



TRABAJO FIN DE GRADO

Patología mitocondrial causada por mutaciones en el gen nuclear FBXL4

Mitochondrial pathology produced by mutations in nuclear gene FBXL4

Autor: Julio Alberto Andrés Sanz

Director: Sonia Emperador Ortiz



FACULTAD DE MEDICINA

Zaragoza, Junio de 2016

ÍNDICE

○ Resumen	3
○ Introducción	4
▪ La mitocondria.....	4
▪ Patología en la mitocondria.....	4
▪ Fenotipo de enfermedad mitocondrial.....	8
○ Hipótesis y objetivos	5
○ Resultados	6
▪ Estudio del gen FBXL4.....	8
▪ Estudio de la proteína FBXL4.....	9
▪ Patología y alteraciones bioquímicas relacionadas con mutaciones en FBXL4	12
▪ Diagnóstico.....	22
▪ Tratamiento.....	28
○ Análisis de las mutaciones y estudio de la relación genotipo- fenotipo	29
▪ Mutaciones descritas.....	29
▪ Relación genotipo-fenotipo.....	32
○ Discusión y Conclusiones	33
○ Agradecimientos	35
○ Glosario de Abreviaturas	36
○ Bibliografía	37
▪ ANEXO 1: Tabla 1	

RESUMEN

Resumen: FBXL4 (F-box and leucine repeat rich 4) es un gen nuclear cuyas mutaciones pueden provocar un cuadro de mioencefalopatía mitocondrial (denominada MTPS13). De descubrimiento reciente, describimos en este trabajo de revisión 37 casos, 2 de ellos no publicados. Todos los sujetos presentan aumento en los niveles de lactato, hipotonía y retraso en el desarrollo psicomotor, causado por una leucoencefalopatía crónica que evoluciona con atrofia cerebral difusa. Puede haber otros síntomas orgánicos y muerte temprana. La proteína FBXL4 se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial aunque su función exacta se desconoce todavía. Su déficit provoca depleción de DNA mitocondrial y descenso en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria. El diagnóstico debe incluir estudio anatomopatológico, RMN y estudio genético. No existe tratamiento efectivo. Por tanto, FBXL4 aparece como una nueva causa de mioencefalopatía de origen mitocondrial.

Abstract: FBXL4 (F-box and leucine repeat rich 4) is a nuclear gene whose mutations may cause a mitochondrial mioencephalopathy syndrome, named MTPS13. After its recent discovery, there are 35 subjects described in literature. Here, we review all them and we add 2 unpublished cases. All affected subjects show early-onset lactic acidemia, hypotonia and developmental delay caused by encephalopathy leading to diffuse brain atrophy. Protein FBXL4 is known to place in the intermembrane space of the mitochondria, although its precise function remains undetermined with precision. The physiopathology involves mtDNA depletion in muscle and markedly reduced function of respiratory chain complexes. For diagnosis, pathology and genetic studies, and MRI images are required. No effective treatment has been found up to date. Consequently, FBXL4 appears as a new cause of mitochondrial encephalomyopathy.

INTRODUCCIÓN

1. La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos de membrana de pequeño tamaño, de 0.5 a 1 μm , con forma alargada. Son orgánulos dinámicos que cambian su forma, se fusionan y dividen y se asocian estratégicamente con los elementos del citoesqueleto. Están presentes en prácticamente todas las células eucariotas en número variable, de unas pocas decenas a varios miles^[1].

Llama la atención de estos orgánulos su doble membrana, denominadas membrana mitocondrial interna y la membrana mitocondrial externa, diferentes en composición y estructura. Mientras que la membrana mitocondrial externa presenta una gran permeabilidad, no pasa así en la membrana mitocondrial interna, que es mucho más selectiva para el paso de proteínas y otras moléculas. La mitocondria presenta varias funciones metabólicas pero la principal y de importancia capital es la producción de ATP a partir del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Lo componen 5 complejos que se componen en total de 90 polipéptidos, complejos macroproteicos localizados en la membrana mitocondrial interna.

Este sistema constituye la fase culminante del metabolismo de producción de energía en los organismos aerobios. Como resultado final, se reduce O_2 a H_2O gracias a los electrones del $\text{NADH} + \text{H}^+$ y el FADH_2 generado en el ciclo de Krebs, que son transferidos a través de los complejos del sistema oxphos, mediante reacciones de óxido-reducción. En el proceso, se bombea H^+ al espacio intermembrana, y se genera un gradiente electroquímico, energía que se emplea en generar ATP a partir de $\text{ADP} + \text{Pi}$ en el proceso de retorno de protones a la matriz mitocondrial.^[2]

El resto de funciones de la mitocondria comprenden la β -oxidación, el ciclo de la urea, el metabolismo de los aminoácidos, la biosíntesis del grupo hemo, la homeostasis del calcio y la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras.

Las mitocondrias poseen su propio sistema genético, lo cual es una particularidad notable. Contienen su propio ADN, el ADN mitocondrial (ADNmt), pero muchas de las proteínas de las que se sirve el orgánulo están codificadas en el ADN nuclear (ADNn). El ADNmt es un sistema de doble cadena circular con 16569 pares de bases, con información para 37 genes. Codifica para 13 ARNm, todos ellos codificantes de subunidades de los complejos del sistema OXPHOS, 2 ARNr y 22 ARNt.

En el ADNmt los genes se encuentran dispuestos de manera similar a como lo hacen en los organismos procariontes, unos a continuación de otros sin regiones espaciadoras ni intrones. Las cadenas se denominan H (de *heavy*) y L (de *light*) y codifican para 28 y 9 genes respectivamente. Su splicing es particular; los genes de ARNt se localizan intercalándose entre los otros genes, de manera que al adoptar estructura terciaria, provocan un splicing mecánico. No se añade capucha ni cola de poliA.

El modo de replicación es conocido desde los años 70. Se replica de forma unidireccional y asimétrica, utilizando para ello dos orígenes de replicación O_H y O_L . La replicación empieza en O_H con la cadena pesada, efectuada por la ADN polimerasa γ partir de un cebador sintetizado por la enzima primasa; y continúa hasta que llega a O_L , momento en el cual comienza la replicación de la segunda cadena.

2. Patología en la mitocondria

La mitocondria, por su rol central en la biogénesis de ATP y otros procesos, se sitúa en el origen fisiopatológico de numerosas patologías, cuando alguna de las proteínas necesarias para su funcionamiento no se produce de manera correcta.

La mitocondria es el único orgánulo en las células animales que está regulado por un sistema genético doble. Esto se explica por la teoría endosimbiótica y se debe a que, en algún momento durante la evolución, la mayoría de los genes de la bacteria púrpura primitiva que dio lugar a las mitocondrias se trasladó al núcleo. Hay evidencias que así lo indican, como la similitud de dichos genes con genes bacterianos [1]. La mayoría de proteínas que actúan en la mitocondria son importadas desde el citosol; todas, de hecho, salvo los 13 polipéptidos que codifica el ADNmt.

Por ello, podemos clasificar los tipos de patologías genéticas mitocondriales en dos tipos claramente diferenciados: las de origen mitocondrial y las de origen nuclear.

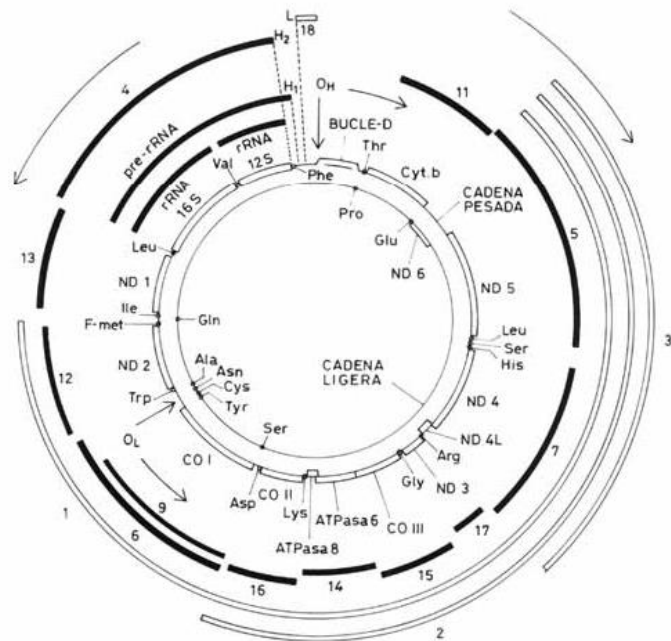


Figura 1. Esquema de la disposición génica en el ADN mitocondrial. Modificado de Montoya y cols [1]

2.1. Patologías genéticas mitocondriales del ADNmt

Como ya se ha mencionado previamente, el ADNmt codifica para 37 genes, de los cuales 13 traducen polipéptidos. No obstante, una mutación deletérea en cualquiera de los genes puede causar patología.

La patología genética del ADN mitocondrial presenta particularidades con respecto a las patologías genéticas clásicas, que se deben entender a partir de ciertas características que diferencian el ADNmt del ADNn.

- Modo de herencia: Se hereda exclusivamente por vía materna, ya que las copias de ADNmt de los espermatozoides son eliminadas tempranamente
- Alta tasa de mutación: Es muy vulnerable, y presenta una tasa de mutación espontánea 10-20 veces superior a la del ADNn. Se debe a varios factores, como la alta producción de ROS; la relativa desprotección de la cadena de ADNmt al no estar unidos a histonas, y un deficiente sistema de reparación. Se ha relacionado la acumulación de mutaciones con el envejecimiento.
- Poliplasmia: Hay 2-10 copias por mitocondria. y de 1000 a 10000 copias en total por célula. Por la alta tasa de mutación, pueden producirse mutaciones durante el desarrollo que en el organismo ya formado den lugar a dos poblaciones de ADNmt: una *wild type* y otra mutante, fenómeno denominado heteroplasmia. Esto explica que el ADN mitocondrial pueda estar mutado en unos tejidos y en otros no, o sólo en ciertas células, lo que se manifiesta clínicamente como heterogeneidad de afectación y de intensidad de los síntomas en diferentes tejidos.
- Segregación mitótica: Las moléculas de mtADN se segregan al azar entre las mitocondrias hijas durante la división, y estas también durante la mitosis de la célula. Por ello, se pueden dar genotipos diversos: homoplásmico normal, homoplásmico mutante y heteroplásmico con % variable de ADNmt mutado. Ello influirá, lógicamente, en el fenotipo patológico de la célula.
- Expresión umbral: al haber varias copias, se puede mantener la actividad del sistema OXPHOS y la producción de ATP normal hasta un cierto límite de ADNmt mutado. Éste porcentaje es

variable, y se estima en el 10% generalmente, siendo mayor en tejidos de alto consumo energético como el sistema nervioso o el tejido muscular.

Las mutaciones del ADNmt solamente van a generar compromiso en 13 polipéptidos concretos que participan del sistema OXPHOS, concretamente los complejos I, III, IV o V (imagen 2). Por lo tanto, la manifestación fisiopatológica común, a nivel celular, será una síntesis deficiente de ATP. Evidentemente se requiere un cierto nivel de heteroplasmia suficiente para que la célula siga funcionando, o bien que las mutaciones, si están en homoplasmia, no causen una reducción total de la actividad de un complejo, de modo que se mantenga parcialmente la síntesis de ATP en la célula.

Se pueden establecer una clasificación en función del tipo de defecto genético:

- A) Mutaciones puntuales
 - Mutaciones puntuales en genes de polipéptidos
 - Mutaciones puntuales en genes de tARN
 - Mutaciones puntuales en genes de rARN
- B) Deleciones
- C) Deplección de ADN mitocondrial

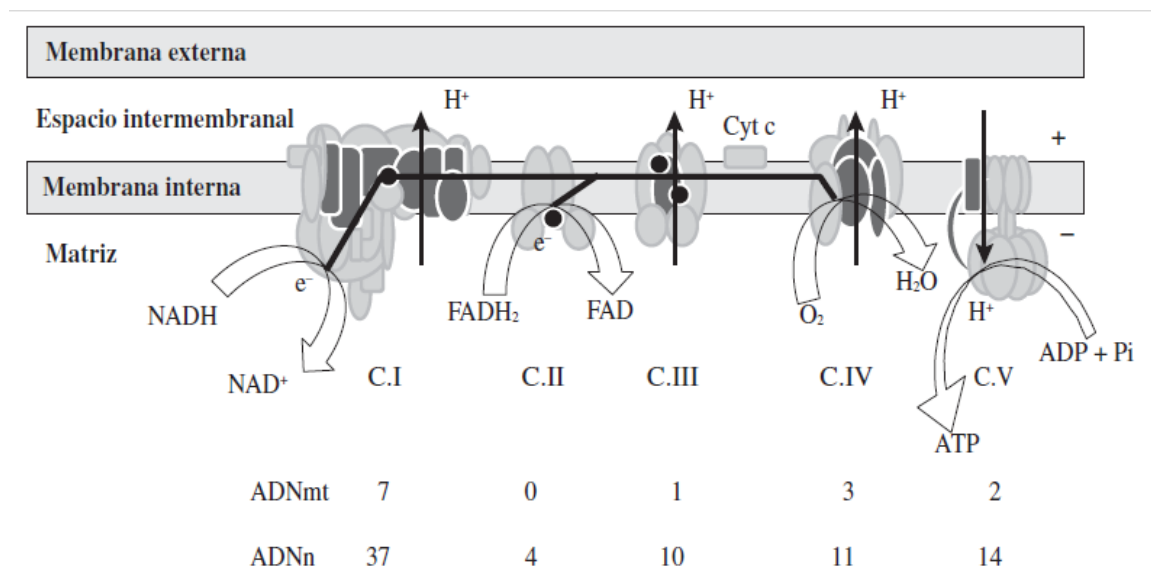


Figura 2. Esquema del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). En gris oscuro se representan las subunidades codificadas en el ADN mitocondrial y en gris claro las codificadas en el ADN nuclear. Puntos negros: coenzima Q. En la parte inferior figura el número de subunidades codificadas en uno u otro genoma. Complejo I: NAHD deshidrogenasa-ubiquinona reductasa; CII: Succinato deshidrogenasa; CIII: Ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa. CIV: citocromo oxidasa; CV: ATP sintasa [2]

Algunos ejemplos de patología por afectación del mtADN son:

- Enfermedades por mutación en subunidades proteicas:
 - Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)
 - Síndrome de NARP (neuropatía, ataxia y retinopatía pigmentaria)
 - Síndrome de Leigh de herencia materna.
- Enfermedades por mutaciones en genes de tARN: afectan indirectamente a las proteínas mitocondriales y también pueden interferir en los procesos de splicing.
 - Síndrome de MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Strokes)

- Síndrome de MERRF
- Sordera neurosensorial no sindrómica e inducida por aminoglucósidos.
- Diabetes de herencia materna con sordera
- Enfermedades causadas por deleciones del ADNmt: hay una deleción común típica de 4977 pb, que es la más frecuente, y numerosas otras.
 - Síndrome de oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO)
 - Síndrome de Kearns Sayre (SKS)
 - Síndrome de Pearson

2.2 Patologías genéticas mitocondriales por mutaciones en el ADNn

Pueden ser por cualquier tipo de herencia típica de los genes nucleares: autosómica recesiva o dominante, ligada a X, etc. Los mecanismos de acción son variados, ya que involucran proteínas muy diversas. Se conocen hasta el momento unos 280 genes nucleares capaces de causar enfermedades relacionadas con la mitocondria^[3].

En este grupo encontraremos las enfermedades asociadas a depleción del ADNmt. Éstas forman un grupo heterogéneo, de herencia autosómica recesiva generalmente, y se asocian a una reducción global muy significativa del número de copias de ADNmt. Se estima que para causar patología debe estar por debajo del 30% con respecto a los controles sanos, lo cual no es del todo exacto, como luego veremos. Los genes afectos codifican para proteínas necesarias para la homeostasis mitocondrial e implicados en el mantenimiento del ADNmt. Es en este tipo de patologías es en el que inscribiremos la encefalomiopatía mitocondrial causada por FBXL4, también denominada MTDPS13 (mitochondrial dna depletion syndrome 13)^[4]

He aquí algunos ejemplos de otras patologías mitocondriales causadas por mutaciones en genes nucleares:^[5]

- Síndrome de Leigh: Múltiples genes involucrados: SCO1, SCO2, COX10, COX15, NDUFS y más.
- MNGIE (Encefalopatía mio-neuro-gastrointestinal): gen TYMP
- Otros síndromes de depleción mitocondrial: genes POLG1, twinkle, TK2, DGUGK, SUCLA2, SUCLG1
- Síndrome de Alpers: Mutaciones en la ADN polimerasa γ subunidad 2
- Atrofia óptica dominante (ADOA): OPA1

3. Fenotipo de enfermedad mitocondrial

Tanto si se produce por error en el ADNmt como en el ADNn, la patología mitocondrial presenta características comunes. Puede manifestarse de formas diversas, afectando de manera multisistémica y con un amplio espectro de fenotipos. Los síntomas pueden encuadrarse en síndromes más o menos característicos y presentar solapamiento entre una enfermedad y otra.^[1] En ocasiones no están desarrollados por completo al tratarse de niños. Se da la circunstancia de que una misma mutación puede mostrar fenotipos diversos, y a su vez un síndrome concreto puede estar causado por diversos genes. No obstante, unas características sugerentes de enfermedad mitocondrial serían:

- Clínica:
 - Implicación de órganos y sistemas sin relación aparente explicable por los síndromes morbosos típicos. Preferencia por tejidos con alto consumo energético (músculo, tejido nervioso, medula ósea, oído, ojo, corazón)

- Bioquímica:
 - Elevación crónica de lactato, en plasma y opcionalmente en líquido cefalorraquídeo, junto a la elevación de la ratio molar lactato/piruvato.
 - Posibles alteraciones en coenzima Q, folato, cuerpos cetónicos, aminoácidos, glucosa, carnitina, creatinina, urea, amonio y ácidos grasos no esterificados.
 - Déficit en la medición de la actividad de alguno o varios complejos de la cadena respiratoria (diversos métodos).
- Anatomía patológica:
 - Presencia de fibras rojo rasgadas (RRF) en los estudios morfológicos (tinción con tricrómmico de Gomori).
 - Presencia de fibras no reactivas o hiporreactivas a la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa (COX) o para la reacción para la succinato deshidrogenasa (SDH)
- Estudios genéticos:
 - Los pacientes resultarán positivos para mutaciones en el ADNmt o en el ADNn, mutaciones que serán causantes de patología.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo es: “Dada la dificultad de llegar a un diagnóstico en determinadas enfermedades mitocondriales, realizar una “síntesis” o comparativa de varios casos clínicos con mutaciones en un mismo gen pueden ayudar a un diagnóstico más preciso y rápido”.

Cuando hay que hacer frente al diagnóstico de una enfermedad supuestamente mitocondrial buscar alteraciones a nivel del ADNmt es relativamente sencillo, debido al tamaño de su molécula. Sin embargo cuando no se encuentra alteración a este nivel el siguiente paso es analizar genes nucleares que codifiquen proteínas con función mitocondrial.

En este punto el diagnóstico se complica puesto que la metodología de la secuenciación del exoma completo da como resultado infinidad de cambios en gran cantidad de genes, siendo a menudo indescifrable. El uso de panes con secuencias génicas conocidas da buenos resultados pero hace que se pierdan mutaciones en genes con función mitocondrial aún desconocidos. Además la gran disparidad de rasgos clínicos en los pacientes y los diferentes protocolos de actuación de los hospitales hace que en ocasiones el diagnóstico en estos pacientes se demore años o incluso se abandone.

Por todo ello, es importante una buena caracterización fenotípica de pacientes con patología mitocondrial, que permita relacionar clínica y genética para favorecer el diagnóstico.

Para ello los objetivos que pretendemos alcanzar en este trabajo son:

- Repasar la patología mitocondrial y la existencia de enfermedades mitocondriales producidas por genes nucleares.
- Estudio del gen FBXL4, la proteína homónima y sus características
- Realizar una revisión bibliográfica de mutaciones en el gen FBXL4
- Comparar los fenotipos de pacientes con mutaciones en este gen
- Establecer relaciones entre la clínica y la bioquímica de dichos pacientes
- Analizar los casos disponibles en el laboratorio
- Proponer una estrategia adecuada de diagnóstico
- Establecer relaciones entre las mutaciones y la clínica de estos pacientes.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL GEN FBXL4

1.1 Estructura del gen

El gen FBXL4 (F-box and leucine-rich repeat-containing protein 4) se localiza en el cromosoma 6, ocupando las coordenadas 6q16.1 a 6q16.2, y concretamente los pares de bases del 99.316.420 al 99.395.849, para un total de 79,469 bases. Se localiza en la hebra (-)^[6,7]



Figura 3: Representación esquemática del cromosoma 6 y la localización de FBXL4 en el mismo. Vemos marcada con un círculo la zona en cuestión, dentro del cromosoma 6

Cuenta con un total de 11 exones y 10 intrones. Se considera que pueden existir variantes de splicing.

1.2 Regulación de la expresión

El gen FBXL4 cuenta con los siguientes elementos que intervienen en su transcripción

- Promotor
- Factores de transcripción: Se conocen los siguientes factores de transcripción como implicados en la expresión de FBXL4:
 - CUTL1
 - Elk-1
 - FOXO3
 - Gli-1
 - Lmo2
 - Pax-3
 - Pou2f1
 - POU2F1a
 - S8

Se ha demostrado además, en experimentos de recuperación de función, mediante trasfección del gen wild type a células de pacientes afectados por mutaciones, que las mutaciones en este gen tienen relación directa con la patología mitocondrial. Fibroblastos de un paciente mutado aumentaron su consumo de oxígeno cuando se expresó el FBXL4^{wt} en ellos. Con ello se favorece la tesis de que tiene un papel central en la homeostasis de la bioenergética mitocondrial.^[9]

2. ESTUDIO DE LA PROTEINA FBXL4

2.1 Generalidades

El gen FBXL4 codifica para una proteína de 621 aminoácidos miembro de la familia de las proteínas F-box, caracterizadas por un dominio conservado de 40 aminoácidos, el F-box. El dominio F-box interviene en interacciones proteína-proteína, generalmente mediante la unión a la proteína Skp-1. El otro rasgo característico de nuestra proteína es que contiene 9 subdominios de repeticiones en tándem ricas en leucina, los llamados LRR (leucine-rich-repeats).^[8] Se localizará a nivel del espacio transmembrana en la mitocondria. Su función exacta todavía no se ha precisado, pero se especula que su función puede ser participar de un complejo de ubiquitinización que regulara ciertas proteínas mitocondriales.

Existen 3 tipos de proteínas F-box, según su dominio de interacción proteica: WD40 (Fbxw), LRR (fbxl) u otro (Fbxo).

Se han localizado el dominios F-box en la región central de la secuencia polipeptídica, con cierta identidad con el dominio SKP2 (23%). Adicionalmente se han identificado al menos 9 zonas de repeticiones ricas en leucina (LRR), en la zona N-terminal. Queda una posible zona de repetición por dilucidar, a causa de ciertos desajustes en el modelo.^[9]

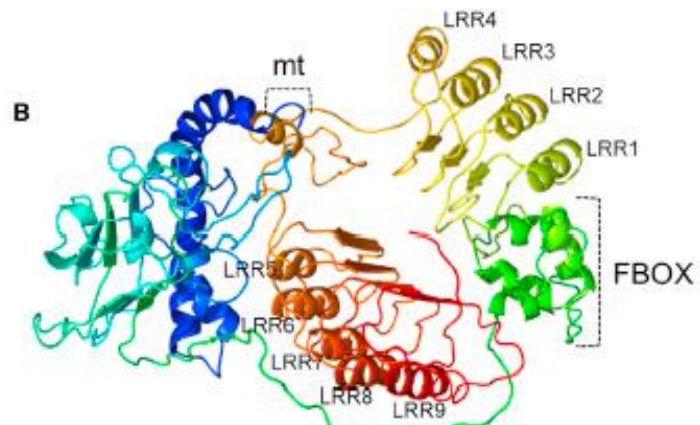


Figura 4: Estructura terciaria de FBXL4,; de C-terminal (añil) a N-terminal (rojo). Extraído de [10]

En la zona N-terminal, no se han encontrado dominios conservados, pero sí señales que determinan localización proteica hacia la mitocondria.

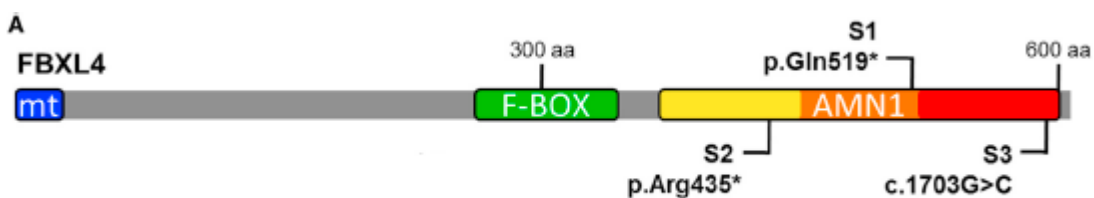


Figura 5: Representación esquemática del gen FBXL4 con los dominios conservados y algunas de las mucaciones principales. Modificado de Bonnen y cols. (2013)

Gai y cols. (2013) habla de que existen evidencias para proponer que esta proteína se encuentra en estado natural formando un complejo cuaternario en el complejo intermembrana, pero no especifica cuáles. Una reconstrucción *in silico* de la proteína sugiere que las hojas β de los LRR intervienen en una interacción proteína-proteína. De hecho, la mayor parte de las mutaciones con cambio de sentido afectan a esta zona, lo que resalta su importancia

2.1 Localización de la proteína

Gai y su grupo realizaron una amplia batería de experimentos para determinar la localización en la célula de la proteína nativa FBXL4. Varias pruebas resolvieron que se encuentra en el espacio transmembrana mitocondrial.

Demostraron, en primer lugar, la presencia de una señal con alto potencial de localización mitocondrial (MTS) en FBXL4, en que se extendía del extremo N-terminal hasta los aminoácidos 22-26. Usaron técnicas de microscopía confocal y marcaje con fluorocromos, en células HEK293T inducidas con doxicilina, que expresaban FBXL4 marcado con HA en C-ter. (hemaglutinina A de virus influenza). Se vió que coincidía la señal de FBXL4-HA^{C-ter} con las mitocondrias, marcadas con Mitotracker (en rojo)^[10], y que no se localizaban en el núcleo. (Figura 6)

No obstante, también se estudió si había alguna señal de señalización mitocondrial enmascarada en C-ter añadiendo HA al extremo N-ter. Se observó una localización principalmente

D

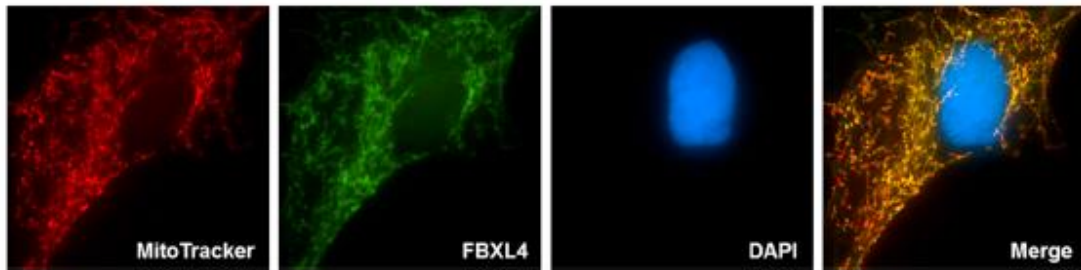


Figura 6. Vemos las mitocondrias en Rojo, el híbrido FBXL4-HA^{C-ter} en verde y los núcleos marcados con DAPI (azul), A la derecha, la imagen de superposición. El mismo resultado fue obtenido por Bonnen y cols. (2013)

mitocondrial con inmunofluorescencia difusa en el citosol, lo cual da a entender que de haberla, no es tan potente. Seguidamente, se transfectaron dos constructos FBXL4, con deleciones parciales en el extremo 3', de manera que empezaban por el AUG correspondiente a los aminoácidos 8 y 29 respectivamente. Mientras que la proteína Δ_8 FBXL4^{HA-C} aún mantenía la localización mitocondrial, el constructo Δ_{29} FBXL4^{HA-C} mostraba una localización citosólica. De este modo, se evidencia la importancia fundamental de la secuencia MTS en N-terminal para la localización mitocondrial.

En las misma línea, se realizaron estudios de visualización por inmunoblot con doble marcaje contra FBXL4 nativa y HA, dado lugar a una banda de material de reacción cruzada (CRM) la proteína aparecía en lisado celular total, pero no en el fraccionado de núcleo o en el de citosol sin mitocondrias. Esto refuerza la idea de localización mitocondrial.

La localización dentro de la mitocondria también es relevante. Para estudiarla, se hicieron estudios de inmunorreacción cruzada en mitocondrias aisladas de ratón, detectando la banda de CRM en la fracción acuosa, pero no en el fraccionado de membranas. Es lógico pensar que no puede estar anclada en una membrana debido a la no existencia de dominios transmembrana en la proteína.

Posteriormente, en experimentos de protección a la digestión con tripsina se encontró una resistencia a la digestión inicial (ataca proteínas de la membrana externa, que no atraviesa) y una disminución progresiva de la intensidad de las bandas conforme se añadían concentraciones crecientes de digitonina (que solubiliza la membrana externa pero no la interna). Éste es un patrón similar al de proteínas de ya sabida localización en el espacio intermembrana (como el citocromo C) pero divergente del de proteínas localizadas en la matriz, que mantenían intacta su expresión. (figura 7). Tampoco sufre la típica

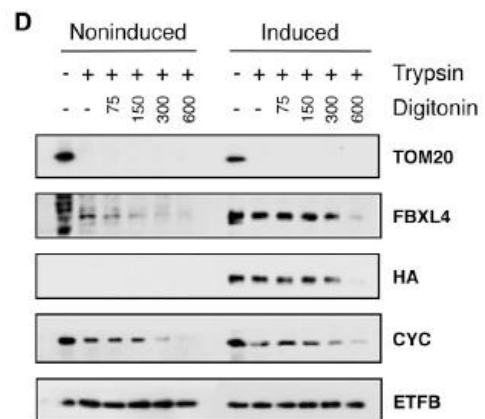


Figura 7: Experimento de resistencia a digestión con tripsina. El resultado de FBXL4 es concordante con el de CYC, de conocida localización en el espacio intermembrana [9]

modificación post-traducciona para eliminar el MTS, como muchas proteínas de matriz.

Por lo tanto, se puede afirmar que la proteína FBXL4 es una proteína que contiene una señal para residir en la mitocondria y que se localiza muy probablemente en el espacio intermembrana, sin anclaje a membranas^[9]

2.3. Hipótesis funcional

El producto del gen FBXL4 es un polipéptido, que pertenece a la superfamilia de proteínas F-box, que presentan funciones muy diversas. Se caracteriza por la presencia del dominio F-box, sus 9 segmentos ricos en repeticiones de Leucina y por localizarse en el espacio mitocondrial.

Su ausencia o disfunción, como veremos en apartados posteriores, es causa de una encefalomiopatía de origen mitocondrial, con gravedad variable en dependencia de la mutación, por lo que podemos afirmar que su función es de gran importancia funcional en la mitocondria pero que no es esencial para la supervivencia, al menos en las primeras edades de la vida.

Las proteínas F-box se descubrieron como proteínas que interactúan con la proteína Skp1. Generalmente sirven como adaptadores de sustrato en complejos proteicos con función E3 ubiquitín ligasa, los Skp1-Cullin-Fbox (SCF)-E3-ubiquitín-ligasas; que actúan conjuntamente con el proteosoma 26S para la degradación de proteínas.^[11]

Hay sin embargo otras funciones propuestas para esta proteína que serían independientes de los procesos SCF, en diversos procesos como la regulación del ciclo celular, regulador del proteosoma, tráfico intracelular o dinámica mitocondrial^[11]. La proteína fbx07, la primera descubierta de la familia de las F-box, se sabe que participa como adaptador de ciertos sustratos en complejos SCF-ubiquitín ligasa, pero además interactúa con ciclina D y otras, y estabiliza p27, participando de esta manera en la regulación del ciclo celular. Además, interactúa con las proteínas PINK y PARKIN^[16], implicadas en procesos mitofágicos.

Suponiendo una analogía funcional con las proteínas de su familia, la duda está en si FBXL4 presentará una función en relación con la ubiquitinización, independiente o ambas. Algunos datos sugieren que sí podría en efecto tener relación con funciones ubiquitinizadoras, sobre todo por las interacciones proteicas que hay descritas (figura 8).

Como precedente, se han descrito además ya dos ubiquitín ligasas (MITOL/MARCH V y MULAN) y desubiquitininas (ubp16/USP30) que actúan en la membrana externa, que formarían parte de algún complejo ubiquitinizador mitocondrial propio.

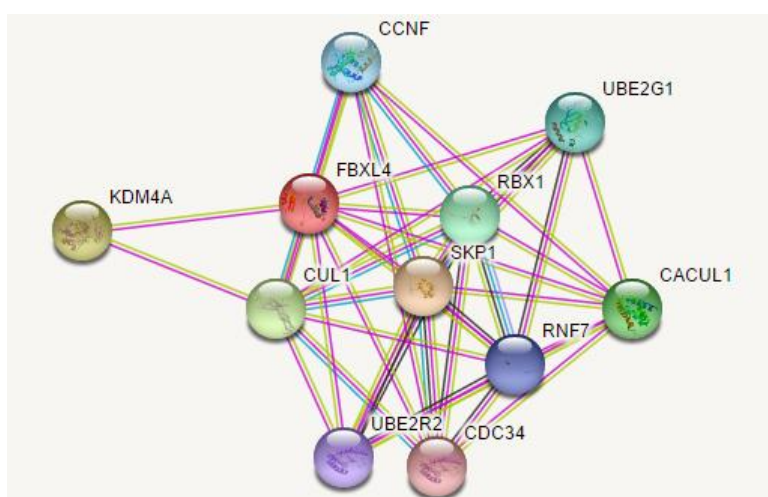


Figura 8: Esquema de interrelación de FBXL4 con otras proteínas. Sugiere interacción más relevante con Cullina (Cul1, skp1 y kdm4 (demetilasa de lisina) Extraído de string-db.org. [18]

Se especula que el paso de las proteínas a través de los poros de la membrana externa y su necesidad de readaptarse para pasar a la interna^[10] requerirían la necesidad de un sistema de control de calidad en el que estaría implicada FBXL4.^[9] Quizás sirva como adaptador de sustrato de proteínas mal plegadas en ese proceso en un sistema SCF que actúe en la mitocondria.

Por otra parte, se propone que el reducido número de mitocondrias y la alteración de la red mitocondrial podría estar relacionada con la activación de procesos autofágicos. Fbxo 7, como decíamos, interacciona con pink y parkin. Pink detecta la pérdida de potencial transmembrana en la mitocondria y recluta parkin por fosforilación y esta estimula de algún modo la ubiquitinización de numerosas proteínas, lo que desencadena el proceso de mitofagia. Por analogía, FBXL4 también podría de alguna manera estar relacionada con procesos de mitofagia indirectamente.

No obstante, no hay una certeza sobre la función exacta de esta proteína, quedando todavía por aclarar este punto.

3. PATOLOGÍA ASOCIADA A LAS MUTACIONES POR FBXL4.

3.1 Introducción

Hasta la fecha la bibliografía recoge 35 casos de encefalomiopatía mitocondrial asociada a mutaciones del gen FBXL4, descritas por diversos autores. Las mutaciones publicadas hasta la fecha se han hallado en pacientes en edad infantil con encefalopatía, hipotonía muscular, acidosis láctica persistente y defectos de la cadena respiratoria, que luego detallaremos.

Contamos con un registro total de 37 pacientes, en un total de 29 familias distintas, recuperadas de diversos estudios recogidos hasta la fecha^[9,10,12,13,14,15] y de informes clínicos de hospitales españoles de casos sin publicar.

Los hallazgos clínicos presentan un patrón general de:

- Acidosis láctica precoz
- Hipotonía,
- Encefalopatía con síntomas neurológicos variados
 - o alteraciones en la sustancia blanca, retraso del desarrollo variable
 - o Atrofia cerebral
 - o Degeneración de ganglios basales, tallo cerebral.

Asociados generalmente a otros rasgos, como:

- Alteraciones analíticas: hiperamonemia, aumento de alanina
- Rasgos dismórficos: microcefalia, facies típica
- Alteraciones de órgano (cardiomegalia, acidosis tubular renal, oculares, hematológicas)

En un porcentaje alto de casos, la enfermedad suele conducir a una muerte precoz antes de los 10 años, aunque hay un sujeto (el sujeto #22 en nuestra serie) que ha sobrevivido más allá de esta edad.

A nivel subcelular vamos a encontrar una alteración de la red mitocondrial, con un marcado descenso en el número de mitocondrias por célula y una alteración variable de la funcionalidad de los complejos I-V de la cadena respiratoria. En adelante explicamos detalladamente estas alteraciones.

3.2 Rasgos clínicos

El síndrome causado por la mutación en FBXL4 se denomina también como Síndrome de depleción del DNA mitocondrial tipo 13, o MTDP13 (OMIM #615471)^[4].

He recogido en una amplia tabla (tabla1, en Anexo) toda la información clínica disponible de todos los pacientes, numerándolos, donde se pueden consultar los casos concretos. Se especifica en el anexo en qué artículos se describe a cada paciente. Procedo a explicar los resultados clínicos globales

Los rasgos clínicos al comienzo dependen del momento de la presentación, pero muestran un patrón común de acidosis metabólica con lactato elevado, hipotonía muscular y rasgos neurológicos, combinado con retraso en el desarrollo y problemas de alimentación. La enfermedad presenta un curso progresivo crónico, al que se van uniendo complicaciones derivadas de la clínica progresivamente.

3.2.1. Edad de comienzo

La edad de aparición de los primeros síntomas comprende una amplia horquilla de edades, que va desde la aparición en período intrauterino, hasta los 24 meses. La media, con los datos de los que disponemos, está en 87,15 días. No obstante, hay que remarcar que los datos tienen mucha dispersión, y que sería más conveniente utilizar la mediana, que no podemos calcular puesto que nos faltan los datos de aproximadamente la mitad de los pacientes. De los que tenemos constancia, aparece al nacimiento en un 62,5% de los casos, lo cual lo sitúa como la moda en cuanto al momento de aparición de los síntomas.

Además, muchos de estos niños presentan un bajo peso para la edad gestacional o un crecimiento intrauterino retardado, que conlleva a menudo un parto pretérmino. Un paciente^[14] fue estudiado tras un parto pretérmino a las 25 + 5 semanas, que acabó en exitus. Ya en este punto mostraba alteraciones morfológicas (craneofaciales), escaso desarrollo, alteraciones en la ecografía craneal (megacisterna magna, calcificaciones) y niveles muy elevados de lactato, y piruvato en plasma. Por tanto, podemos suponer que la afectación comienza desde los primeros momentos de la vida, y que esta mutación afecta al individuo desde su etapa intrauterina.

3.2.2. Clínica general y del desarrollo:

- **Peso al nacer:** la mitad de los niños de los que se tienen datos (10/20), presentaron un peso al nacer por debajo o igual al percentil 3. El resto oscilaban entre el 3 y el 10, con la excepción del neonato que se encontraba en el percentil 30. De los pacientes descritos por Huemer^[13], otros 3/15 estaban por debajo del percentil 3 lo cual nos da un total de 13 de los 35 pacientes de los que se tienen datos. Esto supone que un 37% de los pacientes portadores de mutaciones en FBXL4 presentaban muy bajo peso para la edad gestacional. Podemos afirmar que el crecimiento intrauterino retardado simétrico, es muy prevalente entre estos pacientes.
- **Circunferencia cefálica reducida.** También se puede ver reducida como parte de las anomalías del desarrollo. En la serie de Huemer^[13], 2/5 presentaban microcefalia por debajo del percentil 3. En total observamos una presentación de 5 de 21 pacientes (24%). La prevalencia aumenta notablemente con respecto a la población general, pero no es un hallazgo constante.

- **Peso actual:** La evolución del peso durante la vida de los pacientes se nos ofrece en la serie de Gai^[9] ; observamos una disparidad en cuanto a la recuperación hasta un percentil de peso normal. Mayoritariamente se mantienen en percentiles bajos o muy bajos. No obstante, el peso depende de muchos factores, entre ellos el crecimiento o la capacidad de alimentación autónoma.
- **Facies dismórfica:** Muchos de los pacientes presentan una facies característica, que se caracteriza por microcefalia, frente amplia, cejas gruesas pero difusas con sinofridia, ojos rasgados e inclinados hacia arriba, nariz de base amplia con el puente nasal aplanado, surco nasolabial suavizado, orejas displásicas y de implantación baja. En ocasiones mentón prominente^[7,10] Algunos ejemplos de estos rasgos se muestran en la Figura 7



Paciente 6

Pacientes 8 y 9



Pacientes 19, 21 y 27

Figura 7: Aspecto facial de diversos pacientes. Extraído de [9] y [13]

Se encuentra unido a veces a otras alteraciones morfológicas como:

- Craneosinostosis (Turricefalia, trigonocefalia): alteraciones de la sutura de las fontanelas que ocasionan deformidad ósea.
 - Pectum excavatus: pecho hundido en la región esternal
 - Hipospadias: abertura del pene anormalmente localizada
 - Pezones supernumerarios: Un paciente lo presentó, de manera aislada.
- **Crecimiento retrasado:** Los pacientes presentan alteraciones en el desarrollo estaturoponderal y físico. Se relaciona en gran medida con la dificultad para alimentarse, ya que la hipotonía puede afectar también a los músculos que controlan la deglución y a la motilidad intestinal.
 - **Retraso neurocognitivo:** Los pacientes afectados muestran un desarrollo psicomotor claro. No alcanzan los ítems de desarrollo adecuados para su edad y conforme avanza la enfermedad se va haciendo más patente, mostrando en ocasiones incluso patrones regresivos. No obstante la aparición de síntomas de focalidad neurológica como convulsiones, disfunción auditiva o trastornos del equilibrio no es muy frecuente.

- **Falta de habla.** Uno de los ejemplos más flagrantes de este retraso neurocognitivo son las alteraciones en el habla (desarrollo incompleto del lenguaje) o directamente el hecho de la no verbalidad que presentan muchos de los pacientes.

3.3.3. Clínica del SNC

La enfermedad se caracteriza por ser una encefalopatía de origen mitocondrial, con afectación pleoitrópica de otros tejidos, pero éste es su rasgo principal, junto a la hipotonía. Se trata de una condición crónica, caracterizada por lesiones diversas en el tejido nervioso que afectan principalmente a la sustancia blanca, pero también a zonas grises, como la corteza y los ganglios de la base, así como al troncoencéfalo y el cerebelo. Hablaremos más detalladamente de ello al explicar los rasgos de resonancia magnética.

- **Lesiones de la sustancia blanca:** Se produce un edema localizado en la sustancia blanca supratentorial que se refleja en la hiperseñal T2 que se capta en la RMN de muchos pacientes^[13]. Se describen defectos puntuales en las vías de conducción como en el brazo posterior de la cápsula interna y en la columna espinal.
- **Atrofia cerebral:** Las lesiones inflamatorias crónicas que suponemos causan este edema cerebral se convierten en medio-largo plazo en zonas de atrofia, quizá por degeneración de algunas de las neuronas afectadas
- **Convulsiones:** Al ser un proceso que afecta al SNC, es de esperar que se presenten signos de focalidad neurológica como las convulsiones. Se han documentado en un número pequeño de pacientes, y suelen tener carácter generalizado.
- **Ataxia, coreoatetosis:** La afectación cerebelosa y de las vías piramidales puede dar lugar a ataxia, que se observa como la incapacidad de mantener el equilibrio troncular. Hay coreoatetosis en algún caso.

3.3.4 Clínica neuromuscular

- **Hipotonía:** La hipotonía es el síntoma cardinal de estos pacientes, presentándose en el 100% de los casos descritos. El músculo es uno de los tejidos más afectados por las patologías mitocondriales, y por ello, se manifiestan en forma de impotencia funcional muscular o hipotonía. Es manifiesto sobre todo cuando se presenta desde el nacimiento, ya que en los neonatos el estado fisiológico es de hipertonia muscular.
- **Dificultad para tragar:** Como parte del cuadro de hipotonía, los músculos de la faringe no realizan correctamente su función. Esto, unido a cierto grado de dismotilidad de la pared intestinal, provoca que los niños afectados sufran en muchos casos de mala alimentación y necesiten de la implantación de una sonda nasogástrica o de una gastrostomía percutánea para mantener una nutrición correcta.
- **Dismotilidad intestinal:** En grado variable, no es un hallazgo constante.
- **Incapacidad para la marcha.** De los pacientes que tenemos registrados, la presentan 15, que se sepa. Posiblemente la hipotonía, unida al desarrollo psicomotor y a la mala alimentación, imposibilita la marcha, que requiere de unos músculos antigravitatorios fuertes y una coordinación adecuada que se adquiere en los primeros años de vida. En grados menores de afectación, algunos pacientes sólo presentan intolerancia al ejercicio.

3.3.5. Alteraciones metabólicas

- **Acidosis láctica:** Es un hallazgo constante. Al nacimiento el lactato está especialmente elevado, pero luego permanece de manera crónica. Huemer et al. (2013) describe una

media de 13,2 mmol/l al diagnóstico (rango normal 0,5-2,2) , si bien luego desciende a en torno a 6 mmol/l. Se encuentran depósitos de ácido láctico también periventriculares (secuencia de RM espectroscópica) y aumento en el LCR. Los síntomas aparentes en fases agudas no se nos especifican, pero probablemente estén en relación a esta acidosis láctica (náuseas, debilidad, cefaleas).

- **Alanina elevada en plasma:** No es un hallazgo presente en todos los sujetos, pero se mantiene constante en los que lo presentan. Se calcula una media de 678 en [13], siendo los valores de referencia 120-600.
- El Sujeto #1 lo asocia a hiperprolinemia e hipersierinemia.
- **Hiperammoniemia:** Niveles elevados de $[NH_4^+]$ se presentan igualmente en algunos de estos pacientes, sobre todo al momento del diagnóstico, normalizándose a posteriori. La elevación es moderada, con una media de 99 $\mu\text{g/mol}$ siendo los valores de referencia de 15-70.
- **Incremento de ácidos orgánicos en orina:** en una mayoría de pacientes se encuentran niveles aumentados de 3-OH butirato, piruvato, fumarato, malato y 4OH-fenilactato.

3.3.6. Manifestaciones orgánicas

Las alteraciones a nivel de órgano-sistema son variables entre los diferentes sujetos. No se aportan todos los datos además en todos los casos. Recojo las principales de entre las descritas.

- **Patología cardíaca:** No es un hallazgo constante. En la mayoría de los casos se manifiesta como alteraciones hipertróficas concéntricas del ventrículo izquierdo. Es probable que se deba a un esfuerzo compensatorio para intentar compensar el déficit de energía en los cardiomiocitos. Se ha descrito en algún caso alguna arritmia de tipo sinusal, como en el paciente #1, que fue diagnosticado de arritmia cardíaca e hipertensión pulmonar.
- **Afectación renal:** Se presenta en algunos pacientes en forma de acidosis tubular renal, que requiere de la administración crónica de bicarbonato.
- **Patología oftálmica:** El ojo es un órgano frecuentemente afectado por las patologías mitocondriales (p.ej. Neuropatía óptica hereditaria de Leber), ya que requiere un gran aporte de energía. En esta enfermedad, se manifiesta en:
 - o Catarata congénita: Al menos 4 pacientes presentaron este problema.
 - o Atrofia del nervio óptico: Es más excepcional, se da en muy pocos casos.
- **ERGE:** Como parte de las manifestaciones hipotónicas puede haber una relajación del esfínter esofágico inferior que produce reflujo gastroesofágico. Ocurre en aproximadamente la mitad de los pacientes y hace conveniente el tratamiento profiláctico con inhibidores de la bomba de protones
- **Alteraciones hematológicas:** La médula ósea también es un tejido con unas necesidades energéticas importantes, sobre todo para la producción de las células sanguíneas a partir de los precursores hematopoyéticos.
 - o Anemia: la literatura la describe en un par de casos.
 - o Neutropenia: Su presencia se manifiesta en forma de infecciones recurrentes. En el sujeto #1^[12] se asocia linfopenia e hipogammaglobulinemia. Puede mejorar con la nutrición.
 - o Trombocitopenia: Un caso (manifestado como neutropenia) se asoció a problemas en la cicatrización, y muerte por hemorragia digestiva alta, por lo que se puede hipotetizar la presencia de trombocitopenia
- **Escoliosis progresiva:** Descrita en pocos casos, quizá como consecuencia de escaso tono en los músculos de la espalda.

3.3.7. Síntomas tardíos

La paciente #22 es la de edad más avanzada a la que se ha realizado seguimiento, contando en ese momento con 13 años^[17]. Debido a su relativa longevidad, desarrolló otros síntomas que no se habían manifestado previamente: ^[8,6]

- Ptosis
- Sordera neurosensorial
- Atrofia del nervio óptico con déficit de visión
- Accidentes isquémicos cerebrales de repetición^[17]

En este último evento merece la pena ser remarcado, ya que se trata de un caso de accidente cerebrovascular que constituye un grave riesgo mortal y provoca un agravamiento del estado neurológico, además de generar más discapacidad. Amplia el espectro de las manifestaciones en cuanto a la fisiopatología de la enfermedad, ya que la afectación cerebrovascular no estaba descrita previamente.

A la edad de 10 años sufrió un ACV agudo en el territorio derecho posterior (figura 8), abarcando varios territorios vasculares, que le ocasionó una hemiparesia izquierda permanente. Dos años más tarde vuelve a sufrir un episodio similar, en el hemisferio izquierdo, y afectando a regiones del lóbulo occipital y parietal, abarcando varios territorios vasculares. Un tratamiento profiláctico con L-citrulina no evitó el segundo ataque^[14].

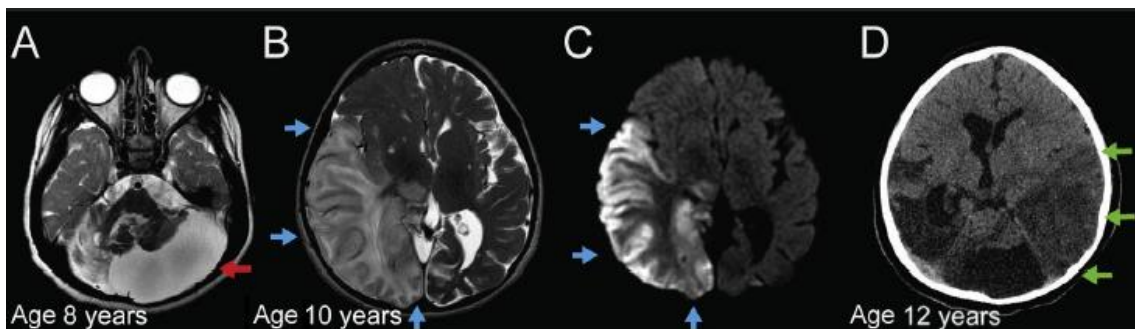


Figura 8: Imagen A: RMN en T2 que muestra atrofia cerebelosa crónica, no afectación supratentorial. B: RMN en T2 en el primer episodio, muestra ictus masivo temporo-parieto-occipital llegando a regiones talámicas (flechas azules). C: RMN en secuencia de difusión del mismo episodio. D: Tomografía computarizada (TC) durante el segundo episodio, a los 12 años. Ictus extenso en el hemisferio derecho, zona parieto-occipital (flechas verdes). Se aprecian lesiones residuales del primer ACV.

Ésta preferencia observada por los territorios occipital y parietal posterior se solapa con los AIC que ocurren en el síndrome de MELAS, en el que también son progresivos, repetitivos y no concuerdan con los territorios vasculares clásicos. Es probable que exista un mecanismo fisiopatológico común, que podría estar en relación con la disfunción mitocondrial en las células endoteliales, sin bien se desconoce.

3.3 Nuevos casos diagnosticados en España

De los casos de los que disponemos, dos de ellos no han sido publicados en la literatura sino que son pacientes españoles cuyos casos se estudian en el departamento de Bioquímica y Biología molecular de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Se trata de los casos numerados en las tablas como #34 y #35. La paciente #34, originaria de Córdoba, es una niña, Se observaron anomalías ya en el periodo fetal: ECO: diagnosticada de CIR, arteria umbilical

única. RMN fetal: megacisterna magna y foco hiperintenso frontal compatible con sangrado o calcificación.

Nacida a término (37 + 6 semanas) 13/9/2013 con bajo peso para la edad gestacional, de parto eutócico. Apgar 9 al minuto 1, 10 al minuto 5. Peso: 2090 (percentil < 1), Longitud 46 (percentil 10), perímetro cefálico: 32 cm (percentil 10-25). No requirió maniobras de intubación. Su exploración fue de un buen estado general, normocoloreada normohidratada. FC: 152 lpm. FR: 64 r/min; TA: 97/64 (valores normales). Exploración normal incluyendo movimientos espontáneos normales, salvo caput parieto-occipital derecho. Ingresa a los 4 días de edad por motivo no especificado. Despistaje de infección prenatal negativo: serologías para Lúes, TORCH y PCR de CMV negativos.

Clínica: Se observan niveles de ácido láctico elevados de forma repetida en gasometrías (pico de 11,3, al alta 4,8, valores normales 0.5 a 2.2 mmol/L), no acidosis ni alteración de los niveles de bicarbonato. Niveles de ácido pirúvico, amonio, sulfiteo, cuerpos cetónicos en orina, transferrina con déficit de carbohidratos, homocisteína normales; prueba de talón, estudio de coagulación y fondo de ojo normal

El estudio de las anomalías radiológicas observadas intraútero se amplía con imagen post natal:

- ECO: Imágenes sugestivas de calcificaciones periventriculares. Posible quiste subependimario en ventrículo lateral izquierdo. Éste presenta paredes irregulares megacisterna magna izquierda. Hiperecogenicidad en lóbulo frontal izquierdo.
- TC craneal: Dos imágenes puntiformes hiperdensas intraventriculares en plexos coroideos, en atrio izquierdo y asta frontal derecha. Dos focos puntiformes en fosa posterior. Todo ello en relación con sangrado.
- RMN: Megacisterna magna, múltiples focos de alteración de señal en: hemisferios cerebelosos, cortical de lóbulo temporal izquierdo en surcos caudotalámicos próximos al agujero de Monro, parasagital posterior derecho, e intraventriculares. Compatibles con calcificación o focos de sangrado. Discreta atrofia del lóbulo temporal izquierdo.

En un segundo ingreso, en enero de 2014, se detallan más síntomas: Neurológicamente, la paciente presentaba retraso en el desarrollo psicomotor y marcada hipotonía. Mantuvo la lactacidemia al alta (4 meses de edad) Fallece a los 8 meses de edad por fallo respiratorio.

El estudio genético de la paciente reveló dos mutaciones en heterocigosis en el gen FBXL4: IVS4+5C>G (alteración en el splicing) y c.1510T>C (cambio de sentido). No están descritas previamente en la literatura existente. Se encontró una depleción de ADNmt del 85% en el laboratorio a partir de biopsia muscular.

De nuestro segundo paciente, el paciente #35, no se tienen datos clínicos. Le fue descubierta la mutación en FBXL4 c.851delC, en homocigosis, no publicada con anterioridad Se cuantificó en el laboratorio, a partir de músculo, una depleción de ADNmt de un 93%. .

3.4 Deficiencias bioquímicas

3.4.1. Deficiencia de los complejos de la cadena respiratorias

Una de las pruebas más concluyentes en patología mitocondrial es la medición de la actividad, en porcentaje global, de los complejos respiratorios mitocondriales. Se puede realizar de dos maneras, mediante estudios polarográficos con un electrodo de oxígeno (electrodo de Clark) o mediante análisis espectrofotométricos en homogeneizado de tejidos.^[1] Se suele medir la

actividad en músculo y en fibroblastos. Otra medida bioquímica que se estudia en patologías que cursan con depleción es el porcentaje de ADNmt restante con respecto a un control que queda en las células de estos pacientes. Es una manera de medir la severidad bioquímica de estas patologías.

En los individuos que están afectados de mutaciones en FBXL4, se observa una reducción significativa de la actividad en todos o algunos de los complejos, dependiendo del sujeto, generalmente más en músculo que en fibroblastos. Algunos de los pacientes han sido estudiados para intentar comprender la fisiopatología de la enfermedad.

Gai (2013) describe deficiencias de actividad en los complejos I-V, en grado variable en todos los pacientes de su estudio, así como niveles disminuidos de citrato sintasa. Halla depleción de DNA mitocondrial en grado variable, incluso en sujetos de un mismo pedigrí con la misma mutación^[9]. La serie de Huemer^[13] muestra una reducción constante en la actividad de complejos respiratorios, citrato sintasa y depleción de ADNm en todos los sujetos estudiados.

En general vemos una reducción de la actividad de los complejos I-V de la cadena respiratoria, si bien es relativamente más frecuente la deficiencia en los complejos I y IV, siendo generalmente el II el menos afecto.

El artículo de Antoun et al (2015) estudia el paciente #1 detalladamente. Muestra una marcada reducción de la actividad de los complejos I y II siendo la inhibición con rotenona (inhibidor del complejo I) prácticamente insignificante en el resultado final de la medición, lo cual indica una muy reducida actividad del complejo I. Vemos los datos resumidos en la tabla 2.

Además, comprueba una reducida viabilidad celular in vitro de los fibroblastos del paciente #1, con respecto a los de control sano. Demuestra un balance más oxidado (menor) de la ratio GSH/GSSG, lo cual indica una perturbación del equilibrio redox del sistema del glutatión. Se sabe que afecta a la actividad de los complejos respiratorios y proteínas como UP3, además de participar en el metabolismo de algunos sustratos como el fumarato.

Además, en los fibroblastos de este paciente #1 se han analizado otros parámetros que se muestran a continuación ^[12]:

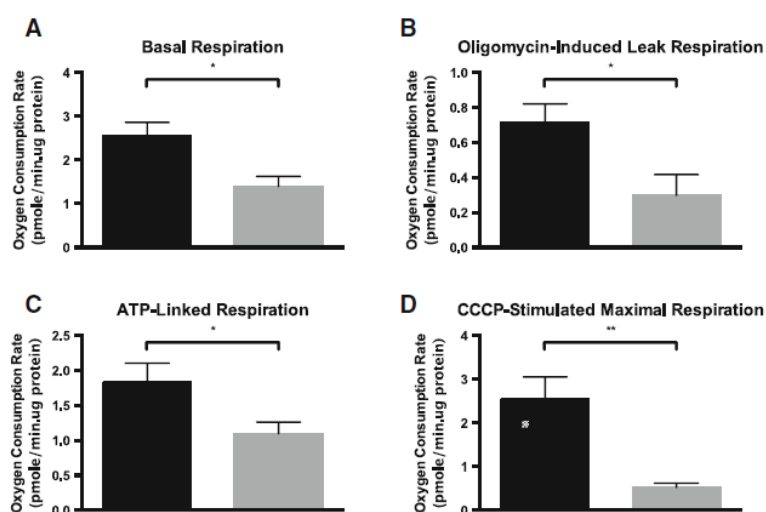


Figura 9: Comparación entre un control adulto sano (barra negra) y un paciente (barra gris) de la Tasa Basal de Consumo de O₂ (Oxygen consumption rate; OCR), en estado basal (A), pico tras la inhibición del

complejo V con Oligomicina (B); OCR asociada a fosforilación, estimada como el descenso relativo tras la adición de fosfomicina.

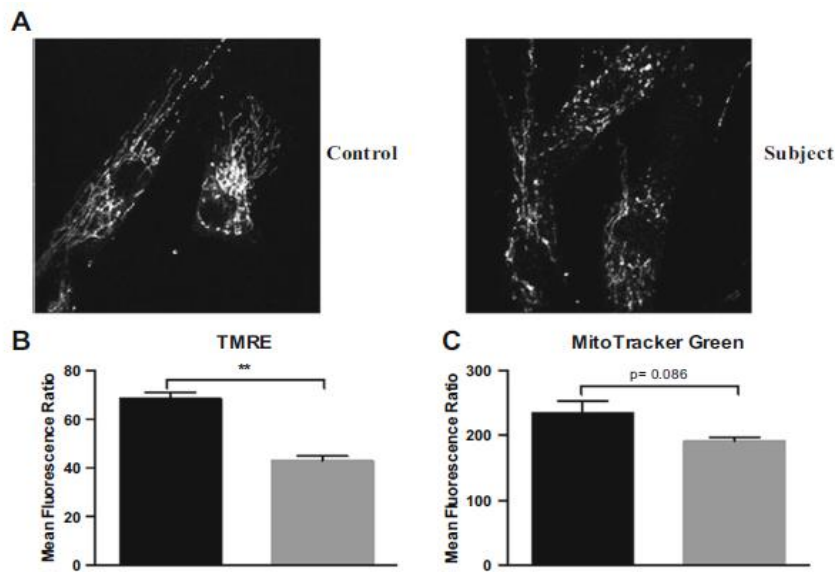


Figura 10: Se muestra la imagen de inmunofluorescencia contra la proteína de la MME TOMM20 en fibroblastos de un sujeto adulto control (A) y de un paciente (B). Los valores de IF POR TMRE (fluorocromo dependiente del potencial transmembrana) y de mitotracker Green, medidos por

citometría de flujo muestran una reducción significativa del potencial transmembrana en la mitocondria (C) y una reducción de la masa total mitocondrial (D)

Asociada a la reducción de la actividad de los complejos mencionada anteriormente, se produce un descenso en la tasa de consumo de oxígeno, basal y acoplada a ATP. La depleción de ADNmt es un hallazgo constante en los sujetos en los que se ha estudiado, siendo esta depleción variable entre sujetos con mismas mutaciones, y entre fibroblastos y músculo.

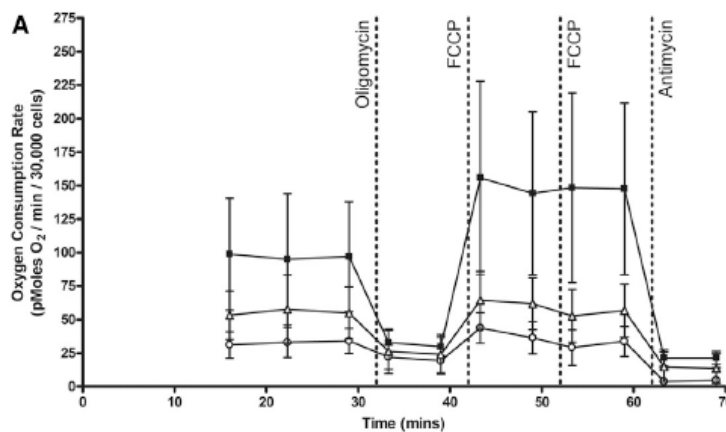


Figura 11. Descenso en la OCR de pacientes y controles. En esta imagen, extraída de Bonnen et al (2013), se muestra el consumo de O₂ con el tiempo en fibroblastos vivos del paciente #11 (triángulos blancos) y #16 (círculos blancos), en comparación con los de un control sano (círculos negros). Desciende considerablemente al añadir oligomicina (inhibidor de la ATP-sintasa o complejo V) y actimicina (inhibidor del transporte electrónico en el complejo III). Tras la inhibición con Oligomicina, se recupera con carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), que desacopla la cadena de electrones de la fosforilación oxidativa.

A continuación presento una tabla en la que se recogen detallados las alteraciones bioquímicas en los pacientes. Cuando no hay datos, se expresa mediante un guion. En algunos se ha podido expresar de manera cuantitativa, con porcentajes, y en otros ha debido ser de manera

Datos			Actividad complejos cadena respiratoria					ADNmt
ID sujeto	cl	cII	CIII	cIV	cV	PDHc	CS	% copias
#1	↓	↓	-	-	-	-	-	37%
#2	-	-	-	-	-	-	-	12%
#3	-	-	-	-	-	-	-	45%
#4	-	-	-	-	-	-	-	25%
#5	-	-	-	-	-	-	-	-
#6	66%	34%	14%	44%	-	-	84%	63%
#7	24%	84%	Normal	75%	-	-	43%	30%
#8	63%	50%	72%	23%	-	-	43%	20%
#9	34%	65%	59%	25%	-	-	18%	35%
#10	61%	52%	56%	56%	-	-	51%	68%
#11	95%	85%	Normal	50%	-	↓	-	27%/62%
#12	-	-	-	-	-	-	-	-
#13	-	-	-	-	-	-	-	-
#14	-	-	-	-	-	-	-	-
#15	-	-	-	-	-	-	-	-
#16	30%	80%	40%	30%	-	↓	-	10%
#17	60%	80%	-	80%	-	↓	-	25%
#18	N	N	N	N	N	N	N	-
#19	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
#20	N	N	N	N	N	N	↓	-
#21	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
#22	↓	-	↓	↓	-	-	-	-
#23	-	-	-	-	-	-	-	-
#24	-	-	-	↓	-	↓	↓	-
#25	-	-	-	-	-	-	-	-
#26	N	N	N	N	N	↓	N	-
#27	-	-	-	-	-	-	-	-
#28	N	N	N	N	N	N	N	-
#29	-	-	-	-	-	-	-	-
#30	-	-	-	-	-	-	-	-
#31	-	-	-	-	-	-	-	-
#32	-	-	-	↓	-	-	-	-
#33	↓	N	N	N	N	N	N	-
#34	-	-	-	-	-	-	-	15%
#35	-	-	-	-	-	-	-	7%
#36	-	-	-	-	-	-	-	-
#37	N	N	N	N	N	N	N	45%

cualitativa. Las flechas hacia abajo indican descenso. Llama la atención que en algunos casos no se detecta una disminución significativa de la actividad, lo que propone otro interrogante más en cuanto a la fisiopatología de la enfermedad. Se comentará en discusión

Tabla 2: Actividades relativas de la cadena respiratoria y porcentaje de ADNmt remanente. Los datos proceden de biopsias musculares. Se recogen de manera cuantitativa (con porcentajes) o de manera

cualitativa dicotómica (disminuido o no) con flechas en dependencia de como haya sido recogido en la literatura. N = normal

4. DIAGNÓSTICO

4.1 Sospecha clínica

Un paciente con mutaciones en FBXL4 va ser considerado como un paciente con síntomas heterogéneos, no encuadrado en ningún síndrome típico. Conociendo la clínica de las enfermedades mitocondriales, el médico (el pediatra en nuestro caso) deberá sospechar esta etiología en los casos en los que coexistan alteraciones metabólicas (lactato, hiperamonemia), neurológicas y musculares sin relación aparente, así como otras posibles anomalías congénitas o retraso en el desarrollo. No es razonable exigir a un clínico que introduzca en su diferencial esta patología en concreto, ya que es extremadamente infrecuente, pero sí que considere encaminar el diagnóstico hacia las patologías mitocondriales o realizar un estudio genético del llamado panel de enfermedades en relación con la mitocondria.^[9,10,12,13]

4.2. Pruebas complementarias

4.2.1. Resonancia magnética

Los sujetos afectados de una mutación bialélica deletérea en FBXL4 muestran en su mayoría alteraciones significativas en la resonancia magnética cerebral, en coherencia con la encefalopatía mitocondrial que padecen.

Los hallazgos dependen del momento en el que se realiza la prueba, ya que la enfermedad va pasando por diferentes fases, de manera que las lesiones evolucionan y aparecen otras nuevas a lo largo del tiempo; por ejemplo, la atrofia cerebral no se suele encontrar en recién nacidos sino a partir de los meses o años.

Algunos de los principales hallazgos son:

- Aumento de líquido o edema generalizado en sustancia blanca
- Atrofia cerebral difusa (típico de la fase crónica)
- Dilatación de ventrículos y/o de la cisterna magna
- Quistes paraventriculares
- Alteraciones de la difusión: aumentada en territorio supratentorial y disminuida en los tractos tegmentales dorsales^[13]
- Mielinización retrasada (fase crónica)

Otros hallazgos menos frecuentes, que sólo aparecen en algún caso concreto son:

- Alteración en los ganglios basales, edema en algunos casos
- Dilatación de las cisternas pericerebelosas
- Alteración de la señal en los brazos posteriores de la cápsula interna
- Lesiones de infartos cerebrales previos.
- Hipoplasia cerebelosa

La resonancia magnética es una herramienta que permite identificar sustancias químicas aplicando diversas secuencias específicas de pulsos. Así, podemos ver que aparecen señales de lactato en ocasiones en ganglios basales y áreas peri ventriculares; o depositados difusamente en todo el parénquima cerebral, incluso en zonas aparentemente sanas^[15]

A continuación se muestran algunas imágenes representativas de los hallazgos descritos:

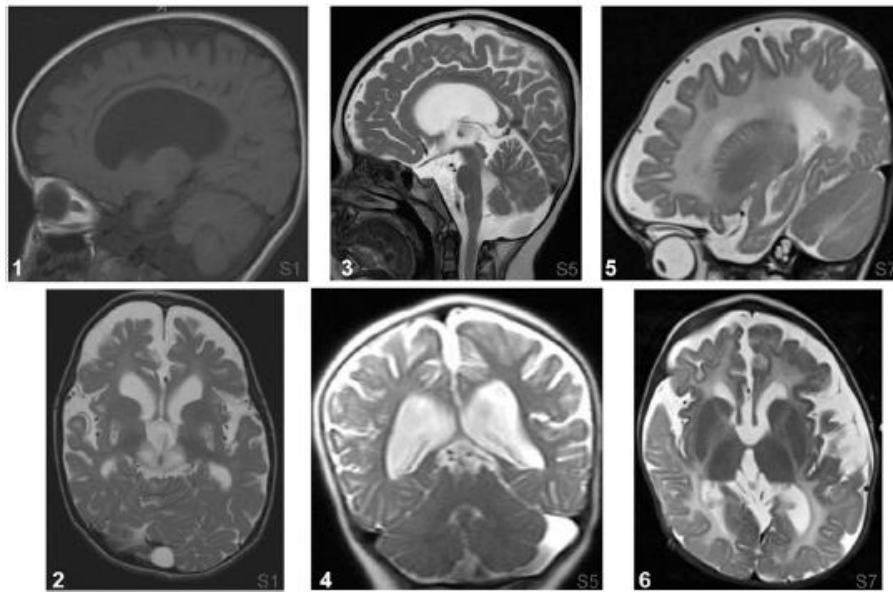


Figura 12: Imágenes 1 y 2 corresponden al sujeto #2 a los 2 años de edad; 3 y 4 corresponden al sujeto #6 con 4 años; 5 y 6 al sujeto #8 a los 9 meses.

En la 1 y 2 vemos una RMN en T1 en la que se aprecia un cuerpo calloso delgado, marcada atrofia supratentorial, señales anormales en la sustancia blanca, principalmente subcorticales, lesiones del putamen y en la región subtalámica. Hay también un quiste subaracnoideo en región occipital.

En 3 y 4 vemos una marcada atrofia supratentorial y cambios distróficos en la sustancia blanca, en el territorio infratentorial vemos agrandamiento de las cisternas con conservación del resto de estructuras. En las imágenes 5 y 6 se aprecia una craneosinostosis clara y atrofia cerebral supratentorial. Modificado de Gai et al (2013)

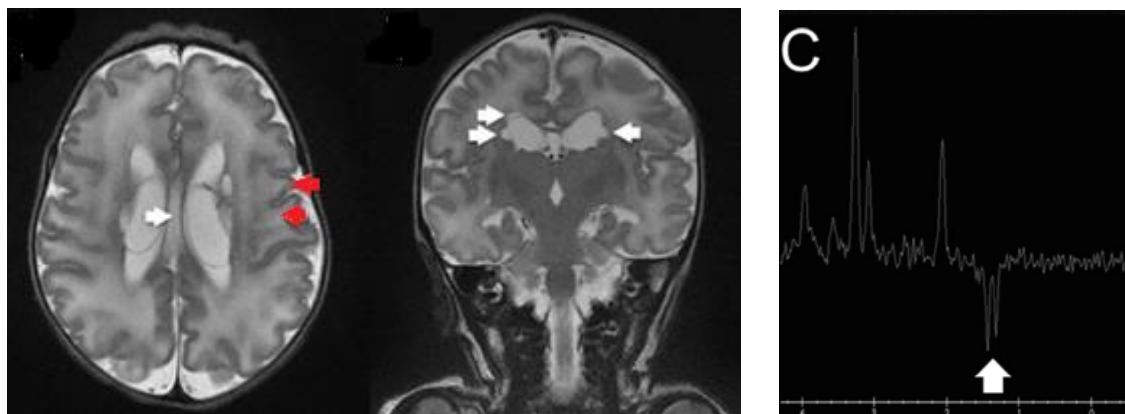


Figura 13: Imágenes correspondiente al paciente #1. En la primera (RMN craneoencefálica en T2) podemos ver edema difuso en la sustancia blanca (flechas rojas), y quistes tanto intraventriculares como periventriculares (flechas blancas). Se trata de un paciente recién nacido por lo que no apreciamos atrofia^[12]. La segunda imagen (espectroscopia por RM) muestra señal de doblete de lactato^[12]. Otra señal distinta, en el paciente #37 se describe como “intensa”, alcanzando picos bastante altos. El lactato resuena a 1,3 ppm. Esta acumulación encefálica de lactato podría desempeñar un origen en la fisiopatología de la encefalopatía y de las lesiones observadas, si bien no se tienen datos acerca de eso.

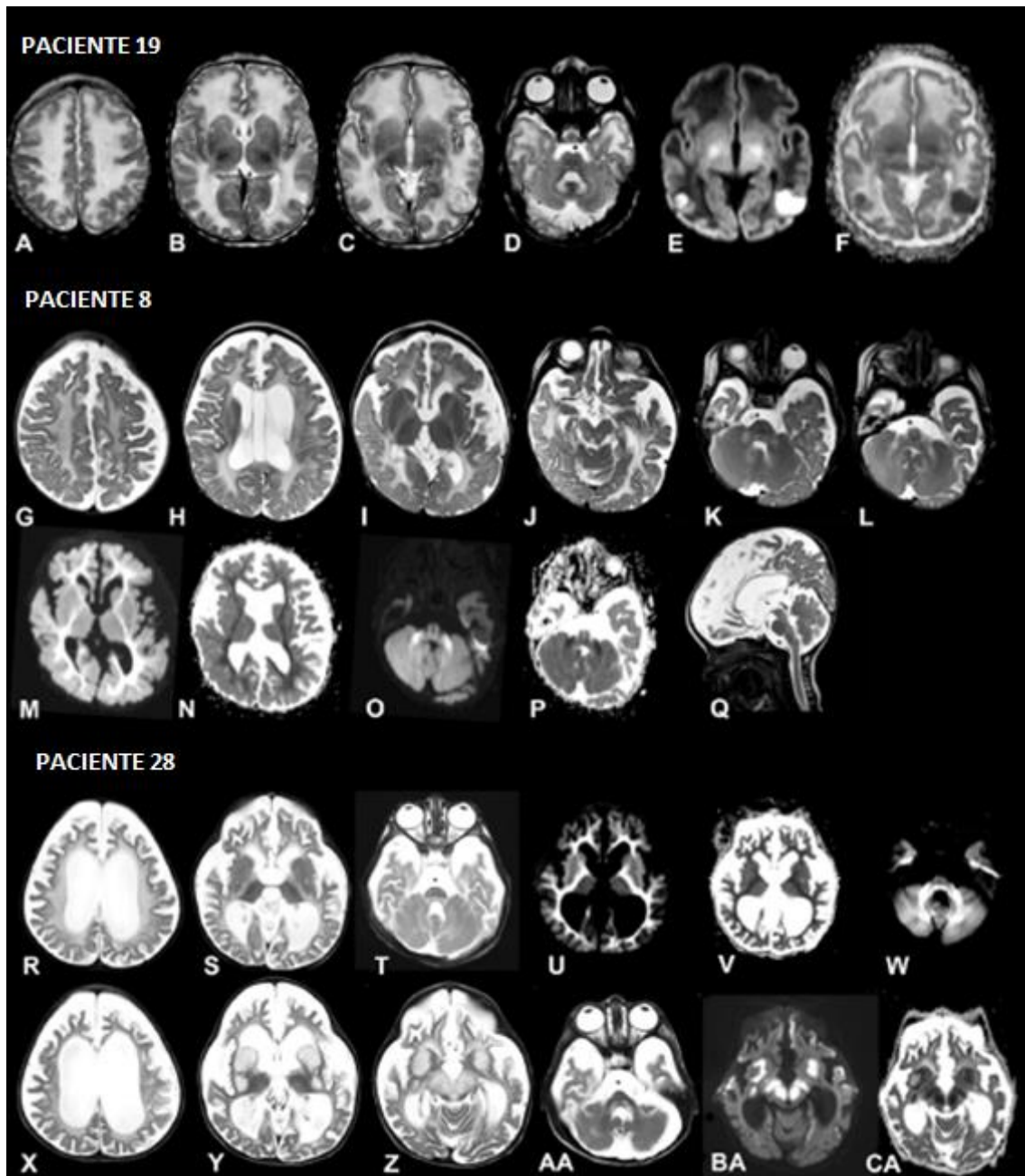


Figura 14: Vemos las resonancias magnéticas en T2 de 3 pacientes distintos a distintas edades. Son los pacientes 19 a los 4 días (identificado como 2 en [13]), 8 a los 9 meses (id como 7 en [9] y como 4 en [13]) y 27 a los 3 años. (id como 19 en [13]).

En el paciente #19, se ve edema y ligera hiperintensidad de la materia blanca supratentorial (a-d), con algunos defectos en los ganglios basales (b). En f vemos difusión incrementada en sustancia blanca con aumento de ADC

Paciente #8 (9 meses): Se aprecia atrofia generalizada supratentorial, un quiste paraventricular izquierdo (h) y un leve y difuso incremento de la señal de la sustancia blanca (g-i). El tecto, los tractos piramidales, el segmento dorsal y los pedúnculos cerebelosos (k,l) tienen hiperseñal.

Paciente #28 (3 años (r-w) y 2,5 meses después (x-ca): Atrofia supratentorial severa (r-t), con troncoencéfalo delgado (t). Señal de sustancia blanca incrementada (r-t) con difusión alterada (u,w), y un bajo ADC; ganglios basales y sustancia negra claramente edematosos con difusión alterada.

4.2.2 Ecografía

La ecografía es un método útil de diagnóstico en esta patología ya que permite evaluar las alteraciones cerebrales intraútero, mediante la ecografía transvaginal. Igualmente refleja las alteraciones orgánicas de los pacientes, permitiendo detectar las alteraciones cardíacas (ecocardiograma), renales, hepáticas etc.

Figura 15: vemos una ecografía transvaginal de la cabeza del paciente #36 [14], que presenta hipoplasia cerebelosa, dilatación ventricular al borde de la normalidad y algunos quistes paraventriculares (flechas).



4.2.3 Estudios anatomopatológicos

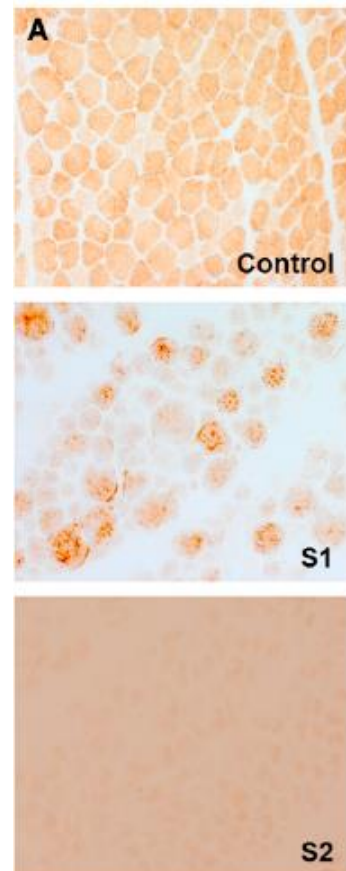
La presencia de una asociación anormal de síntomas, que pueda ser compatible con una enfermedad mitocondrial, junto a unas alteraciones bioquímicas significativas, obliga a un estudio morfológico, bioquímico y anatomopatológico para acercarse al diagnóstico^[1].

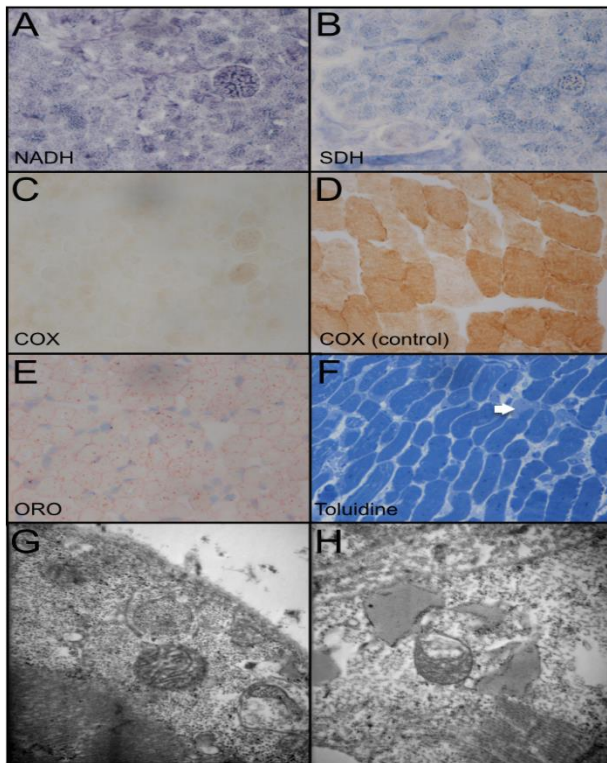
Los tejidos más utilizados frecuentemente son los más afectados, véase el músculo, o los más accesibles, como la piel. La biopsia muscular era norma general, si bien se evita cuando se puede. Algunas de las tinciones utilizadas habitualmente son tricrómico de Gomori, inmunohistoquímica contra NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa (SDH) y citocromo C oxidasa (COX), así como el azul de toluidina.

Los hallazgos no son específicos de la deficiencia de FBXL4, sino que muestran alteraciones específicas de patologías de origen mitocondrial^[12]. Generalmente en las patologías mitocondriales se encuentran fibras rojo rasgadas (RRF), fibras no reactivas a la tinción de la citocromo c oxidasa y disminución de la intensidad de la tinción histoquímica de los complejos I-V de la cadena respiratoria.

Gai (2013) habla de una reducción significativa en la tinción de la citocromo C oxidasa en los pacientes de su serie, pero no de aparición de RRF. Bonnen (2013) aporta resultados similares^[10], en los sujetos #11 y #16, en los que se muestra una actividad de COX, reducida y puntiforme en el sarcoplasma, con acumulaciones subsarcolémicas. El paciente #17 presentó un ligero incremento en la acumulación de glucógeno y un agrandamiento de algunas mitocondrias. (Figura 16)

Figura 16: podemos observar la tinción de la biopsia de músculo vasto lateral de la paciente #1, en la que se describe un incremento de gotitas lipídicas de glucógeno en el espacio intrasarcoplasmico, y deficiencia de actividad de la cadena respiratoria representada en la escasa tinción para citocromo c oxidasa. Las mitocondrias son escasas en número, y algunas de ellas son alargadas y amorfas.





A,B: NADH (complejo I) y SDH (mide actividad del complejo II) muestran una tinción pálida, desigual, con una reacción granular en algunas fibras.

C,D: La COX del paciente muestra una gran disminución, con pocas fibras (+), mientras que en la del control se ve una tinción intensa

E: Aceite red-O muestra un incremento sutil del número de gotas de sangre.

F: La tinción con azul de toluidina muestra acúmulos anormales subsarcolémicos de glucógeno.

G,H: La microscopía electrónica muestra un incremento en el acúmulo de glucógeno, una disminución de las mitocondrias, algunas de las cuales tienen crestas anormales.

Figura 17: Obtenida de Antoun y cols. [12]

La biopsia también puede servir para investigar la tinción de los complejos de la cadena respiratoria, que puede estar disminuida en alguna enfermedad mitocondrial.

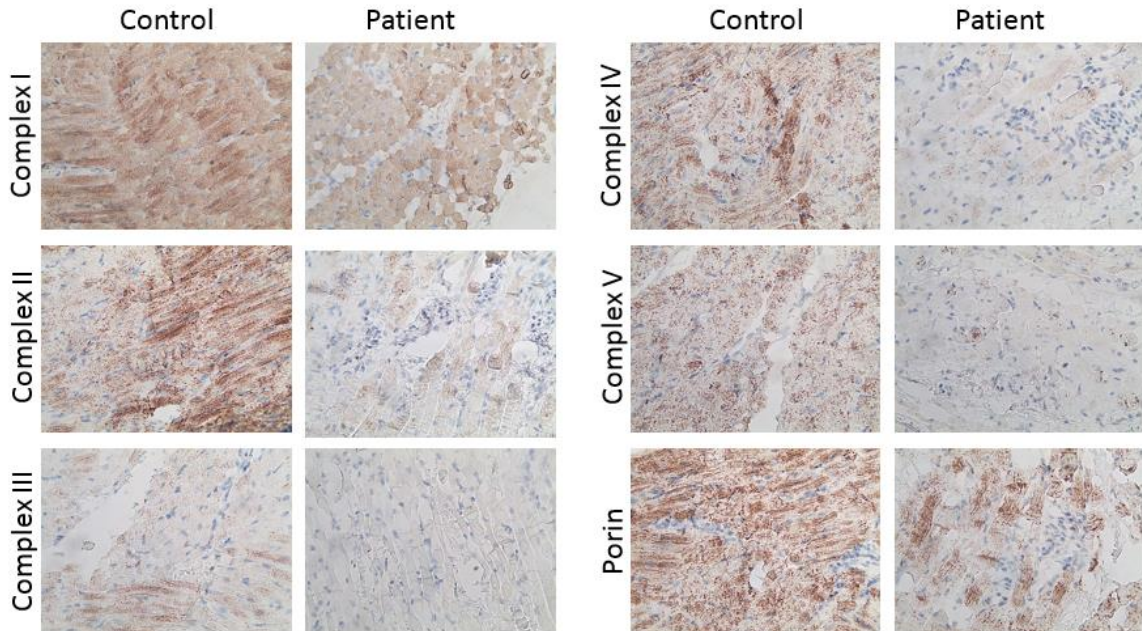


Figura 18: En esta otra imagen vemos un ejemplo, en el que mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos marcados se han marcado los complejos macromoleculares I-V y la proteína porina.

4.2.4. Diagnóstico genético

Ante una sospecha clínica suficientemente sólida y unos datos bioquímicos y anatomopatológicos coherentes con patología mitocondrial, el siguiente paso que estaría indicado sería el diagnóstico genético de la mutación específica causante de la enfermedad.

En primer lugar, se debe investigar la presencia de casos similares en la familia y establecer un pedigrí, que nos puede aclarar el tipo de herencia. En el caso de nuestra patología, será de tipo autosómica recesiva.

Para el estudio genético propiamente dicho, se puede tomar una muestra de tejido muscular, sanguíneo, en células epiteliales de orina, etc. Generalmente, en las patologías en las que se afecta el ADNmt, se emplea una muestra de músculo, por ser el tejido más afecto. En nuestro caso no sería necesario, pero probablemente se haga, ya que en este punto del diagnóstico no se ha asignado todavía la mutación al gen responsable. Bastaría, sin embargo, con métodos menos invasivos, como una muestra de sangre^[1], o una muestra de orina.

Las opciones para realizar un estudio genético propiamente dicho son las siguientes:

- Secuenciación del genoma completo por el método de Sanger
- Secuenciación del exoma completo (WES o whole exome sequencing)
- Hibridación en un array con fragmentos específicos de genes que presentan mutaciones conocidas

En los estudios realizados hasta la fecha, el método principal de diagnóstico genético es la secuenciación por exoma completo o WES (Whole exome sequencing)^[2,4,5]. En los informes clínicos de los pacientes españoles (sin publicar) se realiza una secuenciación de regiones codificantes basándose en un panel de genes específico de afectación mitocondrial, como propone Wortmann^[3]

La secuenciación del exoma es una técnica de secuenciación de las llamadas de nueva generación (NGS), en las que el genoma es fragmentado en fragmentos pequeños, como mucho de 100 pb, y posteriormente sometido a secuenciación masiva. Además, focalizando en el exoma se estudia un 1% del genoma completo, y en él se localizan el 85% de las enfermedades genéticas^[11].

Mediante esta técnica, cuando queremos estudiar un grupo de genes concreto, se prepara un array específico que fije los fragmentos que nos interesan (los que incluyan el exoma de estos genes); se generan muchas copias mediante técnicas de PCR, se secuencian y luego se comparan con la secuencia original del gen disponible en bases de datos.

La ventaja fundamental de la secuenciación del exoma es poder obtener la secuencia de todos los genes funcionales a un costo mucho menor que uno a uno. La prueba supera en rendimiento al análisis de genes individuales, a la búsqueda mediante paneles de mutaciones frecuentes o al uso de array CGH (Comparative Genomic Hybridization). Mediante esta técnica saltamos de examinar genes específicos relacionados con el fenotipo a estudiar genomas enteros, o un buen número de genes que nos interese^[11]. En el caso de mutaciones desconocidas, tiene una tasa de rendimiento del 43-60% en comparación con un 11% de la técnica de Sanger.

Wortmann y cols. (2015) propone utilizar un sistema de secuenciación del exoma para hallar mutaciones en patologías mitocondriales, mediante un procedimiento de dos pasos. En primer lugar, se realiza un panel “virtual” de genes nucleares de proteínas que actúan en la mitocondria

y se secuencian el exoma de esos genes. Si resulta negativo, se realiza la secuenciación del exoma completo. De este modo, hasta un 57% de pacientes en su estudio con alta probabilidad de enfermedad mitocondrial fueron diagnosticados con alguna mutación de genes nucleares. Recomienda también añadir al panel genes que provocan patologías con discapacidad intelectual para aumentar la sensibilidad.

No todas las mutaciones encontradas tienen por qué ser deletéreas. Cuando se halla una mutación, se predice el efecto que tendrá sobre la proteína (cambio en un aminoácido, codón de Stop, cambio en el marco de lectura etc.) A posteriori, se compara la o las mutaciones encontradas con bases de datos de mutaciones patogénicas o SNP no patogénicos. Si resulta ser una mutación nueva, se realizará el estudio bioinformático correspondiente sobre potencial afección a la función de la proteína e incluso se pueden llevar a cabo estudios de recuperación de función, pero esto no es habitual en la práctica clínica sino que solo es factible realizarlo generalmente en estudios de investigación.

Haciendo una síntesis de los métodos habituales para diagnosticar enfermedades mitocondriales, podemos proponer una estrategia racional de diagnóstico que sería la siguiente:

- Ante un paciente que presente los síntomas clásicos de nuestra enfermedad (acidosis láctica precoz, encefalopatía con síntomas neurológicos variados, hipotonía, retraso del desarrollo variable, facies dismórfica), se deberán realizar estudios bioquímicos de sangre y orina completos para ácidos orgánicos y sospechar patología mitocondrial.
- Posteriormente, se deberá realizar una resonancia magnética, estudio anatomopatológico de biopsia muscular, y estudio detallado del neurodesarrollo.
- Si se presentan alteraciones compatibles con enfermedad mitocondrial, solicitar un test genético por secuenciación de exoma sobre un panel de enfermedades mitocondriales (nucleares o del ADN mt)
- Establecer las medidas de soporte adecuadas en caso de confirmarse el diagnóstico.

6. TRATAMIENTO

Para el tratamiento de esta patología, los diversos y desamparados médicos pediatras que atienden a estos niños han probado con una variedad de tratamientos que se utilizan habitualmente para el tratamiento metabólico en enfermedades mitocondriales. Un buen porcentaje de pacientes no recibió tratamiento alguno.

Las opciones serían:

- a) Tratamiento sustitutivo con cofactores: Huemer et al. describen el uso de coenzima Q₁₀, Riboflavina, carnitina, tiamina, biotina, vitamina D. No obstante, una mayoría no experimentó una mejoría clínica o bioquímica, en palabras de sus médicos^[13]. La l-citrulina se usó en el caso de la paciente #17 para prevenir un segundo ictus, sin éxito.
- b) Tratamiento dietético: bezafibratos, dieta hipercalórica o dieta baja en proteínas han sido aplicadas sin éxito
- c) Tratamiento fisiopatológico de soporte: algunos rasgos clínicos son susceptibles de ser tratados
 - Acidosis metabólica: Se administra bicarbonato en casos graves.
 - Neutropenia: factor estimulante de colonias granulocítico (CSF-G); profilaxis contra *Pneumocystis jirovecii*

- Disfagia y retraso en el crecimiento: alimentación enteral por sonda nasogástrica (SNG) o gastrostomía endoscópica percutánea (PEG).
 - ERGE: tratamiento con inhibidores de la bomba de protones.
- d) Consejo genético: El comité de bioética de España lo recomienda en casos en los que haya nacido un hijo previo con una enfermedad genética grave^[5], por lo que sería recomendable realizarlo con las parejas que hayan tenido un hijo afecto. Existe la opción de realizar diagnóstico genético prenatal en hijos sucesivos, mediante técnicas diversas, como amniocentesis, funiculocentesis o biopsia corial, que conllevan un cierto riesgo de mortalidad, pero permitirían interrumpir el embarazo en el caso de que se detectaran anomalías genéticas en homocigosis.^[5] Otra posibilidad es realizar una fecundación in vitro (no accesible en todos los casos) y seleccionar los embriones no afectados mediante diagnóstico preimplantacional, técnica que ya se lleva a cabo con regularidad en los centros avanzados. Por otra parte, sería recomendable realizar el cribado genético, en los padres y en los hermanos de los pacientes afectados, es decir la detección del estado de portador para su posterior tranquilidad en su futuro reproductivo.
- e) Terapia génica: la terapia sustitutiva del gen en caso de genes nucleares eucariotas no ha sido todavía desarrollada con éxito, y no existen estudios para esta patología que estén desarrollando esta posibilidad. No obstante, sería la única opción curativa.

6 ANALISIS DE MUTACIONES Y ESTUDIO DE LA RELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

6.1 Mutaciones descritas

Las mutaciones recogidas hasta el momento son un total de 32, en un total de 37 pacientes, todas ellas descubiertas en sujetos con enfermedad. Podemos intentar establecer una relación entre las mutaciones y el fenotipo, entendido como las manifestaciones clínicas, llevando a cabo una comparación entre la gravedad y el significado de la mutación en la proteína.

En primer lugar recojo en la tabla 3 el total de las mutaciones, los sujetos afectados, el número total de alelos descritos en la literatura que presentan la mutación (un homocigoto, aporta 2, y un heterocigoto 1 de dos mutaciones distintas), el número de familias afectas, la frecuencia relativa (para averiguar si hay alguna más prevalente) así como el cambio provocado en la proteína y el fenotipo, simplificado en 3 categorías que se describen debajo.

Mutación	Sujetos	Nº alelos	Nº familias	Frecuencia relativa (%)	Significado en la proteína	Fenotipo
c.1641_1642 del TG	#1	2	1	2,7	p.C547-fs	Grave
c.1703G>C	#2	2	1	2,7	p.Gly568Ala	Grave
c.1444C>T	#3,4,5,31	7	2	9,45	p.Arg482Trp	Moderado
c.1790A>C	#6	1	1	1,35	p.Gln597Pro	Grave*
c.1067del	#6	1	1	1,35	p.Gly356-fs	Grave
c.1694A>G	#7	2	1	2,7	p.Asp565Gly	Moderado
c.1652T>A	#8	2	1	2,7	p.Ile551Asn	Grave
c.614T>C	#9	1	1	1,35	p.Ile205Arg	Grave*
c.106A>T	#9	1	1	1,35	p.Arg36Stop	Grave*
c.1229C>T	#10	2	1	2,7	p.Ser410Phe	Grave

c.1555C>T	#11,12,13, 14,15,26,27, ,32	16	3	21,6	p.Gln519Stop	Grave
c.1303C>T	#16, 22, 36	5	3		p.Arg435stop	Grave
c.1703G>C	#17	1	1	1,35	p.Gly568Ala	Moderado
c.316C>T	#17	1	1	1,35	p.Gln106Stop	Moderado
c.1304G>T	#18	2	1	2,7	p.Arg435Leu	Moderado
c.513-1G>A	#19	2	1	2,7	Alt. Splicing	Moderado
c.1361 A>G	#20	2	1	2,7	p.Gln454Pro	Moderado
c.662A>T	#21	2	1	2,7	p.Asp221Val	Grave
c.1304G>A	#23,29	2	1	2,7	p.Arg435Gln	Moderado*
c.1232G>A	#23,29 #30	4	2	5,4	p.Cys411Tyr	Grave
c.661G>C	#24	1	1	1,35	p.Asp221Hys	Grave
c.1641_1642del	#24	1	1	1,35	p.Cys547Stop	Grave
c.1772A>G	#25	2	1	2,7	p.Asp591Gly	Moderado
c.1067delG	#28	2	1	2,7	p.Gly256Alafs15	Moderado
c.1232G>A	#29	1	1	1,35	p.Cys411Tyr	Moderado*
c.1546_1563del	#31	1	1	1,35	Pro516_Ser521del	Grave*
c.445G>A	#33	1	1	1,35	p.Gly149Arg	Leve
c.1510T>C	#34	1	1	1,35	p.Cys504Arg	Leve*
IVS4+5 C>G	#34	1	1	1,35	Alt. Splicing	Leve*
c.851delC	#35	2	1	2,7	p.Pro284Leufs	Moderada
c.292C>T	#36	1	1	1,35	p.Arg98Stop	Grave*
c.1442T>C	#37	2	1	2,7	p.Leu481Pro	Moderado

Tabla 3: Mutaciones, cambio en la proteína y gravedad del fenotipo. Nota: #1 Extraído de Antoun et al; #2-10 se nombran como 1-9 en Gai et al; 11-17 extraídos de Bonnen et Al; 18-33 extraídos de Huemer et al; 34 y 35 son casos clínicos recogidos de hospitales españoles; 36 extraído de van Riij et al; 37 extraído de Baroy et al. En la columna de “significado en la proteína”, las mutaciones sin sentido asocian fondo naranja oscuro, las mutaciones con cambio de sentido fondo amarillo; las mutaciones con alteración del marco de lectura fondo verde; las delecciones fondo azul y las alteraciones del splicing fondo morado.

Anotaciones con respecto a la tabla:

- Clasificamos a cada sujeto con un número propio.
- “Fs” indica un cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido correspondiente.
- Stop indica una mutación nonsense (la proteína resulta presenta un codón de parada a partir de este aminoácido)
- * indica que la mutación sólo se ha encontrado en heterocigosis, el fenotipo se deberá en el paciente correspondiente al efecto combinado de dos mutaciones distintas, por lo que no podemos establecer una relación nítida.

Clasificación del fenotipo: Dividimos el fenotipo en 3 categorías para realizar una aproximación; que serán:

- **Grave:** Hiperlactacidemia + leucoencefalopatía + alteraciones dismórficas + alguna otra alteración orgánica (hipertensión pulmonar, arritmias, linfopenia) +/- muerte
- **Moderado:** Hiperlactacidemia + encefalopatía + alguna alteración adicional +/- muerte
- **Leve:** Alteraciones analíticas con encefalopatía leve, supervivencia hasta la fecha

Así pues hemos encontrado un total de 33 mutaciones distintas distribuidas en 37 pacientes. La mutación más frecuente resulta ser la c.1555C>T, que resulta provocar una proteína truncada

en la posición Gln519. Está presente en 7 sujetos, si bien 5 son de la misma familia y otros dos los de otras dos familias independientes.

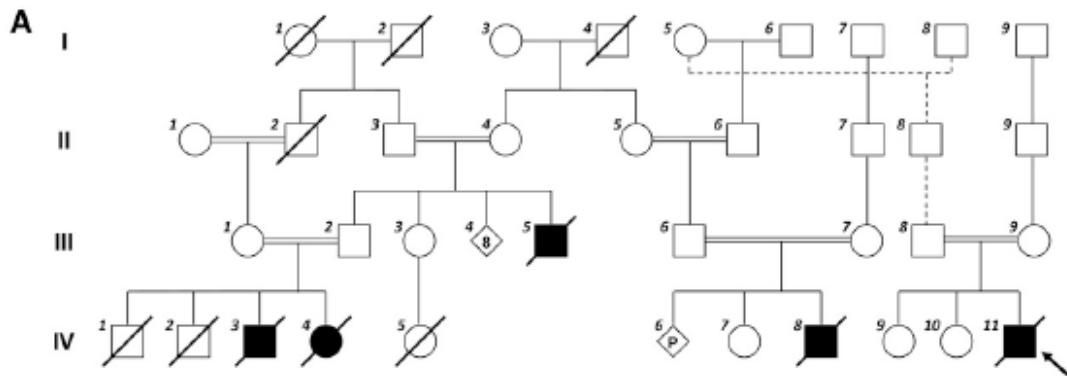


Figura 19: Árbol genealógico de la familia Saudí afectada con la mutación c1555C>T

No obstante, no se puede afirmar que sea estadísticamente significativo como un punto más propenso a la mutación que otros, puesto que sólo representa un pequeño porcentaje de los alelos mutados.

Se observa que en un porcentaje significativo de los casos, la mutación se encuentra en homocigosis (76%); frente a los que se presentan mutaciones en heterocigosis (24%). En los pacientes en los que disponemos del árbol genealógico (#2-#18) los sujetos con mutaciones en homocigosis proceden de padres con relación de consanguinidad.

Es fácilmente deducible que las mutaciones se producen *de novo*, en un familiar de la ascendencia de los pacientes afectados, que a través de algunas pocas generaciones puede haber llegado a dos descendientes que contraen matrimonio consanguíneamente entre ellos, sobre todo en los casos procedentes de países donde esta práctica es habitual. En otros casos, podemos hipotetizar que quizás la mutación se produzca en un ancestro remoto, se extienda por la población y por azar se reproduzcan dos sujetos portadores con ese ancestro común.

6.2. Relación genotipo-fenotipo.

Para valorar la relación entre fenotipo y genotipo, hemos de partir de la base de que las mutaciones que se han recogido no serán, como es lógico pensar las únicas que existirán de este gen, sino que son las que dan patología, se manifiestan en un paciente enfermo y son estudiadas. Por ello, sólo disponemos información de mutaciones que causan una alteración en la proteína lo suficientemente grave como para reducir su función significativamente y causar patología.

Se nos han presentado varios tipos de mutaciones en cuanto a su traducción en la proteína^[20]:

- Mutaciones sin sentido (nonsense): provocan la aparición temprana de un codón de Stop, lo cual da lugar a un péptido truncado.
- Mutaciones con cambio de sentido (missense): producen la sustitución de un aminoácido de la proteína por otro erróneo
- Alteraciones con cambio en el marco de lectura (frameshift): por una deleción o inserción, alteran el marco de lectura generando, a partir del punto afectado, una secuencia errónea de nucleótidos.

- Delecciones: pérdida de algunos nucleótidos en el gen provocan la generación de una proteína sin los aminoácidos correspondientes en esa zona, y posiblemente puedan asociar una alteración del marco de lectura.
- Afectación del splicing: Causadas por mutaciones en zonas intrónicas que alteran el mecanismo de corte y empalme, el cual requiere de unos nucleótidos concretos en zonas limitantes con los exones.

En nuestra serie de pacientes tenemos 19 mutaciones con cambio de sentido, 6 mutaciones sin sentido, 4 alteraciones de marco de lectura, 1 delección de 18 pares de bases y 2 alteraciones en el splicing.

De las mutaciones tenemos fenotipos:

- Cambio de sentido: 8 Graves, 9 Moderados, 2 Leves
- Sinsentido: 5 Graves, 1 moderado
- Alteración en el marco de lectura: 2 leves y 2 moderados
- Splicing y Delección: 2 Graves

A pesar de que la clasificación realizada podría ser mejorable si se dispusiera de los datos clínicos completos de los pacientes, podemos observar que el fenotipo “moderado” corresponde a mutaciones con cambio de sentido en 9 de 11 casos, y que en el resto de los tipos las mutaciones son graves, salvo dos “moderados” en 2 tipo “alteración del marco de lectura” que seguramente en realidad sean más graves.

Sabemos que la expresión fenotípica de una misma mutación es variable; no obstante, los datos concuerdan con la lógica, ya que en las mutaciones tipo sustitución de aminoácidos son las únicas en las que parte de la función de la proteína esté conservada.

Al menos 12 de las 19 mutaciones con cambio de sentido corresponden a los dominios LRR, que son importantes para la interacción proteica. Al estar situados hacia la zona N-terminal de la proteína, todas las mutaciones sin sentido cortan antes de alguna de estas regiones. Además, los LRR también se ven afectados en el resto de las mutaciones. Podemos afirmar por ello que la mayoría de las mutaciones, directa o indirectamente, afectan a estas zonas, que es sabido que tienen funciones de interacción con otras proteínas.

En la figura 19, extraída de Huemer et al (2013), observamos cómo una significativa mayoría de las mutaciones afecta a los dominios LRR, en su serie de pacientes. Esta distribución, si bien no recoge todos los casos, es extrapolable al resto de pacientes de nuestra serie.

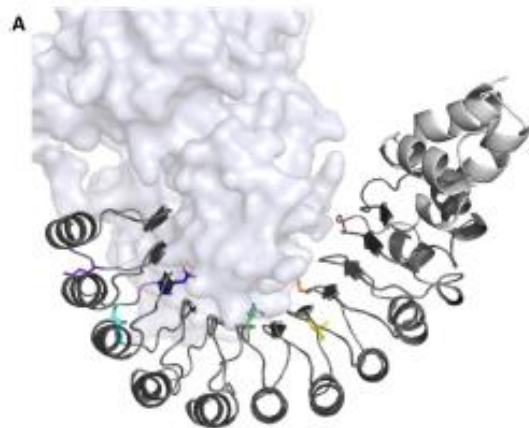


Figura 20: Estructura aproximada de los LRR de FBXL4, suponiendo interacción con CRY2 (ligando de FBXL3). Sugiere interacción por zonas de hoja b en los LRR. Algunas mutaciones aparecen resaltadas en color. Extraído de Gai et al (2013)

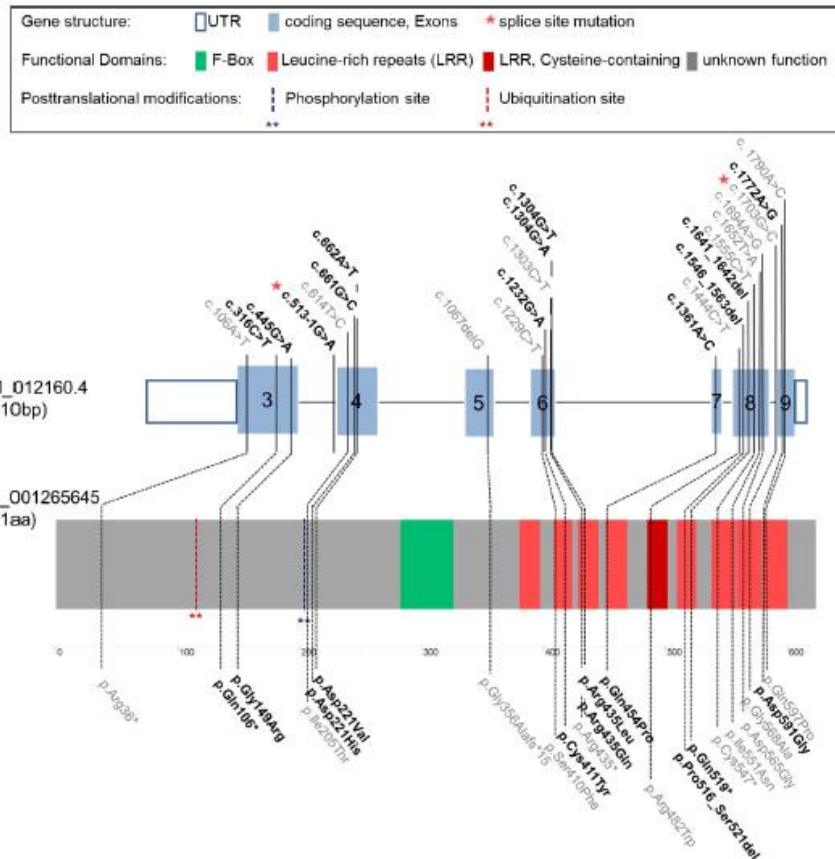


Figura 21: Estructura del gen FBXL4 y distribución de mutaciones en 28 pacientes (pacientes #18-33, #8-10, y #17)

La mayoría de las mutaciones con cambio de sentido por tanto, afectan a aminoácidos conservados de estas regiones ricas en leucina, que realizan funciones de interacción proteica [2,11]. De esto podemos inferir que estos LRR serán por lo tanto claves para la realización de la correcta función de la proteína.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

FBXL4 es un gen nuclear que codifica una proteína localizada en el espacio intermembrana. Perteneció a la familia de las proteínas F-box. Su función se desconoce, aunque se especula que pueda formar parte de un complejo de ubiquitinización con funciones de control de calidad.

Las mutaciones que impiden la formación de una proteína completa o producen una proteína aberrante (sin sentido, alteración del marco de lectura, alteración del splicing) dan lugar a fenotipos graves. Las mutaciones sin sentido que se manifiestan patológicamente afectan a las regiones ricas en leucina (LRR), por su importancia en la interacción proteica.

Se recogen 37 casos de pacientes con mutaciones en ambas copias de este gen. 35 de ellos habían sido descritos por diversos autores y 2 de ellos (#34, #35) son sujetos cuyas muestras se están estudiando en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, no descritos previamente en la literatura.

La clínica abarca un amplio conjunto de síntomas, que tienen en común un comienzo temprano en la primera infancia, en la mayoría de casos al nacimiento, aunque con gran dispersión. Esta dispersión puede ser resultado de retrasos diagnósticos y probablemente la enfermedad empieza a afectar al individuo desde los primeros estadios del desarrollo embrionario, en mayor o menor medida.

Los rasgos compartidos por todos los pacientes incluyen aumento de lactato crónico, con acidosis láctica generalmente hipotonía y un cuadro de encefalopatía mitocondrial. Los pacientes presentan inicialmente un bajo peso al nacer, que se suele mantener en percentiles bajos durante toda su vida, una circunferencia reducida y alteraciones dismórficas características, en el aspecto facial pero también en otros, como hipospadias o craenosinostosis.

La encefalomiopatía causa síntomas neurológicos y motores. Predomina un retraso en el desarrollo psicomotor, en muchas ocasiones llegando a no desarrollarse el habla. Las imágenes por resonancia magnética nos muestran lesiones edematosas en sustancia blanca, que evolucionan a atrofia cerebral supratentorial de localización e intensidad variable, con focos de alteración de señal en otros puntos. Se acompaña en ocasiones de otros síntomas neurológicos, como la ataxia cerebelosa o las convulsiones.

La hipotonía es un hallazgo constante que en la mayoría de casos conlleva una limitación para el ejercicio físico o para la marcha según el caso y dificultad para tragar que pueden llevar a la desnutrición y a la necesidad de nutrición parenteral continuada. El reflujo gastroesofágico también puede aparecer a menudo.

La aparición de síntomas orgánicos es un hallazgo inconstante, pudiendo producirse, entre otros, hipertrofia cardíaca, alteraciones oftálmicas (catarata, atrofia del nervio óptico), renales, hepáticas, escoliosis, y hematológicas. Los ictus atípicos pueden aparecer en fases avanzadas.

En cuanto a la fisiopatología, y en vista de que la depleción de DNA mitocondrial es un hallazgo contante en los casos estudiados, podemos concluir que la depleción de DNA mitocondrial está causada directa o indirectamente por la deficiencia de FBXL4. Por una menor transcripción, se produciría un descenso en la síntesis de subunidades de los complejos de la cadena respiratoria en él codificados, generando de esa manera una menor producción de ATP por la vía de la fosforilación oxidativa y provocando una elevada actividad de la vía de la glicólisis, lo cual desencadenaría las alteraciones fisiopatológicas que se observan.

No obstante, algunos pacientes no presentan alteraciones en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria. Algunos pacientes (por ejemplo, #37) presenta un fenotipo de enfermedad completo pero actividad conservada en los complejos I-V^[15]. Sin embargo, la depleción en estos pacientes suele relativamente leve. En algunos pacientes (19), resulta haber además un descenso en la actividad de citrato sintasa, lo cual nos sugiere un descenso en la masa mitocondrial. En nuestros casos, se está estudiando si los procesos de mitofagia pudieran estar alterados. Estos hechos nos hacen replantearnos que el déficit en la producción de ATP pueda ser el mecanismo último molecular de estas enfermedades, entrando en juego quizá otros procesos como la mitofagia u otros desconocidos.

Cómo causa exactamente la falta de función de FBXL4 la depleción de ADNmt es desconocido. ¿Es consecuencia directa del aumento mitofagia? -Menos mitocondrias totales podrían significar menos DNA medido en el laboratorio-, y ¿cuáles serían los mecanismos últimos de esa? o quizás, ¿es posible que al no haber FBXL4 funcionando, se deja de ubiquitinar y destruir alguna

proteína mal plegada que resulta tóxica en la mitocondria? Son solo algunas hipótesis que se me ocurren.

El diagnóstico debe enfocarse desde el punto de vista de la sospecha de enfermedad mitocondrial, y apoyarse en la biopsia muscular, las pruebas de imagen –sobre todo resonancia magnética y Ecografía- y el diagnóstico genético por secuenciación de secuencias codificantes de un panel de genes con implicación en la mitocondria. Debe considerarse en el diagnóstico diferencial cuando aparezcan los síntomas citados.

Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo curativo, debiendo no obstante aplicarse las medidas de soporte necesarias para aliviar los síntomas y mejorar en lo posible la calidad de vida de estos pacientes. Quizás en el futuro se pueda aplicar terapia génica.

Será necesaria todavía mucha más investigación en este campo para dilucidar el mecanismo exacto de actuación de FBXL4 y poder elaborar una estrategia terapéutica efectiva.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de las facultades de Medicina y Veterinaria, por proporcionarme los materiales necesarios para el trabajo. A mi tutora, Sonia Emperador, por toda su ayuda y sus muy necesarias correcciones. A mi familia y amigos, por aguantarme todo este tiempo. Y a una futura doctora muy especial, por todo su inestimable apoyo y afecto.

ABREVIATURAS

- ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- ADNn: Acido desoxirribonucleico nuclear
- ADP: Adenosín difosfato
- ATP: Adenosín trifosfato
- CIR: crecimiento intrauterino retardado
- CS: Citrato sintasa
- HA: hemaglutinina A
- ERGE: Enfermedad por reflujo gastroesofágico.
- MME: membrana mitocondrial externa
- MTS: Mitochondrion targeting sequence / Secuencia de señalización mitocondrial
- NADH-DH: N-acetil dinucleótido reducido deshidrogenasa
- PDHc: Complejo Piruvato Deshidrogenasa
- Pi: Fosfato inorgánico (PO_3^-)
- ROS: Reactive oxygen species / Especies reactivas de oxígeno
- RRF: red ragged fibers / fibras rojo rasgadas
- SDH: Succinato deshidrogenasa
- WES: Whole exome sequencing

BIBLIOGRAFÍA

1. Montoya J, Lopez-Gallardo E, Ruiz-Pesini E. Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial. Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial Sanjurjo P, Baldellou A Madrid Ergon. 2010;639-56.
2. Nelson DL, Cox MM. Fosforilación oxidativa y fotofosforilación. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principios de bioquímica. 5ª edición. Sabadell. Omega, 2009. pp. 708- 768.
3. Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. J Inher Metab Dis. mayo de 2015;38(3):437-43.
4. OMIM Entry - # 615471 - MITOCHONDRIAL DNA DEPLETION SYNDROME 13 (ENCEPHALOMYOPATHIC TYPE); MTDPS13 [Internet]. [citado 17 de mayo de 2016]. Recuperado a partir de: <http://www.omim.org/entry/615471>
5. Montoya, J., Emperador, S., López-Gallardo, E., Ruiz-Pesini, E. "Enfermedades mitocondriales. Alteración del ADN mitocondrial, déficits bioquímicos de la cadena respiratoria y enfermedades de la fosforilación oxidativa". En: "Manual de Medicina Perinatal. Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo en el Laboratorio Clínico". Pág. 191-203 (Asociación Española de Biopatología Médica, Eds.). 1ª Edición. Capítulo 14. Madrid. 2014. pp: 773-790 . ISBN: 978-84-617-1716-3;
6. FBXL4 Gene - GeneCards | FBXL4 Protein | FBXL4 Antibody [Internet]. [citado 30 de mayo de 2016]. Recuperado a partir de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FBXL4>
7. Gene: FBXL4 (ENSG00000112234) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 84 [Internet]. [citado 30 de mayo de 2016]. Recuperado a partir de: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000112234;r=6:98868538-98948006
8. RCSB PDB - Protein Feature View - F-box/LRR-repeat protein 4 - Q9UKA2 (FBXL4_HUMAN) [Internet]. [citado 5 de junio de 2016]. Recuperado a partir de: http://www.rcsb.org/pdb/protein/O95919?evtc=Suggest&evta=ProteinFeature%20View&evtl=autosearch_SearchBar_querySuggest
9. Gai X, Ghezzi D, Johnson MA, Biagosch CA, Shamseldin HE, Haack TB, et al. Mutations in FBXL4, encoding a mitochondrial protein, cause early-onset mitochondrial encephalomyopathy. Am J Hum Genet. 5 de septiembre de 2013;93(3):482-95.
10. Bonnen PE, Yarham JW, Besse A, Wu P, Faqeih EA, Al-Asmari AM, et al. Mutations in FBXL4 cause mitochondrial encephalopathy and a disorder of mitochondrial DNA maintenance. Am J Hum Genet. 5 de septiembre de 2013;93(3):471-81.
11. Nelson DE, Randle SJ, Laman H. Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. Open Biol. octubre de 2013;3(10):130131.
12. Antoun G, McBride S, Vanstone JR, Naas T, Michaud J, Redpath S, et al. Detailed Biochemical and Bioenergetic Characterization of FBXL4-Related Encephalomyopathic Mitochondrial DNA Depletion. JIMD Rep. 2016;27:1-9.

13. Huemer M, Karall D, Schossig A, Abdenur JE, Al Jasmi F, Biagosch C, et al. Clinical, morphological, biochemical, imaging and outcome parameters in 21 individuals with mitochondrial maintenance defect related to FBXL4 mutations. *J Inherit Metab Dis.* septiembre de 2015;38(5):905-14.
14. van Rij MC, Jansen FAR, Hellebrekers DMEI, Onkenhout W, Smeets HJM, Hendrickx AT, et al. Polyhydramnios and cerebellar atrophy: a prenatal presentation of mitochondrial encephalomyopathy caused by mutations in the FBXL4 gene. *Clin Case Rep.* abril de 2016;4(4):425-8.
15. Barøy T, Pedurupillay CRJ, Blikrud YT, Rasmussen M, Holmgren A, Vigeland MD, et al. A novel mutation in FBXL4 in a Norwegian child with encephalomyopathic mitochondrial DNA depletion syndrome 13. *Eur J Med Genet.* 13 de mayo de 2016.
16. Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, Delgado-Camprubi M, Ivatt RM, Pogson JH, et al. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci.* septiembre de 2013;16(9):1257-65.
17. Ebrahimi-Fakhari D, Seitz A, Kölker S, Hoffmann GF. Recurrent Stroke-Like Episodes in FBXL4-Associated Early-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *Pediatr Neurol.* diciembre de 2015;53(6):549-50
18. FBXL4 protein (Homo sapiens) - STRING network view [Internet]. [citado 31 de mayo de 2016]. Recuperado a partir de: <http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=XimM5tZ2mGSm>
19. Jiménez-Escrig A, Gobernado I, Sánchez-Herranz A. Secuenciación de genoma completo: un salto cualitativo en los estudios genéticos. *Rev Neurol* 2012; 54: 692-8.
20. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. *Genética médica.* Elsevier España; 2011.
21. Alberts B. et al. *Biología molecular de la célula.* Ediciones Omega, S.L.; 2010.
22. Calvo, S.E., Compton, A.G., Hershman, S.G., Lim, S.C., Lieber, D.S., Tucker, E.J., Laskowski, A., Garone, C., Liu, S., Jaffe, D.B., et al. (2012). Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci. Transl. Med.* 4, 118ra110.
23. Shamseldin, H.E., Alshammari, M., Al-Sheddi, T., Salih, M.A., Alkhalidi, H., Kentab, A., Repetto, G.M., Hashem, M., and Alkuraya, F.S. (2012). Genomic analysis of mitochondrial diseases in a consanguineous population reveals novel candidate disease genes. *J. Med. Genet.* 49, 234–241.
24. FBXL4 - F-box/LRR-repeat protein 4 - Homo sapiens (Human) - FBXL4 gene & protein [Internet]. [citado 5 de junio de 2016]. Recuperado a partir de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UKA2>

ANEXO I: Tabla 1: Datos clínicos específicos de cada paciente por paciente. Se han recogido los más comunes. Nd= no disponible. Ne= no especificado. (+): presencia de ese síntoma; (-) ausencia de ese síntoma. Cambio sent. = mutación de cambio de sentido; Alt. Marco lect.: alteración del marco de lectura. La procedencia de los pacientes es la siguiente: #1 Extraído de Antoun et al; #2-10 se nombran como 1-9 en Gai et al; 11-17 extraídos de Bonnen et al; 18-33 extraídos de Huemer et al; 34 y 35 son casos clínicos recogidos a estudio en el laboratorio; 36 publicado por Van Rij et al; 37 extraído de Baroy et al.

Sexo	mujer	hombre	hombre	hombre	hombre	hombre	hombre	hombre	mujer	hombre	hombre	mujer	hombre	mujer	hombre
Pedigree															
Mutación	[c.1641_1642]	[c.1703G>C]	[c.1444C>T]	[c.1444C>T]	[c.1790A>C]; 1067 del	[c.1694A>G]	[c.1694A>C]	[c.1652T>A]	[c.614T>C, 106A>T]						
Defecto proteico	p.C547-fs	[pArg482Trp]	[p.Arg482Trp]	[p.Arg482Trp]	[p.Arg482Trp]	[p.Arg482Trp]	[p.Arg482Trp]	[p.Arg482Trp]	[p.Ile205Thr; Arg365stop]						
Tipo de mutación	Alt. Marco lect.	Cambio sent.	Cambio sent.	Cambio sent.	C.Sent + Al	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent	Cambio sent
Edad de presentación	12 horas	4 meses	4 meses	4 meses	4 meses	4 meses	4 meses	4 meses	1 mes	9 meses	9 meses	3 años	3 años	3 años	3 años
Edad de la última evaluación	14 meses	4 años	4 años	4 años	4 años	9 años	9 años	9 años	8 años	16 meses	16 meses	3 años	3 años	3 años	3 años
Peso al nacer (percentil)	8	<10	<3	10	nd	<10	<10	<10	<10	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Peso más reciente (percentil)	nd	<3	<3	10	nd	50	50	50	42	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Facies dismórfica	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+/-	+	+	+	+	+
Crecimiento retrasado	+	+	+	nd	nd	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Retraso neurocognitivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Falta o alteración del habla	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	+	+	+	+
Lesiones de la sustancia blanca	+	+	+	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Atrofia cerebral	nd	+	+	nd	nd	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Convulsiones	nd	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ataxia	nd	+	+	-	-	-	-	-	+	nd	nd	+	+	+	+
Hipotonía	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dificultad para tragar	+	-	-	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Incapacidad para la marcha	nd	+	+	nd	nd	int. ejercicio	int. ejercicio	int. ejercicio	nd	+	+	+	+	+	+
Acidosis láctica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanina elevada en plasma	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Hiperamoniemia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Patología cardíaca/ pulmonar	HTP/ taq. auricular	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	normal	Hipertrofia	Hipertrofia	hipertrofia	hipertrofia	hipertrofia	normal
Afectación renal	nd	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Patología ocular	nd	nd	nd	nd	nd	normal	normal	normal	normal	na	na	catarata	catarata	catarata	hiperopia
ERGE	nd	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alimentación enteral	+														
Anemia	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Neutropenia	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Escoliosis progresiva	nd	+	+	-	-	-	-	-	+	na	na	-	-	-	-
Deplección mdNA	37%	12%	12%	45%	45%	25%	25%	25%	63%	30%	30%	35%	35%	35%	68%
Fallecimiento (edad)	-	-	-	4 meses	4 meses	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Causa (si conocida)	-	-	-	Acidosis láctica severa	Acidosis láctica severa	-	-	-	-	encefalopatía aguda durante infección intercurrente	encefalopatía aguda durante infección intercurrente	-	-	-	Infección intercurrente

Paciente ID	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Sexo	hombre	hombre	hombre	mujer	hombre	hombre	hombre	mujer	hombre	hombre	mujer	mujer	hombre	hombre
Pedigree														
Mutación	c.[1555C>T]; c.[1555C>T]	c.[1555C>T]; c.[1555C>T]	c.[1555C>T]	c.[1555C>T]	c.[1555C>T]	c.[1303C>T]	c.[1703C>G];316C>T	c.[1304G>T]	c.[513-1G>A]; c.[1361A>C]	c.[1361A>C]	c.[665A>T]	c.[1703C>G];316C>T	c.[1304G>A];12 c.[661G>C];1641 c.[32G>A]	c.[1304G>A];12 c.[661G>C];1641 c.[32G>A]
Defecto proteico	p.[Gln19Sto p.[Gln19Sto op]	p.[Gln19Sto p]	p.[Gln19Sto p]	p.[Gln19Sto p]	p.[Gln19Sto p]	p.[Arg435Sto p]	p.[Gly568Ala;Gln106SStop]	p.[Arg435Leu]	p.172?	p.[Gln454Pro]	p.[Asp221Val]	p.[Gly568Ala;Gln106SStop]	p.[Gly568Ala;Gln106SStop]	p.[Asp221Hys; Cys547SStop]
Tipo de mutación	Sin sentido	Sin sentido	Sin sentido	Sin sentido	Sin sentido	Sin sentido	Cambio sent.	Cambio sent.	alt. Splicing	Cambio sent.	Cambio sent.	Cambio/Sin sent.	Cambio sent.	Cambio sent.
Edad de presentación	3 meses	4 meses	4 meses	nd	nd	nd	6 años	6 años	alt. Splicing	Cambio sent.	Cambio sent.	Cambio sent.	Cambio sent.	Cambio sent.
Edad de la última evaluación	3 años	3 años	3 años	nd	nd	nd	6 años	6 años	37 meses	4 a y 7 m	nd	nd	3 a 1 m	2 días
Peso al nacer (percentil)	<3	3	3	<3	3	3	<10	<10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Peso más reciente (percentil)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Facies dismórfica	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Crecimiento retrasado	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	nd	+	+
Retraso neurocognitivo	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Falta o alteración del habla	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+
Lesiones de la sustancia blanca	+	+	+	+	+	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Atrofia cerebral	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Convulsiones	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ataxia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hipotonía	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dificultad para tragar	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+
Incapacidad para la marcha	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+
Acidosis láctica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanina elevada en plasma	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hiperamoniemia	-	+	-	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Patología cardíaca/ pulmonar	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Cardiomiopatía	nd	nd	nd	nd	hipertrofia e hiperdinamia	nd
Afectación renal	nd	nd	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Patología ocular	-	-	catarata	nd	nd	catarata, atrofia nervio óptico	-	-	-	-	-	-	-	-
ERGE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
Alimentación enteral	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Anemia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-
Neutropenia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-
Escoliosis progresiva	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Deplección mDNA	27%/62%	-	-	-	-	10%	25%	-	-	-	-	-	-	-
Fallecimiento (edad)	3 a 9 m	1 año 8 m	2 años	3 días	4 años	4 meses	-	2 años	-	-	2 a 3 m	-	-	6 a 3 m
Causa (si conocida)	Encefalopatía	nd	acidosis láctica	nd	nd	nd	-	ne	-	-	ne	-	-	ne

Paciente ID	> 25	> 26	> 27	> 28	> 29	> 30	> 31	> 32	> 33	> 34	> 35	> 36	> 37
Sexo	mujer	mujer	hombre	hombre	hombre	hombre	mujer	hombre	mujer	mujer	ne	hombre	hombre
Pedigree	19	20	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Mutación	c.[1772A>G]	c.[1555C>T]	c.[1555C>T]	c.[1067delG]; j;	c.[1304G>A];12 c.[2232G>A]	c.[1444C>T];1546 c.[1555C>T];	p.[Arg482Trp;Pr_1563del];	p.[Gln519SStop]	c.[445G>A]	c.[1510T>C]; VS4+5 C>G	c.[851delC]	c.292C>T; c.1303C>T	c.[1442T>C]
Defecto proteico	p.[Asp591Gly]	p.[Gln519SStop]	p.[Gln519SStop]	p.[Gly356Alafs*15]	p.[Gly568Ala]; p.[Cys411Tyr]	p.[Cys411Tyr]	p.[Arg482Trp;Pr_1563del];	p.[Gln519SStop]	p.[Gly149Arg]	p.[Cys504Arg]	p.[Pro284Leu_fsx6]	p.[Arg98Stop; p.-Arg435Stop]	p.[Leu841Pro]
Tipo de mutación	Cambio	Sin sentido	Sin sentido	Alt. Marco l.	Cambio sent.	Cambio	Cambio sent.	Sin sentido	Cambio sent.	Alt. Splicing	Alt. Marco	Sin sentido	Cambio sent.
Edad de presentación	2 días	3 días	3 meses	4,5 meses	5 meses	6 meses	12 meses	24 meses	nd	nacimiento	ne	intraútero	Nacimiento
Edad de la última evaluación	2 meses	2 años	nd	3 a 9 m	4 a 10 m	nd	4 a 7 m	nd	nd	nd	nd	nd	3 a 6 m
Peso al nacer (percentil)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<3	nd	<30	<3
Peso más reciente (percentil)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	50
Facies dismórfica	-	+	+	+	+	+	+	+	-	nd	nd	+	+
Crecimiento retrasado	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Retraso neurocognitivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Falta o alteración del habla	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lesiones de la sustancia blanca	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	na	nd
Atrofia cerebral	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
Convulsiones	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	+
Ataxia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
Hipotonía	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dificultad para tragar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Incapacidad para la marcha	nd	na	+	nd	+	+	+	nd	nd	+	nd	nd	nd
Acidosis láctica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanina elevada en plasma	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
Hiperamoniemia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	-	nd
Patología cardiaca/ pulmonar	nd	hipertrofia VI	nd	nd	nd	nd	cardiomiopatía	nd	nd	-	nd	hipertrofia	Alt. ECG sdím WPW-like
Afectación renal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-
Patología ocular	-	-	-	-	-	catarata	-	catarata	-	-	nd	nd	-
ERGE	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	-	nd	nd	nd
Alimentación enteral	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
Anemia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-
Neutropenia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-
Escoliosis progresiva	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-
Depleción mDNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15%	7%	-	45%
Fallecimiento (edad)	-	-	3 a 9 m	-	-	2 años	-	2 años	-	8 meses	-	-	-
Causa (si conocida)	-	-	ne	-	-	ne	-	ne	-	fallo respiratorio	-	-	Acidosis láctica, prematuro (25 +5)