

Patología molecular

Patología molecular mitocondrial

A. Panizo Santos

Departamento de Anatomía Patológica, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona.

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares con doble membrana que se encuentran prácticamente en todas las células eucariotas y cuya función principal es llevar a cabo el metabolismo oxidativo, con la consiguiente producción de energía en forma de ATP (fosforilación oxidativa). Además, también participan en la biosíntesis de otros componentes celulares: pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos nu-

cleótidos, ácido fólico, hemo, urea, y una gran variedad de metabolitos (1).

La característica más singular de la mitocondria es la de poseer un sistema genético propio con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para la síntesis de DNA, RNA y de todas las proteínas que codifica. Este segundo sistema genético celular, a pesar de contener un número muy pequeño de genes, es indispensable para la vida celular porque

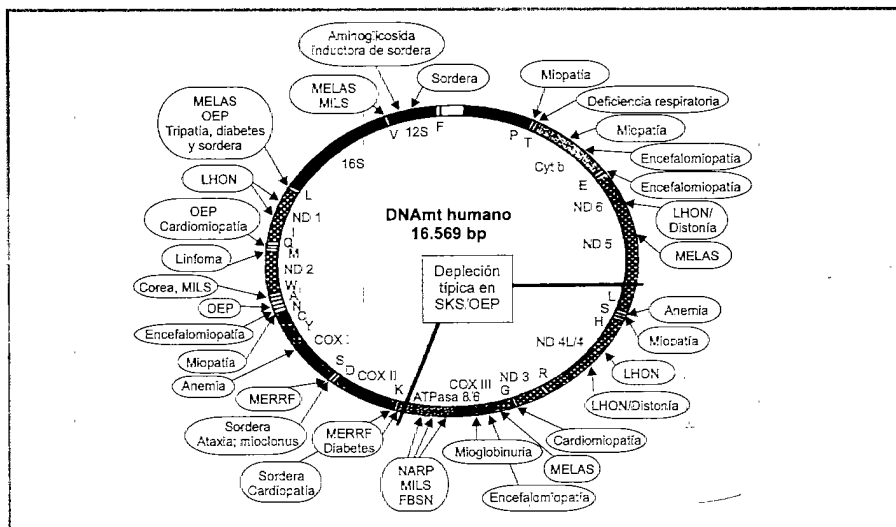


Figura 1. Mapa del genoma mitocondrial. Las diferentes áreas sombreadas representan los genes estructurales. (Tomada de DiMauro; *Rev Neurol* 1999.)

codifica 13 proteínas integrantes de los complejos respiratorios mitocondriales. Sin embargo, las mitocondrias no son autónomas, ya que tanto la formación del orgánulo como la expresión de su genoma dependen de un gran número de proteínas codificadas por el DNA nuclear, que son sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos e importadas a la mitocondria.

La existencia de un sistema genético en el citoplasma celular comenzó a intuirse a finales de la década de 1940. El DNA mitocondrial (DNAm_t) se descubrió en la década de 1960 (2), y desde entonces se ha ido obteniendo una imagen muy detallada de su estructura, así como de su relación con determinadas enfermedades.

El sistema genético mitocondrial presenta una serie de características particulares, como la utilización de un código genético propio, con algunas desviaciones con respecto al universal; la existencia de una alta velocidad y frecuencia de mutaciones; su transmisión por herencia materna, no mendeliana, y la organización y expresión de sus genes (1, 3). Asimismo, desde que en 1988 se describieron por primera vez mutaciones en el DNAm_t que podían causar enfermedades humanas con deficiencias en la producción de ATP (4), el estudio de la bioenergética y genética molecular mitocondrial ha adquirido nuevas dimensiones (5, 6).

ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL DNAm_t HUMANO

En cada célula existe un número variable de mitocondrias en función de los requerimientos energéticos de la misma, y cada una de ellas tiene varias copias del genoma mitocondrial. Las células humanas contienen de 1000 a 10.000 copias de DNAm_t dependiendo de los tejidos. El DNAm_t humano es una molécula duplohelicoidal circular cerrada que consta de 16.569 pares de bases, cuya secuencia se conoce en su totalidad (7). Este DNA codifica 37 genes que corresponden a dos RNA ribosómicos componentes de los ribosomas mitocondriales (RNA_r 12S y 16S), 22 RNA de transferencia y 13 polipéptidos componentes de los complejos respiratorios de la membrana interna mitocondrial (sistema OXPHOS) (Fig. 1). De estos polipéptidos,

siete forman parte del complejo I (subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6); uno corresponde al apocitocromo b del complejo III; tres subunidades (COI, COII y COIII) al complejo IV, y dos son las subunidades 6 y 8 de la ATPasa (complejo V). El resto de las subunidades polipeptídicas de estos complejos están codificadas por el DNA nuclear (8).

Una de las características más sorprendentes del DNAm_t es que presenta una organización genética muy compacta, ya que prácticamente se encuentra saturado por genes. La cadena pesada (H) del DNAm_t codifica los dos RNA_r, 14 RNA_t y 12 polipéptidos, mientras que la cadena ligera (L) contiene solamente información para 8 RNA_t y un polipéptido (ND6). La única zona del DNAm_t que no codifica ningún gen es un pequeño fragmento que corresponde al 7% del DNA, localizado alrededor del origen de replicación de una de las cadenas y que incluye el bucle de desplazamiento (bucle D). Todos estos genes carecen de intrones. En la cadena H los genes se disponen uno a continuación del otro, sin tramos no codificantes intermedios (7). Además, la mayor parte de genes codificantes de proteínas carecen de un codón de terminación. Éstos presentan una T o TA después del último codón con sentido y preceden al extremo 5' del gen adyacente.

El código genético mitocondrial para traducir sus genes presenta algunas diferencias muy significativas en la lectura de codones con respecto al código universal. Así, el codón UGA codifica triptófano en lugar de ser uno de los codones de terminación. Asimismo, además de AUG, la mitocondria utiliza AUA y AUU como codones de iniciación, mientras que AGA y AGG, codones de arginina en el código universal, son señales de terminación.

GENÉTICA MITOCONDRIAL

El sistema genético mitocondrial presenta una serie de características genéticas que lo diferencian del nuclear: el DNAm_t es semiautónomo, se hereda exclusivamente a partir de la madre, tiene segregación mitótica, complementación del DNAm_t y expresión umbral, alta tasa de mutación y acumulación de mutaciones en el DNA (5).

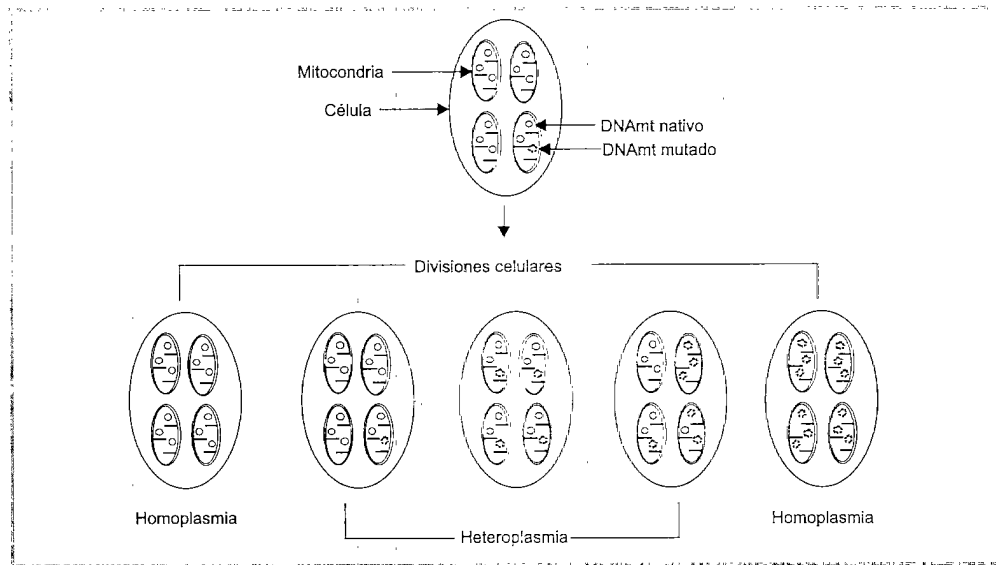


Figura 2. Segregación mitótica del DNAm_t, homoplasmia y heteroplasmia.

El DNAm_t se hereda con un patrón vertical no mendeliano, exclusivamente por vía materna. La madre transmite el genoma mitocondrial a todos sus hijos, solamente las hijas lo transmitirán a todos los miembros de la siguiente generación, y así sucesivamente. Esto es consecuencia del alto número de mitocondrias con sus moléculas de DNAm_t que existen en los óvulos, mientras que el espermatozoide apenas contiene mitocondrias. El número tan pequeño de DNAm_t que pudiera entrar en el huevo durante la fecundación, o bien sufre un proceso de eliminación o no va a tener ningún efecto sobre el genotipo.

El DNAm_t es poliploide y durante la división celular las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hija (segregación mitótica). La división de las mitocondrias y la replicación del DNAm_t son procesos aleatorizados independientes del ciclo celular. En tejidos normales, todas las moléculas de DNAm_t son idénticas, esto es, su DNAm_t es homoplásmico. Sin embargo, en la célula pueden aparecer moléculas de DNAm_t mutado que pueden afectar a todas las moléculas de DNAm_t (homoplasmia para la mutación) o que pueden coexistir con el DNAm_t normal (heteroplasmia). Con la división celular el fenotipo de una línea celular determinada puede variar dando lugar a tres posibles genotipos diferentes: homoplásmico para el DNAm_t normal, hete-

roplásmico y homoplásmico para el DNAm_t mutado (Fig. 2). El fenotipo de una célula con heteroplasmia depende del porcentaje de DNAm_t mutado que exista en cada célula, es decir, del grado de heteroplasmia. Normalmente, todos los polimorfismos neutros del DNAm_t son homoplásmicos, mientras que la mayor parte de las mutaciones patogénicas (aunque no todas) son heteroplásmicas.

La expresión fenotípica de una mutación patogénica del DNAm_t no sigue las reglas de la herencia mendeliana, y depende en gran medida de las proporciones de DNAm_t normal y mutado que existen en un tejido en particular. El efecto umbral representa la proporción mínima de DNAm_t mutado necesaria para alterar el metabolismo oxidativo a un nivel suficiente para que produzca la disfunción de un determinado órgano o tejido (9). El efecto umbral representa un concepto relativo ya que el número de genomas mitocondriales necesarios para producir una disfunción celular varía de tejido a tejido, en función de su dependencia del metabolismo oxidativo. El corazón, el cerebro y el músculo esquelético tienen una gran demanda de energía oxidativa y, por tanto, bajos umbrales para una disfunción mitocondrial cuando son comparados con otros tejidos. Así pues, la presencia de una determinada mutación en una proporción de un 80% en el hígado puede ser clínicamente silente, mientras que la misma propor-

ción en el músculo o el cerebro puede dar lugar a expresión fenotípica. Además, la vulnerabilidad metabólica puede variar en el mismo tejido en función del tiempo y de las demandas energéticas.

La división de las mitocondrias y la replicación del DNAm_t son procesos aleatorizados independientes del ciclo celular, lo que causa la denominada segregación mitótica del DNAm_t. Debido a este hecho, si un paciente es heteroplásmico, la proporción de moléculas de DNAm_t mutadas puede variar de tejido a tejido y, en un mismo tejido, en función del tiempo. Esto significa que un paciente puede tener una serie de síntomas en un momento dado de su vida y variar posteriormente. Si el número de moléculas de DNAm_t mutadas es pequeño, se producirá una complementación de la función con las moléculas de DNAm_t normal y no se manifestará el defecto genético. Sin embargo, al aumentar el porcentaje de DNAm_t mutado se hará patente un fenotipo patogénico. Los tejidos dependen en diverso grado de la energía producida por la mitocondria, y el número de orgánulos y de moléculas de DNAm_t es diferente en cada tejido. Los tejidos que preferentemente se afectan son el sistema nervioso central y periférico, el músculo estriado esquelético, el corazón, los islotes pancreáticos, el riñón y el hígado.

Otra de las características particulares de la genética mitocondrial es que tiene una gran tendencia a mutar, siendo la tasa de sustitución de nucleótidos unas diez veces superior a la del DNA nuclear (10). Una posible explicación para este hecho es la ausencia de histonas que protejan al DNAm_t, así como la ausencia de un sistema eficaz de reparación del DNAm_t lesionado, y el hecho de que el DNAm_t está constantemente expuesto a radicales libres oxidantes derivados del oxígeno y originados en la fosforilación oxidativa (11). Como consecuencia de ello hay una gran variación de secuencias entre especies e incluso entre individuos de una misma. Además de estas diferencias, en un individuo determinado se está produciendo continuamente, a lo largo de la vida, una heterogeneidad en el DNAm_t como consecuencia de las mutaciones que se están originando en sus células. Por tanto, es posible que una acumulación de este daño mitocondrial sea la causa de la disminución de la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar en

el envejecimiento (12). Dada la elevada tasa de mutación del DNAm_t y la presencia de numerosos polimorfismos específicos de una población, resulta fundamental distinguir las mutaciones patogénicas de aquellas que no lo son.

CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Las clasificaciones clínicas o bioquímicas de los trastornos mitocondriales han dado paso a una clasificación de base genética-molecular, aún inacabada, basada en las alteraciones del genoma mitocondrial, del genoma nuclear o de la comunicación entre ambos. El estudio del genoma mitocondrial en relación con la patología humana surge en 1988 con la descripción de deleciones del DNAm_t en relación con las miopatías mitocondriales, el síndrome de Kearns-Sayre, y el hallazgo de una mutación puntual asociada a la neuropatía óptica hereditaria de Leber. Desde entonces se han identificado un gran número de mutaciones en el genoma mitocondrial asociadas a una gran variedad de fenotipos clínicos.

En la actualidad, la mayor parte de las enfermedades mitocondriales para las que se ha establecido la base molecular están causadas por mutaciones del DNAm_t. Existen dos tipos: grandes reordenamientos, que incluyen deleciones y duplicaciones, y mutaciones puntuales. Las mutaciones del DNAm_t se pueden dar espontáneamente en la línea germinal, dando lugar a una herencia materna, o en las células no germinales, originando los casos esporádicos de la enfermedad. También existen evidencias de que las mutaciones del DNAm_t se acumulan en los tejidos posmitóticos, lo que probablemente contribuya al envejecimiento normal o al desarrollo de cuadros patológicos frecuentes, como el fallo cardíaco, la diabetes mellitus o enfermedades neurodegenerativas.

Deleciones y duplicaciones del DNAm_t

Se puede considerar a los pacientes que portan una única deleción o la inserción de un segmento de DNAm_t (duplicación de DNAm_t) en el genoma

mitocondrial, idéntica en todos los tejidos, aunque la proporción de genomas mutados en cada tejido puede variar (heteroplasmia). De forma general, las deleciones no se segregan a tejidos de alto índice de recambio celular, mientras que las duplicaciones sí, lo que permite un diagnóstico molecular menos invasor (13). Las deleciones, en su mayor parte, se localizan en la región comprendida entre los dos orígenes de la replicación. Alrededor del 30% a 40% de los pacientes presentan una idéntica deleción de 4977 pares de bases, que se denomina deleción común (14). Entre las enfermedades mitocondriales causadas por deleciones y/o duplicaciones del DNAm_t se encuentran el síndrome de Kearns-Sayre, la oftalmoplejía externa progresiva esporádica y el síndrome de Pearson. La diabetes mellitus y la sordera constituyen un caso interesante de transmisión materna de una deleción del DNAm_t (15). Otras enfermedades asociadas a diabetes mellitus, tales como el síndrome de Wolfram o la encefalopatía atáxica más disfunción tubular, pueden asociarse a estas alteraciones del DNAm_t (16). De igual manera, la lipomatosis o el síndrome de MELAS asociado a tubulopatía también pueden ser la expresión fenotípica de las deleciones del DNAm_t (17, 18).

Mutaciones puntuales del DNAm_t

Aunque hasta la fecha se han identificado con criterios de patogenicidad más de 50 mutaciones puntuales del DNAm_t, cuatro de ellas son con mucho las más frecuentes: la A3243G MELAS, la G8344A MERRF, la T8993G NARP y la A11778G LHON. Otras mutaciones puntuales del DNAm_t son mucho menos prevalentes, e incluso algunas se han descrito únicamente en un solo individuo o familia (19).

Alteraciones de los genes nucleares

Dado que la mayor parte de las proteínas mitocondriales vienen codificadas por el DNA nuclear, es lógico que muchas citopatías mitocondriales pertenezcan a este grupo. En contraposición al gran número de mutaciones del DNAm_t descritas hasta

ahora, sólo se ha documentado una alteración genética del DNA nuclear que afecta a la cadena respiratoria mitocondrial (20).

Alteraciones en la importación de proteínas mitocondriales

Las proteínas mitocondriales codificadas en el DNA nuclear se sintetizan en el citoplasma y se importan a la mitocondria. Teóricamente hay dos posibles mecanismos genéticos que pueden alterar la importación de péptidos a la mitocondria: mutaciones en los péptidos señal que impiden el transporte de proteínas mitocondriales específicas, y mutaciones que afectan a otros factores que intervienen en la translocación de las proteínas, como las *heat shock*, receptores o proteasas; estas últimas alterarían el transporte de gran parte de las proteínas mitocondriales (21).

Déficit de la comunicación intergenómica

El genoma mitocondrial depende en gran medida del genoma nuclear, que codifica varios factores implicados en la replicación, transcripción y traducción del DNAm_t (5). Se han descrito dos enfermedades en que hay alteraciones en la comunicación entre los dos genomas, que se transmiten por herencia mendeliana, ya que el error genético primario se halla localizado en el DNA nuclear.

Las deleciones múltiples del DNAm_t son genéticamente heterogéneas: pueden darse con patrón autosómico dominante o autosómico recesivo (22). Un tipo particular de la forma recesiva es la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (23).

La presentación clínica inicial de la depleción del DNAm_t parecía estar limitada a tres fenotipos clínicos: miopatía congénita fatal de evolución rápida con o sin participación renal, hepatopatía congénita fatal de evolución rápida, y miopatía congénita infantil de curso más lento que conduce a la muerte del paciente antes de los cinco años (9). Hoy se sabe que el espectro clínico de la depleción del DNAm_t es más amplio (24).

ENFERMEDADES MITOCONDRIALES CLÁSICAS

Los aspectos genéticos y moleculares de las enfermedades mitocondriales se han revisado recientemente con detalle y ya existe un banco de datos del genoma mitocondrial disponible *on-line* en Internet (MITOMAP: <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>), donde se describen todas las mutaciones conocidas (25).

En la actualidad, se han descrito más de 50 mutaciones diferentes del DNAMt que causan un amplio espectro de manifestaciones clínicas: MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios de apoplejía), MERF (epilepsia mioclónica, miopatía con fibras rojo-rotas), y Kearns-Sayre (retinitis pigmentosa, oftalmoplejía externa progresiva, ataxia y alteraciones de la conducción cardíaca). Los síndromes MELAS y MERF están causados por mutaciones puntuales del DNAMt que afectan a los genes que codifican el RNAt (26), mientras que el síndrome de Kearns-Sayre está causado por una delección amplia del DNAMt (27).

ENVEJECIMIENTO

Diferentes estudios han comprobado que existe una acumulación, relacionada con la edad, de la delección común de 4977 pares de bases en diferentes tejidos, que es más intensa en aquellos tejidos posmitóticos como el sistema nervioso y el músculo estriado esquelético y cardíaco (28). Se cree que esta acumulación de mutaciones en el DNAMt lleva a la célula a una reducción en la capacidad de fosforilación oxidativa, con la consiguiente disminución en la capacidad de síntesis de adenosín trifosfato (ATP). La teoría mitocondrial del envejecimiento propone que los radicales libres derivados del oxígeno, generados en la fosforilación oxidativa, reaccionan con el DNAMt, lesionándolo y dando lugar a delecciones y mutaciones, las cuales van a deteriorar la función de la cadena respiratoria (29). La disminución en la generación de ATP origina una reducción del potencial transmembrana de la mitocondria y puede activar la apoptosis mediante la liberación de citocromo c al citoplasma y la activación de la caspasa 3 y 9 (30).

Sin embargo, recientes estudios no han hallado una clara correlación entre el envejecimiento y la capacidad de fosforilación oxidativa en el músculo (31). Esta falta de correlación no debe sorprender si se tienen en cuenta las relativamente pocas mutaciones acumuladas que se observan en individuos de edad avanzada (0,1% a 12%) en comparación con las que se requieren para causar una disfunción de la cadena respiratoria, como por ejemplo en el síndrome de Kearns-Sayre (>60%).

Por tanto, aún existe bastante controversia sobre si la acumulación de delecciones y mutaciones del DNAMt relacionadas con la edad pueden contribuir al proceso de envejecimiento y al desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento tales como fallo cardíaco, demencia, diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas.

CORAZÓN

El corazón es un órgano altamente dependiente de la ATP, y las mitocondrias constituyen aproximadamente un tercio del volumen total de los cardiomiocitos. Se ha especulado que una producción inadecuada de energía puede ser un factor clave que contribuya al fallo cardíaco. Esta importancia en la producción de energía por los cardiomiocitos ha sido subrayada tras los hallazgos de miocardiopatías en pacientes con enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones del DNAMt (32, 33).

Con frecuencia los pacientes con delecciones del DNAMt desarrollan trastornos del sistema de la conducción con bloqueos auriculoventriculares, así como miocardiopatía dilatada (34). Diferentes mutaciones puntuales del DNAMt se asocian con casos hereditarios o esporádicos de miocardiopatía hipertrófica o dilatada (32, 35).

DIABETES MELLITUS

Diferentes estudios han sugerido que mutaciones del DNAMt y disfunciones de la cadena respiratoria pueden estar implicados en la patogénesis de la diabetes mellitus. En primer lugar, mutaciones del DNAMt asociadas con encefalopatías mitocondriales se han identificado también en pacientes con

diabetes mellitus. Segundo, se ha encontrado evidencia directa de mutación del DNAm_t en relación con la diabetes mellitus en pedigríes, con transmisión materna de la enfermedad y asociada a sordera (36). Tercero, es más frecuente heredar la diabetes de una madre afecta que de un padre con la enfermedad, lo cual sugiere una herencia materna de los factores predisponentes. En estudios *in vitro* se ha demostrado que son necesarios el DNAm_t y la cadena respiratoria intacta para la liberación de insulina mediada por glucosa. Este hecho sugiere que mutaciones del DNAm_t u otras causas que alteren la función de la fosforilación oxidativa en las células beta de los islotes pancreáticos pueden originar una reducción en la secreción de insulina y, por tanto, el desarrollo de diabetes mellitus.

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las neuronas son células totalmente diferenciadas sin capacidad de división, por lo que se ha especulado que son particularmente vulnerables ante lesiones del DNAm_t (37). Diversos estudios sugieren que existe una implicación del sistema de fosforilación oxidativa y un incremento del daño oxidativo celular en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (38), y posiblemente también en otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (39). Ciertos polimorfismos de DNAm_t se han descrito en asociación con un incremento del riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson (40). Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado casos de enfermedad de Parkinson con herencia materna, tal y como ocurre en la diabetes mellitus relacionada con alteraciones del DNAm_t.

TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE MITOCONDRIOPATÍAS

La mayor parte de las aproximaciones al diagnóstico de las enfermedades mitocondriales emplean la combinación de métodos bioquímicos y morfológicos para evaluar la función de la cadena respirato-

ria, y técnicas moleculares para detectar mutaciones del DNAm_t o del DNA nuclear.

En la actualidad, los estudios morfológicos que se emplean ante trastornos mitocondriales son: estudios con tricrómico de Gomori (pone de manifiesto las fibras rojo-rotas), estudios de histoquímica (actividad SDH, actividad COX), estudios con fluorescencia, estudios inmunohistoquímicos (anticuerpos frente a las subunidades de la cadena respiratoria codificadas por el DNAm_t), y estudios mediante hibridación *in situ* (41). Con las técnicas de ultraestructura, en las enfermedades mitocondriales las alteraciones son muy variables, aunque lo más frecuente es hallar un aumento del número y a veces del tamaño mitocondrial junto a inclusiones paracristalinas, alteraciones de las crestas mitocondriales, inclusiones de glucógeno o lípidos y mitocondrias anulares (41).

Actualmente también se emplean técnicas moleculares para el estudio de las enfermedades mitocondriales, a la hora de detectar mutaciones específicas de DNAm_t o DNA nuclear. Las mutaciones puntuales del DNAm_t son fácilmente detectables mediante técnicas de PCR, mientras que las técnicas de *Southern-blot* o PCR larga se emplean para detectar y estudiar los reordenamientos del DNAm_t (42). Una posible dificultad a la hora de aplicar estas técnicas de biología molecular a las enfermedades mitocondriales es que las deleciones heteroplásmicas y mutaciones puntuales del DNAm_t pueden no estar presentes en unos tejidos (sangre) y sí en otros (músculo) (25). La secuenciación directa de los productos de PCR se emplea con frecuencia para detectar mutaciones del DNAm_t conocidas o nuevas. El desarrollo de los *chips* de DNA para la secuenciación del DNAm_t podrá simplificar los diagnósticos moleculares de las enfermedades mitocondriales en un futuro (43).

BIBLIOGRAFÍA

1. Attardi G, Schatz G. *Biogenesis of mitochondria*. Ann Rev Cell Biol 1988; 4: 289-333.
2. Nass MMK, Nass S. *Intramitochondrial fibers with DNA characteristics*. J Cell Biol 1963; 19: 593-629.
3. Clayton DA. *Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA*. Annu Rev Cell Biol 1991; 7: 453-478.

4. Wallace DC, Singh G, Lott MT y cols. *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. Science 1988; 242: 1427-1430.
5. Wallace DC. *Diseases of the mitochondrial DNA*. Annu Rev Biochem 1992; 61: 1175-1212.
6. Brown MD, Wallace DC. *Molecular basis of mitochondrial DNA disease*. J Bioenerg Biomembr 1994; 26: 241-250.
7. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG y cols. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature 1981; 290: 427-465.
8. Mariottini P, Chomyn A, Riley M y cols. *Identification of the polypeptides encoded in the unassigned reading frames 2, 4, 4L of human mitochondrial ADN*. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 1563-1567.
9. Moraes CT, Ricci E, Arnaudo E y cols. *Quantitative defects of mitochondrial DNA*. En: DiMauro S, Wallace DC (Eds.). *Mitochondrial DNA in human pathology*. Raven Press, New York 1993; 97-108.
10. Brown WM, George JM, Wilson AC. *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 1967-1971.
11. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. *Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease*. Trends Genet 1997; 13: 450-455.
12. Ozawa T. *Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging*. Physiol Rev 1997; 77: 425-464.
13. Poulton J, Holt I. *Mitochondrial DNA: Does more lead to less?* Nat Genet 1994; 8: 313-315.
14. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M y cols. *Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome*. N Engl J Med 1989; 320: 1293-1299.
15. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV y cols. *Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion*. Nat Genet 1992; 1: 11-19.
16. Barrientos A, Casademont J, Sáiz A y cols. *Autosomal recessive Wolfram's syndrome associated with an 8.5 kb mtDNA single deletion*. Am J Hum Genet 1996; 58: 963-970.
17. Campos Y, Martín MA, Navarro C, Gordo P, Arenas J. *Single large-scale mitochondrial deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis*. Neurology 1996; 47: 1012-1014.
18. Campos Y, García-Silva MT, Rodríguez-Barrionuevo C y cols. *Mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) and Fanconi's syndrome*. Pediatr Neurol 1995; 13: 69-72.
19. Zeviani M, Fernández-Silva P, Tiranti V. *Disorders of mitochondria and related metabolism*. Curr Opin Neurol 1997; 10: 160-167.
20. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D y cols. *Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency*. Nat Genet 1995; 11: 144-149.
21. DiMauro S. *Mitochondrial encephalomyopathies: What next?* J Inher Metab Dis 1996; 19: 489-503.
22. Carozzo R, Hirano M, Fromenty B y cols. *Multiple mitochondrial DNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogeneses*. Neurology 1998; 50: 99-106.
23. Hirano M, Silvestri G, Blake D y cols. *Mitochondrial neuro-gastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): Clinical, biochemical and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder*. Neurology 1994; 44: 721-727.
24. Arenas Mora J, Campos González Y, Castro Gago M. *Deplección de ADN mitocondrial en miopatía mitocondrial por déficit de los complejos III y IV de la cadena respiratoria*. An Esp Pediatr 1996; 45: 656-657.
25. Larsson NG, Clayton DA. *Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders*. Annu Rev Genet 1995; 29: 151-178.
26. Goto YI, Nonaka I, Horai S. *A mutation in the tRNA Leu(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies*. Nature 1990; 348: 651-653.
27. Lestienne P, Ponsot G. *Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion*. Lancet 1988; 1: 885.
28. Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. *A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 7370-7374.
29. Wallace DC, Melov S. *Radicals and aging*. Nat Genet 1998; 19: 105-106.
30. Green DR. *Apoptotic pathways: The roads to ruin*. Cell 1998; 94: 695-698.
31. Barrientos A, Casademont J, Rotig A y cols. *Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun 1996; 229: 536-539.
32. Marín-García J, Goldenthal MJ. *Mitochondrial DNA defects and cardiomyopathy*. Cardiovasc Pathol 1998; 7: 205-213.
33. DiMauro S, Hirano M. *Mitochondria and heart disease*. Curr Opin Cardiol 1998; 13: 190-197.
34. Antozzi C, Zeviani M. *Cardiomyopathies in disorders of oxidative metabolism*. Cardiovasc Res 1997; 35: 184-199.
35. Arbustini E, Diegoli M, Fasani R y cols. *Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy*. Am J Pathol 1998; 153: 1501-1510.
36. Sue CM, Holmes-Walker DJ, Morris JG y cols. *Mitochondrial gene mutations and diabetes mellitus*. Lancet 1993; 341: 437-438.
37. Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. *Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain*. Nat Genet 1992; 2: 318-323.
38. Ikebe SI, Tanaka M, Ohno K y cols. *Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence*. Biochem Biophys Res Commun 1990; 170: 1044-1048.
39. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A y cols. *Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients*. Genomics 1993; 17: 171-184.
40. Brown MD, Shoffner JM, Kim YL y cols. *Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients*. Am J Med Genet 1996; 61: 283-289.
41. Cabello A, Navarro C, Ricoy JR. *Alteraciones morfológicas de las miopatías mitocondriales*. Rev Neurol 1998; 26(Suppl. 1): S44-49.
42. Graff C, Clayton DA, Larsson NG. *Mitochondrial medicine. Recent advances*. J Intern Med 1999; 246: 11-23.
43. Chée M, Yang R, Hubbell E y cols. *Accessing genetic information with high-density DNA arrays*. Science 1996; 274: 610-614.