



Universidad
Zaragoza



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

Alteraciones en la dinámica mitocondrial en enfermedades
causadas por mutaciones puntuales del ADN mitocondrial

Alterations in mitochondrial dynamics in disease caused by
mitochondrial DNA point mutations

Autora

Andrea Lucía Sagastegui Alca

Directora

Sonia Emperador Ortiz

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía e Histología Humana

2022/2023

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. <u>La mitocondria</u>	3
2.1.1. Estructura y función	3
2.1.2. Características del sistema OXPHOS	4
2.2. <u>Patología mitocondrial: características del genoma y enfermedades mitocondriales</u>	5
2.2.1. Características del genoma mitocondrial	5
2.2.2. Enfermedades mitocondriales	6
2.3. <u>Introducción a la dinámica mitocondrial</u>	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
4.1. Diseño	9
4.2. Estrategia de búsqueda	9
4.3. Criterios de inclusión y exclusión	10
4.4. Análisis de datos	11
5. RESULTADOS	12
5.1. <u>Características de la dinámica mitocondrial</u>	12
5.1.1. Fusión y fisión mitocondrial	12
5.1.1.1. <i>Aspectos fisiológicos de la fusión mitocondrial</i>	13
5.1.1.2. <i>Aspectos fisiológicos de la fisión mitocondrial</i>	13
5.1.2. Aspectos fisiológicos de la mitofagia	14
5.1.3. Aspectos fisiológicos de la biogénesis mitocondrial	15
5.2. <u>Dinámica mitocondrial y mutaciones puntuales del ADNmt</u>	16
5.2.1. Dinámica mitocondrial en MELAS: mutación m.3243A>G en el gen ARN ^t _{Leu}	16
5.2.1.1. <i>Mitofagia asociada a la mutación en m.3243A>G</i>	17
5.2.1.2. <i>Biogénesis asociada a la mutación en m.3243A>G</i>	19
5.2.1.3. <i>Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.3243A>G</i>	21

5.2.2.	Dinámica mitocondrial en MERRF: mutación m.8344A>G en el gen ARN ^{Lys}	22
5.2.2.1.	<i>Mitofagia asociada a la mutación en m.8344A>G</i>	22
5.2.2.2.	<i>Biogénesis asociada a la mutación en m.8344A>G</i>	24
5.2.2.3.	<i>Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.8344A>G</i>	24
5.2.3.	Dinámica mitocondrial en NARP: mutación m.8993T>G en el gen codificante de ATPasa-6.....	25
5.2.3.1.	<i>Biogénesis asociada a la mutación en m.8993T>G</i>	25
5.2.3.2.	<i>Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.8993T>G</i>	26
5.2.3.3.	<i>Mitofagia asociada a la mutación en m.8993T>G</i>	27
5.2.4.	Dinámica mitocondrial en MILS: mutación m.8993T>G, m.13051G>A y m.10158T>C en el gen codificante de ATPasa-6	27
5.2.4.1.	<i>Biogénesis asociada a la mutación en m.8993T>G</i>	27
5.2.4.2.	<i>Mitofagia asociada a la mutación en m.13051G>A</i>	28
5.2.4.3.	<i>Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.10158T>C</i>	28
5.2.5.	Dinámica mitocondrial en LHON: mutaciones en m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C de los genes codificantes de C-I:.....	28
5.2.5.1.	<i>Biogénesis asociada a las mutaciones en m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C</i>	29
5.2.5.2.	<i>Mitofagia asociada a las mutaciones en m.3460G>A y m.11778G>A</i>	30
6.	DISCUSIÓN	32
7.	CONCLUSIONES	35
8.	BIBLIOGRAFÍA	36
9.	ANEXOS	40
	Anexo 1. Alteraciones en la dinámica mitocondrial	40
	Anexo 2. Sustancias modificadoras	44
	Anexo 3. Ensayos clínicos.....	46

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNmt/DNAmt: ADN mitocondrial
- ADNn: ADN nuclear
- ARNt: ARN de transcripción
- MMI/MIM: membrana mitocondrial interna
- MME/MOM: membrana mitocondrial externa
- ATP: trifosfato de adenosina
- OXPHOS: sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial
- NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
- C-I/II/III/IV/V: complejo I/II/III/IV/V
- Cyt-c: citocromo C
- ROS: radicales libres de oxígeno
- LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber
- NARP: neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa.
- MELAS: encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares
- MERRF: epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas
- MILS: Síndrome de Leigh de herencia materna
- CPEO: oftalmoplejia progresiva externa crónica
- MIDD: diabetes y sordera hereditaria
- ANOVA: análisis de la varianza
- GTPasa: guanosina trifosfatasa
- CMTA2: Charcot-Marie-Tooth A2
- DOA: atropia óptica dominante
- CoQ₁₀: coenzima Q₁₀
- MFN1/2: Mitofusina 1 y 2
- OPA1: optic atrophy 1
- Drp1: Dynamin-related protein 1
- Fis1: proteína de fisión mitocondrial 1
- PINK1: serin-protein kinasa 1
- PARKIN: E3-ubiquitin ligasa
- AMPK/AMPK α : proteína kinasa activada por AMPK
- ULK1: kinasa 1 activadora de la autofagia
- mTOR: diana de rapamicina
- PGC-1 α : coactivador 1 del receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo α
- NRF1/2: factor de respiración nuclear 1/2
- TFAM: factor de transcripción mitocondrial A
- MIM23/TIM23: proteína translocasa de MMI 23
- LC3: proteína de cadena ligera 3
- siRNA: ARN de silenciamiento
- STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3
- CCCP: carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
- AICAR: 5-Aminoimidazol-4-carboxamida
- Pep-1: péptidos penetrantes de células 1
- Sirt1: sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD
- ATG5/12: autofagia 5/12
- BECLIN1: Beclina 1
- Mff: factor de fisión mitocondrial
- ADNmt+TFAMRh: terapia génica con ADNmt de donante sano y TFAM recombinante humano

1. RESUMEN

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos cuya función principal es producir ATP a través de la cadena respiratoria. La célula eucariota mantiene un control sobre la calidad mitocondrial a través de la dinámica mitocondrial (fusión, fisión, mitofagia y biogénesis). Las enfermedades mitocondriales conocidas como MELAS, MERRF, NARP, MILS y LHON se deben a mutaciones puntuales del ADNmt. En esta revisión bibliográfica se ha sugerido que, en ellas, existan alteraciones en la dinámica que las diferencien de la ausencia de patología. A su vez, se ha realizado la búsqueda de sustancias modificadoras con potencial terapéutico, cuya diana terapéutica sea la dinámica mitocondrial.

Se han utilizado un total de 64 estudios obtenidos de PubMed, Google Académico, búsqueda inversa y proporcionados por la directora, a partir de los cuales se ha extraído la información aquí expuesta. En los resultados, se han descrito las características propias de la dinámica mitocondrial en ausencia de patología, y posteriormente se ha realizado una síntesis de los estudios publicados en los últimos años.

Se ha observado un incremento de la mitofagia y la fisión en relación con una mayor heteroplasmia en las muestras de pacientes con clínica compatible con enfermedad mitocondrial. A pesar de su actividad deficiente, son necesarias para la supervivencia celular. En portadores de LHON, la baja penetrancia condiciona un incremento de la biogénesis. Se ha conseguido revertir el efecto de la mutación en las muestras al utilizar sustancias modificadoras de la dinámica mitocondrial. La mejoría clínica se ha conseguido con la dieta cetogénica, Sirt1, el ácido retinoico y el ejercicio en MELAS e idebenona en LHON.

El estudio de la dinámica mitocondrial y las sustancias modificadoras sobre las muestras no es extrapolable a otros tejidos del organismo, siendo necesario estudiar su efecto en otros tejidos afectados por la enfermedad. La curación completa no ha sido alcanzada en la actualidad, por lo que se recomienda continuar el estudio de los tratamientos con potencial terapéutico con la finalidad de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Palabras clave: enfermedad mitocondrial, alteraciones en la dinámica, baja penetrancia, heteroplasmia, sustancias modificadoras

ABSTRACT

Mitochondria are cytoplasmic organelles whose primary function is to produce ATP through the respiratory chain. The eukaryotic cell maintains control over mitochondrial quality through mitochondrial dynamics (fusion, fission, mitophagy and biogenesis). The mitochondrial diseases known as MELAS, MERRF, NARP, MILS and LHON are due to point mutations in mtDNA. In this literature review, it has been suggested that, in these diseases, there are alterations in the dynamics that differentiate them from the absence of pathology. At the same time, research has been done on modifying drugs with therapeutic potential, whose therapeutic target had to be related to mitochondrial dynamics.

A total of 64 studies were obtained from PubMed, Google Scholar, reverse search and provided by the director, from which the information presented here has been extracted. In the results, the characteristics of mitochondrial dynamics in the absence of pathology were described, followed by a synthesis of the studies published in recent years.

An increase in mitophagy and fission in relation to increased heteroplasmy has been observed in samples from patients with clinical features compatible with mitochondrial disease. Despite their deficient activity, they are necessary for cell survival. In LHON carriers, the low penetrance produces an increase in biogenesis. It has been possible to reverse the effects of the mutation in samples by using drugs that modify mitochondrial dynamics. Clinical improvement has been achieved with ketogenic diet, Sirt1, retinoic acid and exercise in MELAS and idebenone in LHON.

The study of mitochondrial dynamics and modifying drugs on the samples is not extrapolable to other tissues of the organism, being necessary to study their effect on other tissues affected by the disease. Full cure has not been achieved at the present time, so it is recommended to continue the study of treatments with therapeutic potential in order to improve the quality of life of patients.

Keywords: mitochondrial disease, alterations in dynamics, low penetrance, heteroplasmy, modifying drugs

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La mitocondria

2.1.1. Estructura y función

La mitocondria es un orgánulo localizado en el citoplasma de las células eucariotas, considerado una parte elemental de las células desde su descubrimiento en el siglo XIX por el patólogo Richard Altmann. Con la teoría endosimbiótica de Lynn Margulis, publicada en 1975, se afirmó que la mitocondria tiene un origen bacteriano. Las mitocondrias se consideran células procariotas, que fueron englobadas por un antiguo ancestro de las células eucariotas, estableciendo una relación simbiótica (1).

El ADN mitocondrial (ADNmt) es el material genético de las mitocondrias que, a diferencia del ADN nuclear (ADNn), consiste en una doble hélice cuyos extremos se unen covalentemente formando un ADN circular de 16.000 pares de bases. Se diferencia del ADNn por la disposición continua de sus genes, sin nucleótidos intermedios ni intrones, y el elevado porcentaje de ADN codificante. También presenta un número elevado de copias de ADNmt o poliplasmia, que ronda entre las 1.000 y 10.000 copias dependiendo del tejido. Para realizar su función se codifican proteínas tanto del genoma mitocondrial (37 genes en total, siendo 13 proteínas para la cadena respiratoria, 22 ARN de transcripción (ARNt), y 2 proteínas ribosómicas), como del genoma nuclear, estando implicadas más de 1000 proteínas en total. La mitocondria es capaz de utilizar la información genética que contiene replicando, transcribiendo y traduciendo estas moléculas (2).

No todas tienen la misma morfología, pudiendo presentar distinta forma dentro del mismo tejido y dentro de la misma célula. Su tamaño y su número es variable, en dependencia del medio en el que se encuentra, siendo el ejemplo más llamativo el elevado número de mitocondrias de las fibras musculares esqueléticas. A pesar de ello, su estructura interna es la misma entre todas ellas (2).

Uno de sus rasgos más característicos de la mitocondria es su doble membrana. La doble membrana está formada por la membrana mitocondrial interna (MMI), la membrana mitocondrial externa (MME) y el espacio intermembrana entre ellas. Parte de la MMI se pliega sobre sí misma, formando las crestas mitocondriales. La MME es permeable a moléculas de menos de 10.000 Dalton. La MMI actúa como barrera, permitiendo únicamente el paso de O_2 y CO_2 entre el citosol y matriz mitocondrial. Es en ella donde se encuentran los 5 complejos multiméricos que forman parte del sistema de fosforilación

oxidativa mitocondrial (OXPHOS), que utiliza el gradiente de protones generado por la impermeabilidad de la membrana interna para producir la energía necesaria para su función en forma de trifosfato de adenosina (ATP) (3).

En la matriz mitocondrial se encuentra el ADNmt formando complejos nucleoprotéicos o nucleoides, las proteínas necesarias para su replicación y transcripción y las enzimas que participan en otros procesos como la β -oxidación, el ciclo de Krebs y la síntesis de diversas moléculas, como las del grupo Hemo (4).

2.1.2. Características del sistema OXPHOS

El sistema OXPHOS está bajo la influencia de dos genomas, siendo algunas subunidades codificadas en el ADNn y otras en el ADNmt. Está formado por los 5 complejos multiméricos, llamados complejo I (C-I), complejo II (C-II), complejo III (C-III), complejo IV (C-IV) y complejo V (C-V) o ATP sintasa y dos transportadores de electrones móviles conocidos como ubiquinona o coenzima Q_{10} (CoQ_{10}), que transporta de C-I y C-II a C-III y citocromo C (cyt-c), de C-III a C-IV (figura 1):

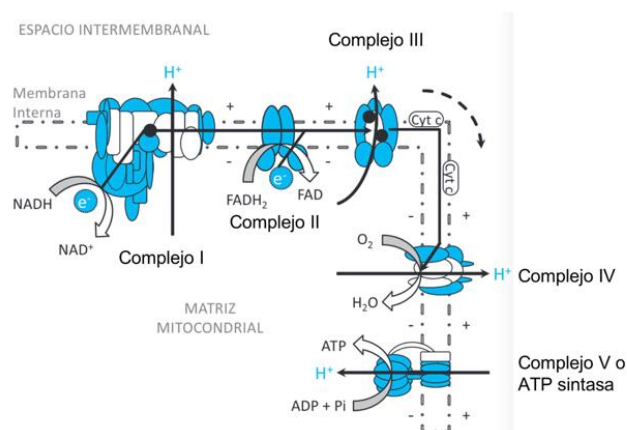


Figura 1: representación gráfica de las subunidades del sistema OXPHOS. En blanco: codificadas por ADNmt. En azul: codificadas por ADNn. (5).

Los 13 péptidos que presentan su origen en el ADNmt son:

- Péptidos ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6 del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) del C-I o ubiquinona óxido-reductasa.
- Una subunidad del C-III o cyt-c óxido-reductasa: cyt b.
- Tres subunidades (CO-I, II, II) del C-IV o cyt-c oxidasa: Cox 1, Cox 2 y Cox3.
- Dos subunidades del C-V o ATP sintasa: ATPasa-6 y ATPasa-8 (5).

El código genético varía en la codificación de estos péptidos, siendo UGA codificador de triptófano, AUA y AUU codones de iniciación y AGA y AGG codones de terminación (6). El resto de péptidos y subunidades pertenecientes a estos complejos, así como el C-

II, se codifican en el ADNn. Estos interactúan con los péptidos de origen mitocondrial para construir finalmente el sistema OXPHOS (2).

2.2. Patología mitocondrial: características del genoma y enfermedades mitocondriales

2.2.1. Características del genoma mitocondrial

El carácter peculiar propio del sistema genético mitocondrial ha sido fuente de estudio desde su descubrimiento, observándose las primeras mutaciones asociadas a presentación clínica en 1988. Desde entonces se ha potenciado su búsqueda, desarrollándose el concepto de patología mitocondrial para definir estos defectos en la producción de ATP (6).

La patología mitocondrial se define por la herencia exclusivamente materna. El ADNmt materno se transmite a toda su descendencia, siendo las hijas capaces de transmitirla a futuras generaciones. Si todas las copias del genoma son idénticas se conoce como homoplasmia, siendo todas normales o mutadas. Si coexisten copias normales y mutadas, se conoce como heteroplasmia. El ADN mutado condiciona la segregación mitótica, en la que el genoma se distribuye de forma aleatoria entre las células hijas, originando tres genotipos (homoplasmia con ADN mutado o normal y heteroplasmia de carga mutacional variable). El fenotipo clínico aparecerá en dependencia de la carga mutacional de ADNmt y los niveles de ATP producidos, siendo necesario superar el efecto umbral, que consiste en la proporción mínima de ADNmt mutado que es capaz de producir una alteración en la cadena respiratoria, cuyo valor es variable entre las células afectadas (5).

Los síntomas clínicos pueden aparecer en la infancia o en la edad adulta, de forma específica en un órgano o multisistémica. Debido a la insuficiente correlación entre fenotipo y mutación, es complicado establecer el diagnóstico desde el primer momento, y en ocasiones no se decide por uno concreto debido a la dificultad de encuadrar los síntomas dentro de un síndrome ya definido (3).

Las mutaciones del ADNmt son hasta 10-20 veces más frecuentes que las del ADNn, debido a la alta producción de radicales libres de oxígeno (ROS), que daña la información genética e incrementa el déficit de ATP. Esto se debe a que el ADNmt es un ADN desnudo, que carece de histonas para su protección. Los mecanismos de reparación de estos daños son poco eficientes, aumentando la tasa de mutaciones por encima del genoma nuclear (6).

2.2.2. Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales causadas por daños en el ADNmt son aquellas en las que existe una afectación directa de los complejos multiméricos del sistema OXPHOS, produciendo el déficit de ATP. Se pueden clasificar en: debidas a mutaciones puntuales, deleciones a gran escala y secundarias a la depleción del ADNmt (6).

Mutaciones puntuales del ADNmt:

No todas son patológicas, pues muchas de ellas son polimorfismos dentro de la población, estimándose una prevalencia de 1 entre 200 personas. Se han descrito más de 200 mutaciones, y sólo algunas de ellas producen síndromes concretos (6). Aunque la variedad fenotípica sea muy extensa, las más habituales son las siguientes, las cuales serán de objeto a estudio en esta revisión (figura 2):

Enfermedad	Mutación	Gen
LHON	G3460A	ND1
	G11778A	ND4
	T14484C	ND6
NARP	T8993G/C	ATP6
Leigh (MILS)	T8993G/C	ATP6
	T9176G/C	ATP6
MELAS	A3243G	ARN _t Leu(UUR)
	Hot spot	ARN _t Leu(UUR)
MERRF	A8344G	ARN _t Lys
	Hot spot	ARN _t Lys
Diabetes y sordera	A3243G	ARN _t Leu(UUR)
Sordera no sindrómica inducida por aminoglicósidos	A1555G	ARN _r 12S
Sordera neurosensorial	Hot spot	ARN _r Ser(UCN)

Figura 2: mutaciones puntuales del ADNmt de carácter sindrómico. **LHON**: neuropatía óptica hereditaria de Leber. **NARP**: neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa. **MILS**: Síndrome de Leigh de herencia materna. **MELAS**: encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares. **MERRF**: epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas. (6).

Se ha observado que hasta el 75% son heredadas, mientras que el 25% restante son presentaciones *de novo*, por tanto, siendo la madre asintomática al no cumplir con el umbral necesario para presentar clínica (6).

Deleciones del ADNmt a gran escala:

Se deben a reacomodamientos en el ADNmt provocados por la pérdida de pares de bases de los nucleótidos que forman parte de su estructura. Son principalmente tres síndromes los que cumplen el criterio de gran deleción (2.000 a 9.000 pares de bases): oftalmoplejía progresiva externa crónica (CPEO), síndrome de Kearns-Sayre y síndrome de Pearson. Este último, aunque menos frecuente (<5% de casos), es el de presentación más cruenta, llevando a la muerte en etapa infantil (7).

Mutaciones secundarias asociadas a depleción del ADNmt:

Se deben a la disminución significativa del número de copias del ADNmt. Son de herencia autosómica recesiva. Se considera una depleción mitocondrial si los niveles disminuyen por debajo del 30%, habiéndose encontrado valores por debajo del 5%. Se distinguen formas miopáticas, encefalomiopáticas y hepatocerebrales. Es asimismo frecuente la muerte infantil, con casos excepcionales en los que alcanzan la pubertad y la edad adulta (8).

2.3. Introducción a la dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son consideradas defectuosas cuando son incapaces de producir energía en forma de ATP. Las células eucariotas han desarrollado un sistema de control de calidad mitocondrial para eliminarlas y reemplazarlas, y así mantener un buen estado basal. Al ser orgánulos dinámicos, es a través de las alteraciones en la dinámica mitocondrial, junto con otros sistemas de defensa (enzima superóxido dismutasa y proteostasis) que se va a alcanzar este objetivo (9,10).

Las mitocondrias requieren de una red de transporte para ser reclutadas a zonas de elevada necesidad energética dentro de la célula. Esta red mitocondrial se forma a partir del citoesqueleto, especialmente de microtúbulos y filamentos de actina. Cuando una mitocondria con actividad defectuosa dentro de la red mitocondrial entra en contacto con una adyacente sana, se produce la fusión de ambas membranas, lo que pone en contacto su contenido y finaliza con la formación de una mitocondria de mayor tamaño. Este fenómeno se conoce como fusión. Si se aísla y se segrega una mitocondria con actividad defectuosa, dando lugar a dos mitocondrias de menor tamaño, se habla de fisión mitocondrial (11).

Estos dos procesos de manera fisiológica se encuentran balanceados, permitiendo la adaptación de la red de transporte mitocondrial a las necesidades energéticas. Controlan la longitud tubular, la morfología mitocondrial, el número y la localización dentro de la célula. Cuando existe un elevado índice de fusión-fisión, el número de mitocondrias es menor, tienen morfología alargada y un mayor número de conexiones entre ellas. Si sucede lo contrario y disminuye, el número de mitocondrias es mayor, tienen una morfología esférica y aparecen mitocondrias fragmentadas (11).

Si el daño ejercido sobre las mitocondrias es superior a lo que los sistemas de control de calidad pueden corregir o existe un número elevado de mitocondrias envejecidas, se produce una degradación selectiva de aquellas consideradas defectuosas

dentro de los lisosomas, mediante un mecanismo de autofagia mitocondrial conocido como mitofagia (10).

De igual manera que existe un balance entre fusión y fisión, la mitofagia se regula en dependencia de la biogénesis mitocondrial, que es un mecanismo que promueve la generación de proteínas en mitocondrias, mejorando su eficacia energética. La remodelación continua de la población mitocondrial mediante mitofagia produciría el fallo bioenergético, mientras que la biogénesis continua daría lugar a un rápido aumento de ROS, habiendo a su vez más apoptosis. El balance mitofagia-biogénesis será entonces esencial para la correcta función mitocondrial y su supervivencia (9).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Sabiendo que las mutaciones puntuales del ADNmt afectan a la producción de ATP por parte de la mitocondria, ¿es posible comprobar la existencia de alteraciones a nivel de la dinámica mitocondrial, en lo que a procesos de fusión, fisión, biogénesis y mitofagia se refiere? Y en caso de confirmarlo, ¿puede la dinámica mitocondrial ser diana terapéutica para estas enfermedades? Para responder a estas hipótesis, se plantea un **objetivo principal**, expuesto según la siguiente pregunta PICO:

P (pacientes): muestras de pacientes con enfermedades mitocondriales causadas por una mutación puntual del ADNmt.

I (intervención): valoración de las alteraciones en los mecanismos y parámetros relacionados con la dinámica mitocondrial con respecto a la ausencia de patología.

C (comparación): estudios publicados en los que se realice esta intervención en presencia de sustancias modificadoras de la dinámica mitocondrial.

O (resultados): confirmación de la existencia de alteraciones en la dinámica mitocondrial en enfermedades mitocondriales causadas por una mutación puntual del ADNmt, así como de sustancias modificadoras con potencial terapéutico cuya diana sea la dinámica mitocondrial.

Se plantean asimismo unos **objetivos secundarios**, siendo son los siguientes:

Observar las características de la dinámica mitocondrial a nivel molecular en ausencia de patología, mejorando la comprensión posterior de las alteraciones propias de las enfermedades mitocondriales.

Observar el impacto de la dinámica mitocondrial sobre la presentación clínica en enfermedades mitocondriales, tanto a nivel de penetrancia como de fenotipo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño

Se ha realizado una revisión bibliográfica basada en artículos de revisión y de investigación sobre mutaciones puntuales del ADNmt asociadas a enfermedades mitocondriales y a alteraciones de la dinámica mitocondrial. Se ha encontrado asimismo información sobre la terapéutica y otros rasgos relacionados con la presentación clínica, de interés en este estudio. La base de datos principal utilizada ha sido PubMed, secundariamente obteniendo artículos de Google Académico y mediante búsqueda inversa de los artículos previamente recogidos, además de 5 artículos proporcionados por la directora de esta revisión. Para la realización de la bibliografía se ha utilizado la extensión MENDELEY, con la posterior revisión de las citas bibliográficas, que son expuestas según las normas Vancouver.

4.2. Estrategia de búsqueda

La realización de la búsqueda bibliográfica comenzó con la selección de múltiples dominios online en la que se incluyen las bases de datos PubMed y Elsevier, la Biblioteca Cochrane Plus, y el repositorio Zeguan. Debido a las características de esta revisión, se decidió utilizar PubMed como la red de referencia, de la cual se han obtenido la mayoría de los resultados. La asociación entre descriptores y resultados es la siguiente:

Introducción: se han utilizado un total de 11 artículos, 4 de ellos proporcionados por la directora de la revisión. 7 artículos han sido obtenidos a partir de la búsqueda en PubMed de las palabras clave “mitochondria”, “mitochondrial pathology AND dynamics” y “organelle biogenesis”. Se han priorizado aquellas revisiones con información general sobre la mitocondria, independientemente del año de publicación y se han seleccionado según su relevancia en el buscador.

Resultados: se ha utilizado 1 artículo proporcionado por la directora, además de los indicados a continuación en la **Tabla 1** (página 10).

- Se han obtenido 85 artículos en total de la búsqueda en PubMed. Junto a 2 artículos de Google Académico, se han utilizado un total de 40 artículos.
- En la búsqueda realizada por PubMed, se han utilizado los filtros siguientes:
 - Fecha de publicación entre 2011 y 2023, dado que la mayoría de los artículos encontrados fueron publicados en este margen de tiempo.

- Cualquier tipo de disponibilidad de texto (abstract+free full text+full text)
- Tipos de artículo: “Research Support” o de apoyo a la investigación, añadiendo en ocasiones el filtro “Non-U.S. Gov’t” y “U.S. Gov’t”.
- Preferencia por artículos publicados en inglés y en español.
- En la búsqueda realizada en Google Académico, se han priorizado los artículos posteriores a 2011 con mayor relevancia según el buscador.

Tabla 1: bases de datos utilizadas para los resultados. Descriptores. Relación entre artículos obtenidos y utilizados.

Base de datos	Descriptores	Artículos obtenidos	Artículos utilizados
PubMed	MELAS AND fission	4	2
	MELAS AND mitophagy	9	5
	MELAS AND biogenesis	12	6
	MERRF AND biogenesis	4	3
	MERRF AND fusion	6	1
	MERRF AND mitophagy	3	2
	NARP AND biogenesis	5	2
	NARP AND mitophagy	3	1
	NARP AND fission	3	2
	Leigh AND mitophagy	3	1
	LHON AND biogenesis	17	7
	LHON AND fusion	5	1
	LHON AND mitophagy	11	5
Google Académico	diabetes and deafness AND fission	Según relevancia	2

Se han obtenido además 12 artículos a través de la búsqueda inversa de los artículos utilizados.

4.3. Criterios de inclusión y exclusión

Para la elección de los artículos a utilizar, ha sido necesario establecer una serie de criterios de inclusión y exclusión, con la condición de que éstos permitieran su exposición y su comparación, teniendo en cuenta las características individuales de cada uno de los estudios.

Los **criterios de inclusión** utilizados han sido:

Accesibilidad del artículo, permitiendo su lectura completa, incluyendo anexos.

Que los objetivos de cada uno de ellos fueran similares a aquellos de esta revisión.

Que la información aportada sea relevante para esta revisión. El artículo:

- Debe incluir obligatoriamente la investigación de una mutación puntual del ADNmt que haya sido relacionada previamente con una enfermedad mitocondrial ya conocida.
- Debe realizar la investigación sobre diferentes muestras, que pueden ser de distinto origen histológico o células obtenidas a través de ingeniería genética.
- Debe describir al menos uno de los mecanismos implicados en la dinámica mitocondrial (fusión, fisión, mitofagia, biogénesis), y demostrar alteraciones en relación con la mutación de ADNmt a través de técnicas diagnósticas y un análisis estadístico, sea o no sea significativa.
- Si procede, puede exponer las variaciones de la dinámica mitocondrial en presencia de sustancias modificadoras, que puedan o no tener interés terapéutico o efecto a nivel clínico.

Los **criterios de exclusión** utilizados han sido:

Que el tipo de estudio no fuera ninguno de los siguientes: ensayo clínico, estudio de cohorte, estudio de casos y controles, revisión narrativa, sistemática o bibliográfica, y que no estuvieran escritos en español o inglés.

Que las enfermedades mitocondriales por mutaciones puntuales del ADNmt no sean el objetivo del estudio.

Que no se indique correctamente los métodos utilizados para valorar la dinámica mitocondrial en el análisis de las muestras. Debe incluir la representación gráfica de los hallazgos obtenidos.

4.4. Análisis de datos

Es esta revisión, se presenta la información con carácter preferentemente cualitativo sobre el cuantitativo. Se entiende información cualitativa como aquellos hallazgos que fueron presentados por los autores en un inicio como valores numéricos con sus respectivas unidades, de los cuales se ha sustraído la relación “mayor/menor que”, comprobando previamente su significación. Para obtener esta información, los estudios experimentales presentan una serie de características:

Muestra experimental:

Los estudios de esta revisión han sido realizados sobre tres muestras diferentes: sobre el tejido primario, sobre híbridos citoplasmáticos o cíbridos y sobre células

madre pluripotentemente inducidas (iPCSs), todas ellas comparadas con un control. Los híbridos son células derivadas de la fusión de una célula sin ADNmt (Rho-0) con una célula anucleada que presenta los polimorfismos mitocondriales de interés, obtenidos de pacientes con la mutación. Las iPCS son capaces de, a partir de una célula sin carácter pluripotencial, generar una célula adulta diferenciada de un tejido diferente al de la muestra original que presente la misma mutación.

Técnicas diagnósticas:

Incluyen la utilización de microscopía electrónica, inmunofluorescencia (preferentemente con los colorantes MitoTracker y Lisotracker), inmunohistoquímica, analizadores de imagen (entre ellos, Mitochondria Analyzer para ImageJ), citometría de flujo y *Western blot*. Esta última es una técnica imprescindible en esta revisión.

Análisis estadístico:

La comparación entre grupos se ha realizado para dos grupos t de student y U de Mann Whitney, y para más de dos grupos análisis de la varianza (ANOVA).

5. RESULTADOS

5.1. Características de la dinámica mitocondrial

5.1.1. Fusión y fisión mitocondrial

Los mecanismos de fusión y fisión forman parte de los procesos reguladores de la dinámica de distribución mitocondrial. Para el transporte de mitocondrias, es necesaria la interacción de las proteínas implicadas en cada uno de ellos, así como las involucradas en el transporte mitocondrial, que incluyen las proteínas Miro (localizada en la MMI) y Milton, y el motor de kinesina (figura 3) (9).

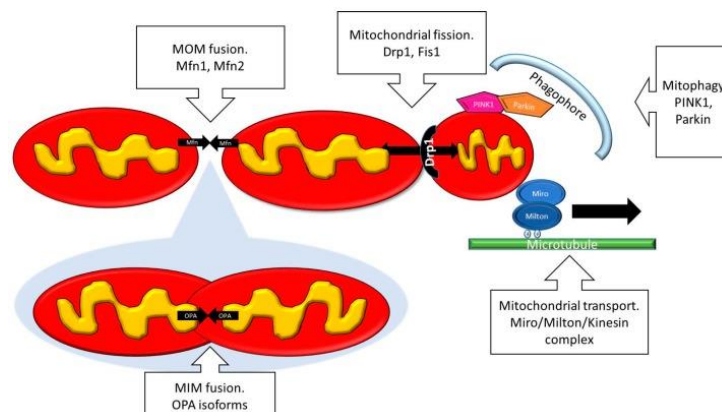


Figura 3: proteínas implicadas en el transporte mitocondrial. MMI/MIM: membrana mitocondrial interna. MME/MOM: membrana mitocondrial externa. (9).

5.1.1.1. Aspectos fisiológicos de la fusión mitocondrial

La fusión y fisión son mediados por proteínas de tipo guanosina trifosfatasa (GTPasa). Las moléculas de GTP se sintetizan a partir de ATP, por lo que variaciones en los niveles de ATP producirán cambios en el gradiente de GTP, regulando el reclutamiento de estas proteínas (9).

La fusión de la MME mitocondriales está regulada por mitofusina 1 (MFN1) y mitofusina 2 (MFN2) (figura 3). Estas GTPasas necesitan estar presentes en ambas mitocondrias para que tenga lugar la fusión mitocondrial. La MFN1 permite la interacción entre membranas de mitocondrias adyacentes, mediada por mecanismos de anclaje o *tethering*. La MFN2 permite la comunicación mediante lugares de unión entre mitocondria y retículo endoplasmático (12). En caso de que una mitocondria no disponga de MFN1, las moléculas de MFN2 compensan la ausencia de función, sin embargo, la ausencia de ambas impide la fusión (11). La regulación de las mitofusinas depende de proteínas relacionadas con la mitofagia, y PKA (proteína kinasa A), entre otras (13). La fusión de la MMI está regulada por la proteína *Optic atrophy 1* (OPA1) (figura 3), que puede ser escindida por OMA1, YME1L y PARL (12). La ausencia de OPA1 provocará una disminución de la capacidad respiratoria incluso mayor que las provocadas por las mitofusinas (11).

En cuanto a patología clínica, se han observado alteraciones en la dinámica de la fusión en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 2A (CMT 2A), debido a una mutación en la MFN2 en heterocigosis. Se ha encontrado la misma alteración en neuropatías, como el síndrome de atrofia óptica dominante (DOA) (13). La mutación principal en el síndrome de DOA es la de OPA1 (11).

5.1.1.2. Aspectos fisiológicos de la fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial depende de la proteína *Dynamin-related 1* (DRP1), una GTPasa citosólica (figura 3) (9). Tiene lugar en las zonas de contacto entre retículo endoplasmático y mitocondria. La mitocondria se ve envuelta por el retículo endoplasmático para seleccionar los puntos de fisión, y posteriormente las proteínas DRP1 son reclutadas, forman anillos y espirales que envuelven la mitocondria, la estrangulan y escinden la doble membrana (13).

Una proteína de interés es la ubiquitin ligasa MARCH5, esencial para la regulación negativa de la fisión al promover la ubiquitinación de DRP1 y la proteína de

fisión mitocondrial 1 (Fis1). La regulación negativa también tiene lugar mediante la fosforilación de Ser637 por PKA. La regulación positiva incluye la sumoilación de DRP1, regulada por dos análogos de Bcl-2 encargados del control de la apoptosis (Bak y Bax) y la desfosforilación por calcineurina (11).

5.1.2. Aspectos fisiológicos de la mitofagia

La mitofagia consiste en la destrucción de las mitocondrias defectuosas. La mitocondria es secuestrada por un fagóforo, formando una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma. A su vez, se fusiona con un lisosoma para formar un autofagolisosoma, en el que se produce su degradación (figura 3) (9).

Como se observa en la figura 4, la mitofagia está en estrecha relación con la fisión mitocondrial. La despolarización que ocurre como consecuencia a la acumulación de ROS y la producción deficiente de ATP actúan como señal de activación de la mitofagia. Para que tenga lugar, se aísla la mitocondria defectuosa, se escinde mediante las proteínas de fisión, y posteriormente se degrada mediante la mitofagia. Esta mitofagia podrá ser o no compensatoria, incrementando la biogénesis o produciendo apoptosis celular (14).

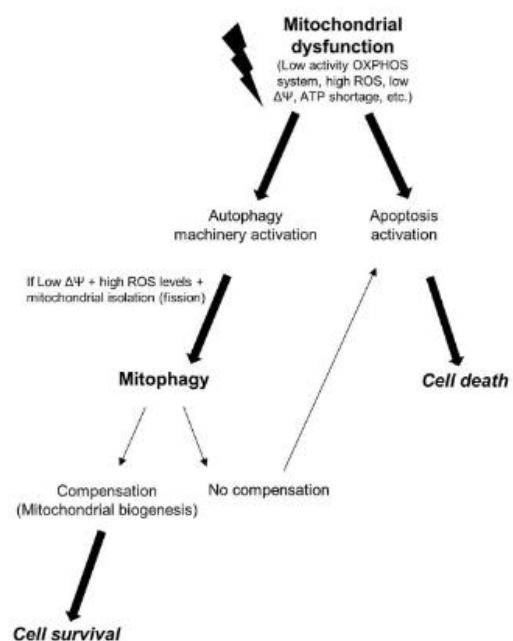


Figura 4: relación entre fisión y mitofagia. (14).

Existen diferentes rutas que concluyen en la activación de la mitofagia (figura 5) (4). La ruta más estudiada es dependiente de ubiquitina, y está mediada por la proteína serin-protein kinasa 1 (PINK1), que a su vez activa la proteína E3-ubiquitin ligasa (PARKIN) y secundariamente ubiquitina las proteínas de la MME. (nº1). También se puede activar a través de proteína kinasa activada por AMP (AMPK), que fosforila y activa la kinasa 1 activadora de la autofagia (ULK1) (nº2) (10). Puede ser inducida a su vez por proteínas relacionadas con la formación de autofagolisosomas, principalmente la proteína de cadena ligera 3 asociada al microtúbulo (LC3) (nº3 y 4). LC3-I se encuentra en citosol, mientras que LC3-II se encuentra en la membrana del autofagosoma (14). Otra proteína que regula la mitofagia es la diana de rapamicina

(mTOR) y sus proteínas accesorias, pues la inhibición de su actividad provoca la inducción de la autofagia (15).

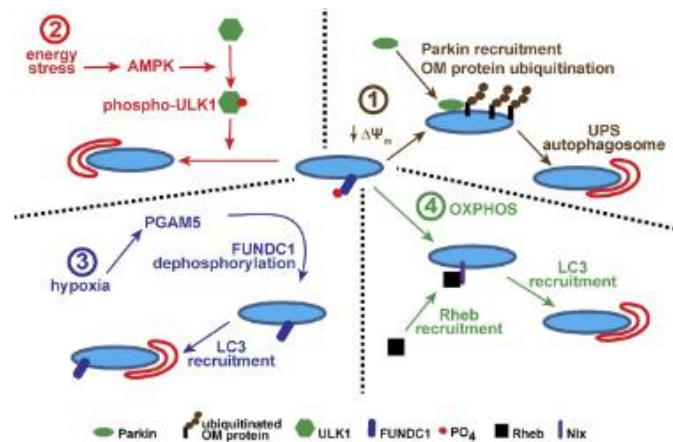


Figura 5: esquema de la ruta n°1 (PARKIN), n°2 (AMPK) y n°3 y n°4 (LC3). (4).

La mutación presente en los genes de PINK1 y PARKIN se encuentra en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson de inicio temprano o juvenil, la enfermedad de Alzheimer y la Esclerosis Múltiple (10,16). También se han descrito en pacientes con diabetes mellitus (17,18)

5.1.3. Aspectos fisiológicos de la biogénesis mitocondrial

La síntesis proteica que caracteriza la biogénesis mitocondrial no se produce únicamente con la división celular y la formación de nuevas mitocondrias, sino que puede producirse en respuesta a las necesidades energéticas de la célula, como sucede en el ejercicio, ante la regulación hormonal, durante el desarrollo y en determinadas enfermedades mitocondriales (19). Es un proceso complejo, que requiere la coordinación de genes procedentes del ADNmt y del ADNn. Se divide en múltiples etapas, siendo la más importante la transcripción del ADNmt, seguida de la síntesis, la importación y el ensamblaje de las proteínas codificadas en el ADNn. Las moléculas implicadas en la biogénesis se encuentran reflejadas en la figura 6 (20).

La transcripción de genes depende principalmente del coactivador 1 del receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PGC-1α). La ruta mejor documentada es aquella en la que su activación, ya sea por fosforilación o deacetilación, induce la cascada de los factores de respiración nuclear 1 y 2 (NRF1 y NRF2), que a su vez incrementa la expresión de factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), que será el efector de la transcripción y replicación del ADNmt (21).

La síntesis de proteínas del ADNn comienza con la señal de activación de la proteína translocasa de MMI23 (TIM23), que dirige las proteínas preformadas en el citosol hacia la matriz mitocondrial, donde se realiza su ensamblaje y finalmente se forman las proteínas localizadas en la MMI (20).

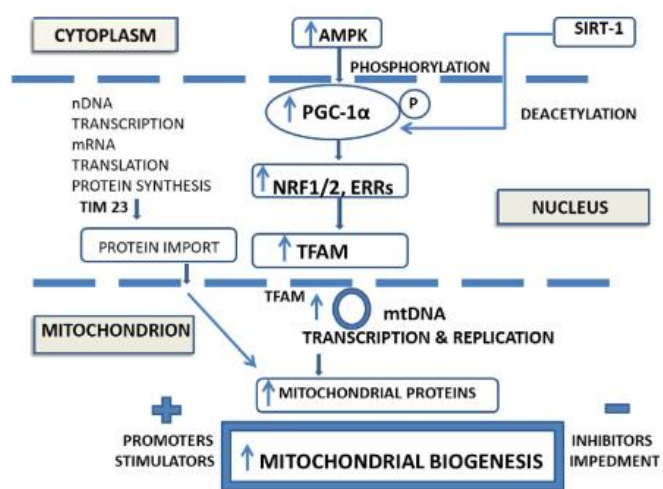


Figura 6: esquema de la biogénesis mitocondrial. AMPK: proteína quinasa activada por AMP. ERR: receptor relacionado con estrógenos SIRT-1: sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD. TIM23: translocasa de MMI 23. (20).

Los marcadores que indican la regulación del balance entre biogénesis y mitofagia son el número de copias de ADNmt, la masa mitocondrial, y la capacidad de expresión génica en dependencia de los niveles de proteínas producidas. Se ha estudiado las alteraciones en la biogénesis en pacientes con enfermedades neurodegenerativas y diabetes mellitus tipo 2, además de su potencial como diana terapéutica en enfermedades mitocondriales (21).

5.2. Dinámica mitocondrial y mutaciones puntuales del ADNmt (9. ANEXOS)

5.2.1. Dinámica mitocondrial en MELAS: mutación m.3243A>G en el gen ARNt^{Leu}

El síndrome de MELAS es la enfermedad mitocondrial más frecuentemente asociada a la mutación m.3243A>G localizada en el gen ARNt^{Leu}, encontrándose en más del 80% de casos. Esta mutación provoca la disfunción de C-I, y su naturaleza es obligatoriamente heteroplásmica (22). El nombre “MELAS” deriva de la clínica característica, que consiste en encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares, que condicionan una disfunción cerebral subaguda, hemiparesias y ceguera (6). Es frecuente encontrar polineuropatía periférica sensitivo-motora de predominio axonal, pero es poco severa (23). La relación genotipo-fenotipo no es fija, pues la mutación es la misma que en pacientes con CPEO y diabetes y sordera hereditaria (MIDD), pudiendo aparecer como evolución clínica a estos síndromes (6). Es más frecuente que MIDD aparezca en edades más avanzadas con un bajo nivel de heteroplasmia, al contrario que MELAS,

que suele ocurrir en la infancia y presentar clínica completa con una heteroplasmia superior al 85% (24). No se han documentado estudios sobre la dinámica mitocondrial en pacientes con mutación y clínica compatible con MIDD, siendo estos preferentemente realizados sobre pacientes con MELAS (17).

5.2.1.1. Mitofagia asociada a la mutación en m.3243A>G

En 2011, Cotán D., Cordero MD., Rodríguez-Hernández Á. y col. publicaron un estudio realizado en fibroblastos primarios con la mutación compatible con MELAS. Se recogieron dos muestras con diferente grado de heteroplasmia, que fueron comparadas con un grupo control de fibroblastos sanos (25). En un estudio anterior realizado sobre células de pacientes con síndrome de déficit de CoQ₁₀, se observó que el déficit se relacionaba con un incremento de la mitofagia (26). En esta nueva investigación, se planteó realizar el mismo procedimiento para justificar el incremento de la mitofagia en los fibroblastos con MELAS, habiendo comprobado previamente el déficit de CoQ₁₀ (25).

En microscopía electrónica (figura 7), se visualizó la acumulación de autofagolisosomas con mitocondrias pequeñas fragmentadas y cuerpos laminares, que fueron positivos para el marcador lisosomal cathepsina D y mitocondrial cyt-c en la inmunofluorescencia. A estos hallazgos se asociaron una menor masa mitocondrial medida con citometría de flujo y un incremento significativo de LC3 en *Western blot*. Posteriormente, se sometió la muestra a la inhibición de la fusión autofagolisosómica con bafilomicina A1, observando que no hubo cambios en los niveles de LC3 con respecto al control, no existiendo un flujo mitofágico eficiente. En el control se observó la normalidad al incrementar el *ratio* LC3-II/LC3-I (25). Al repetir esta prueba en un estudio posterior, obtuvieron el mismo resultado (27).

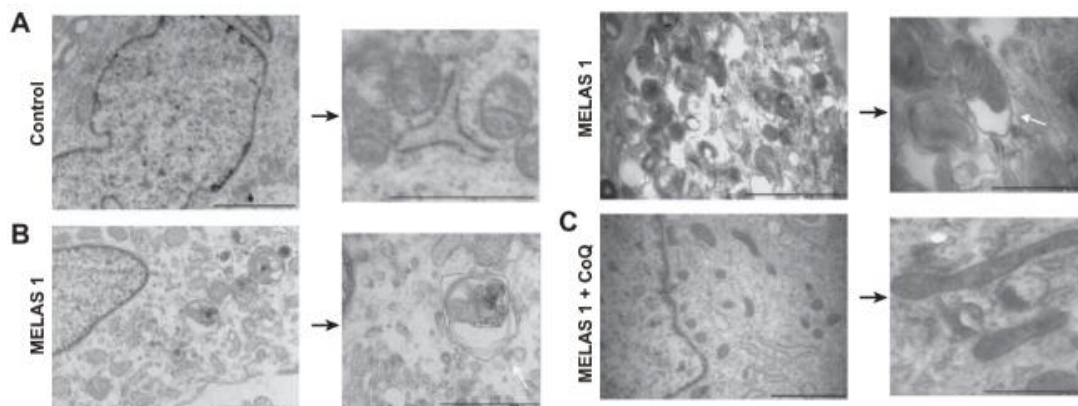


Figura 7: Microscopía electrónica. Ultraestructura de un fibroblasto con MELAS pre. y post. tratamiento con CoQ₁₀. (→): contenido mitocondrial. (25).

Con la administración de CoQ₁₀ durante 72 horas, se vio que la actividad mitofágica observada disminuyó significativamente, obteniendo una ultraestructura similar al control (figura 6) (25).

En ensayos clínicos más recientes, se ha planteado el uso de análogos de CoQ₁₀ como idebenona para el tratamiento del defecto de CoQ₁₀, sin embargo no se ha encontrado ningún beneficio clínico, a pesar de la buena tolerancia farmacológica (estudio NCT00887562) (28).

Para demostrar el rol protector de la mitofagia, el mismo equipo realizó la inhibición total de la mitofagia sobre fibroblastos con MELAS mediante el uso de químicos inhibidores de PINK1 (3-metil-adenina, wortmanina), aunque su especificidad fuera limitada, y mediante *knockdown*/reducción genética con ARN de silenciamiento (siRNA). Ambas pruebas acabaron con la apoptosis celular (14,25).

En 2013, Hämäläinen RH. Manninen T., Koivumäki H. y col. realizaron el estudio de ADNmt con mutación de MELAS en iPCSs reprogramadas a neuronas de 3 pacientes con MELAS con diferentes grados de heteroplasmia, las cuales fueron comparadas con 2 líneas control. Se demostró que el déficit significativo de C-I fue replicable en las iPCSs diferenciadas a neuronas, al encontrar *clusters* con C-I secuestrado en mitocondrias de la periferia nuclear en las neuronas con mayor heteroplasmia (mayor a 80%) (figura 8). Se comprobó que las proteínas implicadas en la mitofagia LC3, PINK1 y PARKIN estaban asimismo presentes. Se ha observado que C-I generaba ROS y los atraía por sus centros hierro-azufre. La mitofagia adquiere entonces un rol protector, al disminuir los niveles de C-I. Los niveles de C-II aumentaron de forma compensatoria (29).

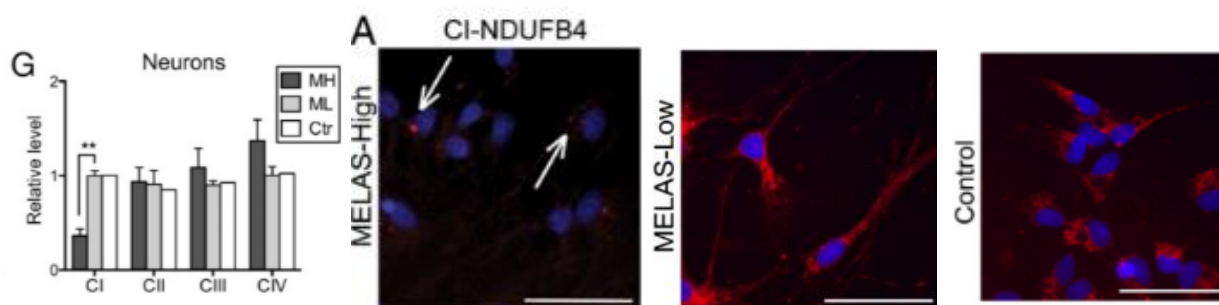


Figura 8: Imagen G: Western blot. Déficit de C-I. Imagen A: Inmunofluorescencia. Clusters de C-I perinucleares en MELAS de mayor heteroplasmia (MELAS High). Distribución de C-I por la red mitocondrial en control y MELAS de menor heteroplasmia (MELAS Low). (29).

A pesar de los hallazgos encontrados, un estudio posterior realizado por Morán M., Delmiro A., Blázquez A. y col. en 2014 demostró resultados contrarios a los encontrados previamente. Se observó que, a pesar de que en fibroblastos con MELAS existe una mayor autofagia, no existía un aumento significativo de la mitofagia, al no detectar la colocalización de las proteínas de la ruta mediada por PARKIN (30).

En 2022, Bhattacharya S., Yin J., Huo W. y col. estudiaron la deficiencia en la mitofagia en células de retina con diferentes grados de heteroplasmia obtenidas a través de iPCSs formadas a partir de fibroblastos con MELAS, con respecto a unas IPCSs control. Se demostró con *Western blot* que el déficit mitofágico provocaba una activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) que regula negativamente la autofagia, un incremento significativo de PINK1 con una menor degradación a mayor heteroplasmia, la inhibición de AMPK α y un incremento de LC3-II como consecuencia al fallo de las moléculas de catepsina D lisosomales. Los niveles de la proteína Prominina 1 eran significativamente mayores de manera compensatoria. Se observó también un incremento de apolipoproteína E (31). Estos resultados se contrastaron con aquellos de un estudio realizado por Lin DS. y col. (32) en 2019, siendo los resultados similares.

Realizaron posteriormente el tratamiento de las muestras con carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), un inhibidor del potencial de membrana, que provocó un aumento de la mitofagia en el control, no ocurriendo en las células de retina con MELAS, observando una activación deficiente. Se determinaron los niveles de Prominina 1, siendo estos similares en presencia y ausencia de CCCP (31).

En otra investigación, realizada por Cotán D., Cordero MD., Rodríguez-Hernández Á. y col. en 2015, se observó que la administración de CoQ₁₀ incrementa la fosforilación de AMPK α , recuperando el flujo mitofágico. Se consideró la forma activa de CoQ₁₀, Ubiquinol, como posible estrategia terapéutica (27).

5.2.1.2. Biogénesis asociada a la mutación en m.3243A>G

En 2015, Cotán D., Cordero MD., Villanueva-Paz M. y col. Estudiaron el balance entre mitofagia y biogénesis y los niveles de las proteínas implicadas. Se utilizaron cuatro muestras de fibroblastos primarios de diferente heteroplasmia, una muestra de híbridos con MELAS y dos muestras control. Mediante *Western blot* se confirmó en fibroblastos primarios que los niveles de PGC-1 α , NRF1 y TFAM eran inferiores

conforme a mayor heteroplasma y menor masa mitocondrial, medida previamente por citometría de flujo. En las muestras de menor heteroplasma (menor a 10%), sus niveles aumentaron significativamente de manera compensatoria. La activación de AMPKα fue significativamente mayor a menor heteroplasma, sin ningún cambio en las muestras de mayor heteroplasma (figura 9) (27).

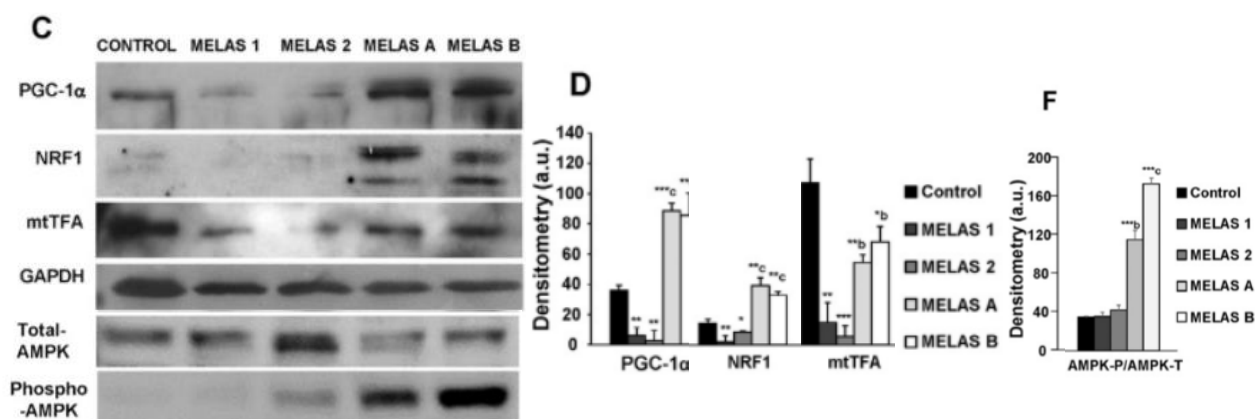


Figura 9: Western blot. Déficit de proteínas de la biogénesis en muestras con MELAS de mayor heteroplasma (MELAS 1 y 2) con respecto a las muestras de menor heteroplasma (MELAS A y B). (27).

Continuando con el estudio de AMPK, se administró 5-Aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR), un análogo de AMP, y CoQ₁₀. en la muestra MELAS 1 y en híbridos, revirtiendo el déficit de proteínas en ambos casos. En inmunofluorescencia, la localización de PGC-1α era citosólica a mayor heteroplasma, y nuclear en el control y a menor heteroplasma, ya que es donde tiene lugar su activación por PKA. La localización en la muestra pasó a ser nuclear tras el tratamiento con AICAR y CoQ₁₀ (27).

En el estudio realizado en 2017 por Chang JC. y col. se verificó la utilidad de los péptidos penetrantes de células 1 (Pep-1) en el trasplante mitocondrial como terapia en MELAS, comprobando su efecto en híbridos. La masa mitocondrial y la expresión de PGC-1α, NRF1 y TFAM incrementaron significativamente, indicando la recuperación de la biogénesis (33).

En 2018, Geffroy G. y col. profundizaron en la relación entre la mutación de MELAS y el déficit de C-I en híbridos con una elevada heteroplasma. Mediante *Western-blot*, se observó un incremento significativo de intermediarios de C-I en la matriz, en respuesta a la falta de ensamblaje. Al estimular la cadena respiratoria disminuyendo el aporte de glucosa durante 3 semanas, el número de intermediarios disminuyó

significativamente, incrementó la síntesis de C-I, la masa mitocondrial y en consecuencia la actividad enzimática. El mismo resultado se obtuvo al estimular la estimulación de AMPK con AICAR (34). En un estudio anterior, los pacientes que realizaron una dieta cetogénica tuvieron una mejoría clínica significativa (35). Se completó un ensayo clínico para valorar si la dieta era capaz de variar la heteroplasmia, pero no se demostró ningún cambio. (Estudio NCT01252979) (34).

Además de los potenciadores de la biogénesis ya comentados, se realizaron estudios utilizando sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD (Sirt1), bezafibrato, resveratrol, ácido retinoico y promoviendo el ejercicio aeróbico. Sin embargo, sólo Sirt1, el ácido retinoico y el ejercicio consiguieron mejorar la clínica y los defectos en la cadena respiratoria (28).

5.2.1.3. Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.3243A>G

En el estudio realizado en 2017 por Chang JC. y col. se observó también la alteración en la fusión y fisión de los cíbridos con MELAS. En microscopía confocal se encontraron *clusters* con mayor fragmentación mitocondrial que el control (figura 10), y en *Western blot* se observó un incremento significativo de Drp1. Al ser tratadas con Pep-1 hubo una mejoría de la red mitocondrial, la proporción de mitocondrias tubulares aumentó significativamente y disminuyó la fragmentación (figura 10). Se comprobaron los niveles de OPA1 y MFN2 y se vió que su expresión aumentó significativamente, y que había una disminución significativa de Drp1 (33).

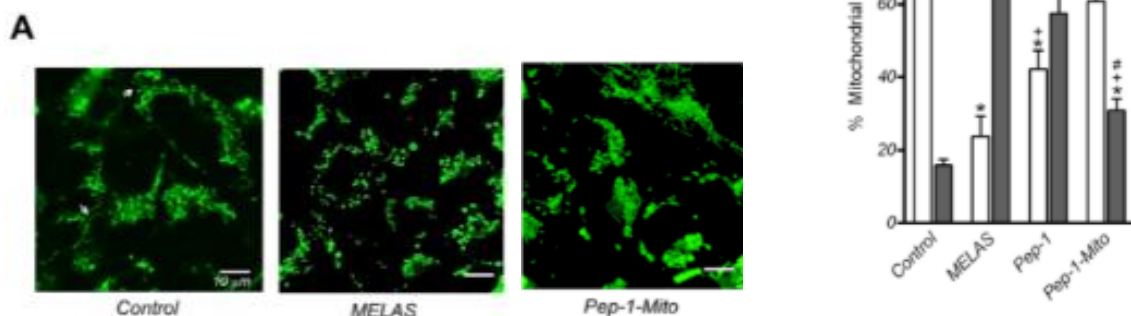


Figura 10: Imagen A: Inmunofluorescencia. Clusters en la muestra MELAS vs. normalidad tras Pep-1. Imagen B: Proporción mitocondrias de tubulares y fragmentadas en la muestra con MELAS vs. Pep-1. (33).

En 2019, Tokuyama T., Hirai A., Shiiba I. y col. estudiaron la morfología mitocondrial de los fibroblastos primarios de un paciente con mutación para MELAS. En los fibroblastos con MELAS, el nivel de Drp1 era significativamente superior con

respecto al control. Para demostrar que la fragmentación observada era a causa de la elevación de Drp1, se indujo un *knockdown* con siRNA observando mediante inmunofluorescencia la normalización de la fragmentación mitocondrial. Eventualmente, la inhibición completa derivó en la apoptosis celular en la citometría de flujo, implicando un rol protector por parte de la fisión al no escindir mitocondrias deficientes (36).

En 2022 se publicó un estudio a nombre de Lin DS. y col. en el que se utilizaron 4 líneas de iPCSs diferenciadas a neuronas a partir de fibroblastos de pacientes con MELAS, de diferente heteroplasmia. En este caso, la muestra con menor heteroplasmia (15%) pertenecía a una paciente asintomática. Se visualizó mediante microscopía confocal que, en neuronas con MELAS, los valores de área, perímetro, ratio dimensional, el factor de forma y otras características estructurales (crestas, vértices, longitud) eran significativamente menores que los del control, sugiriendo una tendencia a la fisión y fragmentación mediante Drp1, especialmente en aquellas neuronas con una mayor heteroplasmia (mayor a 70%). La regulación negativa de la proteína de fusión OPA1 también evidenció estos cambios (37).

5.2.2. Dinámica mitocondrial en MERRF: mutación m.8344A>G en el gen ARN^{Lys}

El síndrome de MERRF es la enfermedad más comúnmente asociada a la mutación de m.8344>G del gen ARN^{Lys}, en hasta un 80% de los casos. El gen afectado es MT-TK (38). Se trata de una enfermedad heteroplásmica que provoca la disfunción del C-V. Se caracteriza por ser una encefalopatía que se presenta usualmente en la infancia o al inicio de la adultez (39). El nombre “MERRF” se debe a la clínica de epilepsia mioclónica, que se acompaña de miopatías, ataxia y debilidad muscular, y de fibras rojo-rasgadas en la biopsia. También es frecuente observar acidosis láctica, derivada del exceso de piruvato obtenido de la glicólisis (22,39). Las fibras rojo-rasgadas se visualizan con tinción de Gomori, y no son reactivas a cyt-c oxidasa (6,22).

5.2.2.1. Mitofagia asociada a la mutación en m.8344A>G

En 2012, Yuan JH., Sakiyama Y., Higuchi I. y col. estudiaron la presencia de vacuolas ribeteadas, propias de otras miopatías, en dos muestras de músculo de pacientes con MERRF. Este estudio se diferenció de otros posteriores en que los pacientes presentaron clínica miopática aislada, en vez del síndrome completo, hecho que asociaron a la mayor heteroplasmia en el músculo con respecto a la sangre.

En inmunohistoquímica, se encontró la agregación de LC3 en estas vacuolas, así como en fibras rojo-rasgadas. En microscopía electrónica, se observaron mitocondrias de morfología anormal. Estos resultados se observan en la figura 11 (40).

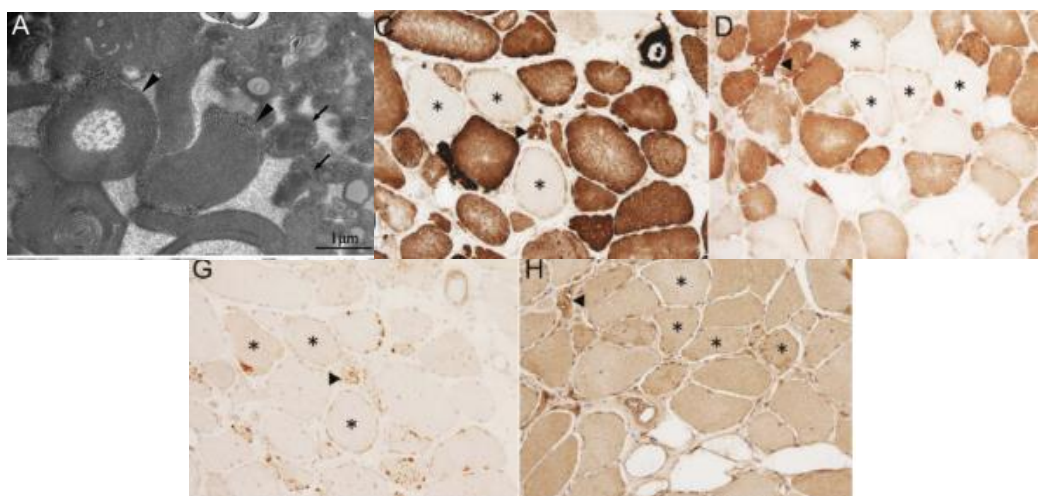


Figura 11: Imagen C y G: muestra 1. Imagen D y H muestra 2. Imagen C y D: tinción cyt-c oxidasa. Imagen G y H: inmunohistoquímica de LC3. (*) fibras rojo-rasgadas, (▲) vacuolas ribeteadas. (A) microscopía electrónica de una vacuola de muestra 1. (▲) crestas circulares. (→) inclusiones paracristalinas. (40).

Ese mismo año, de la Mata M., Cotán D., Cordero MD. y col. comprobaron las alteraciones en la mitofagia que presentaban fibroblastos y cíbridos de pacientes con MERRF de heteroplasmia distinta tras el tratamiento con QoQ₁₀. De manera similar al estudio realizado en muestras con MELAS, se observó un descenso de QoQ₁₀. Mediante inmunofluorescencia vieron, fuera de la red mitocondrial, mitocondrias pequeñas, redondeadas y fragmentadas positivas para LC3 y otros marcadores conocidos como autofagia 12 (ATG12) y Beclina 1 (BECLIN1), así como catepsina D y β -galactosidasa lisosomal. En los cíbridos, los *ratio* ATG5/ATG12 y LC3-I/LC3-II se vieron incrementados significativamente. Tanto los fibroblastos primarios como los cíbridos consiguieron la recuperación de la actividad similar al control al administrar QoQ₁₀, con un incremento significativo de la producción de ATP (38).

En 2020, Villanueva-Paz M., Povea-Cabello S., Villalón-García I. y col. estudiaron asimismo el efecto de QoQ₁₀ sobre la mitofagia en fibroblastos primarios, cíbridos y en iPCSs diferenciadas a neuronas de un paciente con MERRF. Los hallazgos encontrados previos al tratamiento fueron similares a aquellos de 2012 en todas las muestras (38). Se demostró asimismo la presencia de PARKIN, PINK1 y DRP1 junto a mitocondrias fragmentadas y un incremento de AMPK significativo. Se estudió en

los cíbridos el flujo mitofágico en presencia de bafilomicina A1, no existiendo un aumento significativo de LC3-II, pero sí en el control. También se indujo el *knockdown* de la proteína PARKIN, hecho que dio lugar a un incremento de la apoptosis celular. En respuesta a QoQ₁₀, se observó la restauración de la red mitocondrial y un incremento aún mayor de AMPK. No se consiguió el incrementar el ATP en ninguna muestra (41).

5.2.2.2. Biogénesis asociada a la mutación en m.8344A>G

En 2013, Chang JC. y col. estudiaron, con la misma metodología que fue aplicada en muestras con MELAS, el tratamiento con Pep-1 en cíbridos con MERRF. Los cíbridos antes del tratamiento presentaron niveles significativamente menores de PGC-1 α , NRF1 y TFAM. Al tratar la muestra con Pep-1, se observó un incremento significativo de NRF1 y TFAM, sin cambios de PGC-1 α . En consecuencia, hubo un aumento de la masa mitocondrial al quinto día de tratamiento (42).

En 2022, Capristo M., Del Dotto V., Tropeano CV. y col. profundizaron en el tratamiento de MERRF estudiando los cambios morfológicos resultantes del tratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTOR. Para ello, se obtuvieron tres muestras de fibroblastos con MERRF y tres líneas cíbridas de diferente heteroplasma. Se administró rapamicina a dosis bajas durante 4 semanas, produciendo un incremento significativo de PGC-1 α , NRF1, TFAM y LC3 posterior, consiguiendo la recuperación de la capacidad respiratoria en las muestras con heteroplasma intermedia (50%), no ocurriendo en las de mayor heteroplasma (mayor a 80%) (43).

5.2.2.3. Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.8344A>G

En el estudio de Chang JC. y col. sobre cíbridos con MERRF publicado en 2013, se observó por inmunofluorescencia la fragmentación mitocondrial, junto con menor expresión de OPA1 y MFN2, y mayor expresión de Drp1 y Fis1. Tras 48h de la administración de Pep-1 la morfología mejoró significativamente, encontrando mitocondrias tubulares. Asimismo, hubo una reducción de MFN2, Fis1 y principalmente de Drp1, pero no de OPA1 (figura 12) (42).

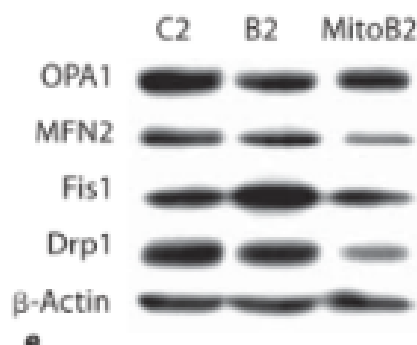


Figura 12: Western blot. Proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial. (C2) control, (B2) muestra MERRF, (MitoB2) muestra MERRF post. tratamiento con Pep-1. (42).

Este hallazgo sugirió que Pep-1 no mejoraba la fusión, pero sí inhibía la fisión. MFN2 posee actividad reguladora del calcio mitocondrial, por lo que se pensó en el bloqueo de la unión MFN2-retículo endoplasmático como tratamiento para evitar la sobrecarga de calcio mitocondrial, que da lugar a la apoptosis celular (42).

Ese mismo año, continuaron el estudio sometiendo esta vez a fibroblastos primarios al tratamiento con Pep-1. A las 72h, se recuperó significativamente casi la totalidad de la actividad mitocondrial, observándose los mismos hallazgos que en los cíbridos, que fueron mantenidos durante 21 días (44).

5.2.3. Dinámica mitocondrial en NARP: mutación m.8993T>G en el gen codificante de ATPasa-6

El síndrome de NARP se caracteriza por la mutación en m.8993T>G en el gen codificante de la subunidad 6 de la proteína ATPasa de la cadena respiratoria. Se trata de una mutación heteroplásmica que será inferior a 90%, siendo excepcional una heteroplasma superior a 95% (39). El nombre “NARP” hace referencia a la clínica, caracterizada por neuropatías, ataxia y retinopatía pigmentaria (39). Además de la clínica característica, puede cursar con encefalopatía, convulsiones, demencia, cardiopatías y retraso en el desarrollo (6).

5.2.3.1. Biogénesis asociada a la mutación en m.8993T>G

En 2011, Wojewoda M., Duszyński J., Szczepanowska J. y col. decidieron estudiar la biogénesis en cíbridos con la mutación de NARP. Se observó que la masa mitocondrial no era diferente a la del control, pero sí que había una disminución del *pool* mitocondrial de ATP. Los niveles de PGC-1 α y TFAM en el *Western blot* fueron similares a los del control, sin embargo, NRF1 demostró un aumento significativo (figura 13). Mediante inmunofluorescencia se comprobó la acumulación de NRF2 en el núcleo. Posteriormente, se trató la muestra con selenita, no observando ningún cambio significativo excepto el incremento de producción de NRF1 y una mayor acumulación de NRF2 (45).

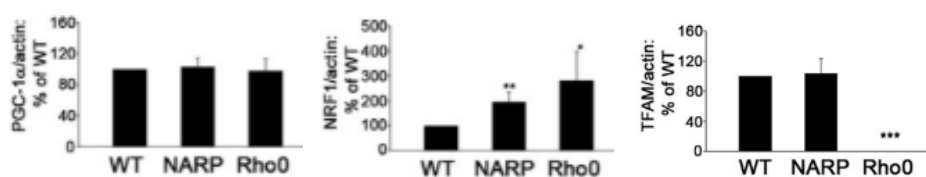


Figura 13: Western blot. (WT): Control. (NARP): muestra NARP. PGC-1 α , NRF1 y TFAM en NARP. (45).

5.2.3.2. Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.8993T>G

En 2012, los investigadores Peng TI, Hsiao CY., Lai YK. y col. realizaron dos estudios complementarios en los que se comprobó las alteraciones de la fisión mitocondrial relacionadas con la depleción de cardiolipina de la MMI y la presencia de factores pro-apoptóticos en cíbridos de un paciente con NARP. En este caso, la heteroplasmia era del 98%, siendo una muestra compatible con MILS y fenotipo NARP. Se interpretó el incremento de la fisión como el cambio morfológico de mitocondrias tubulares a fragmentadas bajo inmunofluorescencia. Se observó asimismo el incremento de la apoptosis en respuesta a los niveles de ROS, calcio mitocondrial, estrés lipídico y péptido β -amiloide (46,47).

Los ROS producidos por el depósito de péptido β -amiloide inducen la depleción de cardiolipina, hecho que provoca la desconexión de la mitocondria del citoesqueleto y por tanto el incremento de la fisión. Se administró melatonina a la muestra, observando a las 12 horas una mejoría significativa en el movimiento, representado en el estudio como menor porcentaje de *overlapping* en el tiempo, y menor fisión mitocondrial (47).

Walczak J, Duszyński J, Szczepanowska J. y col. comprobaron en 2017 el impacto del incremento de las proteínas de fusión y fisión en cíbridos con NARP. En la inmunofluorescencia se observó una mayor fragmentación mitocondrial. En el *Western blot* (figura 14), los niveles de Drp1 total y activado fueron los únicos detectados que eran significativamente menores. Los niveles de Fis1 y factor de fisión mitocondrial (Mff), encargado de reclutar Drp1, fueron superiores. Por otra parte, MFN1 fue similar al control, y MFN2, OPA1, OMA1 e YME1L fueron significativamente superiores. Con microscopía confocal se observó su localización predominantemente nuclear (48).

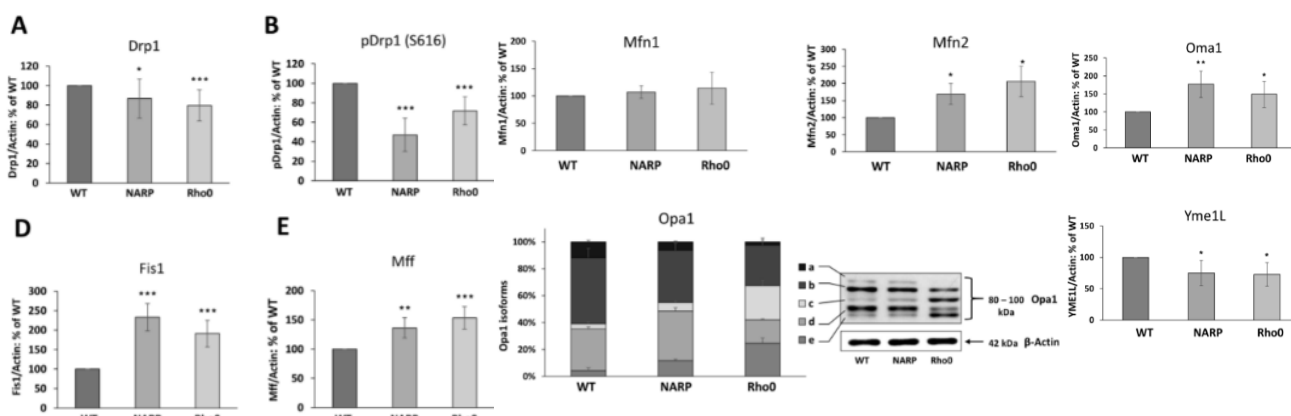


Figura 14: Western blot. WT: Control. NARP: muestra NARP. Drp1. Fis1. Mff. MFN1/2. OPA1. OMA1. YME1L. (48).

5.2.3.3. Mitofagia asociada a la mutación en m.8993T>G

En el estudio realizado por Walczak J, Duszyński J, Szczepanowska J. y col. en 2017 se comprobó la activación de la mitofagia secundaria a la fisión con un incremento significativo del *ratio* de LC3-II/LC3-I y de BECLIN 1 con respecto al control (figura 15) (48).

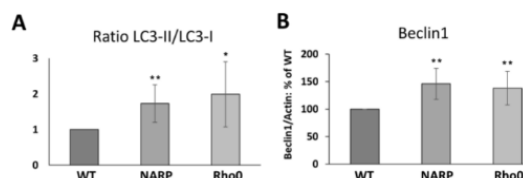


Figura 15: Western blot. WT: Control. Muestra NARP. Ratio LC3-II/LC3-I. Beclin1: Beclina 1. (48).

5.2.4. Dinámica mitocondrial en MILS: mutación m.8993T>G, m.13051G>A y m.10158T>C en el gen codificante de ATPasa-6

El síndrome de Leigh de herencia materna o MILS es una enfermedad neurodegenerativa severa que se asocia frecuentemente a la mutación m.8993T>G en el gen de la subunidad 6 de ATPasa de ADNmt, con un porcentaje obligatoriamente superior a 90% de heteroplasmia, a diferencia del síndrome de NARP (6). Existen otras mutaciones, menos frecuentes, como m.13051G>A y m.10158T>C, que dan clínica similar. La clínica se presenta usualmente durante el primer año de vida con retraso en el desarrollo y disfunción neurológica en forma de epilepsia y ataxia, disfunción cardíaca, respiratoria y muscular rápidamente progresiva, debido a la pérdida crónica de la capacidad de generar energía. Cursa con niveles elevados de lactato y piruvato en sangre y líquido cefalorraquídeo (49).

5.2.4.1. Biogénesis asociada a la mutación en m.8993T>G

En 2012, Iyer S. y col. estudiaron la potenciación de la biogénesis en respuesta a la terapia génica con ADNmt de donante sano y TFAM recombinante humano (ADNmt+TFAMRh) en fibroblastos de un paciente con la mutación y clínica compatible con MILS. Esto se demostró al encontrar una expresión significativamente mayor de PGC-1 α , TFAMA y TFAMB1 14 y 21 días desde el inicio del tratamiento (figura 16). Este incremento se asoció a una mayor masa mitocondrial y a una mayor síntesis de proteínas de la cadena respiratoria de manera significativa (49).

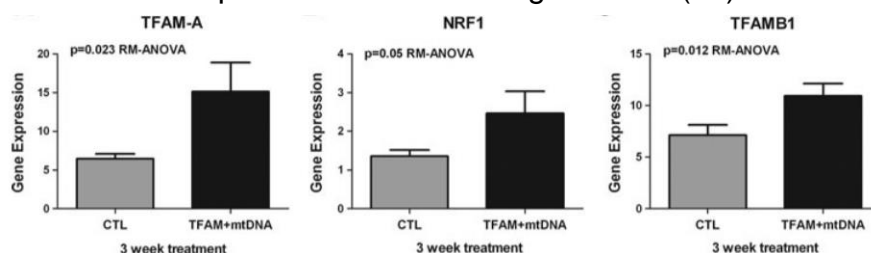


Figura 16: Western blot. CTL: Control. TFAM+mtDNA: muestra MILS + ADNmt+TFAMRh. TFAMA, TFAMb1. NRF1. (49).

Años después, se llevó a cabo un único estudio en el cual se realizó la terapia génica directamente sobre un ovocito para fecundación in vitro, cuyo resultado fue el nacimiento de un hijo asintomático (50). No se llevaron a cabo más estudios debido a las implicaciones éticas y legales de este proceso (51).

Se han propuesto análogos de la vitamina E como terapia para tratar pacientes con MILS. Al tratar con este antioxidante una muestra de fibroblastos, se observó la disminución de ROS y una mayor síntesis de proteínas de la cadena respiratoria, sin mayor evidencia clínica. También se ha estudiado el uso de EPI-743, una benzoquinona más potente que CoQ₁₀, sin embargo los resultados no han sido publicados (NCT01721733) (28).

5.2.4.2. Mitofagia asociada a la mutación en m.13051G>A

En 2016, Dombi D., Diot A., Morten K. y col. demostraron un incremento de actividad mitofágica significativo en fibroblastos de dos familias con la mutación m.13051G>A en homoplasmia con clínica compatible con MILS. Se observó un mayor nivel de ROS y de LC3 y una menor masa mitocondrial con respecto al control (15). Las muestras fueron tratadas con idebenona, disminuyendo la mitofagia y aumentando la capacidad de producir ATP (52).

5.2.4.3. Fusión y fisión asociadas a la mutación en m.10158T>C

En el estudio comentado anteriormente, realizado en 2019 por Tokuyama T., Hirai A., Shiiba I. y col., se investigaron las alteraciones en la fisión de fibroblastos con la mutación m.10158T>C y clínica compatible con MILS. Se observó que hubo una expresión significativamente mayor de Drp1 con respecto a la muestra control, y una mayor fragmentación mitocondrial. El *knockdown* con siRNA, a pesar de normalizar la fragmentación mitocondrial, indujo la apoptosis celular (36).

5.2.5. Dinámica mitocondrial en LHON: mutaciones en m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C de los genes codificantes de C-I:

La neuropatía óptica hereditaria de Leber o LHON es una enfermedad neurodegenerativa que se debe a múltiples mutaciones en los genes que codifican el C-I. Estas son m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C para ND1, ND4 y ND6, respectivamente, y aparecen en el 90% de casos. Las mutaciones son

predominantemente homoplásmicas (22). Es más frecuente en hombres jóvenes que en mujeres (39). Son de penetrancia incompleta, por lo que es común encontrar familiares asintomáticos (6). Su expresión clínica dependerá tanto de las mutaciones del ADNmt como de “mutaciones secundarias”, de las cuales las subclases del haplogrupo J son las más relevantes (53).

La clínica incluye la pérdida de agudeza visual aguda o subaguda no dolorosa, acompañada con atrofia óptica, edema de disco óptico, microangiopatía y un gran defecto en el campo visual central (6). El desenlace más frecuente es la ceguera completa bilateral, asociado a m.11778G>A en un 50% de casos (49). Puede asociarse asimismo problemas en la conducción cardíaca, neuropatía periférica y ataxia cerebelosa (6).

5.2.5.1. Biogénesis asociada a las mutaciones en m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C

Se menciona de nuevo el artículo publicado en 2012 por Iyer S. y col., en el cual estudiaron la potenciación de la biogénesis en respuesta a ADNmt+TFAMRh en híbridos con la mutación m.11778G>A compatible con LHON. Tras la terapia génica, hubo una mayor expresión de PGC-1 α no significativa y de NRF1 y TFAMB1 significativa a los 21 días (49).

En 2014, Giordano C. y col. estudiaron a tres familias con las tres mutaciones más frecuentemente encontradas en pacientes con LHON, obteniendo 100 muestras de adultos sintomáticos (afectados) y 100 muestras de asintomáticos (portadores). Los portadores demostraron tener un incremento de la biogénesis compensatorio al encontrar mayor masa mitocondrial y niveles de TFAM en sangre significativos con respecto a los afectados, así como una mayor producción de NRF1 no significativa. Además, en sus fibroblastos primarios el incremento de TFAM y NRF1 fue significativo. Las muestras obtenidas de afectados no presentaron un incremento significativo en la biogénesis con respecto al control. Tampoco presentaron variaciones significativas de PARL, OPA1 y PINK1 (54). En 2015, el mismo grupo utilizó estrógenos en híbridos de pacientes portadores de una de las mutaciones para LHON, incrementando significativamente Sirt1, TFAM, NRF1 y PGC-1 α (55).

En 2015, Hung SS. y col. estudiaron los efectos de la reprogramación sobre unas iPCSs obtenidas de fibroblastos de 3 pacientes con la mutación m.11778G>A y clínica

compatible con LHON. En estas muestras, la expresión de MFN1 y MFN2 y TFAM y NRF1 no variaron significativamente 28 días después de la reprogramación, a pesar de su mayor expresión con respecto al control (56). Aunque se ha logrado replicar las características de la dinámica mitocondrial en iPCSs, no se ha conseguido la correcta diferenciación a células de la retina de una muestra lo suficientemente grande para continuar el estudio (51).

Se ha realizado el estudio de idebenona como potenciador de la biogénesis. En 2015, su uso fue aprobado para el tratamiento de LHON en Europa (51). En 2007 se llevó a cabo un ensayo clínico (NCT00747487) en el cual, a pesar de no alcanzar resultados significativos, se consiguió la mejoría clínica en un 30,2% de los pacientes (28). En 2022, se observó una mejoría en la agudeza visual a los 24 meses de seguimiento en pacientes con más de 5 años de tratamiento (57). Ese mismo año, Danese A. y col. publicaron un estudio en el que se observó el aumento de la biogénesis en portadores a través de la mayor expresión de TFAM y PGC-1 α (58).

5.2.5.2. Mitofagia asociada a las mutaciones en m.3460G>A y m.11778G>A

En 2018, Sharma LK., Tiwari M., Rai NK. y col. demostraron la existencia de una disregulación de la mitofagia en cíbridos de pacientes con la mutación en m.3460G>A y m.11778G>A con clínica compatible con LHON. Las células fueron incubadas previamente en galactosa, para forzar la producción de ATP a través del sistema OXPHOS. En *Western blot*, se detectó una producción significativamente menor de BECLIN1 y LC3B-II, una mayor masa mitocondrial y un menor número de lisosomas en inmunofluorescencia. La inhibición farmacológica de la síntesis de C-I dio lugar a una disminución significativa de BECLIN1 y LC3B-II, mientras que en el control sus niveles aumentaron de manera compensatoria. La inhibición con Bafilomicina A1 dio lugar a un mayor descenso con respecto al medio de galactosa. En estudios anteriores, la inducción de la mitofagia selectiva con rapamicina demostró una mayor supervivencia celular, obteniendo el mismo resultado en esta investigación (59,60).

El equipo de investigación formado por Zhang J. y col. demostró la disfunción mitofágica en otras mutaciones primarias y en sinergia con mutaciones ya conocidas. En 2018 observaron que la mutación aislada de m.12338T>C para ND5 empeoró la función mitofágica al disminuir LC3-II y secuestrosoma 1 e incrementó la apoptosis celular (61). En 2020, se observó en células con mutación en m.3866T>C y

m.11778G>A el déficit significativamente superior de las mismas proteínas, en comparación ambas mutaciones aisladas (62). Ese mismo año se encontró la mutación c.157T>C (p.Arg53Trp) del gen PRICKLE3, un modificador nuclear, obteniendo resultados similares (63). En 2021 se repitió el mismo procedimiento sobre muestras con la mutación ya conocida m.3460G>A, demostrando el mismo déficit en la mitofagia. En estas muestras, se valoraron los niveles de LC3-II, PINK1 y PARKIN, significativamente menores a las muestras control, y el nivel de p62, significativamente mayor (figura 17). Estos hallazgos se relacionaron con la acumulación de sustratos mitocondriales, debido a la menor capacidad de formar autofagosomas. (64).

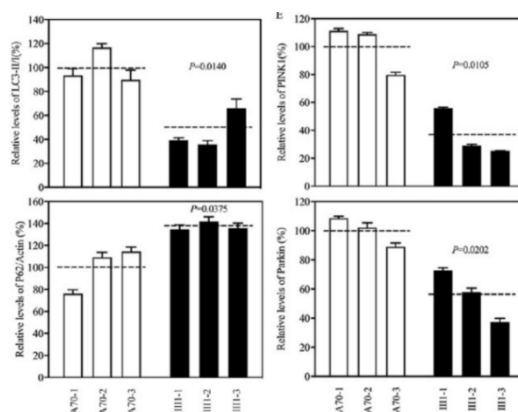


Figura 17: Western blot. Blanco: control. Negro: Cíbridos de LHON con mutación m.3460G>A. Ratio LC3-II/I. PINK1. p62. PARKIN. (64).

Finalmente, en 2022 Danese A. y col. publicaron un estudio enfocado en la relación entre disfunción mitofágica y penetrancia. Se utilizaron iPCSs diferenciadas a neuronas con la mutación m.3460G>A y m.11778G>A, y cuatro muestras de fibroblastos primarios de la misma familia, 2 de pacientes afectados y 2 de portadores de LHON. Se observó un incremento de LC3-II significativo y la localización de PARKIN en mitocondrias en todas las muestras afectadas con respecto a portadores y control. Al someter los fibroblastos primarios afectados a un medio sin glucosa, no hubo el incremento de la mitofagia compensatorio que estuvo presente en el control. La administración de Bafilomicina A1 incrementó significativamente el nivel de LC3-II de manera compensatoria en todas las muestras. El tratamiento con idebenona demostró una menor activación de la mitofagia en fibroblastos afectados. Se repitió la misma investigación sobre cíbridos, observando que los cíbridos obtenidos de portadores presentaron datos similares a los afectados. Además, se evidenció la activación de la mitofagia a través de AMPK y la inhibición de la ruta de mTOR (58).

6. DISCUSIÓN

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático que destaca por su gran importancia en el metabolismo de la célula eucariota. La producción de ATP a través de la cadena respiratoria es esencial para adaptarse a las necesidades energéticas del organismo (3). No se trata de un orgánulo estático, sino que, para mantener el estado basal, realiza diversos cambios moleculares, morfológicos y en su localización, que fisiológicamente forman parte de la fusión, fisión, mitofagia y biogénesis mitocondrial (10,11). La existencia de mutaciones puntuales del ADNmt se relaciona con las enfermedades mitocondriales, cuya clínica sindrómica más destacable aparece al superar el efecto umbral (5).

En esta revisión, el objetivo principal es observar las alteraciones en la dinámica mitocondrial que tienen lugar en MELAS, MERRF, NARP, MILS y LHON, describiendo las variaciones más relevantes encontradas en estudios de los últimos años con respecto a la ausencia de patología. Se puede concluir que estas alteraciones existen, pues han sido demostradas a través de las diversas técnicas analíticas expuestas en **5.2 Dinámica mitocondrial y mutaciones puntuales en el ADNmt** (página 16). Estos resultados se encuentran representados en **9. Anexo 1** (página 40). De manera generalizada, los resultados han sido:

Mitofagia: en muestras de pacientes con MELAS, MERRF, NARP, MILS y LHON existe un incremento de la actividad mitofágica con un flujo deficiente, lo que condiciona menor producción de ATP. Se observaron *clusters* mitocondriales en autofagolisosomas catepsina D y cyt-c positivos (25), el incremento de LC3, *ratio* LC3-II/LC3-I, PINK1, PARKIN y AMPK (15,25,27,29,31,38,40,41,48,58) además de otros marcadores (BECLIN1, ATG12, β -galactosidasa, Prominina 1, apolipoproteína E) (31,38), la disminución de CoQ₁₀ (25,41) y la inhibición de mTOR (58). El único estudio que contradice este resultado indicó que su muestra se diferenciaba de los previos en las características de la despolarización inducida (30). La mitofagia en MELAS evita la formación de ROS por parte del C-I (29). En MERRF, las vacuolas ribeteadas con actividad mitofágica actúan según el efecto umbral, siendo necesario superarlo para que aparezca una fibra rojo-rasgada (40). En LHON predomina el déficit mitofágico en mutaciones no habituales (61–64), actuando el medio de galactosa como regulador negativo (59).

Biogénesis: en muestras de pacientes con MELAS, MERRF y NARP existe menor biogénesis, explicando la menor producción de ATP y la menor masa mitocondrial (34). Los niveles de PGC-1 α , NRF1, TFAM y AMPK eran inferiores con respecto a la

normalidad (27,42,45). En una muestra de NARP se observa el aumento de NRF1, que compensa el déficit energético a través de la biogénesis (45). En LHON existe un incremento significativo en portadores, y no significativo en afectados, debido a la baja penetrancia de la enfermedad (54,58).

Fusión y fisión: en muestras de pacientes con MELAS, MERRF, NARP y MILS existe un incremento de la fisión, al existir una mayor fragmentación mitocondrial (46,47) y alteraciones en la morfología relacionadas con el incremento de Drp1 (33,36,37), Fis1 (42) y Mff (48). Al contrario, se observó menor fusión a través de un descenso de OPA1 (37). Se encontró un único estudio en el que hubo menor nivel de Drp1 y mayor fusión a través de MFN2, OPA1, OMA1 e YME1L, hecho que los autores relacionaron con las características propias de los cíbridos (48).

No se encontraron estudios que profundizasen en las alteraciones en la dinámica de otras enfermedades mitocondriales, como MIDD, ni en la biogénesis en MILS previa al tratamiento y en la fusión y fisión en LHON, esto último posiblemente por el enfoque de los investigadores sobre el tratamiento de la biogénesis.

Todas las alteraciones observadas son más pronunciadas a mayor heteroplasmia tenga la muestra (27,29,31,37,43), implicando que existe una relación proporcional entre carga mutacional y alteraciones en la dinámica. Este hecho se diferencia de la penetrancia en pacientes con LHON, donde los portadores pueden tener la mutación en homoplasmia y compensar el déficit a través de la biogénesis (55), no existiendo clínica.

Se han descrito en ocasiones valores aislados no significativos. Este hecho no se ha considerado una limitación, ya que éstos se acompañan dentro del mismo estudio de otros valores que apoyan la existencia de una alteración en la dinámica.

Conociendo que debe existir un balance fusión-fisión y mitofagia-biogénesis, aquí se confirma que existe una mayor tendencia a la mitofagia y la fisión. Al realizar la inhibición completa de cada una de ellas, se indujo la apoptosis (25,36,41) por lo que, aunque su actividad sea deficiente, son necesarias para la supervivencia celular.

Como parte del objetivo principal, se encontraron sustancias con potencial terapéutico cuya diana es la dinámica mitocondrial. La recopilación de esta información tiene un nivel de interés elevado, ya que pone en evidencia aquellos tratamientos con los que es más probable conseguir mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados si se decide profundizar en su investigación. Los resultados son altamente positivos para todas las sustancias utilizadas en muestras, consiguiendo satisfactoriamente revertir las

alteraciones previamente descritas, pero los estudios realizados a nivel de la clínica son escasos y muchos de ellos sin éxito. La síntesis de estos se encuentra en **9. Anexo 2 y 3** (página 44-46).

A pesar de la efectividad de los tratamientos a nivel de las muestras, esto no es extrapolable a otros tejidos del cuerpo humano, ya que las características de las mitocondrias pueden variar de un tejido a otro (40), no pudiendo afirmar el carácter curativo en todos ellos. Por otra parte, en caso de MILS (36,52) y LHON (61–64), se han estudiado mutaciones puntuales que no son las habituales, por lo que hay que tener precaución a la hora de generalizar estos resultados en estudios posteriores.

La dieta cetogénica, Sirt1, el ácido retinoico y el ejercicio demostraron beneficio clínico en MELAS (28), pudiendo ser de interés continuar su estudio. La aprobación de idebenona como tratamiento para LHON facilitó su estudio tanto en muestras como en pacientes con clínica (28,57), por lo que es conveniente indagar en su potencial curativo. Rapamicina es el único fármaco descrito con capacidad mitofágica selectiva (59,60), siendo el de mayor potencial para ser aprobado como tratamiento en caso de obtener resultados positivos en futuros ensayos clínicos. Sólo hubo un caso de curación completa (50), pero las implicaciones éticas y legales dificultan que en la actualidad se continúe su estudio, siendo recomendable profundizar en alguna de las otras terapias mencionadas.

A pesar de que la literatura disponible es limitada, se ha cumplido con el objetivo principal, al demostrar la existencia de alteraciones a través de la evidencia científica. Esta revisión se beneficia de la elevada validez interna de los estudios utilizados, ya que además de la adecuada y correcta descripción de todos los procedimientos realizados, es frecuente que los autores repitan su investigación sobre la misma muestra varias veces, así como en otras de características similares (58). Además, es común que un mismo grupo continúe con la investigación durante años, confirmando los resultados descritos en estudios previos y formulando nuevas hipótesis, siendo un ejemplo llamativo aquellos realizados en LHON (61–64). Estos hallazgos nos aseguran la replicabilidad, aunque como se ha visto previamente en las muestras creadas por iPCSs en LHON (51,56), al utilizarse cada vez más técnicas innovadoras, es posible que los estudios fracasen por las características propias de las células que conforman las nuevas muestras, requiriendo más intentos para llevar a cabo una investigación satisfactoria.

Por otra parte, las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones puntuales son poco frecuentes, por lo que es difícil encontrar las suficientes personas afectadas

para formar una muestra representativa a la que realizar un seguimiento, lo que podría justificar la falta de ensayos clínicos publicados observada en otras revisiones (28).

Sin duda alguna, aunque la información recopilada en esta revisión es sólida y tiene validez científica, existen múltiples razones por las que continuar el estudio, siendo lo principal encontrar tratamientos que conlleven un efecto beneficioso sobre la dinámica mitocondrial en todos los tejidos afectados por la enfermedad, y que a su vez este efecto pueda verse reflejado en el paciente como la mejoría clínica.

7. CONCLUSIONES

Se ha demostrado la presencia de alteraciones en la dinámica mitocondrial con relación a mutaciones puntuales del ADNmt asociadas a enfermedades mitocondriales (MELAS, MERRF, NARP, MILS y LHON), existiendo una mayor tendencia a la mitofagia y la fisión y una menor biogénesis y fusión en las muestras estudiadas en pacientes con clínica.

Las alteraciones en la dinámica mitocondrial dependen de la heteroplasmia. Una mayor heteroplasmia implica mayor alteración en la dinámica mitocondrial.

La baja penetrancia en pacientes portadores de LHON permite la compensación de las deficiencias de la cadena respiratoria mediante el incremento de la biogénesis.

La mitofagia y la fisión, independientemente de la eficacia de su actividad, son necesarias para la supervivencia celular.

Las sustancias modificadoras con potencial terapéutico son capaces de revertir en las muestras los efectos sobre la dinámica causados por la mutación.

La mejoría clínica se ha conseguido con determinados tratamientos, entre ellos idebenona, pero no se ha logrado la curación completa después del nacimiento.

Es necesario continuar con el estudio de la dinámica mitocondrial y el efecto de las sustancias modificadoras en muestras de diferentes tejidos afectados por la enfermedad, así como continuar el estudio de los tratamientos con potencial terapéutico, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones puntuales del ADNmt.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Riera AM. Indagando en el origen de las mitocondrias. Biol on-line. 2014 Feb;3(1).
2. Solano A, Playán A, López-Pérez MJ, Montoya J. Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. Salud Publica Mex. 2001;43(2):151–61.
3. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. J Pathol. 2017 Jan;241(2):236–50.
4. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. J Cell Biol. 2016;212(4):379–87.
5. Montoya J, Emperador S, Ruiz-pesini E. Capítulo 14. Enfermedades mitocondriales. SEBBM Divulg. 2014;773–90.
6. Montoya J, Emperador S, Lopez E, Ruiz-pesini E. Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 2014. 773–790 p.
7. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi G Pietro, et al. Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. J Neurol. 2015 May 26;262(5):1301–9.
8. Vu T, Sciacco M, Tanji K, Nichter C, Bonilla E, Chatkupt S, et al. Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion. Neurology. 1998 Jun;50(6):1783–90.
9. Suárez-Rivero J, Villanueva-Paz M, de la Cruz-Ojeda P, de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, et al. Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. Diseases. 2016 Dec 23;5(1):1.
10. Choubey V, Zeb A, Kaasik A. Molecular mechanisms and regulation of mammalian mitophagy. Cells. 2022;11(1):38.
11. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(11):870–9.
12. Yang M, He Y, Deng S, Xiao L, Tian M, Xin Y, et al. Mitochondrial Quality Control: A Pathophysiological Mechanism and Therapeutic Target for Stroke. Front Mol Neurosci. 2022 Jan;14:1–19.
13. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, mutations, and elimination. Cells. 2019 Apr 1;8(4):379.
14. Villanueva Paz M, Cotán D, Garrido-Maraver J, Cordero MD, Oropesa-Ávila M, De La Mata M, et al. Targeting autophagy and mitophagy for mitochondrial diseases treatment. Expert Opin Ther Targets. 2016 Apr 2;20(4):487–500.
15. Dombi E, Mortiboys H, Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. Curr Med Chem. 2017 Jun 16;25(40):5597–612.
16. Yapa NMB, Lisnyak V, Reljic B, Ryan MT. Mitochondrial dynamics in health and disease. FEBS Lett. 2021 Apr 1;595(8):1184–204.
17. Dabravolski SA, Orekhova VA, Baig MS, Bezsonov EE, Starodubova A V., Popkova T V., et al. The role of mitochondrial mutations and chronic inflammation in diabetes. Int J Mol Sci. 2021 Jul 1;22(13):6733.
18. Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, Yu T. Mitochondrial Dynamics in Diabetes. Antioxid Redox Signal. 2011;14:439–57.

19. Valero T. Mitochondrial Biogenesis: Pharmacological Approaches. *Curr Pharm Des.* 2014;20(35):5507–9.
20. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med.* 2020 May 1;24(9):4892–9.
21. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther.* 2017 Jan 1;23(1):5–22.
22. Chan DC. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell.* 2006 Jun 30;125(7):1241–52.
23. Pareyson D, Piscoquito G, Moroni I, Salsano E, Zeviani M. Peripheral neuropathy in mitochondrial disorders. *Lancet Neurol.* 2013 Oct;12(10):1011–24.
24. McMillan RP, Stewart S, Budnick JA, Caswell CC, Hulver MW, Mukherjee K, et al. Quantitative Variation in m.3243A > G Mutation Produce Discrete Changes in Energy Metabolism. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1).
25. Cotán D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, Rodríguez-Hernández Á, Izquierdo LG, et al. Secondary coenzyme Q 10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J.* 2011 Aug;25(8):2669–87.
26. Rodríguez-Hernández Á, Cordero MD, Salviati L, Artuch R, Pineda M, Briones P, et al. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy.* 2009 Jan 1;5(1):19–32.
27. Garrido-Maraver J, Villanueva-Paz M, Cordero MD, Bautista-Lorite J, Oropesa-Ávila M, de la Mata M, et al. Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2015 Nov 1;1852(11):2535–53.
28. Hirano M, Emmanuele V, Quinzii CM. Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays Biochem.* 2018 Jul 20;62(3):467–81.
29. Hämäläinen RH, Manninen T, Koivumäki H, Kislin M, Otonkoski T, Suomalainen A. Tissue-and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 17;110(38).
30. Morán M, Delmiro A, Blázquez A, Ugalde C, Arenas J, Martín MA. Bulk autophagy, but not mitophagy, is increased in cellular model of mitochondrial disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(7):1059–70.
31. Bhattacharya S, Yin J, Huo W, Chaum E. Modeling of mitochondrial bioenergetics and autophagy impairment in MELAS-mutant iPSC-derived retinal pigment epithelial cells. *tem Cell Res Ther.* 2022 Dec 1;13(1):260.
32. Lin DS, Huang YW, Ho CS, Hung PL, Hsu MH, Wang TJ, et al. Oxidative insults and mitochondrial DNA mutation promote enhanced autophagy and mitophagy compromising cell viability in pluripotent cell model of mitochondrial disease. *Cells.* 2019 Jan 1;8(1):65.
33. Chang JC, Hoel F, Liu KH, Wei YH, Cheng FC, Kuo SJ, et al. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):10710.
34. Geffroy G, Benyahia R, Frey S, Desquirit-Dumas V, Gueguen N, Bris C, et al. The accumulation of assembly intermediates of the mitochondrial complex I matrix arm is reduced by limiting glucose uptake in a neuronal-like model of MELAS syndrome. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2018 May 1;1864(5):1596–608.

35. Steriade C, Andrade DM, Faghfoury H, Tarnopolsky MA, Tai P. Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) may respond to adjunctive ketogenic diet. *Pediatr Neurol.* 2014;50(5):498–502.
36. Tokuyama T, Hirai A, Shiiba I, Ito N, Matsuno K, Takeda K, et al. Mitochondrial dynamics regulation in skin fibroblasts from mitochondrial disease patients. *Biomolecules.* 2020 Mar 1;10(3).
37. Lin DS, Huang YW, Ho CS, Huang TS, Lee TH, Wu TY, et al. Impact of Mitochondrial A3243G Heteroplasmy on Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics of Directly Reprogrammed MELAS Neurons. *Cell.* 2022 Jan 1;12(1):15.
38. de la Mata M, Garrido-Maraver J, Cotán D, Cordero MD, Oropesa-Ávila M, Izquierdo LG, et al. Recovery of MERRF Fibroblasts and Cybrids Pathophysiology by Coenzyme Q10. *Neurotherapeutics.* 2012 Apr;9(2):446–63.
39. Szczepanowska J, Malinska D, Wieckowski MR, Duszynski J. Effect of mtDNA point mutations on cellular bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Oct;1817(10):1740–6.
40. Yuan JH, Sakiyama Y, Higuchi I, Inamori Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, et al. Mitochondrial myopathy with autophagic vacuoles in patients with the m.8344a>g mutation. *J Clin Pathol.* 2013 Aug;66(8):659–64.
41. Villanueva-Paz M, Povea-Cabello S, Villalón-García I, Álvarez-Córdoba M, Suárez-Rivero JM, Talaverón-Rey M, et al. Parkin-mediated mitophagy and autophagy flux disruption in cellular models of MERRF syndrome. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2020 Jun 1;1866(6):165726.
42. Chang JC, Liu KH, Li YC, Kou SJ, Wei YH, Chuang C Sen, et al. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. *NeuroSignals.* 2013;21(3–4):160–73.
43. Capristo M, Del Dotto V, Tropeano CV, Fiorini C, Caporali L, La Morgia C, et al. Rapamycin rescues mitochondrial dysfunction in cells carrying the m.8344A > G mutation in the mitochondrial tRNA^{Lys}. *Mol Med.* 2022 Dec 1;28(1):90.
44. Chang JC, Liu KH, Chuang C Sen, Su HL, Wei YH, Kuo SJ, et al. Treatment of human cells derived from MERRF syndrome by peptide-mediated mitochondrial delivery. *Cytotherapy.* 2013 Dec;15(12):1580–96.
45. Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J. NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Aug;43(8):1178–86.
46. Peng TI, Hsiao CW, Reiter RJ, Tanaka M, Lai YK, Jou MJ. MtDNA T8993G mutation-induced mitochondrial complex v inhibition augments cardiolipin-dependent alterations in mitochondrial dynamics during oxidative, Ca²⁺, and lipid insults in NARP cybrids: A potential therapeutic target for melatonin. *J Pineal Res.* 2012 Jan;52(1):93–106.
47. Hsiao CW, Peng TI, Peng AC, Reiter RJ, Tanaka M, Lai YK, et al. Long-term Ab exposure augments mCa²⁺-independent mROS-mediated depletion of cardiolipin for the shift of a lethal transient mitochondrial permeability transition to its permanent mode in NARP cybrids: A protective targeting of melatonin. *J Pineal Res.* 2013 Jan;54(1):107–25.
48. Walczak J, Partyka M, Duszyński J, Szczepanowska J. Implications of mitochondrial network organization in mitochondrial stress signalling in NARP cybrid and Rho0 cells. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):14864.
49. Iyer S, Bergquist K, Young K, Gnaiger E, Rao RR, Bennett JP. Mitochondrial gene therapy improves respiration, biogenesis, and transcription in G11778A leber's hereditary optic

- neuropathy and T8993G leigh's syndrome cells. *Hum Gene Ther*. 2012 Jun 1;23(6):647–57.
50. Zhang J, Liu H, Luo S, Lu Z, Chávez-Badiola A, Liu Z, et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reprod Biomed Online*. 2017 Apr 1;34(4):361–8.
 51. Jurkute N, Harvey J, Yu-Wai-Man P. Treatment strategies for Leber hereditary optic neuropathy. *Curr Opin Neurol*. 2019 Feb 1;32(1):99–104.
 52. Dombi E, Diot A, Morten K, Carver J, Lodge T, Fratter C, et al. The m.13051G>A mitochondrial DNA mutation results in variable neurology and activated mitophagy. *Neurology*. 2016 May 17;86(20):1921–3.
 53. Caporali L, Maresca A, Capristo M, Del Dotto V, Tagliavini F, Valentino ML, et al. Incomplete penetrance in mitochondrial optic neuropathies. *Mitochondrion*. 2017 Sep 1;36:130–7.
 54. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, Maresca A, Pisano A, Valentino ML, et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014;137(2):335–53.
 55. Pisano A, Preziuso C, Iommarini L, Perli E, Grazioli P, Campese AF, et al. Targeting estrogen receptor β as preventive therapeutic strategy for Leber's hereditary optic neuropathy. *Hum Mol Genet*. 2015;24(24):6921–31.
 56. Hung SS, Van Bergen NJ, Jackson S, Liang H, Mackey DA, Hernández D, et al. Study of mitochondrial respiratory defects on reprogramming to human induced pluripotent stem cells. *AGING (Albany NY)*. 2016;8(5):945–57.
 57. Yu-Wai-Man P, Carelli V, Tomasso L, Klopstock T. Long-term efficacy and safety of idebenone in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) in the subacute/dynamic phase: Results from the prospective, natural history-controlled LEROS study. *Acta Ophthalmol*. 2022;100(275).
 58. Danese A, Patergnani S, Maresca A, Peron C, Raimondi A, Caporali L, et al. Pathological mitophagy disrupts mitochondrial homeostasis in Leber's hereditary optic neuropathy. *Cell Rep*. 2022 Jul 19;40(3):11124.
 59. Sharma LK, Tiwari M, Rai NK, Bai Y. Mitophagy activation repairs Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial dysfunction and improves cell survival. *Hum Mol Genet*. 2019 Feb 1;28(3):422–33.
 60. Dai Y, Zheng K, Clark J, Swerdlow RH, Pulst SM, Sutton JP, et al. Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet*. 2014 Feb;23(3):637–47.
 61. Zhang J, Ji Y, Lu Y, Fu R, Xu M, Liu X, et al. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)-associated ND5 12338T > C mutation altered the assembly and function of complex I, apoptosis and mitophagy. *Hum Mol Genet*. 2018 Jun 1;27(11):1999–2011.
 62. Ji Y, Zhang J, Lu Y, Yi Q, Chen M, Xie S, et al. Complex I mutations synergize to worsen the phenotypic expression of Leber's hereditary optic neuropathy. *J Biol Chem*. 2020 Sep 18;295(38):13224–38.
 63. Yu J, Liang X, Ji Y, Ai C, Liu J, Zhu L, et al. PRICKLE3 linked to ATPase biogenesis manifested Leber's hereditary optic neuropathy. *J Clin Invest*. 2020 Sep 1;130(9):4935–46.
 64. Zhang J, Ji Y, Chen J, Xu M, Wang G, Ci X, et al. Association between leber's hereditary optic neuropathy and MT-ND1 3460G>a mutation-induced alterations in mitochondrial function, apoptosis, and mitophagy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2021 Jul 1;62(9):38.

9. ANEXOS

Anexo 1. Alteraciones en la dinámica mitocondrial

Autores, título, editorial	Año de publicación	Enfermedad mitocondrial y dinámica a estudio	Características de las muestras	Resultados obtenidos	Conclusiones	Otros hallazgos
Cotán D., Cordero MD., Rodríguez-Hernández Á. y col. Secondary coenzyme Q 10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. FASEB J. (25)	2011	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios con déficit de CoQ ₁₀ (2 muestras).	Clusters mitocondriales en autofagolisosomas (cathepsina D y cyt-c positivos). Incremento de LC3.	Incremento de mitofagia. Flujo mitofágico deficiente.	Bafilomicina A1: LC3 sin cambios. Inhibidores de PINK1 (3-metil-adenina, wortmanina), knockdown con siRNA: apoptosis celular.
Cotán D., Cordero MD., Villanueva-Paz M. y col. Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (27)	2015	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios de diferente heteroplasmia (4 muestras). Cíbridos (1 muestra).	Incremento de LC3. Menor masa mitocondrial.	Incremento de mitofagia a mayor heteroplasmia. Flujo mitofágico deficiente.	Bafilomicina A1: LC3 sin cambios.
Hämäläinen RH, Manninen T., Koivumäki H. y col. Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. Proc Natl Acad Sci U S A. (29)	2013	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	iPCs reprogramadas a neuronas de diferente heteroplasmia (3 muestras divididas en MELAS High y MELAS Low).	Clusters con C-I en mitocondrias de la periferia nuclear (MELAS High). Colocalización de cathepsina D, cyt-c, LC3, PINK1 y PARKIN.	La mitofagia evita la formación de ROS por parte del C-I mediante su secuestro en muestras de mayor heteroplasmia.	Incremento de C-II compensatorio.
Morán M., Delmoro A., Blázquez A. y col. Bulk autophagy, but not mitophagy, is increased in cellular model of mitochondrial disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (30)	2014	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios.	Ausencia de colocalización de LC3, PINK1 y PARKIN.	Incremento de autofagia, pero no de mitofagia.	Características de la despolarización inducida diferentes a otros estudios.
Lin DS. y col. Oxidative insults and mitochondrial DNA mutation promote enhanced autophagy and mitophagy compromising cell viability in pluripotent cell model of mitochondrial disease. Cells. (32)	2018	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	iPCs reprogramadas a células de retina	Incremento de LC3.	Incremento de mitofagia. Activación deficiente.	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP): sin cambios.
Bhattacharya S., Yin J., Huo W. y col. Modeling of mitochondrial bioenergetics and autophagy impairment in MELAS-mutant iPC-derived retinal pigment epithelial cells. Stem Cell Res Ther. (31)	2022	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	iPCs reprogramadas a células de retina de diferente heteroplasmia.	Activación de STAT3. Incremento de LC3, PINK1, BECLIN1, Prominina 1 y apolipoproteína E. Disminución de AMPKα.	Incremento de mitofagia a mayor heteroplasmia. Activación deficiente.	Incremento de Prominina 1 compensatorio. Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP): sin cambios.
Yuan JH., Sakiyama Y., Higuchi I. y col. Mitochondrial myopathy with autophagic vacuoles in patients with the m.8344a>g mutation. J Clin Pathol. (40)	2012	Mitofagia en MERRF (m.8344A>G)	Músculo (2 muestras). Pacientes con clínica miopática aislada.	Agregación de LC3 y fragmentación mitocondrial en vacuolas ribeteadas y fibras rojo-rasgadas.	Las vacuolas ribeteadas tienen mayor actividad mitofágica. Al superar el efecto umbral, se convierten en fibras rojo-rasgadas.	Mayor heteroplasmia en muestras de músculo que en sangre.

Autores, título, editorial	Año de publicación	Enfermedad mitocondrial y dinámica a estudio	Características de las muestras	Resultados obtenidos	Conclusiones	Otros hallazgos
de la Mata M., Cotán D., Cordero MD. y col. Recovery of MERRF Fibroblasts and Cybrids Pathophysiology by Coenzyme Q10. Neurotherapeutics (38)	2012	Mitofagia en MERRF (m.8344A>G)	Fibroblastos primarios y cbridos con déficit de CoQ10.	Fibroblastos primarios: fragmentación mitocondrial con colocalización de LC3, ATG12, BECLIN1 y catepsina D. Cbridos: incremento de ratio ATG5/ATG12 y LC3-/LC3-II.	Incremento de mitofagia.	
Villanueva-Paz M., Povea-Cabello S., Villalón-García I. y col. Parkin-mediated mitophagy and autophagy flux disruption in cellular models of MERRF syndrome. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (41)	2020	Mitofagia en MERRF (m.8344A>G)	Fibroblastos primarios, cbridos e IPCSs reprogramadas a neuronas con déficit de CoQ10.	Mismos hallazgos que en 2012. Fragmentación mitocondrial con colocalización de PARKIN, PINK1 y DRP1. Incremento de AMPK.	Incremento de mitofagia. Flujo mitofágico deficiente.	Bafilomicina A1: LC3 sin cambios. Knockdown de PARKIN: apoptosis celular.
Walczak J, Duszyński J, Szczepanowska J. y col. Implications of mitochondrial network organization in mitochondrial stress signalling in NARP cybrid and Rho0 cells. Sci Rep. (48)	2017	Mitofagia en NARP (m.8993T>G)	Cbridos.	Incremento de ratio LC3-/LC3-II y BECLIN1.	Incremento de mitofagia.	
Dombi D., Diot A., Morten K. y col. The m.13051G>A mitochondrial DNA mutation results in variable neurology and activated mitophagy. Neurology. (52)	2016	Mitofagia en MILS (m.13051G>A)	Fibroblastos primarios de familias con m.13051G>A en homoplasmia.	Incremento de ROS y LC3. Menor masa mitocondrial.	Incremento de mitofagia secundario a fusión.	
Sharma LK., Tiwari M., Rai NK. y col. Mitophagy activation repairs Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial dysfunction and improves cell survival. Hum Mol Genet. (59)	2019	Mitofagia en LHON (m.3460G>A y m.11778G>A)	Cbridos incubados en medio de galactosa.	Disminución de BECLIN1 y LC3B-II. Mayor masa mitocondrial. Menor número de lisosomas.	Regulación negativa de mitofagia en medio de galactosa.	Inhibición farmacológica de C-I, Bafilomicina A1: disminución significativa de BECLIN1 y LC3B-II.
Zhang J. y col. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)-associated ND5 12338T>C mutation altered the assembly and function of complex I, apoptosis and mitophagy. Hum Mol Genet; Complex I mutations synergize to worsen the phenotypic expression of Leber's hereditary optic neuropathy. J Biol Chem; PRICKLE3 linked to ATPase biogenesis manifested Leber's hereditary optic neuropathy. J Clin Invest; Association between leber's hereditary optic neuropathy and MT-ND1 3460G>A mutation-induced alterations in mitochondrial function, apoptosis, and mitophagy. Invest Ophthalmol Vis Sci. (61-64)	2018-2021	Mitofagia en LHON (m.12338T>C, m.3866T>C y m.11778G>A, c.157T>C, m.3460G>A)	Cbridos.	m.12338T>C: disminución de LC3-II y secuestrosoma 1. Mayor apoptosis celular. m.3866T>C y m.11778G>C: mismos resultados en sinergia. c.157T>C: mismos resultados. m.3460G>A: disminución de LC3-II, PINK1, PARKIN e incremento de p62. Mayor apoptosis celular.	Disminución de mitofagia. Acumulación de sustratos mitocondriales por la disfunción en la formación de autofagosomas.	
Danese A. y col. Pathological mitophagy disrupts mitochondrial homeostasis in Leber's hereditary optic neuropathy. Cell Rep. (58)	2022	Mitofagia en LHON (m.3460G>A y m.11778G>A)	IPCSs reprogramadas a neuronas. Fibroblastos primarios (4 muestras): 2 de pacientes afectados y 2 de portadores.	Afectados: incremento de LC3-II. Colocalización de PARKIN. Incremento de AMPK. Inhibición de mTOR. Portadores: sin cambios con respecto al control.	Incremento de mitofagia en afectados. Sin alteraciones en portadores. Flujo mitofágico deficiente.	Medio sin glucosa: sin cambios en muestras de afectados. Bafilomicina A1: incremento de LC3-II en todas las muestras.

Autores, título, editorial	Año de publicación	Enfermedad mitocondrial y dinámica a estudio	Características de las muestras	Resultados obtenidos	Conclusiones	Otros hallazgos
Cotán D., Cordero MD., Villanueva-Paz M. y col. Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (27)	2015	Biogénesis en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios de diferente heteroplasmia (4 muestras). Cíbridos (1 muestra).	Disminución de PGC-1α (localización citosólica), NRF1, y TFAM. Aumento compensatorio de PGC-1α (localización nuclear), NRF1, TFAM y AMPKα en muestras de menor heteroplasmia.	Disminución de biogénesis a mayor heteroplasmia. Aumento de biogénesis compensatorio a menor heteroplasmia.	5-Aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR): cambio de localización de PGC-1α citosólica a nuclear.
Geffroy G. y col. The accumulation of assembly intermediates of the mitochondrial complex I matrix arm is reduced by limiting glucose uptake in a neuronal-like model of MELAS syndrome. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (34)	2018	Biogénesis en MELAS (m.3243A>G)	Cíbridos.	Incremento de intermediarios de C-I. Menor masa mitocondrial.	Disminución de biogénesis por falta de ensamblaje de C-I.	Medio sin glucosa, AICAR: incremento de síntesis de C-I, incremento de masa mitocondrial.
Chang JC. y col. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. NeuroSignals. (42)	2013	Biogénesis en MERRF (m.8344A>G)	Cíbridos.	Disminución de PGC-1α, NRF1 y TFAM.	Disminución de biogénesis.	
Wojewoda M., Duszyński J., Szczepanowska J. y col. NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation. Int J Biochem Cell Biol. (45)	2011	Biogénesis en NARP (m.8993T>G)	Cíbridos.	Incremento de NRF1. Acumulación de NRF2 en el núcleo. PGC-1α y TFAM sin cambios.	Compensación de la biogénesis mediante NRF1.	
Giordano C. y col. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain. (54)	2014	Biogénesis en LHON (m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C)	Sangre y fibroblastos primarios (100 afectados, 100 portadores).	Portadores: mayor masa mitocondrial. Incremento de TFAM, sin cambios de NRF1 en sangre. Incremento de TFAM y NRF1 en fibroblastos. Afectados: sin cambios con respecto al control.	Incremento de biogénesis compensatorio en portadores.	Sin cambios en PARL, OPA1 y PINK1.
Hung SS. y col. Targeting estrogen receptor β as preventive therapeutic strategy for Leber's hereditary optic neuropathy. Hum Mol Genet. (56)	2015	Biogénesis en LHON (m.11778G>A)	iPCs obtenidas de fibroblastos de 3 pacientes.	TFAM y NRF1 sin cambios a los 28 días.	Replicabilidad de los parámetros obtenidos en fibroblastos primarios en iPCs.	Sin cambios en MFN1 y MFN2.
Danese A. y col. Pathological mitophagy disrupts mitochondrial homeostasis in Leber's hereditary optic neuropathy. Cell Rep. (58)	2022	Mitofagia en LHON (m.3460G>A y m.11778G>A)	iPCs reprogramadas a neuronas. Fibroblastos primarios (4 muestras); 2 de pacientes afectados y 2 de portadores.	Portadores: incremento de TFAM y PGC-1α.	Incremento de biogénesis compensatorio en portadores.	

Autores, título, editorial	Año de publicación	Enfermedad mitocondrial y dinámica a estudio	Características de las muestras	Resultados obtenidos	Conclusiones	Otros hallazgos
Chang JC. y col. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. <i>Sci Rep.</i> (33)	2017	Fusión y fisión en MELAS (m.3243A>G)	Cíbridos.	Clusters mitocondriales con fragmentación mitocondrial. Incremento de Drp1.	Incremento de fisión.	
Tokuyama T., Hirai A., Shiiba I. y col. Mitochondrial dynamics regulation in skin fibroblasts from mitochondrial disease patients. <i>Biomolecules.</i> (36)	2019	Fusión y fisión en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios.	Incremento de Drp1. Mayor fragmentación mitocondrial.	Incremento de fisión.	Knockdown con siRNA: apoptosis celular.
Lin DS. y col. Impact of Mitochondrial A3243G Heteroplasmy on Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics of Directly Reprogrammed MELAS Neurons. <i>Cell.</i> (37)	2022	Fusión y fisión en MELAS (m.3243A>G)	iPCs reprogramadas a neuronas de diferente heteroplasma.	Disminución de área, perímetro, ratio dimensional, factor de forma, crestas, vértices y longitud. Incremento de Drp1 a mayor heteroplasma. Mayor fragmentación mitocondrial. Disminución de OPA1.	Incremento de fisión a mayor heteroplasma. Disminución de fusión.	
Chang JC. y col. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. <i>NeuroSignals.</i> (42)	2013	Fusión y fisión en MERRF (m.8344A>G)	Cíbridos.	Incremento de fragmentación mitocondrial. Incremento de Drp1 y Fis1. Disminución de OPA1 y MFN2.	Incremento de fisión. Disminución de fusión.	
Peng TI, Hsiao CY, Lai YK. y col. MTDNA T8993G mutation-induced mitochondrial complex v inhibition augments cardiolipin-dependent alterations in mitochondrial dynamics during oxidative, Ca ²⁺ , and lipid insults in NARP cybrids: A potential therapeutic target for melatonin. <i>J Pineal Res</i> ; Long-term Ab exposure augments mCa ²⁺ -independent mROS-mediated depletion of cardiolipin for the shift of a lethal transient mitochondrial permeability transition to its permanent mode in NARP cybrids: A protective targeting of melatonin. <i>J Pineal Res.</i> 2013 (46,47)	2012-2013	Fusión y fisión en NARP (m.8993T>G)	Cíbridos de heteroplasma del 98% con clínica compatible con NARP.	Incremento de fragmentación mitocondrial. Menor proporción de mitocondrias tubulares. Depleción de cardiolipina secundaria al depósito de péptido β -amiloide.	Incremento de fisión.	Incremento de la apoptosis en respuesta a los niveles de ROS, calcio mitocondrial, estrés lipídico y péptido β -amiloide
Walczak J, Duszyński J, Szczepanowska J. y col. Implications of mitochondrial network organization in mitochondrial stress signalling in NARP cybrid and Rho0 cells. <i>Sci Rep.</i> (48)	2017	Fusión y fisión en NARP (m.8993T>G)	Cíbridos.	Mayor fragmentación mitocondrial. Disminución de Drp1. Incremento de Fis1 y Mff. Incremento de MFN2, OPA1, OMA1 e YME1L nuclear. MFN1 sin cambios.	Incremento de fisión. Incremento de fusión.	Características de los cíbridos diferentes a otros estudios.
Tokuyama T., Hirai A., Shiiba I. y col. Mitochondrial dynamics regulation in skin fibroblasts from mitochondrial disease patients. <i>Biomolecules.</i> (36)	2019	Fusión y fisión en MLS (m.10158T>C)	Fibroblastos primarios.	Incremento de Drp1. Mayor fragmentación mitocondrial.	Incremento de fisión.	Knockdown con siRNA: apoptosis celular.

Anexo 2. Sustancias modificadoras

Autores, título, editorial	Año de publicación	Enfermedad mitocondrial y dinámica diana	Características de las muestras	Sustancia modificadora con potencial terapéutico	Resultados obtenidos y conclusiones
Cotán D., Cordero MD., Rodríguez-Hernández Á. y col. Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. FASEB J. (25)	2011	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios con déficit de CoQ10 (2 muestras).	CoQ10 durante 72 horas.	Disminución de mitofagia. Ultraestructura similar al control.
Cotán D., Cordero MD., Villanueva-Paz M. y col. Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (27)	2015	Mitofagia en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios de diferente heteroplasmia (4 muestras). Cíbridos (1 muestra).	CoQ10 durante 72 horas.	Recuperación del flujo mitocondrial. Incremento de fosforilación de AMPKα.
de la Mata M., Cotán D., Cordero MD. y col. Recovery of MERRF Fibroblasts and Cybrids Pathophysiology by Coenzyme Q10. Neurotherapeutics. (38)	2012	Mitofagia en MERRF (m.8344A>G)	Fibroblastos primarios y cíbridos con déficit de CoQ10.	CoQ10 durante 72 horas.	Recuperación de la actividad mitocondrial. Incremento de producción de ATP.
Villanueva-Paz M., Povea-Cabello S., Villalón-García I. y col. Parkinson-mediated mitophagy and autophagy flux disruption in cellular models of MERRF syndrome. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (41)	2020	Mitofagia en MERRF (m.8344A>G)	Fibroblastos primarios, cíbridos e IPCs reprogramadas a neuronas con déficit de CoQ10.	CoQ10 durante 72 horas.	Restauración de la red mitocondrial. Incremento de AMPK. No incremento de producción de ATP.
Dombi D., Diot A., Morten K. y col. The m.13051G>A mitochondrial DNA mutation results in variable neurology and activated mitophagy. Neurology. (52)	2016	Mitofagia en MILS (m.13051G>A)	Fibroblastos primarios de familias con m.13051G>A en homoplasmia.	Idebenona.	Disminución de mitofagia. Incremento de producción de ATP.
Sharma UK., Tiwari M., Rai NK. y col. Mitophagy activation repairs Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial dysfunction and improves cell survival. Hum Mol Genet. (59)	2019	Mitofagia en LHON (m.3460G>A y m.11778G>A)	Cíbridos incubados en medio de galactosa.	Rapamicina.	Inducción de mitofagia selectiva. Mayor supervivencia celular.
Cotán D., Cordero MD., Villanueva-Paz M. y col. Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. (27)	2015	Biogénesis en MELAS (m.3243A>G)	Fibroblastos primarios de diferente heteroplasmia (MELAS 1). Cíbridos (1 muestra).	CoQ10.	Incremento de biogénesis. Cambio de localización de PGC-1α citosólica a nuclear.
Chang JC. y col. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. Sci Rep. (33)	2017	Biogénesis en MELAS (m.3243A>G)	Cíbridos.	Transplante mitocondrial con Pep-1.	Incremento de biogénesis. Incremento de masa mitocondrial y la expresión de PGC-1α, NRF1 y TFAM.
Chang JC. y col. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. NeuroSignals. (42)	2013	Biogénesis en MERRF (m.8344A>G)	Cíbridos.	Transplante mitocondrial con Pep-1.	Incremento de biogénesis. Incremento de masa mitocondrial y expresión de NRF1 y TFAM. PGC-1α sin cambios.

Autores, título, editorial	Año de publicación	Enfermedad mitocondrial y dinámica	Características de las muestras	Sustancia modificadora con potencial terapéutico	Resultados obtenidos y conclusiones
Capristo M., Del Dotto V., Tropeano CV. Rapamycin rescues mitochondrial dysfunction in cells carrying the m.8344A>G mutation in the mitochondrial tRNAlys. Mol Med. (43)	2022	Biogénesis en MERRF (m.8344A>G)	Fibroblastos primarios (3 muestras). Cíbridos (3 líneas) de diferente heteroplasmia.	Rapamicina.	Incremento de la biogénesis en heteroplasmia intermedia. Incremento de PGC-1α, NRF1, TFAM y LC3. Sin cambios en muestras de mayor heteroplasmia.
Wojewoda M, Duszyński J., Szczepanowska J. y col. NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation. Int J Biochem Cell Biol. (45)	2011	Biogénesis en NARP (m.8993T>G)	Cíbridos.	Selenita.	Incremento de biogénesis. Incremento de expresión de NRF1 y acumulación de NRF2.
Iyer S. y col. Mitochondrial gene therapy improves respiration, biogenesis, and transcription in G11778A leber's hereditary optic neuropathy and T8993G leigh's syndrome cells. Hum Gene Ther. (49)	2012	Biogénesis en MILS (m.8993T>G)	Fibroblastos primarios (1 muestra).	ADNmt de donante sano y TFAM recombinante humano (ADNmt+TFAMrh)	Incremento de biogénesis a los 14 y 21 días. Incremento de PGC-1α, TFAM, TFAMβ1, de la masa mitocondrial y de proteínas de la cadena respiratoria.
Iyer S. y col. Mitochondrial gene therapy improves respiration, biogenesis, and transcription in G11778A leber's hereditary optic neuropathy and T8993G leigh's syndrome cells. Hum Gene Ther. (49)	2012	Biogénesis en LHON (m.11778G>A)	Cíbridos.	ADNmt de donante sano y TFAM recombinante humano (ADNmt+TFAMrh)	Incremento de biogénesis a los 21 días. Incremento de NRF1 y TFAMβ1. PGC-1α sin cambios.
Pisano A. y col. Targeting estrogen receptor β as preventive therapeutic strategy for Leber's hereditary optic neuropathy. Hum Mol Genet. (55)	2015	Biogénesis en LHON (m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C)	Cíbridos.	Estrógenos.	Incremento de biogénesis en portadores de LHON. Incremento de Sirt1, TFAM, NRF1 y PGC-1α.
Chang JC. y col. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. Sci Rep. (33)	2017	Fusión y fisión en MELAS (m.3243A>G)	Cíbridos.	Transplante mitocondrial con Pep-1.	Disminución de fisión. Mayor proporción de mitocondrias tubulares, menor fragmentación. Disminución de Drp1. Incremento de fusión. Incremento de OPA1 y MFN2.
Chang JC. y col. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. NeuroSignals. (42)	2013	Fusión y fisión en MERRF (m.8344A>G)	Cíbridos.	Transplante mitocondrial con Pep-1.	Disminución de fisión. Mayor proporción de mitocondrias tubulares, menor fragmentación. Disminución de Fis1 y Drp1. Mantenimiento de fusión por OPA1. Disminución de MFN2.
Chang JC. y col. Treatment of human cells derived from MERRF syndrome by peptide-mediated mitochondrial delivery. Cytotherapy. (44)	2013	Fusión y fisión en MERRF (m.8344A>G)	Fibroblastos primarios.	Transplante mitocondrial con Pep-1.	Disminución de fisión a las 72h. Mantenido durante 21 días.
Peng TI, Hsiao CY., Lai YK. y col. mtDNA T8993G mutation-induced mitochondrial complex v inhibition augments cardiolipin-dependent alterations in mitochondrial dynamics during oxidative, Ca 2+, and lipid insults in NARP cybrids: A potential therapeutic target for melatonin. J Pineal Res; Long-term Ab exposure augments mCa2+-independent mROS-mediated depletion of cardiolipin for the shift of a lethal transient mitochondrial permeability transition to its permanent mode in NARP cybrids: A protective targeting of melatonin. J Pineal Res. 2013 (46,47)	2012-2013	Fusión y fisión en NARP (m.8993T>G)	Cíbridos de heteroplasmia del 98% con clínica compatible con NARP.	Melatonina.	Disminución de fisión. Mejor movimiento mitocondrial.

Anexo 3. Ensayos clínicos

Ensayo clínico	Sustancia modificadora con potencial terapéutico	Enfermedad mitocondrial	Resultados y conclusiones
NCT00887562. (28)	Idebenona	MELAS	No beneficio clínico. Buena tolerancia.
Steriade C. y col. Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) may respond to adjunctive ketogenic diet. <i>Pediatr Neurol.</i> (35) NCT01252979. (34)	Dieta cetogénica	MELAS	Mejoría clínica, sin cambios en la heteroplasmia.
Información obtenida de: Hirano M, Emmanuele V, Quinzii CM. Emerging Therapies for Mitochondrial Diseases. (28)	Sirt1, bezafibrato, resveratrol, ácido retinoico y ejercicio aeróbico	MELAS	Sirt1, ácido retinoico y ejercicio aeróbico: mejoría clínica.
Zhang J. y col. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. <i>Reprod Biomed Online.</i> (50)	Transferencia de huso materno	MILS	Curación completa al nacimiento.
Información obtenida de: Hirano M, Emmanuele V, Quinzii CM. Emerging Therapies for Mitochondrial Diseases. (28)	Análogos de vitamina D	MILS	Sin mayor evidencia clínica.
NCT01721733. (28)	EPI-743	MILS	No publicados.
NCT00747487. (28)	Idebenona	LHON	Mejoría clínica en el 30,2% de los pacientes.
Yu-Wai-Man P. y col. Long-term efficacy and safety of idebenone in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) in the subacute/dynamic phase: Results from the prospective, natural history-controlled LEROS study. <i>Acta Ophthalmol.</i> (57)	Idebenona	LHON	Mejoría en la agudeza visual.