



Defectos de la fosforilación oxidativa de presentación neonatal: revisión casuística

V. Rebage Moisés^a, S. Rite Gracia^a, J. López-Pisón^b, M. Muñoz Albillos^a, E. Aisa Pardo^a, J.A. Giménez Más^c, J. Arenas Barbero^d, J. Montoya Vilarroya^e, A. Marco Tello^a, M.I. Salazar García-Blanco^f y A. Baldellou Vázquez^g

^aUnidad Neonatal. ^bSección de Neuropediatría. ^cServicio de Anatomía Patológica. Hospital Miguel Servet. Zaragoza. ^dCentro de Investigación. Hospital 12 de Octubre. Madrid. ^eDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. ^fLaboratorio de Bioquímica. ^gUnidad de Metabolismo. Hospital Miguel Servet. de Zaragoza.

(An Esp Pediatr 2000; 52: 251-257)

Objetivos

Definir el síndrome de déficit de la fosforilación oxidativa neonatal, en función de su incidencia, características perinatales, clínicas, bioquímicas y genéticas.

Material y métodos

Se revisan los casos de 9 recién nacidos catalogados como déficit de la fosforilación oxidativa en los últimos 8 años en nuestro centro, mediante valoración clínica, metabólica, histopatológica, enzimática y molecular, además de otras evaluaciones. El diagnóstico se estableció en función del déficit enzimático de la cadena respiratoria, asociado a alteraciones del ADNmt en un caso, y en cinco a anomalías ultraestructurales mitocondriales.

Resultados

La incidencia fue de 1/3.555 y de 1/832 recién nacidos ingresados en nuestra unidad neonatal. Cuatro tenían antecedentes familiares positivos, y dos polihidramnios. La mayoría (8/9) fueron recién nacidos a término, de embarazo y parto normales, con Apgar y somatometría también normales. La clínica se inició en el período neonatal inmediato, como sufrimiento neurológico agudo en la mayoría. La evolución fue grave (5 fallecieron y 4 sobreviven gravemente afectados). Todos presentaban un fenotipo clínico de encefalopatía grave precoz, asociada a dismorfia, hipotonía, alteraciones neurosensoriales, atrofia y disgenesia cerebral, electroencefalograma patológico, y en 5 de ellos, además, a anomalías viscerales (principalmente cardiopatía). La alteración bioquímica más frecuente fue un aumento significativo del cociente lactato/piruvato. Cinco pacientes presentaron alteraciones ultraestructurales mitocondriales en la biopsia muscular pero la tinción de Cox no resultó claramente patológica en ningún caso. Tres tenían un déficit del complejo IV, tres de I-IV, dos del I y uno del I-III-IV. Sólo en un paciente se detectaron delecciones múltiples del ADNmt.

Conclusiones

Se trata de enfermedades frecuentes y graves, de comienzo prenatal con escasa repercusión fetal, fenotipo clínico homogéneo con afectación predominante del SNC y extraneurológica variable, y perfil bioquímico inconstante. El diagnóstico exige el estudio enzimático de la cadena respiratoria en todos los casos sospechosos.

Palabras clave:

Mitocondria. Recién nacido. Defectos de la fosforilación oxidativa. Encefalopatía mitocondrial.

OXIDATIVE PHOSPHORILATION DEFECTS WITH NEONATAL PRESENTATION: REVIEW OF OUR EXPERIENCE

Objetives

To define the oxidative phosphorylation deficit syndrome in the neonatal in terms of incidence and clinical, biochemical and genetic features.

Material and methods

We report 9 newborns diagnosed as oxidative phosphorylation deficit during the last 8 years in our hospital by means of clinical, metabolic, pathological and molecular studies, among other evaluations. The diagnosis was established based on enzymatic deficit of the respiratory chain, associated with alterations in the mtDNA in one case, and with mitochondrial ultrastructural anomalies in 5 cases.

Results

There was an incidence of 1/3.555 newborns and 1/832 newborns admitted in our Neonatal Unit. In four of them there were familial antecedents and polihidramnios in two. Most of them, 8 out of 9, were born at term after a normal pregnancy and delivery, with normal Apgar sco-

Correspondencia: Dr. V. Rebage Moisés. Princesa, 11-13, 3.º A. 50005 Zaragoza.

Recibido en septiembre de 1999.

Aceptado para su publicación en enero de 2000.

re and auxological examination. Symptomatology started immediately at the neonatal period as acute neurological damage in most of them. There was a severe evolution as 5 children died and 4 survived with severe damage. All of them had the classical phenotype of early severe encefalopathy, associated with dismorphic features, hypotonia, neurosensorial defects, brain dysgenesis and atrophy, anomalies in the EEG and in 5 of them there were also systemic anomalies, mainly cardiopathy. The most frequent biochemical alteration was a significative increment of the quotient lactate/piruvate. Five patients presented ultrastructural alterations of the mitochondria in the muscle biopsy but Cox stain was not positive in any case. Three cases has a deficit of the complex IV, e of the complex I-IV, 2 of the complex I and one the complex I-III-IV. Only one patient had multiple deletions in the mtDNA.

Conclusions

Oxidative phosphorylation deficit are frequent and severe diseases of prenatal onset with limited fetal effects, homogeneous clinical phenotype with frequent damage of the central nervous system and variable extraneurological alteration and inconsistent biochemical pattern. Enzymatic studies are needed for making the diagnosis in all suspected cases,

INTRODUCCIÓN

Los defectos de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) son afecciones multisistémicas de una extraordinaria complejidad en su expresión clínica, debido principalmente a la dualidad genética particular de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial¹⁻⁴. Sin embargo, en el período neonatal suelen configurar formas clínicas graves mejor definidas, con afectación predominante del sistema nervioso central^{5,6}. Otras veces, pasada la época neonatal y de lactante, pueden evolucionar hacia síndromes clínicos específicos^{7,8}.

El objetivo de esta revisión es definir las características del síndrome de déficit OXPHOS neonatal en nuestro medio, en función de su incidencia, datos perinatales, hallazgos clínicos, bioquímicos y genéticos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se revisan las historias clínicas de nueve recién nacidos catalogados de déficit OXPHOS desde 1990 hasta 1998, en la Unidad Neonatal del Hospital Miguel Servet de Zaragoza. Se realizó valoración clínica, bioquímica, histopatológica, enzimática y molecular. Se practicaron, además, pruebas de neuroimagen y EEG, se llevó a cabo una evaluación neurológica, cardiológica, oftalmológica, de función renal y hepática, y se determinaron las enzimas musculares, para comprobar la extensión de la enfermedad.

El diagnóstico se hizo mediante demostración del déficit enzimático de la cadena respiratoria, asociado a anomalía del ADNmt en un paciente, y en otros cinco a alteraciones ultraestructurales mitocondriales^{9,10}.

El estudio bioquímico incluye determinaciones basales en plasma de ácido láctico y pirúvico, dosificación de cuerpos cetónicos y estudio de relaciones molares, así como cromatografía de aminoácidos en sangre y orina, perfil de ácidos orgánicos en orina, en seis casos, y lactato en LCR en siete casos.

Las muestras de biopsia muscular se obtuvieron del cuádriceps mediante punción abierta con anestesia local, para su estudio morfológico e histoquímico con tinción especial para la citocromo C oxidasa¹¹.

El análisis espectrofotométrico de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria se realizó sobre muestras congeladas de músculo, de acuerdo con los métodos publicados anteriormente¹².

El ADNmt muscular fue extraído y analizado por el procedimiento de Southern blot¹³. En un paciente el estudio se realizó en sangre periférica.

Se realizó valoración estadística mediante la comparación de medias de los resultados bioquímicos con una población de control (U de Mann-Whitney).

RESULTADOS

Incidencia (fig. 1)

De 1990 a 1998, se diagnosticaron 35 casos neonatales de errores congénitos del metabolismo sobre un total de 32.000 recién nacidos vivos, lo que supone una incidencia de 1/914 neonatos. De ellos, 9 fueron defectos OXPHOS, lo que equivale a 1/3.555 recién nacidos. En

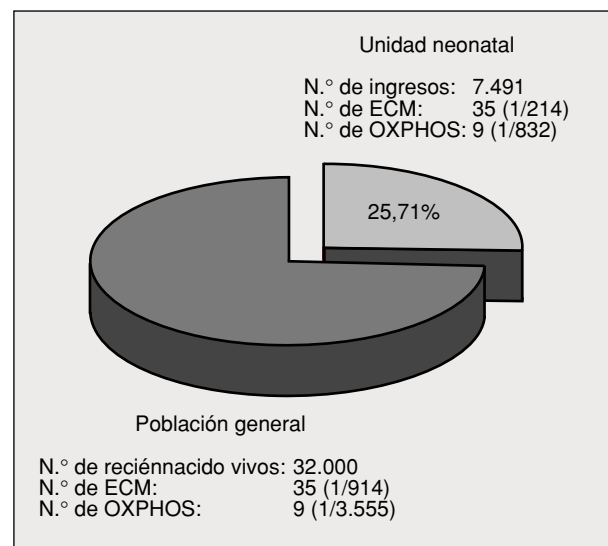


Figura 1. Incidencia de ECM y de los defectos de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) en nuestra población general y unidad neonatal (1980-1998).

nuestra unidad neonatal, esto significa un caso de metabopatía por cada 214 ingresos, y un defecto OXPHOS por cada 832 recién nacidos ingresados.

Datos perinatales (tabla 1)

La gran mayoría nacieron a término de embarazo y parto normales, con puntuación Apgar y somatometría también normales. En dos casos se constató polihidramnios. Sólo un paciente presentó sufrimiento fetal y retraso de crecimiento intrauterino. El peso, la talla y el perímetro cefálico eran equiparables a los estándares normales de referencia de los niños de nuestra región, con una desviación estándar que los situaba dentro de los percentiles normales.

Datos clínicos (tabla 2)

Seis eran varones y tres hembras. Existían antecedentes familiares positivos en 4 pacientes (consanguinidad parental en tres, y uno tenía un hermano afectado). La edad media de aparición de la sintomatología fue en los primeros días de vida (uno ingresó a los 30 días aunque los síntomas existían desde el nacimiento). Cinco ingresaron por cuadro neurológico agudo con crisis convulsivas epilépticas desde las primeras horas de vida, y en los restantes, aunque las causas eran aparentemente extraneurológicas (hipoglucemia, falta de medro, sospecha de sepsis, dismorfia), todos presentaban también una encefalopatía evidente.

La evolución ha sido particularmente grave. Cinco pacientes fallecieron alrededor de los 7 meses por trastornos cardíacos y respiratorios, y uno de muerte súbita. Tres sobreviven con una encefalopatía crónica grave.

Fenotipo clínico (tabla 3)

Todos presentaban, desde el nacimiento, un fenotipo clínico de encefalopatía grave, no constatándose en ningún caso fenotipo de miopatía aislada. La mayoría presentaba rasgos dismórficos, 4 hipotonía, 3 alteraciones sensoriales de atrofia óptica y sordera, 4 disgenesia del cuerpo calloso (DCC) y atrofia cerebral en la neuroimagen (fig. 2), y 6 un trazado EEG de mal pronóstico. En 5 casos se comprobaron alteraciones extraneurológicas o viscerales: 5 cardiopatías (2 trastornos de conducción, una miocardiopatía hipertrófica y 2 estructurales), 2 hepatopatías con aumento de transaminasas y GGT, una catarata, un hiperparatiroidismo, 4 retrasos del desarrollo y una trombopenia aislada.

Fenotipo bioquímico (tabla 4)

Sólo un caso presentó hiperlactacidemia evidente, pero el cociente lactato/piruvato (L/P) se encontró elevado de manera significativa en relación con la población neonatal de control ($p < 0,01$), a expensas de los valores del piruvato inferiores a los controles con diferencias también significativas ($p < 0,05$). Los cuerpos cetónicos

TABLA 1. Datos perinatales

	Pacientes (n = 9)	Valores de referencia
Gestación		
Duración	38,93 ± 2,03 (36-41) días	
Alteraciones	Polihidramnios (n = 2)	
S. fetal		
	n = 1 (11,11%)	
PEG/CIR		
	n = 1 (11,11%)	
Parto		
	Eutócico (n = 6) (66,66%)	
Apgar		
	-1 min: 8,14 ± 1,21 (6-9)	
	-5 min: 9,43 ± 0,98 (8-10)	
Peso (kg)		
	V: 3,06 ± 0,56 (SDS -0,78)	3,25 ± 0,37
	M: 3,13 ± 0,28 (SDS +0,46)	3,11 ± 0,32
Talla (cm)		
	V: 48,50 ± 1,73 (SDS -1,31)	50,51 ± 1,53
	M: 49,00 ± 1,73 (SDS -0,57)	49,86 ± 1,49
PC (cm)		
	V: 34,87 ± 2,53 (SDS +0,06)	34,68 ± 1,12
	M: 34,67 ± 0,57 (SDS +0,69)	33,94 ± 1,04

Valores de referencia: estándares de normalidad en niños aragoneses. SDS: (medida real - medida teórica) / desviación estándar.

TABLA 2. Datos clínicos

Sexo	
V (n = 6)	
M (n = 3)	
Historia familiar (+) (n = 4) (44,44%)	
Edad de inicio (d) 5,44 ± 10,78 (1-30)	
Motivo de ingreso	
Sufrimiento neurológico + convulsiones (n = 5)	
Sospecha de sepsis (n = 1)	
Falta de medro (n = 1)	
Hipoglucemia + inercia (n = 1)	
Síndrome polimalformativo (n = 1)	
Evolución	
5 fallecimientos (7,00 ± 4,85 meses)	
4 sobreviven con encefalopatía crónica 1,95 ± 0,20 años)	

TABLA 3. Fenotipos clínicos

Afectación del SNC (n = 9)	Extraneurológica o visceral (n = 5)
Encefalopatía n = 9	Cardiopatía (n = 5)
Dismorfias n = 8	Miocardiopatía n = 1
Hipotonía n = 4	Arritmia n = 2
Alt. neurosens. n = 3	Estructural n = 2
Neuroimagen (n = 9)	Hepatopatía n = 2
DCC + atrofia n = 4	Catarata n = 1
EEG (n = 8)	Hipoparatiroidismo n = 1
B-S n = 2	Retraso peso/talla n = 4
Multifocal +	Trombopenia n = 1
paroxístico n = 3	
Hipovoltado n = 1	

eran normales y similares a los controles, y el amonio y CK presentaron también valores significativos. En 2 casos había afectación de la función hepática, en otros 2 se observó lactorraquia y en tres, proteinorraquia elevada. La función renal era normal en todos, y la cromatografía de los ácidos orgánicos en orina (CAO) era indicativo de esta patología en el 50% de los casos investigados.



Figura 2. TAC cerebral de una paciente fallecida, con signos de disgenesia del cuerpo calloso (DCC) y atrofia cerebral.

Estudio muscular (tabla 5)

Cinco pacientes presentaron alteraciones ultraestructurales con aumento difuso del número y tamaño de las mitocondrias, que estaban desestructuradas con tume-

facción, vacuolización y áreas subsarcólemicas sin organelas. Asimismo, presentaban una disposición anómala de las crestas mitocondriales (fig. 3). Sin embargo, la tinción de Cox no resultó claramente patológica en ninguno de los casos, incluso en los déficit IV. El estudio enzimático identificó 3 déficit de la actividad del complejo IV, 3 déficit combinados I-IV, 2 del complejo I, y un déficit múltiple I-III-IV.

TABLA 4. Datos bioquímicos

	Pacientes (n = 9)	Controles (n = 11)	p*
Plasma			
Lactato (mg/dl)	32,48 ± 24,48	22,88 ± 8,62	NS
Piruvato (mg/dl)	0,41 ± 0,27	0,71 ± 0,15	< 0,05
Lactato/piruvato	89,73 ± 50,33	33,68 ± 7,74	< 0,01
3-B-OHB (mg/dl)	3,42 ± 1,40	3,78 ± 1,78	NS
AcAc (mg/dl)	1,61 ± 0,27	1,74 ± 0,87	NS
3-B-OHB/AcAc	2,08 ± 0,60	2,60 ± 1,60	NS
Amonio (µg/dl)	87,58 ± 29,15	60,79 ± 18,24	< 0,05
CK (U/l)	449,86 ± 248,72	147,10 ± 79,72	< 0,01
F. renal	0/9		
F. hepática	2/9 (22,22%)		
Sobrecarga de glucosa	0/2		
LCR			
Lactato (mg/dl)	2/7		
Proteinorraquia (g/l)	3/7		
Orina			
CAO	3/6 (50%)		

*Valor de la significación estadística tras comparación de medias (U de Mann-Whitney).

El estudio del ADNmt en músculo por procedimiento de Southern blot¹³ detectó sólo en uno de los pacientes alteraciones en forma de deleciones múltiples de distinto tamaño y en baja proporción (fig. 4).

TABLA 5. Biopsia muscular

	(n = 9)
Alteraciones morfológicas	n = 5
Reacción histoquímica	
Tinción de Cox positiva	n = 9
Defecto enzimático	
Déficit del complejo I	n = 2
Déficit del complejo IV	n = 3
Déficit del complejo I-IV	n = 3
Déficit del complejo I-III-IV	n = 1
Anomalías del ADNmt	
Sangre	0/1
Músculo	1/8 (deleciones múltiples)



Figura 3. Alteraciones mitocondriales ultraestructurales en uno de los casos.



Figura 4. Delecciones múltiples del ADNmt de distinto tamaño y en baja proporción, detectadas en un único paciente.

DISCUSIÓN

En nuestro medio, los defectos OXPHOS neonatales parecen tener una mayor incidencia de la que podría deducirse por los casos comunicados en la bibliografía^{5,6}. La falta de diagnóstico podría deberse al rápido curso evolutivo de estas afecciones, a las dificultades de interpretación de una acidosis láctica en un recién nacido gravemente enfermo o a la dificultad de realizar análisis específicos en el tejido correcto, y también a la existencia de alteraciones mínimas en las mitocondrias, no detectables por métodos bioquímicos^{5,10}.

Se tratan de formas especialmente graves, ya que 5 neonatos fallecieron, principalmente, por miocardiopatía hipoxicoisquémica y los que sobreviven están gravemente afectados. Esta evolución es también similar a

la de la bibliografía^{5,6}, donde la evolución de los casos neonatales suele ser fatal, salvo las formas benignas por déficit de Cox que pueden incluso regresar totalmente¹⁴.

La evidencia clínica en todos los pacientes de encefalopatía, desde el nacimiento, y en gran parte de ellos de dismorfias faciales, malformaciones viscerales y disgenesia cerebral, sugiere un comienzo prenatal de estas afecciones^{7,15}. No obstante, la repercusión fetal ha sido mínima, ya que todos los pacientes fueron normales al nacer (sólo uno presentó bajo peso y sufrimiento fetal), alterándose a continuación la función OXPHOS, lo que no es fácil de explicar. Probablemente, los sustratos que pasan de la madre al feto a través de la placenta sean suficientes para mantener la síntesis de ATP necesaria para sus funciones vitales básicas¹⁶.

A pesar de la gran variabilidad de la expresión clínica de estas afecciones¹⁷, nuestros pacientes presentaban un fenotipo clínico bastante homogéneo con afectación predominante del SNC o encefalopatía. Cinco pueden catalogarse como formas multisistémicas graves, y cuatro son encefalopatías que sobreviven hasta el momento sin manifestaciones extraneurológicas. Una de ellas ha evolucionado hacia un síndrome de Alpers, y las restantes permanecen sin catalogar sindrónicamente. Esto no debe extrañar ya que un 50% de los casos, según la bibliografía, no se corresponde con síndromes específicos. Asimismo, menos del 20% de las mitocondriopatías estudiadas en el Hospital des Enfants-Malades de París se pueden encuadrar en uno de ellos⁸.

Las alteraciones metabólicas que reflejan el estado de oxidorreducción celular fueron inconstantes, siendo el

aumento de la relación L/P el hallazgo más frecuente del estudio. La hiperlactacidemia, marcador útil de enfermedad de la cadena respiratoria¹⁸, únicamente se detectó en un paciente. Como ha sido confirmado en otros estudios, el aumento de la relación L/P al relacionarse con un déficit de la cadena respiratoria ayuda al diagnóstico^{1,4,6}. Esta elevación se producía a expensas de los valores del piruvato que eran inferiores a los de control, con diferencias también significativas, lo que refleja probablemente la complejidad de esta vía metabólica y la necesidad de mantener un adecuado equilibrio oxidativo intramitocondrial.

El lactato en LCR se encontró elevado en 2 pacientes con encefalopatía destructiva con valores normales en sangre, hecho confirmado también por otros autores¹⁹⁻²¹, lo que refleja la importancia de esta determinación en la evaluación diagnóstica de estas enfermedades²².

El perfil de los ácidos orgánicos en orina orientó el diagnóstico en 3 de 6 pacientes, lo que obliga a su evaluación. El amonio y la CPK mostraron también elevaciones moderadamente significativas ($p < 0,05$), aunque el valor de la actividad creatinasa suele ser incierto en los procesos metabólicos, especialmente en estas afecciones¹⁸. La única excepción fue un paciente con un aumento próximo a 1.000 U/l afectado de encefalomiopatía, que falleció al mes de vida por una taquicardia paroxística supraventricular, con signos de miocardiopatía isquémica y shock cardiogénico.

Las anomalías ultraestructurales de las mitocondrias fueron el hallazgo más frecuente en las biopsias musculares, como se refiere en otros estudios¹⁰, aunque no se comprobaron en todos los pacientes con defecto OXPHOS confirmado. Llamaba la atención la ausencia de fibras citocromo oxidasa negativas, incluso en los déficit del complejo IV, considerada como importante criterio diagnóstico de enfermedad mitocondrial¹⁰. Esta positividad podría explicarse por la presencia de una actividad enzimática residual y la naturaleza heteroplásmica del ADNmt²³.

Sólo en un paciente se detectaron deleciones en el ADNmt, proporción baja que también se refleja en otros estudios de casos neonatales⁵. Alternativamente, en estas formas neonatales, se han descrito pocas alteraciones del ADNmt, por lo general causadas por mutaciones nucleares autosómicas recesivas^{5,13,24}. Esto viene apoyado por el alto índice de casos familiares y consanguinidad parental, así como por recientes estudios sobre fibroblastos con déficit de la cadena respiratoria e identificación de mutaciones génicas de este origen^{17,25}.

Por todo ello, el diagnóstico prenatal en estas afecciones suele ser un problema complejo y difícil, lo que obliga a ser prudentes en cuanto a la utilización de la enzimología y estudios moleculares en células del líquido amniótico y coriales, y su correlación con la clínica futura del niño²⁶⁻²⁸.

En conclusión el síndrome de déficit OXPHOS neonatal puede definirse como:

1. Enfermedades frecuentes dentro de los trastornos hereditarios del metabolismo y especialmente graves, siendo causa importante de mortalidad y morbilidad neonatal, sobre todo neurológica.

2. Se trata de afecciones de comienzo prenatal con escasa repercusión fetal.

3. El fenotipo clínico es básicamente homogéneo, con afectación predominante del SNC y extraneurológica variable.

4. Su perfil bioquímico es inconstante; puede ayudar al diagnóstico el aumento de la relación L/P.

5. El diagnóstico exige el estudio enzimático de la cadena respiratoria en todos los casos sospechosos, debiendo basarse la sospecha clínica en la presencia de encefalopatía grave y precoz, especialmente si va asociada a manifestaciones clínicas viscerales o a una hiperlactacidemia persistente y significativa.

6. Creemos que se debe prestar más atención a esta patología y considerarla como causa importante de encefalopatía prenatal, debiéndose adoptar una actitud menos conservadora en la práctica de biopsia muscular, único medio en la actualidad para establecer el diagnóstico definitivo. Asimismo, es fundamental en estas formas neonatales la rapidez de la actuación médica para identificar la causa y asesorar convenientemente a los padres.

BIBLIOGRAFÍA

- Jackson MJ, Schaefer JA, Johnson MA, Morris AAM, Turnbull DM, Bindoff LA. Presentation and clinical investigation of mitochondrial respiratory chain disease. A study of 51 patients. *Brain* 1995; 118: 339-357.
- DiMauro S, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch Neurol* 1993; 50: 1197-1208.
- Munnich A, Rustin P, Rötig A, Chretien D, Bonnefont JP, Nuttin C et al. Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 448-455.
- Robinson BH, De Meirleir L, Glerun N, Sherwood G, Becker L. Clinical presentation of mitochondrial respiratory chain defects in NADH-coenzyme Q reductase and cytochrome oxidase: clues to pathogenesis of Leigh disease. *J Pediatr* 1987; 110: 216-222.
- Lombes A, Romero NB, Touati G, Frachon P, Cheval MA, Giraud M et al. Clinical and molecular heterogeneity of cytochrome C oxidase deficiency in the newborn. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 286-289.
- Caruso U, Adami A, Bertini E, Burlina AB, Carnevale F, Cerone R et al. Respiratory chain and pyruvate metabolism defects: Italian collaborative survey on 72 patients. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 143-148.
- García Silva MT, Bonnefont JP, Rötig A, Romero N, Vassault A, Colonna M et al. Las enfermedades de la cadena respiratoria en la infancia. Presentación clínica y diagnóstico. *An Esp Pediatr* 1989; 5: 421-430.

8. Chabrol B, Mancinu J, Livet MO, Pinsard N. Les presentations neuromusculaires des maladies mitochondriales. *Arch Fr Pediatr* 1992; 49: 295-300.
9. Birch-Machin MA, Jackson MA, Singh Kler R, Turnbull DM. Study of skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *Methods Toxicol* 1993; 2: 51-69.
10. Tulinius MH, Holme E, Kristiansson B, Larsson NH, Oldfors A. Mitochondrial encephalomyopathies in childhood. I. Biochemical and morphological investigations. *J Pediatr* 1991; 119: 242-250.
11. Johnson MA, Bindoff LA, Turnbull DM. Cytochrome C oxidase activity in single muscle fibers: assay techniques and diagnostic applications. *Ann Neurol* 1993; 33: 28-35.
12. Lombes A, Nakase H, Trischtler HJ, Kadenbach B, Bonilla E, De Vivo DC et al. Biochemical and molecular analysis of cytochrome C oxidase deficiency in Leighs syndrome. *Neurology* 1991; 41: 491-498.
13. Guirado Giménez F, Montoya Vilarroya J, Oliván del Cacho MJ, Playán Ariso A, Alcaine Villarroya MJ, Rábano Rodríguez A et al. Paciente con síndrome de Pearson y de Kearns-Sayre y la delección común de 4.9 Kb del ADN mitocondrial en sangre. *An Esp Pediatr* 1998; 49: 510-512.
14. Zeviani M, Petron P, Servidei S. Benign reversible muscle cytochrome C oxidase deficiency. A second case. *Neurology* 1987; 37: 64-67.
15. Ribes A, Rodés M, Briones P. Enfermedades mitocondriales. En: *Del cromosoma al gen*. Barcelona: Institut d'Estudis de la Diputació de Barcelona, 1995; 277-285.
16. Pridjian G. Fetomaternal interactions: placental physiology and its role as a gobetween. En: Avery GB, Flether MA, MacDonald MG, editores. Filadelfia: JB Lippincott Company, 1994; 126-143.
17. Von Kleist-Retzow JCH, Cormier-Daire V, De Lonlay P, Parfait B, Chretien D, Rustin P et al. A high rate (20-30%) of parenteral consanguinity in cytochrome-oxidase deficiency. *Am J Human Genet* 1998; 63: 428-435.
18. Petty RKH, Harding AE, Morgan-Hughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain* 1986; 109: 915-938.
19. Goto Y, Horai S, Matsuoka T, Koga Y, Nihei K, Kobayashi M et al. Mitochondrial Myopathy. *Brain* 1986; 109: 915-938.
20. Trijbels JMF, Scholte HR, Ruitenbeek W, Sengers RCA, Jansen AJM, Busch HFM. Problems with the biochemical diagnosis in mitochondrial encephalo-myopathies (review). *Eur J Pediatr* 1993; 152: 178-184.
21. Ciafolini E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Sulvestri G, Hirano M et al. MELAS: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *Ann Neurol* 1992; 31: 391-398.
22. Stacpoole PW, Bunch ST, Neiberger RE, Perkins LA, Quisling R, Hutson AD et al. The importance of cerebrospinal fluid lactate in the evaluation of congenital lactic acidosis. *J Pediatr* 1999; 134: 99-102.
23. Arenas J, Cabello A, Campos Y. Aspectos bioquímicos e histoenzimáticos de las miopatías mitocondriales. *Rev Neurol* 1994; 22: 189-191.
24. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 1175-1212.
25. Van den Heuvel L, Ruitenbeek W, Smeets R, Gelman-Kohan Z, Elpeleg O, Loeffen J et al. Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-KD (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 262-268.
26. Bourgeron T, Chretien D, Amati P, Rötig A, Munnich A. Expression of respiratory chain deficiencies in human cultures. *Neuromuscul Disord* 1993; 3: 605-608.
27. Wanders RJ, Wijburg FA, Ruitenbeek W, Sengers RC, Bakkeren JA et al. Prenatal diagnosis of systemic disorders of the respiratory chain by cultured amniocytes and chorionic villus fibroblast by studied formation of lactate and pyruvate from glucose. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 84-91.
28. Munnich A, Sadubray JM. Les cytopathies mitochondriales. *Arch Fr Pediatr* 1991; 48: 163-166.