



ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Caso Clínico: Paciente con diabetes e hipoacusia neurosensorial

PILAR CARRASCO SALAS. Centro de Genética Molecular Genetaq, Málaga.

GEMA FERNÁNDEZ GONZÁLEZ. Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva.

JUAN LÓPEZ SILES. Centro de Genética Molecular Genetaq, Málaga.

Palabras clave: Cadena respiratoria, ADN nuclear, ADN mitocondrial, enfermedad mitocondrial.

CASO CLÍNICO

Mujer de 55 años con índice de masa corporal bajo (22 kg/m²) que acude a urgencias por disnea a mínimos esfuerzos. Como antecedentes personales destaca una hipoacusia neurosensorial severa del oído izquierdo y diabetes tipo II en tratamiento desde hace 10 años.

Llama la atención la presencia de sordera familiar: madre e hijo también están afectados. El hijo con sordera presenta además un síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome caracterizado por taquicardias supraventriculares y anomalías en el electrocardiograma. Un hermano y su madre también son diabéticos.

En la analítica se observa un aumento de lactato (91 mg/dL, valores de referencia 4 - 20 mg/dL) y una glucosa de 169 mg/dL. El resto de parámetros analíticos estudiados se encuentra dentro de los valores de referencia, incluidas las troponinas. En la radiografía de tórax se aprecia una ligera cardiomegalia, con aumento de trama broncovascular. La ecocardiografía revela disfunción sistólica, con una fracción de inyección del ventrículo izquierdo (FEVI) muy severamente deprimido por hipoquinesia generalizada y un llenado ventricular con patrón restrictivo.

Con estos datos, se establece el diagnóstico de miocardiopatía dilatada y se instaura tratamiento. ¿Podría existir alguna relación entre la miocardiopatía, la diabetes y la hipoacusia que presenta la paciente? Dados los antecedentes familiares de sordera y diabetes ¿existe algún cuadro clínico hereditario que englobe estas alteraciones? ¿Puede ofrecerse a la familia algún estudio genético?

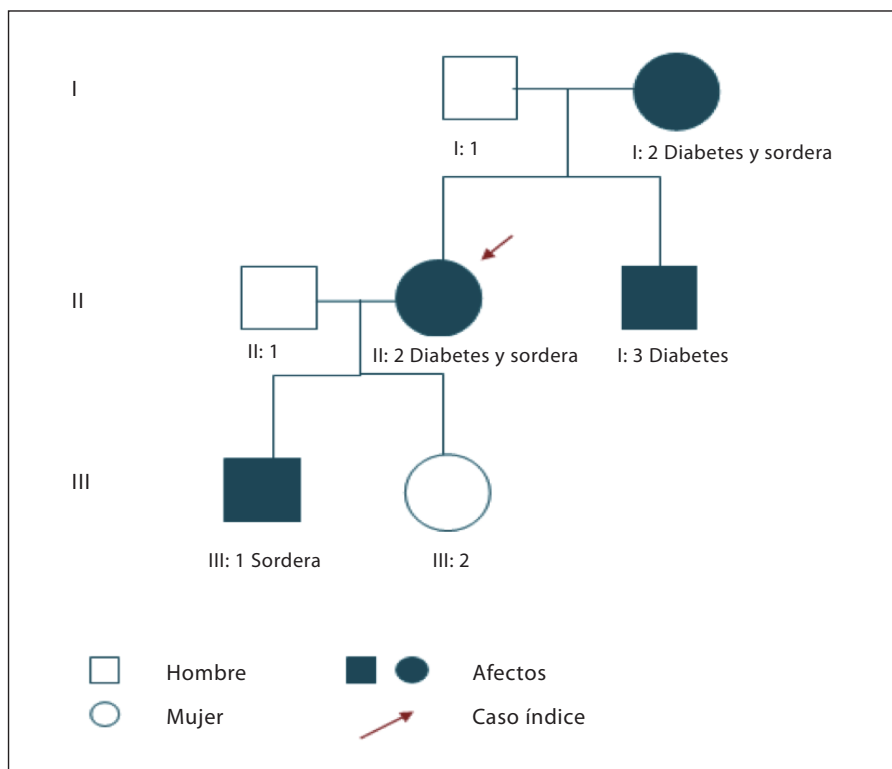


Figura 1. Árbol genealógico del caso índice.

1. INTRODUCCIÓN

El término de enfermedades mitocondriales engloba a un grupo heterogéneo de alteraciones que se caracterizan por la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial.

La cadena respiratoria presente en las mitocondrias está compuesta por cinco complejos enzimáticos y dos moléculas que actúan a modo de nexo de unión. La función principal de esta cadena es regenerar el poder reductor de la célula y producir energía a partir de la oxidación aeróbica de los sustratos.

Los azúcares, ácidos grasos y aminoácidos cuando son degradados (oxidados) reducen cofactores celulares como el NAD y el FAD. Para regenerar estos cofactores y sintetizar ATP, se produce entre los complejos enzimáticos que forman la cadena respiratoria una transferencia de electrones desde las moléculas reducidas hasta el aceptor final, que en los organismos aerobios es el oxígeno. La energía liberada por la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, es usada para el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Este bombeo produce un gradiente de protones, y como consecuencia una desigualdad de cargas y de pH a ambos lados de la membrana interna. La fuerza protón-motriz entre los dos compartimentos genera un flujo pasivo de H⁺ hacia la matriz a través de la ATP asa, sintetizándose ATP (este proceso se puede consultar en: <http://www.cell.com/cms/attachment/606824/4828776>).

Dada la gran mortalidad infantil de estos trastornos, las cifras de prevalencia no son exactas, aunque se estima en torno al 1 por 15 000 a los 14 años.

Las patologías mitocondriales, pueden afectar a un único órgano (como el ojo, en la neuropatía óptica de Leber), pero en general se presentan como enfermedades progresivas y multisistémicas, que afectan a tejidos con alta demanda energética, como el músculo, el sistema nervioso central, los órganos endocrinos o la retina. Los rasgos clínicos típicos de las enfermedades mitocondriales incluyen: ptosis, oftalmoplejia externa, miopatía proximal e intolerancia al ejercicio, miocardiopatía, sordera neurosensorial, retinopatía pigmentaria, encefalopatía, convulsiones, migraña y diabetes mellitus.

Debe sospecharse un defecto de la cadena respiratoria mitocondrial en cualquier paciente que presente una asociación inexplicable de dos o más síntomas, con un curso clínico rápidamente progresivo y con afectación del sistema nervioso central en los estados avanzados de la misma.

2. GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

La mayoría de polipéptidos que forman los complejos de la cadena respiratoria están codificados por ADN nuclear (ADNn). El ADN contenido en las mitocondrias, conocido como ADN mitocondrial (ADNmt), codifica 13 subunidades esenciales (y los ARNs necesarios para su expresión, que también son esenciales).

Dado que en la formación de la cadena respiratoria participan los dos sistemas genéticos de la célula, las enfermedades mitocondriales pueden estar ocasionadas por mutaciones en genes nucleares o por mutaciones en el ADNmt. Éste último, aunque codifica pocas proteínas de la cadena respiratoria, es responsable de un número elevado de las deficiencias de actividad de la misma.

2.1. Enfermedades por mutaciones en el ADNn

El ADNn contiene al menos 80 genes codificantes de las subunidades de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria, además de genes implicados en la regulación de la expresión del ADNmt (comunicación intergenómica), en el ensamblaje de dichos complejos, en la maduración de proteínas sintetizadas en el citoplasma, etc. Cualquier mutación en estos genes puede dar lugar a enfermedades mitocondriales (tabla 1).

TIPO DE ALTERACIÓN	GENES	HERENCIA
Mutaciones en genes que codifican subunidades que forman parte de distintos complejos de la cadena respiratoria	<i>SURF1, SCO1, SCO2, COX10, COX15, BCS1L</i>	Autosómica recesiva
Mutaciones en genes implicados en la comunicación intergenómica	<i>ANT1, POLG1, TP, DGUK, TK2, EGF1, PSU1,</i>	Autosómica recesiva Autosómica dominante
Mutaciones en genes que regulan componentes lipídicos de las membranas mitocondriales	<i>G4.5</i>	Ligada al X
Mutaciones en genes que regulan la fusión, fisión y movilidad mitocondrial	<i>KIF5A, OPA1, MNF2</i>	Autosómica dominante

Tabla 1. Clasificación genética de las enfermedades mitocondriales por mutaciones en el ADNn.

2.2. Enfermedades por mutaciones en el ADNmt

El ADNmt humano es una molécula circular cerrada de doble cadena de 16 569 pares de bases (figura 2). Contiene 37 genes que codifican proteínas de la cadena respiratoria y moléculas de ARN transferente (ARNt) y de ARN ribosómico (ARNr). A diferencia del ADNn, el ADNmt es muy eficiente, siendo un 93 % de su secuencia codificante. No contiene intrones y algunos genes tienen regiones solapantes. El ADNmt sólo contiene una región significativa no codificante: la región *D-loop*, que contiene el lugar donde comienza la replicación del ADNmt.

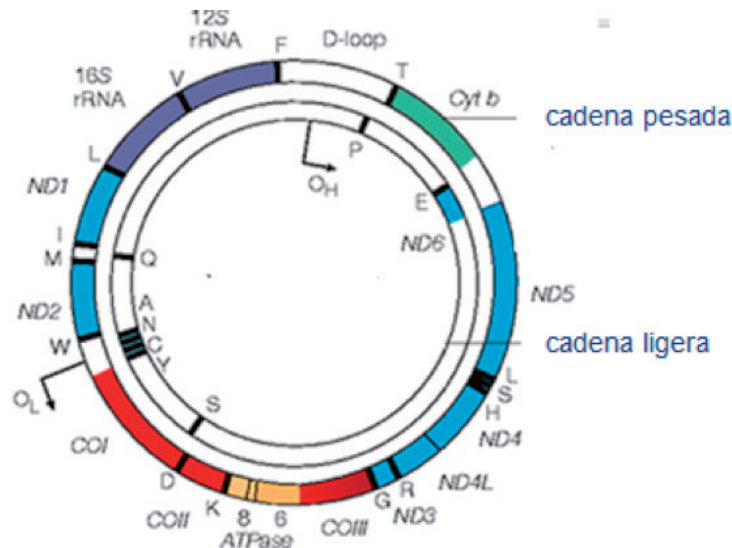


Figura 2. Esquema del genoma mitocondrial humano. Cada color representa los genes que codifican subunidades del mismo complejo. Por ejemplo, en azul los genes que codifican subunidades del complejo 1 (ND1 a ND6 y ND4L). Modificado de Taylor RW and Turnbull DM, *Nature Reviews Genetics* 6, 389-402: 2005.

El código genético mitocondrial difiere levemente del código del ADNn. Así, el codón UGA codifica triptófano en lugar de un codón de terminación; AUA metionina en lugar de isoleucina; y AGA y AGG especifican codones de terminación en lugar de arginina.

Cada célula, dependiendo de la demanda de energía del tejido en el que se encuentre, contiene un número de mitocondrias, y cada una de ellas, en general, de 5 a 10 copias de ADNmt. Por tanto dentro de cada célula puede existir entre cientos y miles de copias de ADNmt.

Las enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt no siguen las reglas de la herencia mendeliana y sus manifestaciones clínicas están condicionadas por los fenómenos de heteroplasmia, efecto umbral y segregación mitótica. En la mayoría de los casos las moléculas de ADNmt no tendrán una secuencia idéntica, debido a una reparación del ADNmt ineficiente, a la localización en un ambiente oxidativo y/o a una replicación aumentada. Como resultado, podrán aparecer dos poblaciones de ADNmt en una misma célula, coexistiendo el ADNmt *wild type* con ADNmt mutado. A este fenómeno se le conoce como heteroplasmia. La expresión fenotípica de una mutación patogénica depende además del efecto umbral, es decir, de la proporción mínima de ADNmt mutado necesaria para que se produzca la disfunción en un deter-

minado órgano o tejido, y de un fenómeno denominado segregación mitótica, por el que las moléculas de ADNmt mutado se reparten al azar entre las células hijas en cada división celular. En virtud de este mecanismo, en un paciente con una mutación heteroplásmica, la proporción de moléculas de ADNmt mutadas puede variar de un tejido a otro. Ello se traduce en que la expresión de la enfermedad se puede producir en cualquier momento de la vida del paciente y puede afectar sucesivamente a distintos órganos y tejidos. En los tejidos con alto índice de recambio, como el hemático, una mutación puede llegar a desaparecer debido a un fenómeno de selección clonal negativa.

En cuanto a la herencia, la teoría actual establece que el ADNmt se hereda por vía materna. La pequeña cantidad de genoma mitocondrial del espermatozoide raramente entra en el oocito maduro, y cuando lo consigue, es eliminado de manera activa. Pero si una madre porta una mutación en el ADNmt, la dosis de ADNmt mutado que porte cada uno de los óvulos y por tanto cada uno de sus descendientes, puede variar ampliamente debido a un proceso de restricción y amplificación conocido como “cuello de botella” mitocondrial. Según este mecanismo, durante una etapa temprana de la embriogénesis, en la formación de la línea germinal de la mujer, el número de moléculas de ADNmt en cada oocito disminuiría drásticamente, siguiendo posteriormente una amplificación del ADNmt que dará lugar a las 100 000 copias que existen en el oocito maduro (figura 3). Este “cuello de botella” facilita el proceso de eliminación de mutaciones deletéreas y es el responsable de las diferencias de porcentaje de ADNmt mutado entre óvulos y la descendencia.

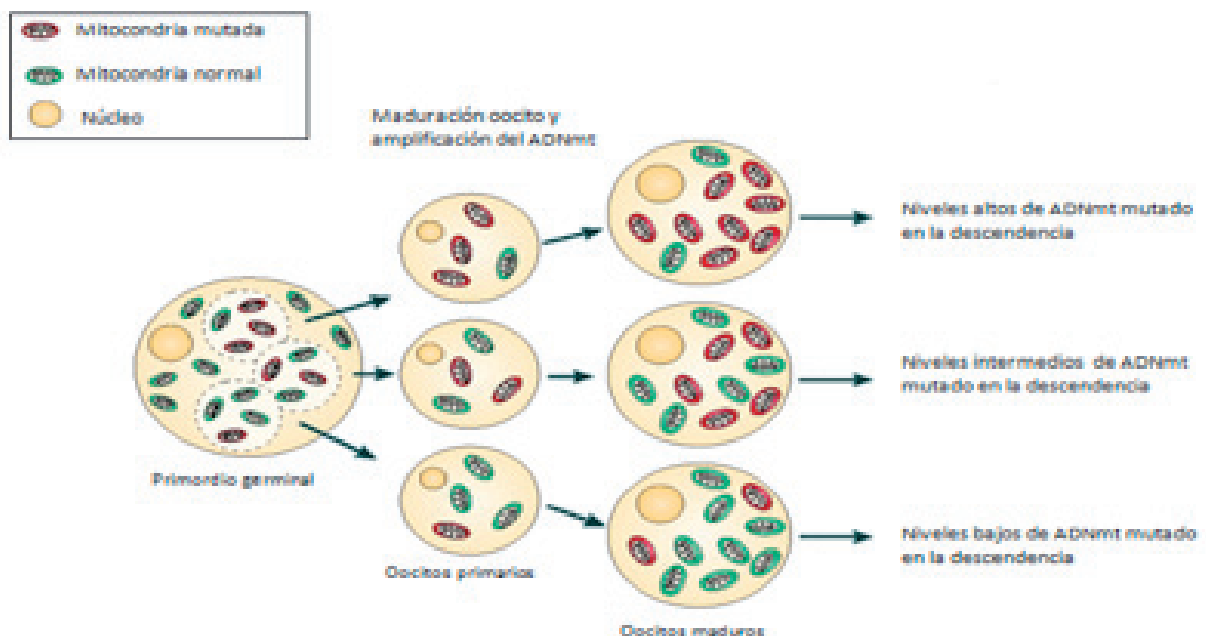


Figura 3. Proceso de restricción y amplificación que se produce en el ADNmt durante la embriogénesis. Modificado de Taylor RW y Turnbull DM. *Nat Rev Genet.* 2005 May; 6(5): 389–402.

En el ADNmt se han identificados dos clases de mutaciones: (i) mutaciones con cambio de una sola base y (ii) reordenamientos (deleciones e inserciones). En contraste con las primeras, los reordenamientos en el ADNmt no se heredan; son mutaciones normalmente esporádicas que se producen en el oocito.

Las diferentes mutaciones del ADNmt tienen una gran variabilidad fenotípica y su expresión puede producir una combinación de los síntomas y signos ya mencionados. No obstante, se pueden distinguir, algunas enfermedades con entidad clínica definida. Los principales se detallan en la tabla 2.

ENFERMEDAD	OMIM	SÍNTOMAS	MUTACIONES EN EL ADNmt
Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)	530000	Bloqueo cardíaco Proteínas en LCR >1 g/l Ataxia cerebelosa Oftalmoplejía externa	Reordenamientos (deleciones y duplicaciones)
Oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO)	-	Oftalmoplejía externa Ptosis bilateral	Reordenamientos (deleciones y duplicaciones)
Síndrome de Pearson	557000	Anemia sideroblástica en la infancia Pancitopenia Fallo pancreático exocrino	Reordenamientos (deleciones y duplicaciones)
Síndrome de Leigh	256000	Deterioro psicomotor grave Afectación de ganglios basales y otras estructuras subcorticales	m.8993T>G, m.8993T>C (gen <i>MT-ATP6</i>)
Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP)	551500	Ataxia Retinopatía pigmentaria	m.8993T>G, m.8993T>C (gen <i>MT-ATP6</i>)
Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares (MELAS)	540000	Migraña Vómitos Epilepsia asociada a episodios similares a apoplejía	m.3243A>G, m.3251A>G, m.3271T>C (gen <i>MT-TL1</i>)
Epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas (MERFF)	545000	Epilepsia Ataxia cerebelar	m.8344A>G, m.8536T>C (gen <i>MT-TK</i>)
Neuropatía óptica de Leber (LHON)	535000	Pérdida visual bilateral y simétrica Atrofia óptica	m.3460G>A (gen <i>MT-ND1</i>) m.11778G>A (gen <i>MT-ND4</i>) m.14484T>C (gen <i>MT-ND6</i>)
Diabetes y sordera mitocondrial (MIDD)	520000	Hipoacusia Diabetes	m.3243A>G (gen <i>MT-TL1</i>) m.8296A>G (gen <i>MT-TK</i>) m.14709T>C (gen <i>MT-TE</i>)

Tabla 2. Clasificación genética de las enfermedades mitocondriales por mutaciones en el ADNmt.

Como puede observarse en la tabla, en los trastornos mitocondriales una misma alteración puede dar lugar a distintos cuadros clínicos y un mismo fenotipo puede ser debido a distintas mutaciones en distintos genes.

3. ALGORITMO DIAGNÓSTICO

Tras realizar una historia clínica detallada y una exploración completa, el estudio inicial en todo paciente con sospecha de enfermedad mitocondrial debería incluir las siguientes pruebas bioquímicas:

- Determinación de lactato y piruvato en sangre, y eventualmente en líquido cefalorraquídeo, cuando el cuadro clínico sea de afectación central. Los trastornos mitocondriales se caracterizan por hiperlactacidemia y una relación lactato/piruvato aumentada.
- Determinación de cuerpos cetónicos (hidroxibutirato y acetoacetato), aminoácidos y carnitina en plasma y/o suero para descartar otras entidades que pueden cursar con hiperlactacidemia, como las acidemias orgánicas.

En caso de que persista la sospecha clínica, el médico debe valorar si el fenotipo del paciente puede englobarse dentro de alguno de los síndromes mitocondriales clásicos o representa un trastorno no sindrómico, si sigue una herencia mendeliana o materna o si el fenotipo se ha podido producir de manera esporádica.

Cuando el fenotipo sugiera un trastorno concreto (MELAS, MERFF, NARP, etc.), el análisis genético debe comenzar por el análisis de las mutaciones puntuales relacionadas. Para este caso pueden emplearse técnicas moleculares como la PCR a tiempo real o la secuenciación Sanger del gen o genes implicados. Si el fenotipo hace pensar en una enfermedad mitocondrial debida a reordenamientos del ADNmt, el *Southern blot* es el método recomendado para detectar este tipo de mutaciones. El estudio de deleciones en el ADNmt se puede realizar también con long-PCR (variante de la técnica convencional de PCR que permite amplificar fragmentos de ADN de gran tamaño) del genoma mitocondrial entero o de regiones concretas del mismo. La visualización en gel de agarosa de una sola banda de 16,6 kb, en caso de amplificar el ADNmt entero, descartaría la presencia de deleciones. Si existen deleciones, se observarían una o más bandas de menor tamaño. Los resultados positivos obtenidos por una u otra técnica deben confirmarse siempre debido a que en el ADNmt pueden aparecer deleciones simplemente relacionadas con la edad y a que también es posible la existencia de polimorfismos en la zona de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el *Southern* que den lugar a resultados falsos positivos.

La muestra recomendada para los estudios que requieren la detección de reordenamientos es generalmente el músculo (síndromes CPEO y KSS). Sin embargo, en el síndrome de Pearson sí puede utilizarse muestras de sangre periférica para el estudio genético.

En aquellos casos en los que los síntomas del paciente no se encuadren dentro de un cuadro clínico ya conocido, la valoración bioquímica de la actividad de los complejos enzimáticos o los estudios morfológicos o histoenzimáticos a nivel tisular pueden poner de manifiesto si existe un sólo trastorno de la cadena respiratoria (afectan a un solo complejo) o varios. En ambos casos el origen de la alteración genética puede encontrarse en el ADNn o en el ADNmt.

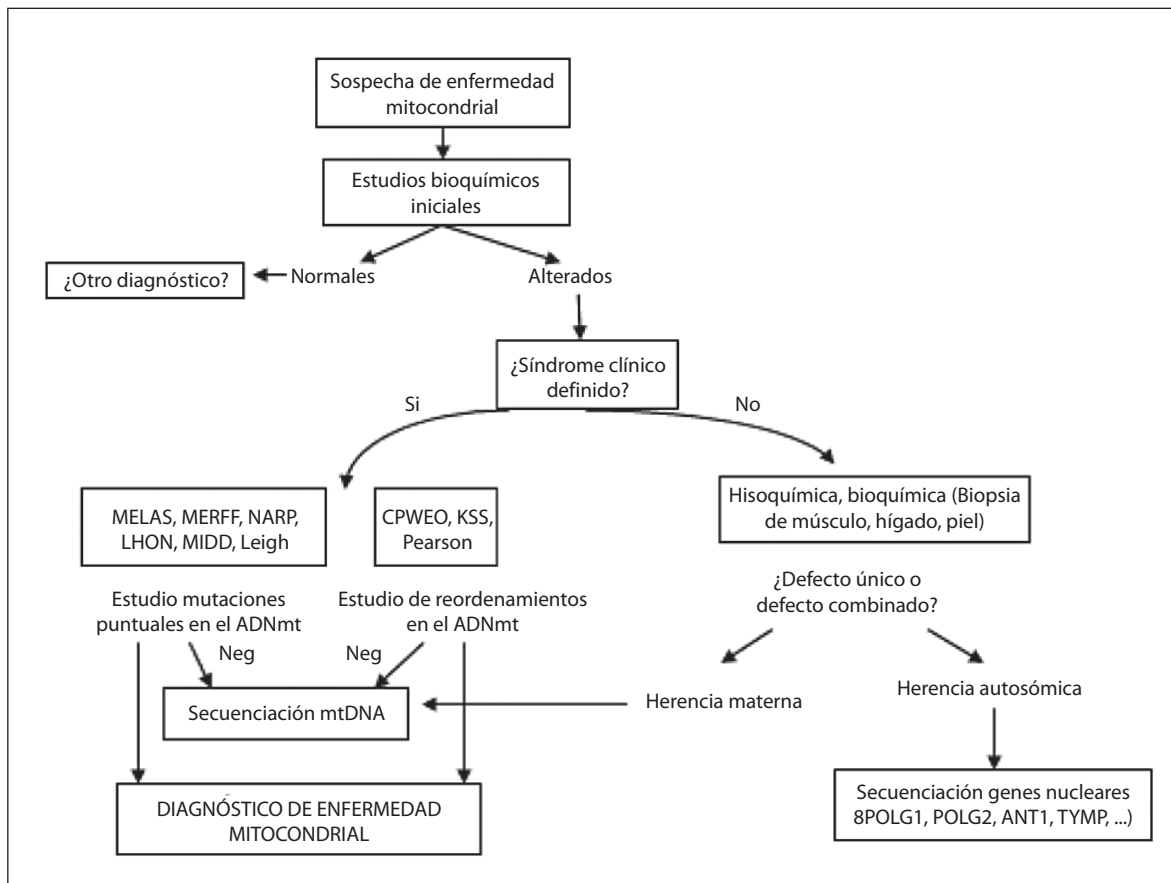


Figura 4. Algoritmo para el diagnóstico genético de las enfermedades mitocondriales.

RESULTADO DEL CASO CLÍNICO

La presencia de sordera, diabetes y miocardiopatía dilatada de etiología no isquémica en esta paciente podría explicarse por la presencia de un cuadro clínico conocido como sordera y diabetes de transmisión materna (MIDD, de sus siglas en inglés *maternally inherited diabetes and deafness*). En la mayoría de casos, los pacientes que tienen este síndrome presentan sordera neurosensorial y una diabetes que simula una diabetes de tipo 2, con un índice de masa corporal normal o bajo. Los órganos con una alta actividad metabólica suelen estar afectados, lo que puede ocasionar dolores musculares, nefropatía, miocardiopatía y síntomas neuropsiquiátricos.

La MIDD se produce normalmente por la presencia de la mutación puntual m.3243A>G en el gen mitocondrial *MT-TL1*, que codifica el ARNt de la leucina. En una proporción menor de los pacientes, se detecta mutaciones puntuales en los genes mitocondriales *MT-TE* y *MT-TK*, que codifican el ARNt del ácido glutámico y de la lisina, respectivamente.

Ante la sospecha de MIDD, se solicita al laboratorio externo el estudio de la mutación m.3243A>G en el ADNmt. La secuenciación Sanger del gen *MT-TL1* puso de manifiesto la presencia en heteroplasmia de dicha mutación (figura 5a), lo que confirmó el diagnóstico de MIDD.

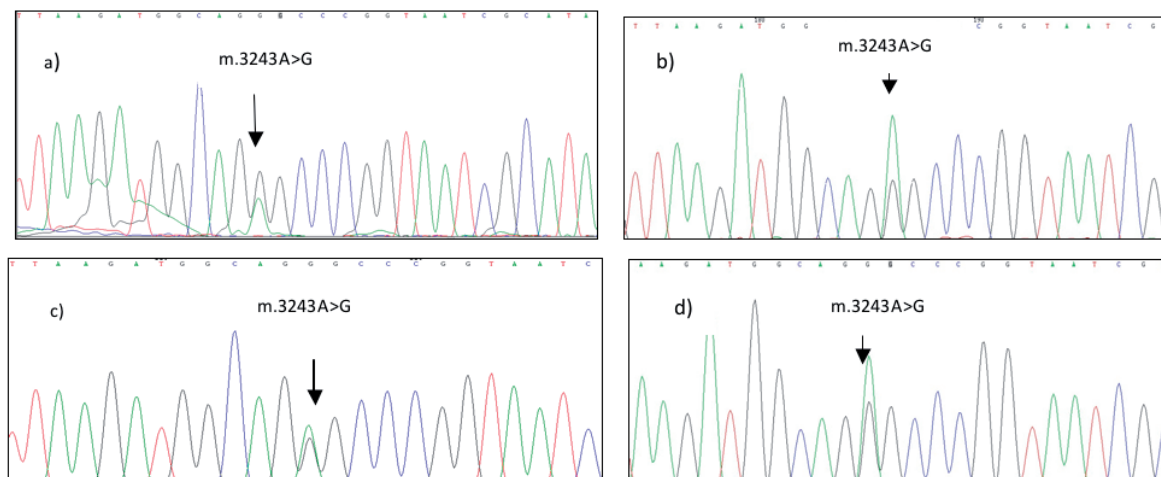


Figura 5. Electroferograma en el que se muestra la mutación m.3243A>G en heteroplasmia en a) caso índice, b) hermano, c) hijo afecto e d) hija asintomática

Posteriormente, se realizó el estudio de la mutación m.3243A>G en otros familiares. En el hermano del caso índice, de 52 años, diabético tipo 2 y sin historia de sordera, se detectó la mutación m.3243A>G también en heteroplasmia (figura 5b). Sin embargo, el nivel de ADNmt mutado en sangre era a simple vista menor que en la hermana, probablemente por el fenómeno de “cuello de botella” que hemos visto antes. Esta menor proporción de ADNmt mutado podría explicar la ausencia de hipoacusia en el paciente.

En uno de los hijos del caso índice, de 36 años y diagnosticado de síndrome de Wolff-Parkinson-White e hipoacusia bilateral (utiliza audífono desde hace 12 años con un grado de discapacidad del 55 %), también se identificó la mutación m.3243A>G en heteroplasmia. En este caso los síntomas han aparecido antes.

En otra hija del caso índice, de 30 años de edad y asintomática, se detectó también la mutación en heteroplasmia. Probablemente desarrolle algún síntoma, pero la severidad y la edad de inicio de los mismos dependerá del porcentaje de ADNmt mutado que haya en cada tejido.

Dado que el ADNmt se transmite por vía materna, tanto el hermano del caso índice como el hijo no transmitirán la mutación a la descendencia. En cambio la hija sí; la cantidad de ADN mutado que transmita a sus hijos podrá variar por el fenómeno de amplificación-restricción que se produce durante la ovogénesis.

RESUMEN

Las enfermedades mitocondriales constituyen un grupo heterogéneo de trastornos que pueden presentarse con cualquier síntoma, en cualquier órgano y a cualquier edad. Se caracterizan por una alteración de la cadena respiratoria debido a mutaciones localizadas tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear. La genética del ADNmt tiene una serie de características que difieren significativamente del ADNn y que deben tenerse en cuenta al realizar el estudio genético.

Aunque existen síndromes clínicos perfectamente definidos, en muchos casos el paciente presenta una asociación de signos y síntomas que pueden modificarse a lo largo de los años, complicando el estudio de estas patologías. El diagnóstico final debe realizarse combinando datos clínicos, bioquímicos, histológicos y genéticos.

BIBLIOGRAFÍA

Arpa J, Cruz-Martínez A, Campos Y et al. Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients. *Muscle Nerve*. 2003 Dec;28(6):690-5.

Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull*, 2013; 106 (1):135-159.

Deschauer M, Krasnianski A, Zierz S, Taylor RW. False-positive diagnosis of a single, large-scale mitochondrial DNA deletion by Southern blot analysis: the role of neutral polymorphisms. *Genet Test*. 2004 Winter;8(4):395-9.

Finsterer J, Harbo HF, Baets J et al. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Eur J Neurol*. 2009;16(12):1255-64.

Practice guidelines for the molecular diagnosis of mitochondrial diseases. CMGS 2008.

Taylor RW and Turnbull DM, Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics* 2005; 6, 389-402.

Tengan CH, Moraes CT. Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR. *Biochemical and molecular medicine* 1996 Jun 58 (1): 130-4.

Wong LC, Scaglia F, Graham BH et al. Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* 100 (2010) 111–117.

FORMACIÓN CONTINUADA EN GENÉTICA COMISION DE GENETICA MOLECULAR

Josep Oriola Ambrós, Ana M^a Sánchez de Abajo, Atocha Romero (*coordinadora del curso*), Begoña Ezquieta, Carmen Cañadas, Concha Alonso, Cristina Torreira Banzas, Jesús Molano, María Arruebo Muñio, María Santamaría González, Orland Diez, Pilar Carrasco Salas

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

M. Rodríguez (*presidente*), D. Balsells, R. Deulofeu, M. Gassó, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, MC. Villà

ISSN 1887-6463 - Diciembre 2014 (recibido para su publicación Noviembre 2014)