimento A, Ormazábal A, Carrilho I, Briones P, Montoya J, Garesse R, Sala-Castellví P, Pineda M, Artuch R. Mitochondrial diseases mimicking neurotransmitter defects. *Mitochondrion*. 2008;8:273-8.
  111. Montero R, Artuch R, Briones P, Nascimento A, García-Cazorla A, Vilaseca MA, Sánchez-Alcázar JA, Navas P, Montoya J, Pineda M. Diagnosis of paediatric patients with coenzyme Q10 deficiency. *J Inher Metab Dis*. 2007; 30: 73-73.
  112. Ayuso T, Tuñón MT, Montoya J, Lacruz F, Herrero MD, Echávarri C, Ruiz E. Mutación mitocondrial inhabitual en pacientes con fenotipo MELAS. *Neurología*. 2006;21: 650-1.
  113. 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 (Barcelona)*. 2006;126:457-60.
  114. Pérez M, Barrera R, Montoya J, Marta E. [Evolution until death of two members of a family with A3243G mutation and MELAS phenotype versus diabetes mellitus]. *Neurología*. 2006;21:327-32.

115. 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.
116. Navarro-Sastre A, Playán A, López-Gallardo E, Montoya J, Yanes L, Ruiz-Pons M, Campistol J, Pineda M, Vilaseca MA, Briones P, Ribes A. Screening for mutations in DGUOK in patients with mitochondrial DNA depletion. *J Inher Metab Dis*. 2004;27(S1):117-117.
117. Pineda M, Playán-Arís A, Alcaine-Villarroya MJ, Vernet AM, Serra-Castanera A, Solano A, Vilaseca MA, Artuch R, López-Pérez M, Briones-Godino MP, Andreu A, Montoya J. [Familiar chronic progressive external ophthalmoplegia of mitochondrial origin]. *Rev Neurol*. 2004;38:1023-7.
118. Raspall-Chaure M, Solano A, Vázquez E, Macaya-Ruiz A, Del Toro-Riera M, Cabezuelo-Briones A, Montoya J, Andreu A, Roig-Quilis M. [A patient with bilateral lesion in the striatum and slowly progressive dystonia secondary to T14487C mutation in the ND6 gene of complex I of the mitochondrial respiratory chain]. *Rev Neurol*. 2004;39:1129-32.
119. Mancuso M, Vives-Bauza C, Filosto M, Martí R, Solano A, Montoya J, Gámez J, DiMauro S, Andreu AL. A mitochondrial DNA duplication as a marker of skeletal muscle specific mutations in the mitochondrial genome. *J Med Genet*. 2004;41:E73.
120. Solano A, Russo G, Playán A, Parisi M, DiPietro M, Scuderi A, Palumbo M, Renis M, López-Pérez MJ, Andreu AL, Montoya J. De Toni-Debre-Fanconi syndrome due to a palindrome-flanked deletion in mitochondrial DNA. *Pediatr Nephrol*. 2004;19:790-3.
121. Gutiérrez A, Saldaña-Martínez A, García-Ramírez R, Rayo-Mares D, Carreras M, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Montiel-Sosa JF. [Leigh syndrome caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in a Mexican family]. *Rev Neurol*. 2009;49:248-50.
122. Pacheu-Grau D, Gómez-Durán A, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial pharmacogenomics:

- barcode for antibiotic therapy. *Drug Discov Today*. 2010;15:33-9.
123. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003;4:119-41.
  124. Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards MB. Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int*. 2007;168:1-13.
  125. Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, Turnbull DM. Leber hereditary optic neuropathy: Identification of the same mitochondrial NDI mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet*. 1991;49:939-50.
  126. 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.
  127. 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.
  128. 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.
  129. 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.
  130. Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, Devivo DC, DiMauro S. The Mutation at Nt 8993 of Mitochondrial DNA Is a Common Cause of Leighs Syndrome. *Ann Neurol*. 1993;34:827-34.
  131. 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.

132. 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.
133. Carrozzo R, Tessa A, Vázquez Memije ME, Piemonte F, Patrono C, Malandrini A, Dionisi Vici C, Vilarinho L, Villanova M, Schagger H, Federico A, Bertini E, Santorelli F. The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology*. 2001;56:687-90.
134. Goto Yi, 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.
135. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell*. 1990;61:931-7.
136. 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;S3:S124-S130.
137. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu XD, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischelghodsian N. Mitochondrial Ribosomal RNA Mutation Associated with Both Antibiotic-Induced and Non-Syndromic Deafness. *Nat Genet*. 1993;4:289-94.
138. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet*. 2004;74:139-52.
139. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophtalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New Engl J Med*. 1989;320:1293-9.

140. Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, Di Donato S. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature*. 1989;339:309-11.
141. Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Bordoni A, Pannacci M, Amati P, Moggio M, Servidei S, Scarlato G, Di Donato S. Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: A new autosomal dominant disease. *Am J Hum Genet*. 1990;47:904-14.
142. Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lonqvist J, Savontaus ML, Peltonen L. Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest*. 1992;90:61-6.
143. 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.
144. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988;331:717-9.
145. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*. 1998;51:1525.
146. Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM, Munnich A. Mitochondria DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet*. 1989;1:902-3.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	11
2. EL SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL HUMANO .....	15
2.1. Organización genética .....	15
2.2. Replicación del DNA mitocondrial .....	18
2.3. Transcripción del mtDNA humano .....	21
2.4. Traducción de los mRNA mitocondriales .....	25
2.5. Regulación de la expresión del mtDNA .....	27
3. CARACTERES DIFERENCIALES DE LA GENÉTICA MITOCONDRIAL .....	29
4. ENFERMEDADES CAUSADAS POR MUTACIONES EN EL DNA MITOCONDRIAL .....	33
4.1. Enfermedades causadas por mutaciones puntuales en el mtDNA .....	38
4.2. Enfermedades causadas por deleciones del mtDNA .....	39
4.3. Enfermedades causadas por depleción del mtDNA .....	40
4.4. Nuevas mutaciones puntuales en el mtDNA y criterios de patogenicidad .....	41
4.5. Criterios de diagnóstico de las enfermedades mitocondriales .....	46
4.6. Diagnóstico prenatal y consejo genético .....	50
4.7. Influencia de los haplogrupos mitocondriales sobre la enfermedad .....	51
4.8. Genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales: regreso a la genética mendeliana .....	54
4.9. Terapia de las enfermedades mitocondriales .....	55
4.10. La patología mitocondrial en España .....	55
5. EL DNA MITOCONDRIAL EN ANÁLISIS FORENSES .....	59
BIBLIOGRAFÍA .....	61



Esta obra se terminó de imprimir  
el 9 de marzo de 2010  
en los talleres gráficos de INO Reproducciones,  
de Zaragoza

