

Heteroplasma de la mutación del ADN mitocondrial m.3243A>G en la diabetes y sordera de herencia materna

LUIS RODRIGO CATALDO^{1,4,a}, PABLO OLMOS¹,
SUSAN VALERIE SMALLEY^{1,b}, ALBERTO DÍEZ^{1,c}, ALEJANDRA PARADA^{1,d},
ROGER GEJMAN², RICARDO FADIC³, JOSÉ LUIS SANTOS^{1,e}

Mitochondrial DNA heteroplasmy of the m.3243A>G mutation in maternally inherited diabetes and deafness

Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD) is caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA), mainly m.3243A>G. Severity, onset and clinical phenotype of MIDD patients are partially determined by the proportion of mutant mitochondrial DNA copies in each cell and tissue (heteroplasmy). The identification of MIDD allows a correct treatment with insulin avoiding drugs that may interfere with mitochondrial electron chain transport. We estimated the degree of heteroplasmy of the mutation m.3243A>G from blood, saliva, hair root and a muscle biopsy using quantitative PCR (qPCR) in a female adult patient. For this purpose, PCR products were inserted in a vector creating plasmids with 3243A or G. Mutant and wild-type vectors were mixed in different proportions to create a calibration curve used to interpolate heteroplasmy percentages with qPCR threshold cycles. The proportions of m.3243A>G heteroplasmy were 62% (muscle), 14% (saliva), 6% (blood leukocytes) and 3% in hair root. Quantitative analysis of heteroplasmy showed marked variations in different tissues (highest in muscle and lowest in blood). Given the relatively high heteroplasmy found in saliva, this type of biological sample may represent an adequate non-invasive way for assessing the presence of m.3243A>G mutations in epidemiologic studies.

(Rev Med Chile 2013; 141: 305-312).

Key words: Deafness; DNA, mitochondrial; Genetic techniques.

La diabetes afecta a más de 285 millones de personas en el mundo (<http://www.who.int>). La mayoría corresponde a pacientes con diabetes tipo 2, mientras que alrededor de 5% están diagnosticados como diabetes tipo 1. Un bajo porcentaje (1-2%) corresponde a formas conocidas de diabetes monogénica, entre las que se encuentran defectos del ADN mitocondrial (mtDNA)¹. En 1992, se describió una enfermedad llamada MIDD (“*Maternally Inherited Diabetes and Deafness*”; MIM ID#520000) en diabéticos con pérdida de audición de tipo neurosensorial causadas por la mutación m.3243A>G. Aunque

esta mutación es la causa más frecuente de MIDD conocida hasta el momento, otras investigaciones han encontrado diferentes mutaciones del mtDNA que también se asocian a esta enfermedad²⁻⁴.

La mutación m.3243A>G se ubica en el gen MT-TL1 que codifica para uno de los dos ARN de transferencia (tRNA) para la leucina existentes en el mtDNA (anticodón UUR; <http://mamit-trna.u-strasbg.fr/>)⁴. Esta mutación promueve una modificación en la estructura del tRNA que impide la correcta traducción en el mitorribosoma y la consiguiente alteración de los componentes de la cadena transportadora de electrones codifi-

¹Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo.

²Departamento de Anatomía Patológica.

³Departamento de Neurología.

Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

⁴Universidad de los Andes, Facultad de Medicina,

^aBioquímico, MSc.

^bBiólogo, MSc.

^cAlumno medicina Pontificia Universidad Católica de Chile.

^dNutricionista, PhD.

^eBiólogo, PhD MSc.

Recibido el 6 de julio de 2012, aceptado el 8 de noviembre de 2012.

Correspondencia:

José Luis Santos.

Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo

Edificio de

Gastroenterología.

Escuela de Medicina,

Pontificia Universidad Católica de Chile.

Alameda 340, Santiago.

Fono: 3543862-3865.

E-mail: jsantos@med.

puc.cl

cados en el ADN mitocondrial⁵⁻⁹. En este sentido, la síntesis de ATP a partir de glucosa es un paso esencial para la secreción de insulina, dado que actúa bloqueando el canal de potasio dependiente de ATP, despolarizando la membrana plasmática, y permitiendo la entrada de calcio y la posterior liberación de la insulina en la célula β -pancreática⁷. Por tanto, una alteración en la cadena transportadora de electrones debido a una mutación en MT-TL1 explicaría el defecto de secreción de insulina característico de MIDD⁸. Por otro lado, una menor producción de ATP en las células de la estría marginal del oído interno, explicaría la hipoacusia neurosensorial⁹.

El mtDNA humano (NC_012920) codifica un total de 37 genes: 2 ARN ribosomales, 22 ARN de transferencia y 13 polipéptidos, siendo todos ellos parte de la cadena respiratoria. Existen dos características importantes del mtDNA que le distinguen del ADN nuclear, estas son la poliplasmia y la heteroplasmia¹⁰. La poliplasmia se refiere a la existencia de múltiples copias de mtDNA, mientras que la heteroplasmia se refiere a la diferente proporción de genomas mitocondriales mutados que se presentan en cada célula, tejido o paciente¹¹. En relación a mutaciones patogénicas, se ha propuesto que la localización tisular de mutaciones que superan cierto umbral en el grado de heteroplasmia, pueden afectar la severidad y la presentación clínica de la enfermedad⁹.

El objetivo de este trabajo es evaluar el grado de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G en diferentes tejidos obtenidos de una paciente afectada con MIDD (sangre, raíz de pelo, músculo y saliva) y evaluar su utilidad diagnóstica.

Pacientes, Materiales y Métodos

Evaluación del caso clínico

El caso índice es una mujer nacida en 1954 y diagnosticada con diabetes a la edad de 40 años. La familia de la paciente presenta una agregación inusual de diabetes y sordera compatible con herencia materna; diagnosticada en tres hermanos y en su madre. Los antecedentes clínicos, el tratamiento y la evolución de MIDD en esta paciente fueron recientemente reportados por nuestro grupo⁹. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Obtención de muestras biológicas y extracción de ADN

El ADN se extrajo desde muestras de saliva no-estimulada (Oragene kits; <http://www.dnagenotek.com>), raíces de pelo mediante la resina Chelex-100¹², leucocitos de sangre y biopsia de tejido muscular del antebrazo (Wizard Genomic ADN Purification Kit; Promega). La cuantificación de ADN se realizó fluorimétricamente (Quant-it kit, Qubit, Invitrogen). El tejido muscular fresco se congeló en nitrógeno líquido mediante el uso de isopentano en fase líquida, y se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina, tricrómico modificado de Gomori y métodos para NADH y ATPasa.

Identificación de la mutación m.3243A>G

Se buscaron, mediante la técnica de PCR-RFLP, las mutaciones más frecuentes asociadas a MIDD en Latinoamérica¹³: m.3243A>G, m.1438A>G y m.1310C>T. Se detectó la presencia de la mutación m.3243A>G a través de la observación en un gel de agarosa de 3% del corte parcial del producto de PCR (429 pb) con la enzima de restricción ApaI en dos fragmentos de 312 y 117 pb. Se descartó la presencia de las mutaciones 1438A>G y 1310C>T¹³.

Estimación del grado de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G

El cálculo del grado de heteroplasmia se realizó inicialmente evaluando la proporción de intensidad de las bandas en geles de agarosa del producto de PCR digerido (banda 312 pb) versus el total (bandas de 312 y 429 pb), a través del programa IMAGEJ (<http://www.rsweb.nih.gov/ij>). Para estimar de forma más exacta el grado de la heteroplasmia, implementamos una técnica de cuantificación basada en PCR de tiempo real¹⁴. Para ello, los productos de PCR iniciales (429 pb) fueron insertados en plásmidos pGEM-T Easy (Invitrogen, USA) y transformados en bacterias competentes (*E. coli*, cepa JM109). Posteriormente, se seleccionaron los clones plasmidiales que poseían únicamente, bien el alelo normal (3243A) o el alelo mutado (3243G), lo que se confirmó mediante secuenciación (<http://www.macrogen.com>). Ambos ADN plasmidiales fueron mezclados en diferentes proporciones, desde 100% de 3243A hasta 100% de 3243G. Para construir una curva de calibración, se utilizó un ensayo Taqman de PCR de tiempo real con una pareja de partidores

y dos sondas que reconocen la secuencia normal (3243A) o la secuencia mutada (3243G) (10 min 95°C, seguidos de 40 ciclos de 25 seg 92°C y 80 seg a 60°C; Eficiencia PCR = 1,8)¹⁴. Las sondas de cada alelo liberan una señal específica de fluorescencia, que es recogida en las longitudes de onda de 535-555 nm (3243A) y 492-516 nm (3243G). La interpolación en la curva del ciclo umbral del inicio de la fase exponencial y la relación entre la intensidad de ambas fluorescencias para la mezcla 50:50 (3243A:3243G) permitió calcular el porcentaje de heteroplasma en las muestras problema¹⁵. Los ensayos fueron realizados en un termociclador Agilent Stratagene 3000XP.

Determinación de haplogrupos de mtDNA

Se realizó la amplificación de las regiones polimórficas del mtDNA que definen cuatro haplogru-

pos característicos de las poblaciones amerindias (A, B, C y D) mediante PCR y corte con enzimas de restricción (RFLP)¹⁶.

Resultados

Se encontraron alteraciones en la biopsia muscular del paciente tales como un aumento de la variabilidad de los diámetros dado por la presencia de fibras levemente atroficas, aumento de núcleos centrales y presencia de fibras con material granular subsarcolemal de tinción basófila con la hematoxilina y tinción rojo/púrpura tricrómico de Gomori, mostrando reacción intensa con NADH. Se encontró un aumento moderado en la cantidad de lípidos presentes en el sarcoplasma (Figura 1).

La Figura 2 muestra el PCR-RFLP de la muta-

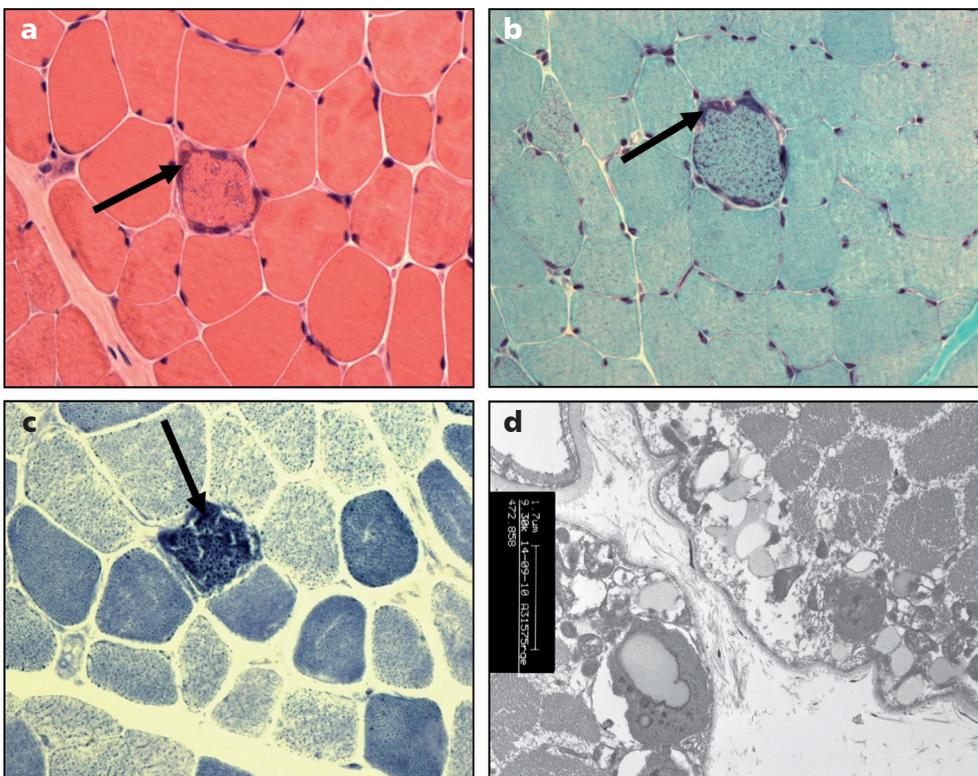


Figura 1. Microscopía de biopsia muscular de la paciente con MIDD. Corte transversal de tejido muscular mostrando deterioro celular con distintas técnicas de tinción; **a)** presencia de fibras con cúmulos de material basófilo subsarcolemal (flecha). Hematoxilina-eosina, x 200; **b)** presencia de fibras con cúmulos de material púrpura subsarcolemal, denominadas fibras rojas rasgadas (flecha). Tricrómico de Gomori, x 200; **c)** presencia de fibras con cúmulos de material subsarcolemal que se tiñe de azul con NADH, denominadas fibras azules rasgadas (flecha) Tricrómico de Gomori, x 200; **d)** Microscopía electrónica de transmisión mostrando aumento en el número de mitocondrias subsarcolemales asociado a aumento en la variabilidad de sus tamaños y presencia de gotas de lípidos.

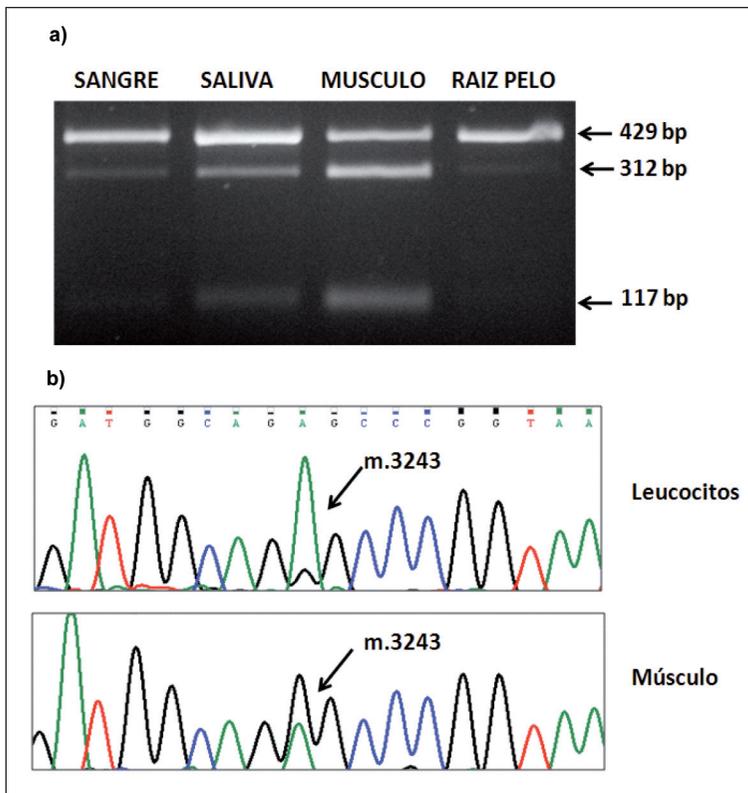


Figura 2. Detección de la mutación mt.3243A>G en diferentes tejidos de una paciente con MIDD mediante PCR-RFLP y secuenciación. **a)** Corte con la enzima de restricción Apal del producto de PCR aplicado a distintos tejidos de la paciente portadora de la mutación m.3243A>G, flechas indican las tres bandas con distinto tamaño e intensidad de bandas obtenidas cuando hay alelo mutado en distinto grado. **b)** Secuenciación del mtDNA obtenido desde tejido de sangre (leucocitos) y músculo en la región que contiene la posición mutada m.3243 (flecha), mostrando distinta intensidad del pico de fluorescencia para alelo A (verde) o alelo G (negro) de acuerdo al grado de heteroplasmia.

ción m.3243A>G en las muestras provenientes de sangre, saliva, raíz de pelo y biopsia muscular. Esta mutación genera un sitio de restricción, de manera que cuando existe la mutación en un porcentaje del mtDNA, se generan dos fragmentos de 312 y 117 pb, aparte del producto de PCR original (429 pb). Tomado como base el cociente de intensidad de bandas, la Figura 2 muestra que la biopsia de músculo tiene un mayor grado de heteroplasmia de m.3243A>G en relación a los otros tejidos (51% en músculo, 22% en saliva, 5% en leucocitos y 6% en pelo). La secuenciación del ADN procedente de la biopsia muscular muestra una señal para 3243G de mayor altura que el correspondiente para A, lo que es concordante con el mayor grado de heteroplasmia encontrado en el músculo en comparación con la sangre.

La Figura 3 muestra la secuencia de los clones plasmidiales con 100% del alelo 3243A y 100% del alelo 3243G. El grado de heteroplasmia calculado a través de los ensayos de PCR de tiempo real indicó que el grado de heteroplasmia de m.3243A>G en músculo (62%) fue muy superior al encontrado

en saliva (14%), leucocitos y sangre (6%) o raíz de pelo (3%) (Figura 4). Se determinó una adecuada concordancia entre la heteroplasmia determinada mediante qPCR y la intensidad de bandas de PCR-RFLP (coeficiente de concordancia de Lin = 0,95; $p < 0,0001$). Por otro lado, el análisis de mtDNA reveló que la paciente poseía el haplogrupo D.

Discusión

Es importante conocer las características clínicas propias de MIDD, dado que el diagnóstico de esta patología tiene implicancias tanto en el consejo genético como en el tratamiento. Los pacientes con MIDD tienen tendencia a desarrollar niveles de ácido láctico en reposo elevados que pueden aumentar de forma abrupta en situaciones de estrés y agravarse con el tratamiento con metformina, dado que este medicamento parece inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial¹⁷. Se han descrito otros fármacos con efectos perjudiciales sobre la función mitocondrial como

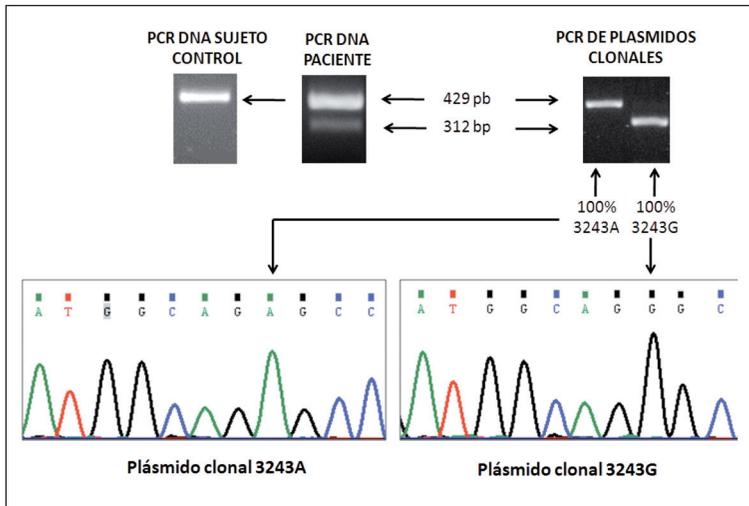


Figura 3. Plásmidos clonales de la mutación m.3243A>G. Corte con la enzima de restricción Apal del producto de PCR aplicado a la paciente portadora de la mutación m.3243A>G y en plásmidos clonales. La figura muestra el análisis de secuenciación que confirmó la obtención de plásmidos clonales 100%A y 100%G de la posición m.3243.

antibióticos (tetraciclinas y cloranfenicol) o anti-epilépticos (valproato, fenitoína y fenobarbital)⁸.

La sintomatología de MIDD a menudo no es reconocida por los médicos, quienes deberían de tener en cuenta esta posibilidad especialmente

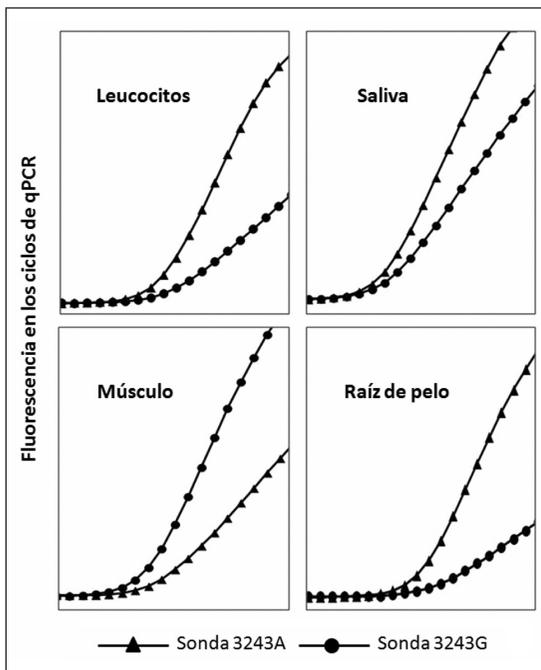


Figura 4. Ciclos umbrales en PCR cuantitativa (qPCR) para diferentes grados de heteroplasmia. Ciclos umbrales obtenidos en qPCR en muestras representativas de diferente grado de heteroplasmia obtenidas mediante la mezcla de proporciones variables de DNA plasmidial con el alelo 3243A y 3243G.

en aquellos pacientes diabéticos con patrón de transmisión por vía materna. Los signos clínicos en MIDD se presentan gradualmente y de una forma similar a la diabetes tipo 2, aunque aproximadamente 20% de los pacientes tienen un debut abrupto que puede acompañarse de cetoadicidosis⁷. A diferencia de los pacientes con diabetes tipo 1, no presentan autoanticuerpos frente a células β -pancreáticas. En un alto porcentaje, MIDD se presenta con hipoacusia neurosensorial variable, pudiendo acompañarse de cardiomiopatía, desórdenes neuromusculares y neuropsiquiátricos. Es importante señalar que la mutación m.3243A>G no sólo se relaciona con MIDD, sino que también tiene una estrecha relación con MELAS (*Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*; MIM ID#540000). En este sentido, se ha descrito que hasta 13% de portadores de m.3243A>G tienen una combinación de síntomas de MELAS y MIDD.

Aunque no existen datos de prevalencia de diabetes de origen mitocondrial en Chile, la frecuencia de MIDD en diabéticos se ha estimado en una proporción no inferior al 1%. En un estudio en Brasil, se calculó que la prevalencia de alguna de las 15 mutaciones más frecuentes del mtDNA en diabéticos tipo 2 no seleccionados fue de 2,45%, mientras que la prevalencia en diabéticos con características sugerentes de MIDD fue de 36,8%¹³. Mediante la secuenciación completa del ADN mitocondrial, se ha descrito recientemente una alta frecuencia de la mutación diferente a m.3243A>G en pacientes con características de MIDD². La prevalencia calculada

en distintas poblaciones es muy variable, lo que probablemente depende del criterio de inclusión de los pacientes, su procedencia étnica, el origen de la muestra biológica (saliva versus sangre) y del método analítico usado para la detección molecular¹⁸⁻²². Según los datos de la encuesta nacional de salud 2009-2010 (www.minsal.cl), el número estimado de diabéticos tipo 2 en Chile, es de 1.200.000 (9,4% de la población mayor de 15 años de edad), lo que significaría que en Chile existen probablemente entre 12.000 y 29.400 pacientes afectados con diabetes de origen mitocondrial.

Se han propuesto diferentes estrategias terapéuticas en desórdenes mitocondriales tales como la suplementación con carnitina, coenzima Q10, tiamina, succinato, folato, azul de metileno, bezafibrato, arginina o resveratrol²³⁻²⁵. Debido al reducido número de casos existentes, estas terapias han sido estudiadas en ensayos con bajo poder estadístico y frecuentemente sin un grupo control adecuado. Recientemente, se han incorporado nuevas posibilidades terapéuticas basadas en la estimulación de la biogénesis mitocondrial, la regulación de la fusión/fisión mitocondrial, estrategias de cambio del nivel de heteroplasmia y transferencia de RNA²⁵⁻²⁷.

Existe gran variabilidad en el grado de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G entre los tejidos de la paciente descrita en este trabajo: el más alto en músculo y el más bajo en leucocitos en sangre. Se ha descrito que la heteroplasmia podría variar de acuerdo a la tasa de replicación de cada tejido²⁸ según lo cual un tejido de rápida división como las células nucleadas de la sangre tienden a reducir la proporción de ADN mitocondrial mutado con la edad, mientras que un tejido como el músculo usualmente concentra mayores niveles de heteroplasmia²⁹. Adicionalmente, nos llamó la atención que la paciente presentó encanecimiento precoz desde la edad de 10 años, lo que podría relacionarse con observaciones previas de alteraciones de la pigmentación en enfermedades mitocondriales³⁰. Dada la relación entre la producción de radicales libres generada por la mitocondria y la formación de canas en el envejecimiento³¹, quisimos averiguar si esta paciente presentaba mayores valores de heteroplasmia en la raíz de pelo blanco (cana) con respecto al pelo negro. Con este propósito, tomamos ADN extraído de raíz de ambos tipos de pelo, encontrando que la heteroplasmia de la raíz de cana (20%) era

notablemente mayor que la estimada en la raíz de pelo negro (3%). Sin embargo, no ha sido posible con los datos disponibles afirmar que las raíces de cana tienen un mayor grado de heteroplasmia de m.3243A>G que las raíces de pelo negro, dado las diferencias encontradas podrían deberse a la gran variabilidad en la heteroplasmia que se ha descrito en raíces de pelo³².

En nuestra paciente, el grado de heteroplasmia de m.3243A>G encontrado en sangre es bajo (6%). Es necesario tomar en consideración este hecho, dado que en estudios epidemiológicos previos, la prevalencia de MIDD puede haber sido subestimada, dado que las técnicas de análisis frecuentemente no poseen la suficiente sensibilidad para detectar mutaciones con bajo nivel de heteroplasmia. Por otro lado, la saliva ofrece ADN en cantidad y calidad aceptable, de fácil accesibilidad y que presenta, según hemos mostrado en este trabajo, un grado de heteroplasmia de la mutación m.3243A>G relativamente alto (14%), con valores que también han sido encontrados en otros estudios^{29,34}. Con respecto a la técnica molecular utilizada, la detección basada en qPCR presenta una adecuada sensibilidad, exactitud, rapidez, en relación a PCR-RFLP en geles o PCR-RFLP de fluorescencia de último ciclo²⁹. Recientemente, se ha descrito la aplicación de técnicas de secuenciación masiva paralela que podrían incrementar en forma notoria la capacidad de detección de mutaciones y su grado de heteroplasmia³⁵. Por otro lado, nuestra paciente portadora de la mutación m.3243A>G presentó un haplogrupo mitocondrial D, que se ha descrito como de origen amerindio¹⁶. De forma interesante, este mismo haplogrupo fue identificado en otros pacientes chilenos con mutaciones en el mtDNA causantes de neuropatía óptica de Leber (MIM ID #535000)³⁶.

En conclusión, la identificación de la mutación m.3243A>G en una paciente chilena permitió diagnosticar genéticamente la presencia de MIDD, lo que llevó a una terapia apropiada para su diabetes. El uso de mtDNA de saliva para la detección de esta mutación parece ser adecuado, dado el mayor grado de heteroplasmia que ha presentado en relación al encontrado en leucocitos y su menor grado de invasividad con respecto a la biopsia muscular. Por otro lado, es recomendable el uso de PCR cuantitativa en la estimación del grado de heteroplasmia de las mutaciones conocidas del ADN mitocondrial.

Referencias

- Murphy R, S Ellard, AT Hattersley. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4 (4): 200-13.
- Mazzaccara C, Lafusco D, Liguori R, Ferrigno M, Galderisi A, Vitale D, et al. Mitochondrial diabetes in children: seek and you will find it. *Plos One* 2012; 7 (4): e34956.
- van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, et al. Mutation in mitochondrial tRNA (Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1992; 1 (5): 368-71.
- Vialettes BH, Paquis-Flucklinger V, Pelissier JF, Bendahan D, Narbonne H, Silvestre-Aillaud P, et al. Phenotypic expression of diabetes secondary to a T14709C mutation of mitochondrial DNA. Comparison with MIDD syndrome (A3243G mutation): a case report. *Diabetes Care* 1997; 20 (11): 1731-7.
- Kameoka K, Isotani H, Tanaka K, Azukari K, Fujimura Y, Shiota Y, et al. Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA (Lys) (8296A-->G) associated with diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245 (2): 523-7.
- Kirino Y, Yasukawa T, Marjavaara SK, Jacobs HT, Holt IJ, Watanabe K, et al. Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA^{Leu} (CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (6): 897-904.
- Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 2010; 53 (6): 1019-32.
- Murphy R, Turnbull DM, Walker M, Hattersley AT. Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet Med* 2008; 25 (4): 383-99.
- Olmos PR, Borzone GR, Olmos JP, Diez A, Santos JL, Serrano V, et al. Mitochondrial Diabetes and Deafness: Possible Dysfunction of Strial Marginal Cells of the Inner Ear. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 40 (2): 93-103.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290 (5806): 457-65.
- He Y, Wu J, Dressman DC, Iacobuzio-Donahue C, Markowitz SD, Velculescu VE, et al. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 2010; 464 (7288): 610-4.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10 (4): 506-13.
- Crispim D, Estivalet AA, Roisenberg I, Gross JL, Canani LH. Prevalence of 15 mitochondrial DNA mutations among type 2 diabetic patients with or without clinical characteristics of maternally inherited diabetes and deafness. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008; 52 (8): 1228-35.
- Singh R, Ellard S, Hattersley A, Harries LW. Rapid and sensitive real-time polymerase chain reaction method for detection and quantification of 3243A>G mitochondrial point mutation. *J Mol Diagn* 2006; 8 (2): 225-30.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-8.
- Moraga ML, Moraga ML, Rocco P, Miquel JF, Nervi F, Llop E, et al. Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent. *Am J Phys Anthropol* 2000; 113 (1): 19-29.
- Owen MR, E Doran, AP Halestrap. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000; 348 (3): 607-14.
- Maassen JA. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet* 2002; 115 (1): 66-70.
- Guillausseau PJ, Massin P, Dubois-LaForgue D, Timsit J, Virally M, Gin H, et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med* 2001; 134: 721-8.
- Vionnet N, Passa P, Froguel P. Prevalence of mitochondrial gene mutations in families with diabetes mellitus. *Lancet* 1993; 342 (8884): 1429-30.
- Hart LM, Lemkes HH, Heine RJ, Stolk RP, Feskens EJ, Jansen JJ, et al. Prevalence of maternally inherited diabetes and deafness in diabetic populations in The Netherlands. *Diabetologia* 1994; 37 (11): 1169-70.
- Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Yamanouchi T, et al. Mitochondrial diabetes mellitus: prevalence and clinical characterization of diabetes due to mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene mutation in Japanese patients. *Diabetologia* 1994; 37 (5): 504-10.
- Marriage B, Clandinin MT, Glerum DM. Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders. *J Am Diet Assoc* 2003; 103 (8): 29-38.
- Tarnopolsky MA. The mitochondrial cocktail: rationale

- for combined nutraceutical therapy in mitochondrial cytopathies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60 (13-14): 1561-7.
25. Schapira AHV. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012; 379: 1825-34.
 26. Wang G, Shimada E, Zhang J, Hong J, Smith G, Teitell MA, et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *PNAS* 2012; 109 (13): 4840-5.
 27. Schon EA, DiMauro S, Hirano M, Gilkerson RW. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Mol Med* 2010; 16 (6): 268-76.
 28. Sue CM, Quigley A, Katsabanis S, Kapsa R, Crimmins DS, Byrne E, et al. Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. *J Neurol Sci* 1998; 161 (1): 36-9.
 29. Frederiksen AL, Andersen PH, Kyvik KO, Jeppesen TD, Vissing J, Schwartz M. Tissue specific distribution of the 3243A->G mtDNA mutation. *J Med Genet* 2006; 43 (8): 671-7.
 30. Bodemer C, Rötig A, Rustin P, Cormier V, Niaudet P, Saudubray JM, et al. Hair and skin disorders as signs of mitochondrial disease. *Pediatrics* 1999; 103 (2): 428-33.
 31. Wood JM, Decker H, Hartmann H, Chavan B, Rokos H, Spencer JD, et al. Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. *FASEB J* 2009; 23 (7): 2065-75.
 32. Bendall KE, Macaulay VA, Sykes BC. Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. *Am J Hum Genet* 1997; 61 (6): 1303-8.
 33. Frederiksen AL, Andersen PH, Kyvik KO, Jeppesen TD, Vissing J, Schwartz M. Tissue specific distribution of the 3243A->G mtDNA mutation. *J Med Genet* 2006; 43 (8): 671-7.
 34. de Laat P, Koene S, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ, Janssen MC, Smeitink JA. Clinical features and heteroplasmia in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. *J Inher Metab Dis* 2012 Mar 9.
 35. Tang S, Huang T. Characterization of mitochondrial DNA heteroplasmia using a parallel sequencing system. *Biotechniques* 2010; 48 (4): 287-96.
 36. Luco C, Schweitzer M, Repetto G, Lobos C, Fadic R. mtDNA mutations in Chilean patients with optic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71 (5): 707.