

ARTÍCULO DE REVISIÓN

La mitocondria y el corazón

José Marín-García y Michael J. Goldenthal

The Molecular Cardiology and Neuromuscular Institute.
Highland Park, NJ. EE.UU.

Para su correcto funcionamiento, el corazón depende estrechamente de la energía oxidativa generada en las mitocondrias, principalmente a partir de la betaoxidación de los ácidos grasos, de la cadena respiratoria de electrones y de la fosforilación oxidativa. Los defectos en la estructura y función mitocondriales se asocian a enfermedades cardiovasculares, como las miocardiopatías hipertrófica y dilatada, defectos en la conducción cardíaca y muerte súbita, miocardiopatías isquémicas y alcohólicas y miocarditis. Aunque una parte de estas anomalías mitocondriales tiene una base genética definida (p. ej., los cambios en el ADN mitocondrial que conducen a una disfunción de la fosforilación oxidativa, o los defectos de la betaoxidación de los ácidos grasos debidos a mutaciones específicas del ADN nuclear), otras anomalías parecen deberse a agresiones cardiotoxícas o ambientales más esporádicas o a causas todavía no identificadas.

Esta revisión se centra en las anomalías de la función bioenergética mitocondrial y en los defectos del ADN mitocondrial asociados a enfermedades cardiovasculares, su significado en la patogenia cardíaca y las opciones diagnósticas y terapéuticas disponibles. También se describen de forma concisa los antecedentes relacionados con la biogénesis mitocondrial y con las vías bioenergéticas durante el crecimiento cardíaco, el desarrollo y el envejecimiento.

Palabras clave: *Mitocondria. Miocardiopatía dilatada. Miocardiopatía hipertrófica. Miocardiopatía isquémica. Cardiotoxicidad. Apoptosis. Células madre. Terapia génica.*

The Mitochondrial Organelle and the Heart

The heart is highly dependent for its function on oxidative energy generated in mitochondria, primarily by fatty acid β -oxidation, respiratory electron chain and oxidative phosphorylation. Defects in mitochondrial structure and function have been found in association with cardiovascular diseases such as dilated and hypertrophy cardiomyopathy, cardiac conduction defects and sudden death, ischemic and alcoholic cardiomyopathy, as well as myocardiitis. While a subset of these mitochondrial abnormalities have a defined genetic basis (e.g. mitochondrial DNA changes leading to oxidative phosphorylation dysfunction, fatty acid β -oxidation defects due to specific nuclear DNA mutations), other abnormalities appear to be due to a more sporadic or environmental cardiotoxic insult or have not yet been characterized.

This review focuses on abnormalities in mitochondrial bioenergetic function and mitochondrial DNA defects associated with cardiovascular diseases, their significance in cardiac pathogenesis as well as on the available diagnostic and therapeutic options. A concise background concerning mitochondrial biogenesis and bioenergetic pathways during cardiac growth, development and aging will also be provided.

Key words: *Mitochondria. Dilated cardiomyopathy. Hypertrophic cardiomyopathy. Ischemic cardiomyopathy. Cardiotoxicity. Apoptosis. Stem cells. Gene therapy.*

Full English text available at: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

Las anomalías en la función y estructura de las mitocondrias se han encontrado cada vez con mayor frecuencia asociadas a enfermedades cardiovasculares,

como la miocardiopatía dilatada e hipertrófica, defectos en la conducción cardíaca y muerte súbita, miocardiopatía isquémica y alcohólica y miocarditis. Algunas anomalías mitocondriales pueden tener una base genética (p. ej., los cambios en el ADN mitocondrial [ADNmt], que producen una disfunción de la fosforilación oxidativa, o los defectos en la oxidación de los ácidos grasos debidos a mutaciones específicas del ADN nuclear), mientras que otras de estas anomalías parecen ser debidas a agresiones cardiotoxícas más esporádicas o ambientales, o a causas todavía no identificadas.

Correspondencia: Dr. J. Marín-García.
The Molecular Cardiology and Neuromuscular Institute.
75 Raritan Ave. Highland Park, NJ 08904-EE.UU.
Correo electrónico: tmci@att.net

Recibido el 22 de julio de 2002.
Aceptado para su publicación el 25 de julio de 2002.

Para comprender mejor el papel que desempeñan las mitocondrias en la enfermedad cardiovascular, vamos a presentar un resumen de los antecedentes sobre la biogénesis y la función de las mitocondrias cardíacas durante el crecimiento normal, el desarrollo y el envejecimiento. En este contexto, estudiaremos la interacción y caracterización de las mitocondrias/anomalías mitocondriales en las enfermedades cardíacas, su diagnóstico y las opciones terapéuticas disponibles. Aunque las aberraciones en la función bioenergética de las mitocondrias están frecuentemente relacionadas con la disfunción cardíaca, los defectos específicos que causan la disfunción bioenergética a menudo residen en vías metabólicas no bioenergéticas, por ejemplo, en las vías de señalización entre las mitocondrias y el núcleo, o en el conjunto de la biogénesis mitocondrial y/o las vías de degradación. La comprensión de estas vías y el impacto que tienen los defectos mitocondriales en las enfermedades cardíacas es importante para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de las afecciones cardíacas de causa mitocondrial.

LAS MITOCONDRIAS Y EL CORAZÓN NORMAL

Bioenergética mitocondrial

Las mitocondrias son muy abundantes en el corazón, donde constituyen un 20-40% del volumen celular, por ser un tejido de gran demanda energética. La producción energética mitocondrial depende de facto-

res genéticos codificados por el núcleo y por el ADNmt, que modulan la función mitocondrial normal, incluyendo la actividad enzimática y la disponibilidad de cofactores, y de factores ambientales como la disponibilidad de combustibles (p. ej., azúcares, grasas y proteínas) y oxígeno. Diversas vías bioenergéticas interaccionan contribuyendo al metabolismo energético mitocondrial (que se exponen en la fig. 1), como la oxidación del piruvato, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la betaoxidación mitocondrial de los ácidos grasos y la vía final común de la fosforilación oxidativa que genera el 80-90% del ATP celular. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo a partir de complejos de proteínas localizados en la membrana mitocondrial interna, que incluyen los complejos I-IV de la cadena respiratoria de transporte de electrones, la ATP sintasa (complejo V) y la translocasa de los nucleótidos de adenina (ANT). Los ácidos grasos son el principal sustrato energético para la producción de ATP en el músculo cardíaco a partir de la fosforilación oxidativa. Los ácidos grasos deben ser transportados de forma efectiva al interior del cardiomiocito primero, y luego al interior de la mitocondria para poder ser utilizados en la producción bioenergética a través de la betaoxidación mitocondrial, y este proceso de transporte requiere diversas proteínas que forman parte del transportador de carnitina (la aciltransferasa de carnitina y dos palmitoiltransferasas de carnitina, así como la carnitina). La betaoxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los hidratos de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos genera la mayor parte del NADH y

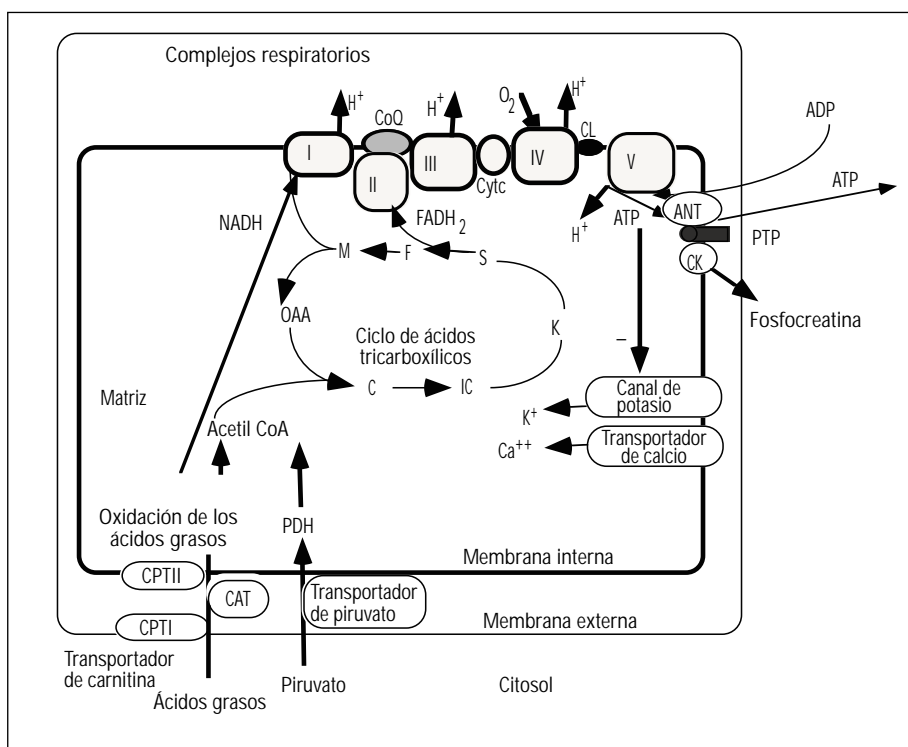
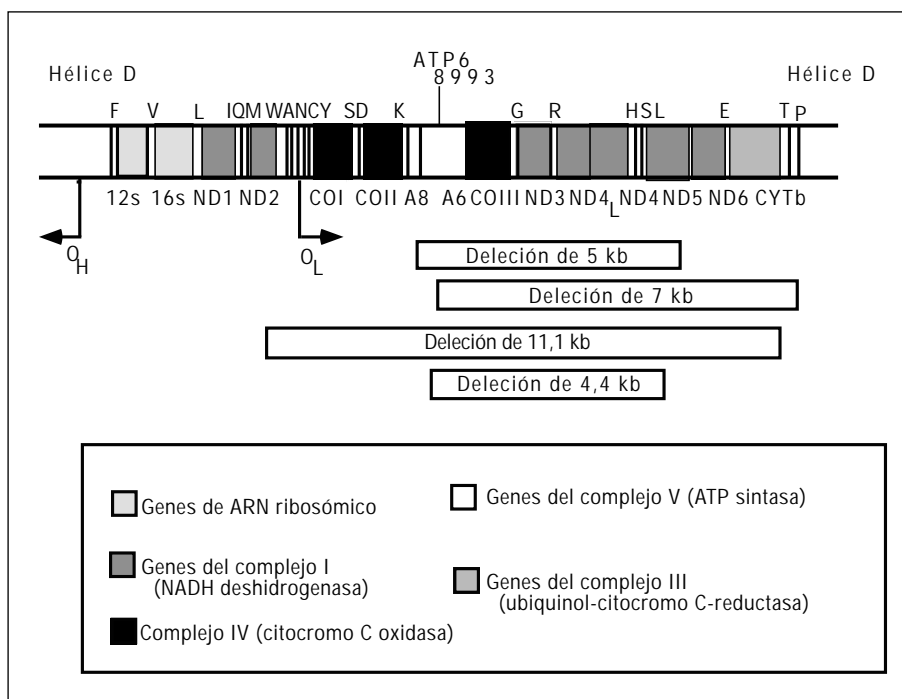


Fig. 1. Vías bioenergéticas mitocondriales. Complejos respiratorios I-V (círculos sombreados) localizados en la membrana mitocondrial interna con los componentes asociados de la transferencia electrónica, coenzima Q (CoQ) y citocromo C (cytc). También se observan las vías de la oxidación del piruvato asociadas a la matriz, la betaoxidación de los ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) asociado a la apoptosis se expone con dos de las muchas proteínas descritas: la translocasa de los nucleótidos de adenina (ANT) y la creatinasa mitocondrial (CK). La vía de transporte de carnitina para el influjo mitocondrial de ácidos grasos, el transportador de piruvato, el canal de K⁺ y el transportador de Ca²⁺ se encuentran localizados en las membranas mitocondriales.

Fig. 2. Genoma mitocondrial humano. Se observa una representación lineal de la molécula circular humana de ADNmt con 16.569 pares de bases y la localización de 22 ARNt identificados por su aminoácido relacionado y representados con un código de una letra única (F, V, L, I, Q, M, W, A, N, C, Y, S, D, K, G, R, H, S, L, E, T, P), los 2 genes de ARNr (12s y 16s) y los 13 genes codificadores de proteínas (ND1-ND6, COI-COIII, cytb, ATPasa-6 y ATPasa-8). En el recuadro inferior se especifican las funciones (es decir, los complejos respiratorios y las funciones enzimáticas asociadas) desempeñadas por las proteínas codificadas por cada uno de los 13 genes estructurales. Las localizaciones relativas de las deleciones comunes de 5 y 7,4 kb, y las nuevas deleciones de 11,1 y 4,4 kb, se exponen en las regiones encuadradas. También se describen las posiciones del origen de la replicación para la cadena pesada (OH) que se encuentra dentro de la región no codificadora de la hélice D, y del origen de la replicación de la cadena ligera (OL). La numeración se ha escogido de acuerdo con Anderson et al¹.



FADH intramitocondriales, que son la fuente directa de electrones para la cadena de transporte respiratoria. El aporte de ATP a partir de otras fuentes (p. ej., del metabolismo glucolítico) es limitado en el tejido cardíaco normal. Además de las vías bioenergéticas y de los intermediarios metabólicos, el corazón contiene también fosfatos de alta energía (p. ej., la fosfocreatina) producida por la creatincinasa mitocondrial a partir del ATP de la translocasa de nucleótidos de adenina estrechamente relacionada y de la sintasa de ATP mitocondrial.

Descripción general de la biogénesis mitocondrial

Las mitocondrias humanas contienen su propia molécula circular de ADN en forma de doble cadena, que engloba 16.569 pares de bases que codifican 13 proteínas, las cuales constituyen una parte de los 5 complejos enzimáticos involucrados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa¹. Los genes de ADNmt que codifican proteínas son transcritos en forma de ARNm específicos que se traducen en un complejo específico de síntesis ribosoma/proteína. El ADNmt también codifica parte de la maquinaria de síntesis proteica mitocondrial, como 2 ARN ribosómicos (ARNr) y 22 ARN de transferencia (ARNt), como se observa en la figura 2. En general, cada célula cardíaca contiene múltiples mitocondrias (50-100) y cada mitocondria contiene múltiples copias de ADNmt (1-10 moléculas/mitocondria). La biogénesis mitocon-

drial está aumentada durante la hipertrofia cardíaca, en el tratamiento con diversos agentes como, por ejemplo, la tirotoxina o los agentes xenobióticos, durante la estimulación eléctrica y en el ejercicio². En la actualidad, todavía no han sido completamente caracterizados los mecanismos que regulan los niveles de ADNmt específicos del corazón, ni el número global de mitocondrias³. Sin embargo, está bien establecido que las mutaciones puntuales patogénicas y las deleciones a gran escala en el genoma mitocondrial, así como la depleción generalizada del ADNmt, tienen consecuencias graves en órganos como el corazón, en donde el ATP derivado de la fosforilación oxidativa es necesario para mantener la contractilidad miocárdica.

Por el contrario, el genoma nuclear codifica la dotación completa de proteínas involucradas en la replicación y transcripción del ADNmt, los componentes proteicos de los ribosomas mitocondriales, múltiples proteínas estructurales y transportadoras de las membranas mitocondriales y el resto de las subunidades peptídicas (actualmente se calcula que son 71) de los complejos respiratorios (las que no forman parte de las 13 subunidades peptídicas codificadas por el ADNmt). Estas proteínas codificadas por el núcleo son sintetizadas en ribosomas citosólicos, dirigidas a las mitocondrias e importadas por procesos complejos. La regulación cardíaca específica de una parte de los genes nucleares que codifican proteínas de la fosforilación oxidativa puede estar mediada por una expresión génica variable (p. ej., la subunidad beta de la sintasa de ATP se expresa más en el corazón que en otros tejidos)

sensible a una gran variedad de estímulos fisiológicos y ambientales, y por la presencia de isoformas específicas de tejido para péptidos específicos (p. ej., existen isoformas específicas cardíacas para genes que codifican las subunidades VIa, VIIa y VIII de la oxidasa del citocromo C). Por tanto, puede esperarse que determinadas mutaciones en genes nucleares involucrados en la biogénesis mitocondrial contribuyan en parte a los defectos observados en las enzimas cardíacas mitocondriales y en el ADNmt, como el aumento de la incidencia de deleciones de ADNmt a gran escala, y depleción de ADNmt asociados a alteraciones cardíacas. Hasta el momento se han identificado unas pocas mutaciones en los genes nucleares que afectan a la biogénesis mitocondrial y que conducen a alteraciones cardíacas. Mientras que el genoma nuclear controla la biosíntesis mitocondrial, los genes de ADNmt presentan una tasa de mutaciones mucho más elevada, carecen de histonas, tienen un mecanismo de reparación de ADN limitado y se encuentran expuestos a especies reactivas del oxígeno generadas por la cadena de transporte electrónico. La búsqueda de mutaciones, tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial, así como las mutaciones que afectan a la intercomunicación entre los genomas, es actualmente un campo en expansión.

Cambios mitocondriales cardíacos durante el crecimiento y el desarrollo del corazón

En el corazón fetal, que funciona en un ambiente relativamente hipóxico, la glucosa y el lactato son los principales sustratos energéticos utilizados por la glucólisis y la oxidación del lactato, respectivamente. El gran aporte de glucógeno que existe en el corazón fetal y, en menor medida, en el corazón neonatal, constituye una fuente significativa de glucosa y ATP en el miocardio. La glucogenólisis es particularmente importante en situaciones de privación de oxígeno, y puede hacer que el corazón fetal sea más resistente a los efectos de la hipoxia y la isquemia que el corazón adulto⁴. Los corazones fetales tienen un menor contenido mitocondrial y, por tanto, menores grados de actividad del complejo respiratorio y del ciclo de los ácidos tricarbónicos. La oxidación de los ácidos grasos proporciona una pequeña parte de la producción global de ATP debido a que los valores de ácidos grasos circulantes son bajos, y también como consecuencia de la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos por los elevados valores de lactato presentes en el corazón fetal.

En el período posnatal se produce un cambio, de manera que los ácidos grasos se convierten en el principal sustrato energético del corazón⁵. La expresión de genes que codifican enzimas de ácidos grasos (p. ej., las enzimas e isoformas de la palmitoiltransferasa mitocondrial de carnitina [CPT]) experimenta un cambio

importante durante el período posnatal temprano que va en paralelo con el aumento de la utilización de los ácidos grasos como sustrato energético en el corazón del neonato. Los grados de actividad específicos de la CPT-II aumentan durante el primer mes de vida, de igual forma que los valores de carnitina miocárdica⁶. De las otras 2 isoformas específicas de tejido de la CPT-I, el gen *CPT-Ia* tiene una elevada expresión en el corazón fetal y declina después del nacimiento, mientras que el gen *CPT-Ib* presenta una gran expresión durante todo el desarrollo cardíaco⁷. Las proteínas específicas asociadas a la membrana mitocondrial y las proteínas citoplasmáticas involucradas en la captación de los ácidos grasos de cadena larga se encuentran reguladas de forma coordinada durante el desarrollo del tejido cardíaco⁸.

La creatinquinasa cardíaca mitocondrial (CKmt), que permanece indetectable en las fases iniciales del desarrollo fetal, presenta una activación de su expresión durante el desarrollo neonatal. El aumento de la expresión de la CKmt durante las primeras semanas después del nacimiento está acoplado a la disponibilidad de ADP en la mitocondria y a la reorganización estructural de las mitocondrias cardíacas, desde una disposición aleatoria (en el día 1) hasta la constitución de una red organizada en torno a las 3 semanas de vida posnatal⁹. La maduración del transportador de fosfocreatina está coordinada con el desarrollo de las propiedades contráctiles del miocardio¹⁰.

Es necesario establecer con claridad los valores posnatales de actividad de las enzimas mitocondriales cardíacas implicadas en la fosforilación oxidativa¹¹. Por el momento, la información disponible está limitada por el reducido número de individuos estudiados con un corazón normal, y por la variabilidad de la actividad de estas enzimas en función de la dieta, el ejercicio y los estímulos hormonales.

Una de las consecuencias derivadas de la producción bioenergética mitocondrial es la generación de radicales libres del oxígeno, como los radicales de superóxido e hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El anión superóxido se genera directamente como consecuencia de las reacciones colaterales de la cadena de transporte electrónico con el oxígeno. Los lugares principales de generación de radicales libres del oxígeno en la mitocondria son los complejos I y III de la cadena respiratoria; tanto un exceso como una disminución del flujo de electrones en estos puntos puede estimular la autooxidación de las flavinas y las quinonas (incluida la coenzima Q), produciendo radicales superóxido. Éstos pueden convertirse en H₂O₂ (en presencia de la superóxido dismutasa) que, a su vez, puede reaccionar para formar radicales de hidroxilo. Normalmente, estos subproductos tóxicos con un gran poder oxidante capaz de dañar la célula son neutralizados por enzimas antioxidantes, algunos de los cuales están localizados en las mitocondrias, por ejem-

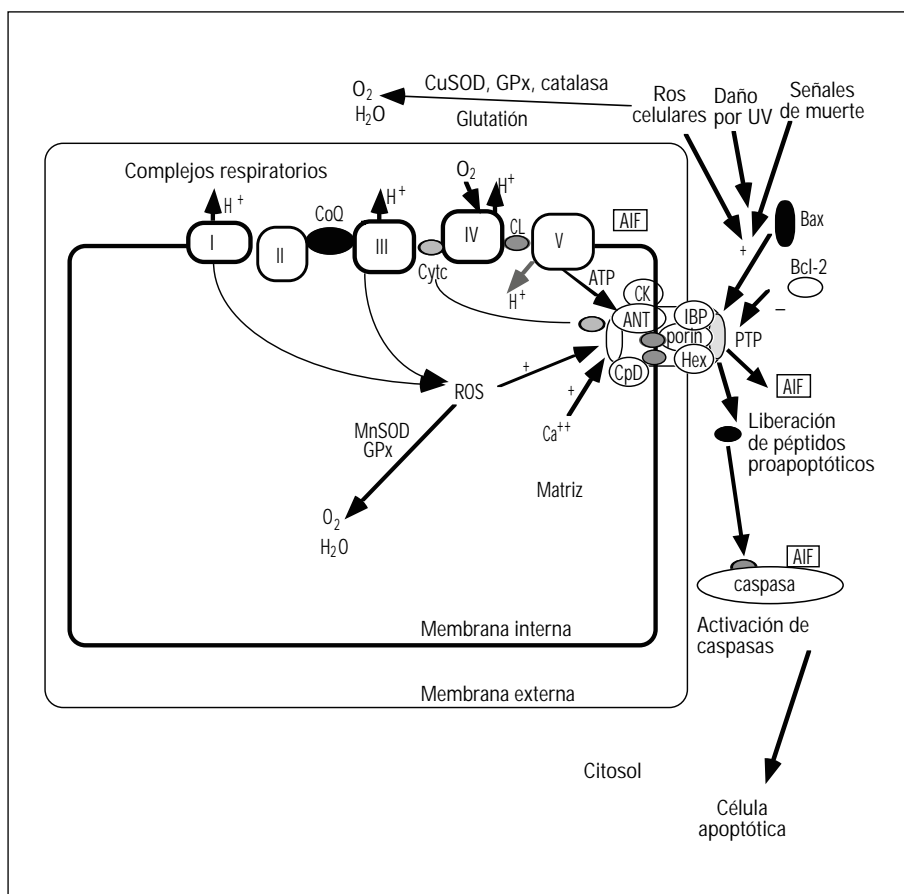


Fig. 3. Vía mitocondrial de la apoptosis. Las señales celulares del tipo de generación de radicales libres del oxígeno, o daño del ADN inducido por UV, y una variedad de «señales de muerte», desencadenan la vía apoptótica a través de la modulación de la unión de las proteínas proapoptóticas (como la BAX) al PTP, provocando su apertura. Como se observa, los valores elevados de calcio mitocondrial, así como la producción excesiva de radicales libres del oxígeno (generados en los complejos respiratorios I y III) también promueven la apertura del PTP. Este fenómeno se continúa con la liberación de citocromo C y del factor inductor de apoptosis (AIF) desde la mitocondria al citosol, con la consiguiente activación de las caspasas que inician la autodigestión celular y la fragmentación del ADN nuclear, provocando la muerte celular apoptótica. La asociación de BAX a la mitocondria se previene por la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl. La neutralización de los radicales libres del oxígeno ocurre en los 2 lugares intramitocondriales por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y glutatión peroxidasa (GPx), y en el citosol por la CuSOD, GPx y catalasa. También se representan las principales proteínas de que consta el PTP, en los lugares de unión de las membranas mitocondriales in-

terna y externa, como la hexocinasa (HK), la translocasa de los nucleótidos de adenina (ANT), la creatinincinasa (CK), la ciclofilina D (CpD), la porina y el receptor de benzodiazepinas (IBP), así como el fosfolípido de la membrana interna cardiolipina (CL).

plo, la Mn-superóxido dismutasa (MnSOD) y la glutatión peroxidasa (fig. 3), y otros son citosólicos, por ejemplo, la Cu-superóxido dismutasa y catalasa, o son eliminados por el glutatión. El aumento de la generación de radicales libres del oxígeno como consecuencia de la isquemia/reperfusión miocárdicas, la inflamación, el mal funcionamiento de las defensas antioxidantes y el envejecimiento pueden causar profundos efectos en las células cardíacas, como un aumento de la peroxidación lipídica que afecta principalmente a los fosfolípidos y proteínas de la membrana. El anión superóxido es particularmente nocivo para la mitad Fe-S de las enzimas (p. ej., el complejo I, la aconitasa y la succinato deshidrogenasa¹²). El daño oxidativo también ocurre en los ácidos nucleicos (sobre todo el ADNmt) e incluye la inducción de roturas de la cadena, una alta incidencia de modificación de bases (formación de 8-oxoguanosina) y subsiguientes mutaciones puntuales y deleciones. Las mitocondrias, por ser el principal lugar de generación de radicales libres del oxígeno, son la diana crítica de su efecto nocivo; la localización de la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria hace que a menudo resulte dañada, lo que a su vez produce un aumento

de la generación de radicales libres del oxígeno que conduce a un círculo vicioso de deterioro de la función mitocondrial. Además del bien conocido papel de los radicales libres del oxígeno en la inducción de daño celular, evidencias recientes han aportado una visión alternativa en relación con la generación de radicales libres del oxígeno y el estrés oxidativo y su papel como un mecanismo importante de regulación¹³. Las especies oxidativas (como el H₂O₂) pueden actuar también como potentes mecanismos de señalización emitidos por las mitocondrias a otros sitios de la célula, desencadenando un despliegue rápido y reversible de cascadas intracelulares con diferentes objetivos fisiológicos en los cardiomiocitos (p. ej., apoptosis, necrosis, cardioprotección o proliferación celular).

Cambios mitocondriales cardíacos durante el envejecimiento y la senescencia

Entre los múltiples cambios metabólicos que tienen lugar en el músculo cardíaco en la edad avanzada se encuentran las modificaciones en la composición de ácidos grasos y lípidos de la membrana como, por ejemplo, un aumento de los valores de ácidos grasos

saturados¹⁴ y una reducción de las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados¹⁵ y de cardiolipina¹⁶. La cardiolipina, que es el fosfolípido insaturado celular más abundante, es el principal componente de la membrana mitocondrial interna, y desempeña un papel integral en la función de transporte de la membrana mitocondrial cardíaca, en su fluidez y estabilidad, además de facilitar la función de las enzimas bioenergéticas que se encuentran en la membrana. Se ha descrito una importante reducción en los valores de carnitina y acetilcarnitina en individuos ancianos¹⁷.

Con el envejecimiento también se produce un aumento de la tasa de deleciones a gran escala y de mutaciones puntuales del ADNmt cardíaco, y una reducción de las actividades enzimáticas mitocondriales¹⁸⁻²⁰. Se ha sugerido que estas anomalías mitocondriales pueden ser debidas en gran parte al aumento de la producción mitocondrial de radicales libres del oxígeno asociado al envejecimiento^{12,21}. Sin embargo, el efecto del envejecimiento sobre la función de las enzimas implicadas en la fosforilación oxidativa cardíaca ha sido revaluado recientemente y se ha cuestionado el grado y el papel que desempeña el declive de la función bioenergética mitocondrial^{11,22}. Las discrepancias entre los diferentes hallazgos pueden estar basadas en las distintas metodologías empleadas para medir la actividad mitocondrial. Si consideramos las mitocondrias cardíacas que forman parte de distintas poblaciones (lo que requiere una separación física de las poblaciones de estas organelas *in vitro*), las mitocondrias interfibrilares localizadas entre las miofibrillas y las mitocondrias subsarcolemales, localizadas debajo de la membrana plasmática, las reducciones asociadas a la edad de las actividades de los complejos enzimáticos respiratorios III y IV se encuentran en las mitocondrias interfibrilares y no en las mitocondrias subsarcolemales²³. Una gran cantidad de cambios/parámetros fisiológicos puede tener influencia sobre las actividades enzimáticas mitocondriales. Así, por ejemplo, el grado de ejercicio y condicionamiento, así como el aumento del estrés isquémico, pueden ejercer un gran impacto sobre la actividad de las enzimas mitocondriales²⁴.

DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

ADNmt y enfermedad cardiovascular

En las miocardiopatías se han documentado defectos discretos de la fosforilación oxidativa mitocondrial o deficiencias en la cadena respiratoria. Tanto la miocardiopatía dilatada como la hipertrófica se encuentran acompañadas frecuentemente por niveles defectuosos de las actividades enzimáticas de la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria²⁵⁻²⁸.

Las miocardiopatías (sobre todo la hipertrófica) se asocian a menudo a mutaciones puntuales patogénicas

específicas del ADNmt²⁹⁻³⁵ (en la tabla 1 se presenta un listado actualizado). Las mutaciones patogénicas del ADNmt se encuentran localizadas generalmente en nucleótidos altamente conservados a lo largo de la evolución, y a menudo tienen una presentación heteroplásmica (una población mixta de genomas de ADNmt mutante y silvestre), aunque evidencias recientes indican que las mutaciones patogénicas de ADNmt pueden ser también homoplásmicas³⁶. Estas mutaciones se suelen acompañar por niveles reducidos de la actividad de enzimas respiratorias específicas.

Se han identificado mutaciones patogénicas de ADNmt en varios genes de ARNt mitocondriales que están asociadas a miocardiopatías. Algunos genes específicos de ARNt, como el *LEU*, el *ILE* y el *LYS*, parecen ser zonas calientes de mutación en pacientes con miocardiopatías. El lugar donde se producen las mutaciones dentro de la estructura en hoja de trébol del ARNt genérico puede tener un gran impacto sobre la severidad del fenotipo y, posiblemente, sobre su especificidad tisular³⁷. En general, las mutaciones patogénicas de ARNt mitocondrial afectan negativamente a la síntesis proteica de las mitocondrias y la actividad de múltiples enzimas respiratorias. Se ha descrito también una mutación de ADNmt asociada a miocardiopatía en el ARNr³⁸. Asimismo, otras mutaciones puntuales de ADNmt que se encuentran en otras localizaciones del ADNmt (algunas en genes de ARNt, otras en genes del ADNmt codificadores de proteínas), que no están presentes en individuos normales se han asociado a pacientes con miocardiopatía dilatada. Estas mutaciones potencialmente patogénicas son heteroplásmicas, y se encuentran en secuencias altamente conservadas³⁹⁻⁴¹. Además, se han descrito mutaciones con pérdida de sentido en el citocromo b en un amplio espectro de miocardiopatías, entre las que se incluyen la miocardiopatía dilatada, la hipertrófica, la histiocitoide y la miocardiopatía posparto (tabla 1). Es importante remarcar que el citocromo b, la única subunidad del complejo III codificada por la mitocondria, también representa una zona caliente de mutaciones en pacientes con miocardiopatía.

Las enfermedades multisistémicas mitocondriales con afección cardíaca se describen asociadas a un espectro creciente de manifestaciones clínicas. Algunas de ellas se heredan por vía materna (debido a mutación del ADNmt) y pueden presentarse con un fenotipo cardíaco variable (hipertrofia ventricular, cardiomegalia y disritmias) junto con síndromes neurológicos como el de Leigh (retraso en el desarrollo, debilidad muscular, oftalmoplejía y necrosis de los ganglios basales), el de MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios de tipo ictus) y el de MERRF (epilepsia mioclónica y desorganización de las fibras rojas)⁴²⁻⁴⁴. Las mutaciones específicas de ADNmt, encontradas en asociación con miocardiopatía primaria, también pueden estar presentes en pacien-

TABLA 1. Mutaciones puntuales específicas de ADNmt en la enfermedad cardíaca

| Gen | Lugar | Cambio de aminoácido | Fenotipo cardíaco | REF ¹ |
|----------------------------------|--------------|----------------------|---|------------------|
| Mutaciones de ARnt | | | | |
| <i>leu</i> | 3243 A -> G | | HCM | 42 |
| <i>leu</i> | 3260 A -> G | | Taquicardia HCM-inicio en edad adulta | 34 |
| <i>leu</i> | 3303 C -> T | | HCM infantil fatal | 30 |
| <i>leu</i> | 3254 C -> G | | HCM | 145 |
| <i>leu</i> | 12997 T -> C | | DCM | 146 |
| <i>ile</i> | 4300 A -> G | | HCM-inicio en edad adulta | 35 |
| <i>ile</i> | 4317 A -> G | | HCM-DCM infantil fatal | 147 |
| <i>ile</i> | 4320 C -> T | | HCM infantil fatal | 31 |
| <i>ile</i> | 4269 A -> G | | CF a los 18 años, inicio en edad adulta | 29 |
| <i>ile</i> | 4 295 A -> G | | HCM | 148 |
| <i>ile</i> | 4284 G -> A | | CM | 149 |
| <i>lys</i> | 8363 G -> A | | HCM | 32 |
| <i>lys</i> | 8334 A -> G | | HCM | 44 |
| <i>lys</i> | 8269 A -> G | | HCM | 150 |
| <i>lys</i> | 8348 A -> G | | HCM | 151 |
| <i>gly</i> | 9997 T -> C | | Arritmia ventricular HCM | 33 |
| <i>cys</i> | 5814 A -> G | | HCM | 152 |
| <i>val</i> | 1624 C -> T | | HCM | 36 |
| <i>ala</i> | 5587 T -> C | | DCM | 40 |
| <i>arg</i> | 10415 T -> C | | DCM | 40 |
| <i>arg</i> | 10424 T -> C | | DCM fatal | 41 |
| Mutaciones de ARNr | | | | |
| <i>12 s</i> | 1555 A -> G | | CM | 38 |
| <i>16 s</i> | 3093 C -> G | | CM | 153 |
| Mutaciones génicas estructurales | | | | |
| <i>Cytb</i> | 14927 A -> G | Thr-> Ala | HCM | 154,56 |
| <i>Cytb</i> | 15236 A -> G | Ile-> Val | DCM | 56 |
| <i>Cytb</i> | 15508 C -> G | Asp-> Glu | DCM | 41 |
| <i>Cytb</i> | 15509 A -> C | Asn-> His | CM posparto fatal | 155 |
| <i>Cytb</i> | 15243 G -> A | | HCM | 157 |
| <i>Cytb</i> | 15498 G -> A | Gly -> Asp | CM histiocitoide | 156 |
| <i>COI</i> | 6860 A -> C | Lys -> Asn | DCM | 40 |
| <i>COII</i> | 7923 A -> G | Tyr-> Cys | DCM | 41 |
| <i>COIII</i> | 9216 A -> G | Gln -> Gly | DCM | 41 |
| <i>ND5</i> | 14069 C -> T | Ser -> Leu | DCM | 41 |
| <i>ATPase6</i> | 8993 T -> G | Leu -> Arg | Síndrome de Leigh/HCM | 43 |

¹Ref: referencias; CM: miocardiopatía; HCM: miocardiopatía hipertrófica; DCM: miocardiopatía dilatada; CF: insuficiencia cardíaca.

tes con diversas combinaciones de fenotipos clínicos. La variabilidad entre el genotipo mitocondrial y el fenotipo puede explicarse por la implicación de cofactores genéticos o ambientales no identificados capaces de modular el efecto de las mutaciones de ADNmt. De la misma forma, determinados síndromes o fenotipos pueden estar causados por mutaciones completamente diferentes del ADN nuclear o mitocondrial. Por ejemplo, el síndrome de Leigh puede estar causado por mutaciones en la subunidad de la ATPasa-6⁴³, por mutaciones puntuales en el gen *LYS* del ARNt mitocondrial⁴⁵, por mutaciones del ADN nuclear de la piruvato deshidrogenasa⁴⁶, por mutaciones nucleares que afectan a las subunidades del complejo II⁴⁷ o por depleción del ADNmt⁴⁸. Sin embargo, todavía no se ha podido

establecer la correlación entre la afección cardíaca de la enfermedad de Leigh y los *loci* afectados (tanto nucleares como mitocondriales).

También se han asociado a alteraciones cardíacas los reagrupamientos esporádicos a gran escala del ADNmt. En el síndrome de Kearns-Sayre (KSS), las anomalías de la conducción cardíaca coexisten típicamente con deleciones somáticas a gran escala del ADNmt^{49,50}. La mayoría de las deleciones de ADNmt en el KSS es de un único tipo, no se heredan y se detectan principalmente en el músculo cardíaco y de manera más rara en la sangre. Existe un estudio que ha demostrado una prevalencia localizada de deleciones de ADNmt en tejidos del sistema de conducción cardíaco, por ejemplo, en el nodo sinoauricular y auri-

culoventricular, en comparación con el miocardio circundante⁵¹. En cambio, el fenotipo de delección múltiple de ADNmt asociado a la miocardiopatía dilatada se debe a defectos genéticos en *loci* nucleares autosómicos no identificados que pueden heredarse tanto de forma dominante como recesiva^{52,53}. Los casos de delección de ADNmt detectados en el KSS y en alteraciones autosómicas tienden a ser muy abundantes (alcanzando hasta un 95% del ADNmt total), tanto en forma de delecciones discretas de una única zona como en forma de agregados, y se detectan por la técnica del Southern blot⁵⁴. Además, aunque menos abundantes, las delecciones a gran escala de ADNmt se detectan a menudo por análisis de PCR en el tejido cardíaco de muchas miocardiopatías primarias. Este tipo de delecciones son el reflejo de un daño específico del ADNmt (presumiblemente como consecuencia de los radicales libres del oxígeno), son dependientes de la edad^{54,55} y sigue sin esclarecerse su papel en las enfermedades cardíacas.

Se ha descrito la depleción en los valores de ADNmt cardíaco en pacientes con una miocardiopatía aislada, tanto dilatada como hipertrófica⁵⁶. Además, la depleción del ADNmt cardíaco puede ser inducida específicamente por zidovudina (AZT), que inhibe tanto la polimerasa de ADN del VIH como la polimerasa gamma del ADNmt, lo que interfiere con la replicación de ADNmt. En humanos y en animales tratados con AZT^{57,58} se han encontrado valores reducidos de ADNmt cardíaco asociados a una marcada disminución de la actividad de las enzimas respiratorias y un fenotipo clínico de disfunción cardíaca. La depleción de ADNmt parece ser reversible, ya que el cese de la terapia con AZT se ha asociado a una mejoría de la función ventricular izquierda.

Defectos en proteínas mitocondriales codificadas por ADN nuclear y enfermedad cardiovascular

Las mutaciones en un amplio grupo de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales pueden causar miocardiopatías. Por ejemplo, una miocardiopatía es a menudo una consecuencia de mutaciones en proteínas transportadoras mitocondriales (p. ej., la translocasa de la carnitina-acilcarnitina) que facilitan el paso de metabolitos críticos a través de la membrana mitocondrial interna⁵⁹, y también de mutaciones en la frataxina, una proteína de transporte mitocondrial implicada en la acumulación mitocondrial de hierro que causa la ataxia de Friedreich (a menudo se presenta con miocardiopatía hipertrófica)⁶⁰. También se han implicado en algunas enfermedades de base mitocondrial, como el síndrome de Leigh, algunas mutaciones de genes nucleares que codifican factores necesarios para el ensamblaje y el funcionamiento de las múltiples subunidades que conforman los complejos enzi-

máticos respiratorios. En este sentido, las mutaciones en el gen *SCO2* que codifica una chaperona de cobre involucrada en el ensamblaje del complejo IV (COX), pueden dar lugar a una miocardiopatía⁶¹. Es interesante señalar que el fenotipo clínico en pacientes con mutaciones en *SCO2* es distinto del que se ha encontrado en otras mutaciones que afectan a otros factores del ensamblaje de COX (p. ej., el *SURF1*), que normalmente se presentan sin afección cardíaca⁶².

La miocardiopatía es la manifestación clínica primaria de diversas alteraciones hereditarias de la betaoxidación mitocondrial de los ácidos grasos⁶³. Se han descrito como causas de miocardiopatía en niños las deficiencias en la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga⁶⁴, en la 3-hidroxilacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga⁶⁵ y en la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta⁶⁶. También se han encontrado asociados a miocardiopatía los defectos en el transporte de carnitina al interior de las células, así como defectos en el mecanismo de transporte carnitina-acilcarnitina, responsable del transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria⁶⁷. Los defectos en la proteína mitocondrial trifuncional que afectan a la proteína de cadena larga L-3 hidroxilacil-CoA están asociados frecuentemente a la miocardiopatía dilatada⁶⁸. La patogenia cardíaca de estas alteraciones hereditarias que afectan a la betaoxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de la carnitina incluyen probablemente dos factores: un deficiente aporte bioenergético al corazón y la acumulación de concentraciones tóxicas de ácidos grasos con la subsiguiente disfunción cardíaca. Este tipo de alteraciones ocurre principalmente durante la infancia y a menudo se pone de manifiesto por enfermedades infecciosas o por el ayuno, en una situación en la que el corazón presenta una dependencia aumentada de la oxidación de los ácidos grasos para la obtención de energía. Muchas de las alteraciones hereditarias del metabolismo de los ácidos grasos que se han descrito con anterioridad pueden acabar en muerte súbita neonatal.

Los defectos en la conducción cardíaca y las arritmias están presentes frecuentemente en pacientes con defectos específicos en la oxidación de los ácidos grasos⁶⁹. Tanto las arritmias ventriculares como las auriculares se han asociado a deficiencias en el CPT-II, en la translocasa de la carnitina y en la proteína trifuncional. En cambio, no se han descrito arritmias cardíacas en pacientes con deficiencias en el CPT-I, en el transportador de carnitina y en el MCAD, lo que sugiere que la acumulación de metabolitos arritmogénicos (p. ej., las acilcarnitinas de cadena larga) promueve las arritmias y contribuye potencialmente a la insuficiencia cardíaca y la muerte súbita. Hace mucho tiempo que se sabe que las acilcarnitinas de cadena larga poseen propiedades de tipo detergente y pueden modificar en gran manera las proteínas y los lípidos de membrana, ejerciendo efectos tóxicos sobre las funciones

electrofisiológicas de las membranas cardíacas, como el transporte iónico y la función de las *gap junctions*. Además, la acumulación de metabolitos de ácidos grasos de cadena larga (p. ej., la acilcarnitina de cadena larga) desempeña un papel fundamental en el desarrollo de arritmias ventriculares que tienen lugar durante la isquemia miocárdica⁷⁰. La acumulación de ésteres de cadena larga potencialmente tóxicos durante la hipoxia/isquemia puede prevenirse bloqueando selectivamente la actividad del CPT-I con perhexilina o amiodarona, lo que resulta en una reducción del riesgo de anomalías electrofisiológicas de membrana y de la incidencia de arritmias letales⁷¹.

La presencia de mitocondrias anormales y de miocardiopatía dilatada aguda también se ha descrito en el síndrome de Barth, una alteración ligada al cromosoma X que se caracteriza por una neutropenia cíclica de comienzo neonatal. Las arritmias y la insuficiencia cardíaca también están frecuentemente presentes. La proteína tafazzina, responsable del síndrome de Barth⁷², está codificada por el gen *G4.5* y probablemente pertenece a una familia de aciltransferasas involucradas en la síntesis de fosfolípidos. En pacientes con mutación en el *G4.5* se produce un aumento de los valores de ácidos grasos saturados, mientras que los ácidos grasos insaturados y la cardiolipina están marcadamente reducidos^{73,74}. Una función defectuosa de la aciltransferasa puede resultar en un aumento de la saturación de los ácidos grasos, lo que perjudica la fluidez y la función de las membranas cardíacas.

Los genes que codifican importantes proteínas estructurales y del citoesqueleto han estado frecuentemente implicados en la patogenia de las miocardiopatías. Las mutaciones específicas del ADN nuclear que afectan a proteínas estructurales y contráctiles, como la actina, la desmina, el sarcoglicano y la distrofina, han sido identificadas como agentes causales en muchos casos de miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca. De la misma forma, algunos casos de miocardiopatía hipertrófica familiar son debidos a mutaciones patogénicas concretas de proteínas cardíacas implicadas en la generación de la fuerza contráctil, como la cadena pesada de la betamiosina, la troponina T, la tropomiosina y la proteína C que se une a la miosina. Es importante remarcar la relación que existe entre los defectos mitocondriales y las proteínas estructurales codificadas por el núcleo. Algunos pacientes con mutaciones específicas de la cadena pesada de la betamiosina pueden desarrollar un número anormal de mitocondrias y una marcada reducción de la función respiratoria mitocondrial^{75,76}. Se ha sugerido una interacción potencial entre estas mutaciones nucleares patogénicas y las mutaciones de ADNmt a partir de estudios que demuestran la coexistencia de mutaciones de la cadena pesada de la betamiosina y del ADNmt en pacientes con miocardiopatía hipertrófica⁷⁷. Además, la distribución intracelular de las mitocondrias puede

estar profundamente alterada en pacientes con proteínas estructurales defectuosas (p. ej., la desmina)⁷⁸, ya que tanto la posición intracelular como el movimiento de las mitocondrias están mediados por las proteínas del citoesqueleto. Las localizaciones celulares defectuosas de las mitocondrias pueden desempeñar un papel crítico en la fisiopatología cardíaca, al modificar la función bioenergética cardíaca.

Isquemia miocárdica

Cuando el suplemento de oxígeno es limitado, como ocurre durante la isquemia miocárdica, la fosforilación oxidativa y el flujo del transporte electrónico declinan, se produce una depleción rápida de las reservas de creatina fosfato, disminuye la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos y se deteriora la producción de ATP. La hidrólisis del ATP derivado de la glucólisis y la acumulación de lactato conducen a una disminución del pH intracelular y al desarrollo de acidosis intracelular, lo que ejerce un efecto inhibitorio directo sobre la función contráctil. El AMP y otros metabolitos se acumulan, y esto da lugar a la aparición de edema mitocondrial y degeneración progresiva. Además, la isquemia miocárdica produce una disminución de los valores de los complejos respiratorios IV⁷⁹ y V⁸⁰ y un aumento de las delecciones de ADNmt⁸¹. La isquemia sostenida acaba por producir depleción de ATP y muerte celular necrótica.

Paradójicamente, las mitocondrias funcionales pueden exacerbar el daño isquémico, especialmente al comienzo de la reperfusión. Durante la reperfusión se produce un aumento del influjo de ácidos grasos y un desequilibrio de la oxidación de los ácidos grasos, lo que da lugar a un exceso de acetil-CoA que satura el ciclo de los ácidos tricarbóxicos a expensas de la oxidación de glucosa y piruvato, y que al final resulta inhibido. El aumento de la fosforilación oxidativa causa un incremento de la acumulación de radicales libres del oxígeno con un aumento de la peroxidación lipídica; esto produce una disminución de la concentración de cardiolipina en la membrana interna, con el subsiguiente efecto sobre la actividad del complejo IV. La actividad normal respiratoria puede ser restablecida con la adición de cardiolipina exógena⁸². En la actualidad, existe evidencia de que el daño por reperfusión implica la existencia de muerte celular apoptótica, mientras que el daño isquémico consiste principalmente en muerte celular necrótica⁸³.

El estrés hipertérmico puede proteger contra la disfunción miocárdica secundaria al daño por isquemia-reperfusión⁸⁴. En los corazones sometidos a estrés por calor se alcanzan valores superiores de actividad de los complejos I-IV, de la expresión de las proteínas *heat shock* (p. ej., la Hsp32, 60 y 72) y mejora la función ventricular. En comparación con el miocardio reperfundido no tratado, en el que las mitocondrias estaban gra-

vemente dañadas, se ha descrito que el miocardio reperfundido sometido a estrés por calor presenta una actividad superior de los complejos respiratorios y un mayor número de mitocondrias con membranas intactas y crestas paralelas. Estas observaciones han proporcionado evidencias de que el aumento de la capacidad energética mitocondrial mediado por estrés hipertérmico está asociado a un aumento de la tolerancia al daño por isquemia-reperusión.

Existe un mecanismo cardioprotector de autodefensa en el corazón isquémico que implica la apertura de unos canales mitocondriales de K^+ sensibles al ATP. Este efecto cardioprotector puede estar mediado por una mejoría de la producción de ATP, por una disminución de la sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial y por un aumento de la generación de radicales libres del oxígeno, que dan lugar a una activación de la proteincinasa C. Se dispone de varios fármacos que funcionan activando específicamente la apertura de los canales de K^+ mitocondriales como, por ejemplo, el diazóxido. Existen evidencias en humanos que demuestran que los canales de K^+ mitocondriales son los efectores del preconditionamiento⁸⁵.

Apoptosis y muerte celular en la enfermedad cardíaca

Existen evidencias que demuestran que la apoptosis (muerte celular programada), que conduce a la pérdida de células cardíacas y al remodelamiento del ventrículo izquierdo, constituye un hecho significativo de la insuficiencia cardíaca en pacientes con miocardiopatía dilatada y en modelos animales. Cada vez existe mayor acuerdo en el reconocimiento de que las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en las fases tempranas de la apoptosis.

En la vía mitocondrial de la apoptosis, la liberación desde la mitocondria al citosol de proteínas proapoptóticas, citocromo C y factor inductor de apoptosis (AIF) es un hecho crucial en la puesta en marcha de la subsiguiente cascada de cambios citoplasmáticos, incluida la activación de las cisteína-aspartato proteasas (caspasas) y las endonucleasas nucleares que desencadenan la muerte celular^{86,87}. La liberación de péptidos mitocondriales se encuentra facilitada por la apertura de un megacanal, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), un complejo multiproteico dinámico localizado en los puntos de contacto entre la membrana interna y la membrana externa, que se activa por la unión de proteínas proapoptóticas como la Bax (fig. 3). La proteína antiapoptótica Bcl2 (una proteína mitocondrial) previene la asociación de Bax con el PTP e interfiere con la liberación de péptidos proapoptóticos desde la mitocondria (p. ej., el citocromo C y el AIF). Evidencias recientes han establecido que la apertura del PTP es un eslabón temprano crítico de la apoptosis que precede a la cascada de caspasas. La

apertura del PTP está promovida por el influjo de Ca^{2+} hacia la mitocondria y por la producción excesiva de radicales libres del oxígeno en la mitocondria⁸⁸. Existen otros segundos mensajeros proapoptóticos, como los prooxidantes y el óxido nítrico, que también inducen la apertura del PTP. Además de su implicación en la muerte celular apoptótica, la apertura del PTP se ha relacionado con la muerte celular clínica de cardiomiocitos inducida por las excitotoxinas (como el glutamato), así como en la muerte celular necrótica que tiene lugar durante la anoxia y la isquemia⁸⁹. Estas observaciones apoyan la idea, cada vez más aceptada, de que los cambios mitocondriales constituyen un paso fundamental en el desarrollo de los dos tipos de muerte celular, la apoptosis y la necrosis.

La apertura del PTP produce una disipación del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)⁸⁸ y una despolarización de la membrana mitocondrial. Los cambios en el potencial de membrana pueden ser una causa o una consecuencia de la apertura de PTP, ya que se acompañan de un influjo masivo de protones. La disminución de la actividad de las enzimas respiratorias mitocondriales (particularmente del complejo III) y de la fosforilación oxidativa pueden contribuir al comienzo de la apoptosis. El PTP representa un lugar crítico donde la fosforilación oxidativa puede integrarse con los estímulos de la señalización celular y las respuestas. La disminución del contenido de ATP promueve la transferencia de la proteína Bax al PTP. Sin embargo, existe un equilibrio dinámico continuo entre los factores proapoptóticos Bax y los factores antiapoptóticos Bcl, que modulan los acontecimientos que tienen lugar en el PTP. Debido a que la apoptosis es un proceso que requiere energía, el bloqueo de la fosforilación oxidativa que causa la apertura del PTP o que resulta como consecuencia de la misma no es completo. Es importante señalar que la desenergización mitocondrial completa no favorece el desarrollo de apoptosis, sino más bien el de necrosis. No debería sorprendernos que los acontecimientos iniciales de la apoptosis incluyan la modulación de los valores de ATP, dada la estrecha proximidad que hay entre el PTP y los complejos respiratorios en la membrana mitocondrial interna, así como su implicación en la pérdida de citocromo C, una molécula crítica de la cadena de transporte electrónico. En el lugar del PTP está presente también un gran número de moléculas mitocondriales asociadas a energía, como el intercambiador de nucleótidos de adenina, la enzima glucolítica hexocinasa, el canal de aniones dependiente de voltaje de la membrana externa (VDAC o porina), la creatinasa mitocondrial y la cardiollipina.

Mitocondria y cardiotoxicidad

Cada vez hay mayor número de fármacos/toxinas con efectos deletéreos conocidos sobre la función mi-

tocondrial cardíaca. El lector puede consultar dos excelentes revisiones generales sobre las mitocondrias como dianas farmacológicas^{90,91}. Nosotros vamos a limitar nuestra discusión a dos toxinas relativamente bien caracterizadas con efectos cardíacos asociados a las mitocondrias.

Hace mucho tiempo que se sabe que los fármacos anticancerosos de tipo glucósido antraquinona (p. ej., la adriamicina-doxorrubicina) afectan a la función miocárdica. En la miocardiopatía inducida por doxorrubicina se producen cambios moleculares y bioquímicos en el miocardio que se acompañan de sorprendentes cambios en la estructura y función mitocondriales. Los cambios mitocondriales incluyen un gran aumento de la producción de radicales libres debido a una actividad anormal de la deshidrogenasa de NADH; un incremento del daño del ADNmt, del tipo de acumulación de 8 OHdG y deleciones a gran escala de ADNmt; alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ mitocondrial; cambios en la actividad de las enzimas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos (p. ej., el CPTI) y aumento de la actividad de la translocasa de nucleótidos de adenina⁹²⁻⁹⁶. La mayor parte de los efectos bioquímicos deletéreos de la doxorrubicina puede ser contrarrestada con la suplementación de alguno de los siguientes factores: MnSOD, carnitina, adenosina o metalotioneína, capaces de aportar grados variables de cardioprotección⁹⁷⁻⁹⁹. También existe evidencia de que la doxorrubicina actúa sobre el PTP mitocondrial, modulando el flujo de Ca²⁺, la generación de radicales libres del oxígeno, la actividad de la translocasa de nucleótidos de adenina, el transporte y metabolismo de carnitina y la integridad del ADNmt. La posible implicación de la doxorrubicina en la inducción de la vía apoptótica en el corazón es consistente con la estimulación que ejerce sobre la liberación de citocromo C en cardiomiocitos¹⁰⁰. En este sentido, vale la pena señalar que los pacientes con una miocarditis viral también presentan una disminución del contenido y actividad de la translocasa de nucleótidos de adenina¹⁰¹, lo que sugiere que el PTP mitocondrial puede constituir una diana común de actuación de agentes cardíacos tóxicos o infecciosos. Además, existen evidencias que demuestran que el PTP de la vía apoptótica puede ser el lugar de acción de agentes tóxicos (como el salicilato y el valproato) implicados en la fisiopatología del síndrome de Reye⁸⁸.

La ingestión de cantidades moderadas de alcohol puede ejercer efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular¹⁰²; esto puede manifestarse por un aumento moderado en la bioenergética mitocondrial del miocardio (p. ej., un incremento de la actividad de las enzimas respiratorias y del ADNmt), lo que sugiere un incremento de la biogénesis mitocondrial específica del corazón¹⁰³. Por el contrario, se ha observado que el consumo de grandes dosis de alcohol ejerce efectos deletéreos sobre el tejido miocárdico que, en las sub-

células, consisten en anomalías de la estructura y función mitocondriales y en depleción del ADNmt¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Modelos animales de enfermedades cardiovasculares asociadas a las mitocondrias

La ablación génica en el ratón (es decir, la generación de mutaciones sin sentido o de genes *knock-out*) dirigida a un espectro relativamente amplio de genes que codifican proteínas mitocondriales resulta en una disfunción cardíaca grave. Estos genes incluyen el ANT¹⁰⁷, el MnSOD^{108,109}, los factores involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, como el PPAR, las subunidades MTP^{110,111}, el factor de transcripción mitocondrial TFAMt (también llamado TFAM)¹¹² y la frataxina, la proteína responsable de la ataxia de Friedreich¹¹³. Además de permitir el examen de los efectos específicos sobre la función cardíaca que se derivan de la eliminación de genes implicados en la función mitocondrial, los ratones *knock-out* específicos de tejido con una miocardiopatía mitocondrial se han utilizado para identificar los genes modificados con potencial valor terapéutico¹¹⁴. Hasta el momento disponemos de una información limitada sobre el impacto que tiene en el miocardio la eliminación de genes nucleares involucrados directamente en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Un estudio reciente ha descrito la existencia de disfunción cardíaca en ratones que carecen de la subunidad VIa-H de la citocromo C oxidasa, la isoforma cardíaca¹¹⁵. Hay poca información disponible relacionada con la ablación génica de ADNmt, ya que la generación de *knock-out* para genes de ADNmt constituye un reto tecnológico que requiere una aproximación novedosa para la creación de animales transgénicos mitocondriales; algunos de estos enfoques se discuten más adelante.

Un avance reciente en la construcción de animales transgénicos mitocondriales ha sido la creación de una cepa de ratones que contiene valores altos de una deleción única de ADNmt a gran escala (4.696 pb)¹¹⁶. Las mitocondrias miocárdicas de ratones con valores elevados (> 85%) de deleción en el ADNmt4696 tenían una tendencia a desarrollar crestas anormales y una marcada deficiencia en la COX¹¹⁷; no obstante, y a diferencia de los pacientes con KSS y su deleción análoga en el ADNmt, los ratones con una alta proporción de deleción en el ADNmt fallecían por enfermedad renal. Estudios posteriores realizados con ratones que albergaban la deleción ADNmt4696 han revelado también que las células individuales (de la mayoría de tejidos) contenían uno de los 2 tipos de mitocondrias, las mutantes o las normales; ambos tipos de mitocondrias no coexistían en la misma célula¹¹⁸. Se ha propuesto que la existencia de complementación intermitocondrial imposibilita la expresión del fenotipo de deleción en presencia del ADNmt silvestre de longitud

completa. Si el modelo murino es relevante en relación con las enfermedades humanas de delecciones de ADNmt, este hallazgo puede tener importantes implicaciones en el potencial tratamiento del síndrome KSS basado en delección utilizando ADNmt de cadena completa.

El uso de la sobreexpresión específica en el corazón de determinados genes también ha tenido un gran valor informativo en nuestra comprensión del papel de las mitocondrias en la disfunción cardíaca. Esta técnica consiste en fusionar una región reguladora de un gen específico del corazón con un gen candidato de interés y su posterior introducción en el ratón transgénico, que expresará el gen candidato específicamente en las células musculares cardíacas. La sobreexpresión de un gran número de genes que participan en la expresión y control del metabolismo energético cardíaco (p. ej., el *PGC1*, el *PPAR*, el *TNF-alfa*) es capaz de producir una miocardiopatía con disfunción cardíaca grave y cambios pronunciados en la estructura y función mitocondriales^{119,120}.

El desarrollo de modelos animales con una disfunción cardíaca basada en alteraciones mitocondriales ofrece la posibilidad de probar de una manera directa la efectividad de potenciales tratamientos. Por ejemplo, la demostración de que los animales deficientes en MnSOD desarrollan toxicidad por radicales libres del oxígeno y miocardiopatía dilatada permite especular que el tratamiento con antioxidantes puede mejorar el fenotipo cardíaco; de hecho, la inyección peritoneal del antioxidante MnTBAP en ratones deficientes de MnSOD fue capaz de eliminar la disfunción cardíaca y de revertir la acumulación de radicales libres del oxígeno¹²¹.

Diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardíacas producidas por alteraciones mitocondriales

El diagnóstico de la disfunción mitocondrial en la enfermedad cardíaca procede en gran parte de estudios de biopsias endomiocárdicas que han utilizado análisis histoquímicos, ultraestructurales y de la actividad de las enzimas de la fosforilación oxidativa y de la respiración celular. Recientemente se ha demostrado la utilidad diagnóstica del análisis de las enzimas de músculo esquelético en pacientes con miocardiopatía¹²², y la biopsia muscular puede reemplazar la necesidad de utilizar biopsia endomiocárdica en la evaluación y seguimiento de la miocardiopatía basada en alteraciones mitocondriales. También puede ser informativo el análisis de ADN utilizado para identificar mutaciones patogénicas específicas del ADNmt, el análisis de las delecciones a gran escala del ADNmt y la evaluación de los niveles de ADNmt; sin embargo, según nuestra experiencia, la incidencia global de mutaciones patogénicas de ADNmt es baja en pacientes

con enfermedad cardíaca, incluyendo aquellos que presentan defectos de las enzimas de la fosforilación oxidativa. Una vez que las mutaciones específicas de ADNmt han sido identificadas, su significado funcional puede ser confirmado utilizando tecnología «cibrida». Según esta metodología, los citoplastos de los pacientes (células enucleadas que contienen las mitocondrias y el ADNmt de los pacientes) son fusionadas con células rho^o receptoras deficientes en ADNmt (células nucleadas en cultivo cuyo ADNmt ha sido eliminado mediante crecimiento prolongado en bromuro de etidio). La línea celular híbrida citoplásmica resultante («cibrida»), que se puede hacer crecer bajo condiciones apropiadas, posee un bagaje nuclear silvestre derivado de las células receptoras rho^o y un ADNmt derivado enteramente del paciente, y puede ser utilizada para el estudio del crecimiento, consumo de oxígeno, producción de ATP, síntesis proteica mitocondrial y evaluación de las actividades enzimáticas específicas¹²³. Para aquellos pacientes en los que se sospecha la existencia de defectos genéticos nucleares, los cíbridos también pueden ser construidos a partir de un genoma mitocondrial silvestre y el genoma nuclear del paciente.

Aunque la evaluación de los ácidos grasos utilizando un perfil de las concentraciones sanguíneas de acilcarnitina por espectroscopia de masas parece ser el método más fiable de probar la existencia de una alteración mitocondrial asociada a su metabolismo¹²⁴, se puede usar análisis bioquímicos alternativos para determinar los valores de otros intermediarios mitocondriales clave, como la coenzima Q10, la cardiolipina y la carnitina.

Un conocimiento preciso de los defectos bioquímicos y moleculares puede permitir el tratamiento con intermediarios metabólicos (p. ej., el succinato), coenzimas y vitaminas que sirvan como donadores de electrones, transportadores y cofactores del transporte electrónico (p. ej., vitamina K, tiamina, ascorbato y riboflavina) que permitan obviar los defectos específicos en la fosforilación oxidativa y aumentar la producción de ATP¹²⁵. Por ejemplo, la coenzima Q10 ha demostrado tener efectos beneficiosos en el tratamiento de episodios de tipo ictus, acidosis láctica y fatiga del síndrome de MELAS, en los trastornos de la conducción cardíaca asociados al síndrome KSS¹²⁵, y en el tratamiento de otras miocardiopatías¹²⁶. Recientemente, la idebenona, un análogo sintético de la coenzima Q, ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de la miocardiopatía asociada a la ataxia de Friedreich^{127,128}. La coenzima Q también es potencialmente útil como antioxidante¹²⁵.

Las alteraciones mitocondriales de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (entre los que se incluye la deficiencia de CPT II) pueden ser tratadas de forma efectiva con terapia dietética a largo plazo, mediante el reemplazo de las grasas normales de la dieta

por triglicéridos de cadena media e incremento de la ingestión de hidratos de carbono, especialmente en la miocardiopatía aguda asociada a deficiencias de VLCAD y LCHAD^{129,130}. La prevención de estas alteraciones incluye también evitar de forma estricta el ayuno, sobre todo durante la infancia. Los pacientes con miocardiopatía secundaria a deficiencia primaria de carnitina pueden ser tratados con L-carnitina oral. En muchos casos de tratamiento con carnitina la miocardiopatía se resolvió y se previno la incidencia de recurrencias durante más de 5 años¹³¹. Asimismo, cada vez hay mayor evidencia de que los ácidos grasos libres poliinsaturados en la dieta pueden proporcionar un efecto cardioprotector contra la fibrilación ventricular secundaria a la isquemia y las arritmias, aumentan el contenido de cardioproteína mitocondrial y mejoran la tolerancia cardíaca a la isquemia y reperfusión¹³².

Las deficiencias en CPT-II, translocasa de carnitina-acilcarnitina o MTP que resultan en un aumento de la incidencia de defectos en la conducción cardíaca y arritmias, pueden ser tratadas con fármacos capaces de aumentar la utilización de glucosa y la energía derivada de la oxidación de piruvato, a costa de la oxidación de los ácidos grasos, y así prevenir la acumulación de acilcarnitinas de cadena larga¹³³. Otros casos de intervención metabólica consisten en revertir el aumento de la oxidación de los ácidos grasos que tiene lugar durante la reperfusión utilizando trimetazidina y ranolazina. El tratamiento con dicloroacetato se presenta como una estrategia prometedora para contener el aumento de la acidosis láctica y revertir la disminución de la actividad de la deshidrogenasa de piruvato que se producen en el daño por isquemia/reperfusión miocárdicos.

La terapia con carnitina también puede ser utilizada para disminuir la acumulación de acil-CoA. Además, los pacientes con insuficiencia cardíaca tratados con carvedilol, un bloqueador de los receptores adrenérgicos de tipo beta, presentan una mejoría notoria en la eficiencia energética del miocardio, debido a que se induce un cambio en los sustratos oxidativos empleados, desde los ácidos grasos a la glucosa¹³⁴.

El camino por delante: células madre embrionarias y terapia génica

La formación de células miocárdicas funcionantes en el ratón y en los humanos se ha conseguido con el uso de células madre embrionarias (ES) derivadas de estadios blastocitarios en fases preembrionarias¹³⁵⁻¹³⁷. Esta tecnología tan prometedora tiene numerosas aplicaciones potenciales en el tratamiento de muchas enfermedades cardíacas, como las miocardiopatías, mediante el aumento, la regeneración o el reemplazo de cardiomiocitos defectuosos. También puede ser utilizada en pruebas farmacológicas para la evaluación de compuestos cardiotóxicos¹³⁸. Por el momento, dispo-

nemos de una información limitada en relación con la estructura y función mitocondriales en células ES, y no existen datos sobre su utilidad en las enfermedades cardíacas que presentan anomalías mitocondriales extensas, ni sobre pruebas realizadas para probar la cardiotoxicidad mitocondrial.

Recientemente, el ADNmt procedente de una línea celular murina con deficiencias respiratorias y resistente al cloramfenicol (CAPR) fue introducido en forma de citoplastos enucleados en células ES (tratadas con rodamina 6G para eliminar sus mitocondrias) utilizando la técnica de fusión celular; los híbridos resultantes fueron inyectados en blastocitos y se obtuvieron ratones quiméricos¹³⁹. El fenotipo de la línea celular CAPR, que se debe a una mutación puntual del ADNmt en el nucleótido próximo al extremo 3' del gen del ARNr 16S, fue transmitido por vía materna a la descendencia. Los ratones quiméricos CAPR desarrollaron un gran número de anomalías oculares, incluyendo cataratas congénitas y disminución de la función de la retina, así como retraso grave en el crecimiento, miopatía y miocardiopatía dilatada. Las mitocondrias estaban anormalmente agrandadas en el músculo esquelético y cardíaco de los ratones CAPR y contenían numerosos gránulos electrodensos. Aunque todavía no se ha podido entender completamente el mecanismo cardiopatógeno de CAPR, vale la pena señalar que la mutación que presenta produce una gran deficiencia en la síntesis proteica mitocondrial y comparte la gravedad y la patogenicidad cardíaca manifestada en otras mutaciones del ADNmt que afectan a la síntesis proteica de las mitocondrias (p. ej., las mutaciones patogénicas de ARNr y ARNr mencionadas anteriormente).

Mientras que los enfoques experimentales basados en el uso de células ES de ratón híbridas son un medio potencial para generar y examinar modelos animales de enfermedad mitocondrial, todavía no se ha intentado utilizar la tecnología de las células ES para estudiar las mutaciones patogénicas del ADNmt implicadas en las enfermedades cardíacas humanas. Un estudio reciente ha propuesto la posibilidad de introducir células ES con «ADNmt reparado» en un paciente que presentaba un defecto en el ADNmt, con la idea de transformar el miocardio enfermo en uno sano¹⁴⁰. La célula con el «ADNmt reparado» debería derivarse del propio paciente (para evitar el rechazo inmunológico), después de recibir tratamiento con bromuro de etidio para eliminar el genoma de ADNmt endógeno y defectuoso, debería ser sometida a un proceso de reincorporación de los genes de ADNmt en su forma silvestre. De una manera parecida, el tratamiento de los defectos de ADN nuclear en los pacientes debe incluir un reemplazo genético específico del defecto nuclear (la recombinación homóloga sitio específica puede realizarse fácilmente en células ES) o, si el lugar preciso del defecto genético no se conoce, el reemplazo del núcleo completo del paciente por un nú-

cleo silvestre y la subsiguiente generación de un constructo obtenido a partir de células ES. El desarrollo de la ingeniería celular basada en la terapia con células ES puede tener un importante impacto en el tratamiento de las enfermedades cardíacas basadas en defectos mitocondriales.

El uso eficaz de la terapia génica para el tratamiento de los defectos derivados del ADNmt en la fosforilación oxidativa está pendiente de una metodología basada en el reemplazo génico mitocondrial en células humanas. Mientras avanzamos hacia ese futuro, varios laboratorios han hecho público sus progresos en la creación de vectores catiónicos (p. ej., liposomas), capaces de transportar secuencias dirigidas a péptidos, covalentemente unidas a oligonucleósidos mitocondriales, al interior de las mitocondrias de células vivas¹⁴¹⁻¹⁴³. Este tipo de aproximación basada en la transfección mitocondrial puede combinarse con una estrategia antisentido encaminada a reducir la expresión del alelo mitocondrial defectuoso en el tejido del paciente. Además, se acaba de publicar la corrección genética de una deficiencia específica en el ADNmt que afectaba a la sintasa de ATP¹⁴⁴. Utilizando una tecnología que se basa en la expresión de un gen de ADNmt en el núcleo (el gen de la ATPasa-6) en híbridos humanos, se ha conseguido corregir el fenotipo bioquímico y el crecimiento del alelo mutante 8993. Un enfoque genético similar puede resultar exitoso en el tratamiento de las alteraciones cardíacas debidas a mutaciones puntuales definidas del ADNmt.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-65.
- Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4:289-333.
- Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 1997;66:409-35.
- Lopaschuk GD, Collins-Nakai RL, Itoi T. Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovasc Res* 1992;26:1172-80.
- Sack MN, Harrington LS, Jonassen AK, Mjos OD, Yellon DM. Coordinate regulation of metabolic enzyme encoding genes during cardiac development and following carvedilol therapy in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000;14:31-9.
- Brown NF, Weis BC, Husti JE, Foster DW, McGarry JD. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem* 1995;270:8952-7.
- Cook GA, Edwards TL, Jansen MS, Bahouth SW, Wilcox HG, Park EA. Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase-I gene isoforms (CPT-I alpha and CPT-I beta) in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:317-29.
- Van Nieuwenhoven FA, Willemsen PH, Van der Vusse GJ, Glatz JF. Co-expression in rat heart and skeletal muscle of four genes coding for proteins implicated in long-chain fatty acid uptake. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:489-98.
- Tiivel T, Kadaya L, Kuznetsov A, Kaambre T, Peet N, Sikk P, et al. Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart *in vivo*. *Mol Cell Biochem* 2000;208:119-28.
- Hoerter JA, Kuznetsov A, Ventura-Clapier R. Functional development of the creatine kinase system in perinatal rabbit heart. *Circ Res* 1991;69:665-76.
- Marín-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ. Human mitochondrial function during cardiac growth and development. *Mol Cell Biochem* 1998;179:21-6.
- Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000;25:502-8.
- Nulton-Persson AC, Szweida LI. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2001;276:23357-61.
- Paradies G, Ruggiero FM. Age-related changes in the activity of the pyruvate carrier and in the lipid composition in rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990;1016:207-21.
- McMillin JB, Taffet GE, Taegtmeier H, Hudson EK, Tate CA. Mitochondrial metabolism and substrate competition in the aging Fischer rat heart. *Cardiovasc Res* 1993;27:2222-8.
- López Jiménez JA, Bordoni A, Lorenzini A, Rossi CA, Biagi PL, Hrelia S. Linoleic acid metabolism in primary cultures of adult rat cardiomyocytes is impaired by aging. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:142-5.
- Costell M, O'Connor JE, Grisolia S. Age-dependent decrease of carnitine content in muscle of mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 161:1135-43.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989;1:642-5.
- Hattori K, Tanaka M, Sugiyama S, Obayashi T, Ito T, Satake T, et al. Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor in presbycardia. *Am Heart J* 1991;121:1735-42.
- Muller-Hocker J. Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart – an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. *Am J Pathol* 1989;134:1167-73.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1995;1272:165-70.
- Miro O, Casademont J, Casals E, Perea M, Urbano-Márquez A, Rustin P, et al. Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects. *Cardiovasc Res* 2000;47:624-31.
- Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia – reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1065-89.
- Lucas DT, Szweida LI. Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: age-dependent inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6689-9.
- Rustin P, Lebigois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF, Rotig A, et al. Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies. *J Pediatr* 1994;124:224-8.
- Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, Wiegand V. Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1990;11:509-16.
- Marín-García J, Goldenthal MJ, Pierpont ME, Ananthakrishnan R. Impaired mitochondrial function in idiopathic dilated cardiomyopathy: biochemical and molecular analysis. *J Card Fail* 1995;1:285-91.
- Marín-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ, Pérez-Atayde A. Cardiac mitochondrial dysfunction and DNA depletion in children with hypertrophic cardiomyopathy. *J Inher Metab Dis* 1997;20:674-80.
- Taniike M, Fukushima H, Yanagihara I, Tsukamoto H, Tanaka J, Fujimura H, et al. Mitochondrial tRNA Ile mutation in fatal cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:47-53.

30. Silvestri G, Santorelli FM, Shanske S, Whitley CB, Schimmenti LA, Smith SA, et al. A new mtDNA mutation in the tRNA LEU(UUR) gene associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mutat* 1994;3:37-43.
31. Santorelli FM, Mak SC, Vázquez-Acevedo M, González-Astiazaran A, Ridaura-Sanz C, González-Halphen D, et al. A novel mtDNA point mutation associated with mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216:835-40.
32. Santorelli FM, Mak SC, El-Schahawi M, Casali C, Shanske S, Baram TZ, et al. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA Lys gene (G8363). *Am J Hum Genet* 1996;58:933-9.
33. Merante F, Tein I, Benson L, Robinson BH. Maternally inherited cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA Gly gene. *Am J Hum Genet* 1994;55:437-46.
34. Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, Rimoldi M, Morandi L, Villani F, et al. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA Leu. *Lancet* 1991;338:143-7.
35. Casali C, Santorelli FM, D'Amati G, Bernucci P, DeBiase L, DiMauro S. A novel mtDNA point mutation in maternally inherited cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:588-93.
36. McFarland R, Clark KM, Morris AA, Taylor RW, Macphail S, Lightowlers RN, et al. Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nat Genet* 2002;30:145-6.
37. Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:131-49.
38. Santorelli FM, Tanji K, Manta P, Casali C, Krishna S, Hays AP, et al. Maternally inherited cardiomyopathy: an atypical presentation of the mtDNA 12S rRNA gene A1555G mutation. *Am J Hum Genet* 1999;64:295-300.
39. Arbustini E, Diegoli M, Fasani R, Grasso M, Morbini P, Banchieri N, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998;153:1501-10.
40. Li YY, Maisch B, Rose ML, Hengstenberg C. Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2699-709.
41. Marín-García J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME. The complete sequence of mtDNA genes in idiopathic dilated cardiomyopathy shows novel missense and tRNA mutations. *J Card Fail* 2000;6:321-9.
42. Shoffner JM, Wallace DC. Heart disease and mitochondrial DNA mutations. *Heart Dis Stroke* 1992;1:235-41.
43. Pastores GM, Santorelli FM, Shanske S, Gelb BD, Fyfe B, Wolfe D, et al. Leigh syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in an infant with a mitochondrial point mutation (T8993G). *Am J Med Genet* 1994;50:265-71.
44. Anan R, Nakagawa M, Miyata M, Higuchi I, Nakao S, Suehara M, et al. Cardiac involvement in mitochondrial diseases: a study of 17 patients with mitochondrial DNA defects. *Circulation* 1995;91:955-61.
45. Graf WD, Marín-García J, Gao HG, Pizzo S, Naviaux RK, Markusic D, et al. Autism associated with the mitochondrial DNA G8363A transfer RNA(Lys) mutation. *J Child Neurol* 2000;15:357-61.
46. Matthews PM, Marchington DR, Squier M, Land J, Brown R, Brown GK. Molecular genetic characterization of an X-linked form of Leigh's syndrome. *Ann Neurol* 1993;33:652-5.
47. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995;11:144-9.
48. Filiano JJ, Goldenthal MJ, Mamourian AC, Hall CC, Marín-García J. Mitochondrial DNA depletion in Leigh syndrome. *Pediatr Neurol* 2002;26:239-42.
49. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of mtDNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988;331:717-9.
50. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988;38:1339-46.
51. Muller-Hocker J, Jacob U, Seibel P. The common 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA preferentially accumulates in the cardiac conduction system of patients with Kearns-Sayre syndrome. *Mod Pathol* 1998;11:295-301.
52. Bohlega S, Tanji K, Santorelli FM, Hirano M, al-Jishi A, DiMauro S. Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy. *Neurology* 1996;46:1329-34.
53. Suomalainen A, Paetau A, Leinonen H, Majander A, Peltonen L, Somer H. Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet* 1992;340:1319-20.
54. Marín-García J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Fricker FJ, Lipshultz S, et al. Specific mitochondrial DNA deletions in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1996;31:306-14.
55. Simonetti S, Chen X, DiMauro S, Schon E. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* 1992;1180:113-22.
56. Marín-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Pierpont ME. Biochemical and molecular basis for mitochondrial cardiomyopathy in neonates and children. *J Inher Metab Dis* 2000;23:625-33.
57. Lewis W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Med* 1995;1:417-22.
58. Herskowitz A, Willoughby SB, Baughman KL, Schulman SP, Bartlett JD. Cardiomyopathy associated with antiretroviral therapy in patients with HIV infection: a report of 6 cases. *Ann Intern Med* 1992;116:311-13.
59. Huizing M, Iacobazzi V, Ijlst L, Savelkoul P, Ruitenbeek W, van den Heuvel L, et al. Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient. *Am J Hum Genet* 1997;61:1239-45.
60. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996;271:1423-7.
61. Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, et al. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 1999;23:333-7.
62. Sue CM, Karadimas C, Checcarelli N, Tanji K, Papadopoulou LC, Pallotti F, et al. Differential features of patients with mutations in two COX assembly genes, SURF-1 and SCO2. *Ann Neurol* 2000;47:589-95.
63. Kelly DP, Strauss AW. Inherited Cardiomyopathies. *N Eng J Med* 1994;330:913-9.
64. Strauss AW, Powell CK, Hale DE, Anderson MM, Ahuja A, Brackett JC, et al. Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10496-500.
65. Rocchiccioli F, Wanders RJ, Aubourg P, Vianey-Liaud C, Ijlst L, Fabre M, et al. Deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: a cause of lethal myopathy and cardiomyopathy in early childhood. *Pediatr Res* 1990;28:657-62.
66. Tein I, Haslam RH, Rhead WJ, Bennett MJ, Becker LE, Voclekly J. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology* 1999;52:366-72.
67. Stanley CA, Treem WR, Hale DE, Coates PM. A genetic defect in carnitine transport causing primary carnitine deficiency. *Prog Clin Biol Res* 1990;321:457-64.

68. Brackett JC, Sims HF, Rinaldo P, Shapiro S, Powell CK, Bennett MJ, et al. Two subunit donor splice site mutations cause human trifunctional protein deficiency. *J Clin Invest* 1995;95:2076-82.
69. Bonnet D, Martin D, de Lonlay P, Villain E, Jouvett P, Rabier D, et al. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation* 1999;100:2248-53.
70. Corr PB, Creer MH, Yamada KA, Saffitz JE, Sobel BE. Prophylaxis of early ventricular fibrillation by inhibition of acylcarnitine accumulation. *J Clin Invest* 1989;83:927-36.
71. Tripp ME. Developmental cardiac metabolism in health and disease. *Pediatr Cardiol* 1989;10:150-8.
72. D'Adamo P, Fassone L, Gedeon A, Janssen EA, Bione S, Bolhuis PA, et al. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *Am J Hum Genet* 1997;61:862-7.
73. Bissler JJ, Tsoras M, Goring HH, Hug P, Chuck G, Tombragel E, et al. Infantile dilated x-linked cardiomyopathy, g4.5 mutations, altered lipids, and ultrastructural malformations of mitochondria in heart, liver, and skeletal muscle. *Lab Invest* 2002;82:335-44.
74. Vreken P, Valianpour F, Nijtmans LG, Grivell LA, Plecko B, Wanders RJ, et al. Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:378-82.
75. Fananapazir L, Dalakas MC, Cyran F, Cohn G, Epstein ND. Missense mutations in the beta-myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3993-7.
76. Thompson CH, Kemp GJ, Taylor DJ, Conway M, Rajagopalan B, O'Donoghue A, et al. Abnormal skeletal muscle bioenergetics in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 1997;78:177-81.
77. Arbustini E, Fasani R, Morbini P, Diegoli M, Grasso M, Dal Bello B, et al. Coexistence of mitochondrial DNA and beta myosin heavy chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy with late congestive heart failure. *Heart* 1998;80:548-58.
78. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* 2000;150:1283-98.
79. Corbucci GG. Adaptive changes in response to acute hypoxia, ischemia and reperfusion in human cardiac cell. *Minerva Anestesiol* 2000;66:523-30.
80. Ylitalo K, Ala-Rami A, Vuorinen K, Peuhkurinen K, Lepojarvi M, Kaukoranta P, et al. Reversible ischemic inhibition of F(1)F(0)-ATPase in rat and human myocardium. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:329-39.
81. Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K, Wallace DC. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. Implications for cardiac disease. *JAMA* 1991;266:1812-6.
82. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero FM. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1999;27:42-50.
83. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-28.
84. Sammut IA, Jayakumar J, Latif N, Rothery S, Severs NJ, Smolenski RT, et al. Heat stress contributes to the enhancement of cardiac mitochondrial complex activity. *Am J Pathol* 2001;158:1821-31.
85. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Evidence for mitochondrial K ATP channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 2000;45:934-40.
86. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2 related proteins. *J Exp Med* 1998;187:1261-71.
87. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998;281:2027-31.
88. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:177-96.
89. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1996;16:6125-33.
90. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002;54:101-27.
91. Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:353-88.
92. Abdel-Aleem S, el-Merzabani MM, Sayed-Ahmed M, Taylor DA, Lowe JE. Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:789-97.
93. Serrano J, Palmeira CM, Kuehl DW, Wallace KB. Cardiospecific and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:201-5.
94. Zhou S, Heller LJ, Wallace KB. Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175:60-7.
95. Solem LE, Henry TR, Wallace KB. Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;129:214-22.
96. Adachi K, Fujiura Y, Mayumi F, Nozuhara A, Sugiu Y, Sakamashi T, et al. A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:945-51.
97. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;98:1253-60.
98. Shneyvays V, Mamedova L, Zinman T, Jacobson K, Shainberg A. Activation of A (3) adenosine receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1249-61.
99. Sayed-Ahmed MM, Salman TM, Gaballah HE, Abou El-Naga SA, Nicolai R, Calvani M. Propionyl-L-carnitine as protector against adriamycin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Res* 2001;43:513-20.
100. Wang GW, Klein JB, Kang YJ. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:461-8.
101. Schulze K, Schultheiss HP. The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *Eur Heart J* 1995;16 (Suppl O):64-7.
102. Fuchs CS, Stampfer MJ, Colditz GA, Giovannucci EL, Manson JE, Kawachi I, et al. Alcohol consumption and mortality among women. *N Engl J Med* 1995;332:1245-50.
103. Marín-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ. Heart mitochondria response to alcohol is different than brain and liver. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:1463-6.
104. Siddiq T, Salisbury JR, Richardson PJ, Preedy VR. Synthesis of ventricular mitochondrial proteins *in vivo*: effect of acute ethanol toxicity. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:894-9.
105. Beckemeier ME, Bora PS. Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2487-94.
106. Schoppet M, Maisch B. Alcohol and the heart. *Herz* 2001;26:345-52.
107. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the

- heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 1997;16:226-34.
108. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright Jr, Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9782-7.
 109. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376-81.
 110. Djouadi F, Brandt JM, Weinheimer CJ, Leone TC, González FJ, Kelly DP. The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in control of cardiac lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999;60:339-43.
 111. Ibdah JA, Paul H, Zhao Y, Binford S, Salleng K, Cline M, et al. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J Clin Invest* 2001;107:1403-9.
 112. Wang J, Wilhelmsson H, Graff C, Li H, Oldfors A, Rustin P, et al. Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* 1999;21:133-7.
 113. Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, et al. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 2001;27:181-6.
 114. Li H, Wilhelmsson H, Hanson A, Thoren P, Duffy J, Rustin P, et al. Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3467-72.
 115. Radford NB, Wan B, Richman A, Szczepaniak LS, Li JL, Li K, et al. Cardiac dysfunction in mice lacking cytochrome-c oxidase subunit VIaH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H726-33.
 116. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, et al. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 2000;26:176-81.
 117. Nakada K, Inoue K, Chen CS, Nonaka I, Goto Y, Ogura A, et al. Correlation of functional and ultrastructural abnormalities of mitochondria in mouse heart carrying a pathogenic mutant mtDNA with a 4696-bp deletion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:901-7.
 118. Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, et al. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 2001;7:934-40.
 119. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, et al. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002;109:121-30.
 120. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000;106:847-56.
 121. Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1998;18:159-63.
 122. Marín-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ, Pérez-Atayde A. Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of children with cardiomyopathy. *Pediatrics* 1999;103:456-9.
 123. Chomyn A, Meola G, Bresolin N, Lai ST, Scarlato G, Attardi G. *In vitro* genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy patient mitochondria. *Mol Cell Biol* 1991;11:2236-44.
 124. Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, et al. Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inher Metab Dis* 1999;22:488-502.
 125. Shoffner JM, Wallace DC. Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations: diagnosis and treatment. *Annu Rev Nutr* 1994;14:535-68.
 126. Langsjuen P, Vadhanavikit S, Folkers K. Response of patients in classes III and IV of cardiomyopathy to therapy in a blind and cross-over trial with coenzyme Q10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4240-4.
 127. Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rotig A. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 1999;354:477-9.
 128. Lerman-Sagie T, Rustin P, Lev D, Yanoov M, Leshinsky-Silver E, Sagie A, et al. Dramatic improvement in mitochondrial cardiomyopathy following treatment with idebenone. *J Inher Metab Dis* 2001;24:28-34.
 129. Bonnefont JP, Demaugre F, Prip-Buus C, Saudubray JM, Brivet M, Abadi N, et al. Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol Genet Metab* 1999;68:424-40.
 130. Brown-Harrison MC, Nada MA, Sprecher H, Vianey-Saban C, Farquhar J Jr, Gilladoga AC, et al. Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: successful treatment of acute cardiomyopathy. *Biochem Mol Med* 1996;58:59-65.
 131. Pierpont ME, Breningstall GN, Stanley CA, Singh A. Familial carnitine transporter defect: a treatable cause of cardiomyopathy in children. *Am Heart J* 2000;139:S96-S106.
 132. Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG, Hansford RG. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. *Am J Physiol* 1999;276:H149-58.
 133. Pollitt RJ. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation. *J Inher Metab Dis* 1995;18:473-90.
 134. Wallhaus TR, Taylor M, DeGrado TR, Russell DC, Stanko P, Nickles RJ, et al. Myocardial free fatty acid and glucose use after carvedilol treatment in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2001;103:2441-6.
 135. Doetschman T, Shull M, Kier A, Coffin JD. Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension* 1993;22:618-29.
 136. Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, Ji GJ, Endl E, Middeler G, et al. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *FASEB J* 2000;14:2540-8.
 137. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1525-39.
 138. Bremer S, Worth AP, Paparella M, Bigot K, Kolossov E, Fleischmann BK, et al. Establishment of an in vitro reporter gene assay for developmental cardiac toxicity. *Toxicol In Vitro* 2001;15:215-23.
 139. Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, Allard P, Dillehay DL, Nusinowitz S, et al. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14461-6.
 140. Zullo SJ. Gene therapy of mitochondrial DNA mutations: a brief, biased history of allotopic expression in mammalian cells. *Semin Neurol* 2001;21:327-35.
 141. Geromel V, Cao A, Briane D, Vassy J, Rotig A, Rustin P, et al. Mitochondria transfection by oligonucleotides containing a signal peptide and vectorized by cationic liposomes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001;11:175-80.
 142. Taylor RW, Wardell TM, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular basis for treatment of mitochondrial myopathies. *Neurol Sci* 2000;21:S909-12.
 143. Weissig V, Torchilin VP. Towards mitochondrial gene therapy: DQAsomes as a strategy. *J Drug Target* 2001;9:1-13.
 144. Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, Sadlock JE, Kwong JQ, Guy J, et al. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet* 2002;30:394-9.
 145. Kawai T, Kawakami H, Kozuka K, Izumi Y, Matsuyama Z, Watanabe C, et al. A new mitochondrial DNA mutation associa-

Marín-García J, et al. La mitocondria y el corazón

- ted with mitochondrial myopathy: tRNA (Leu) (UUR) 3254C-to-G. *Neurology* 1997;49:598-600.
146. Grasso M, Diegoli M, Brega A, Campana C, Tavazzi L, Arbustini E. The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA (Leu (CUN)) and is associated with dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2001;9:311-5.
 147. Tanaka M, Ino H, Ohno K, Hattori K, Sato W, Ozawa T, et al. Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. *Lancet* 1990;336:1452.
 148. Merante F, Myint T, Tein I, Benson L, Robinson BH. An additional mitochondrial tRNA (Ile) point mutation (A-to-G at nucleotide 4295) causing hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 1996;8:216-22.
 149. Corona P, Lamantea E, Greco M, Carrara F, Agostino A, Guidetti D, et al. Novel heteroplasmic mtDNA mutation in a family with heterogeneous clinical presentations. *Ann Neurol* 2002;51:118-22.
 150. Akita Y, Koga Y, Iwanaga R, Wada N, Tsubone J, Fukuda S, et al. Fatal hypertrophic cardiomyopathy associated with an A8296G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. *Hum Mutat* 2000;15:382.
 151. Terasaki F, Tanaka M, Kawamura K, Kanzaki Y, Okabe M, Hayashi T, et al. A case of cardiomyopathy showing progression from the hypertrophic to the dilated form: association of Mt 8348A->G mutation in the mitochondrial tRNA (Lys) gene with severe ultrastructural alterations of mitochondria in cardiomyocytes. *Jpn Circ J* 2001;65:691-4.
 152. Karadimas C, Tanji K, Geremek M, Chronopoulou P, Vu T, Krishna S, et al. A5814G mutation in mitochondrial DNA can cause mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *J Child Neurol* 2001;16:531-3.
 153. Hsieh RH, Li JY, Pang CY, Wei YH. A novel mutation in the mitochondrial 16S rRNA gene in a patient with MELAS syndrome, diabetes mellitus, hyperthyroidism and cardiomyopathy. *J Biomed Sci* 2001;8:328-35.
 154. Obayashi T, Hattori K, Sugiyama S, Tanaka M, Tanaka T, Itoyama S, et al. Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1992;124:1263-9.
 155. Marín-García J, Ananthakrishnan R, Gonzalvo A, Goldenthal MJ. Novel mutations in mitochondrial cytochrome b in a case of fatal post-partum cardiomyopathy. *J Inher Metab Dis* 1995;18:77-8.
 156. Andreu AL, Checcarelli N, Iwata S, Shanske S, DiMauro S. A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Pediatr Res* 2000;48:311-4.
 157. Valnot I, Kassis J, Chretien D, de Lonlay P, Parfait B, Munnich A, et al. A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclear encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase deficiency. *Hum Genet* 1999;104:460-6.