



Universidad
Zaragoza



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**Efecto de la variación genética del
mtDNA sobre la penetrancia de la
mutación m.11778G>A.**

Meta-análisis de la literatura.

*Effect of mtDNA genetic variation on the penetrance
of m.11778G> A mutation.*

Meta-analysis of the literature.

Autor:

ADELINA MIRUNA PERTA

Director:

EDUARDO RUIZ PESINI

Grado en Biotecnología-Facultad de Ciencias

2021

ABREVIATURAS

aa: Aminoácido

ATP: Adenosín trifosfato

bp: pares de bases

CDS: secuencia codificante

CI: complejo respiratorio I mitocondrial.

CII: complejo respiratorio II mitocondrial.

CIII: complejo respiratorio III mitocondrial.

CIV: complejo respiratorio IV mitocondrial.

CV: complejo V mitocondrial o ATP sintasa.

Ci: Índice de conservación

CTE: Cadena de transporte de electrones

DNA: ácido desoxirribonucleico.

LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber

mRNA: RNA mensajero

mtDNA: DNA mitocondrial

nt: nucleótido

OCT: tomografía de coherencia óptica

OH: origen de replicación de la cadena pesada del mtDNA

OL: origen de replicación de la cadena ligera del mtDNA

OXPPOS: sistema de fosforilación oxidativa

ROS: especies reactivas de oxígeno

RNA: ácido ribonucleico.

rRNA: RNA ribosómico

tRNA: RNA de transferencia

WT: wild-type

ÍNDICE

ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 MITOCONDRIA Y OXPHOS.....	2
1.2 DNA MITOCONDRIAL Y PATOLOGÍA.....	2
1.3 NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER.....	4
1.3.1 Epidemiología.....	4
1.3.2 Descripción clínica.....	4
1.3.3 Diagnóstico.....	4
1.3.4 Etiología.....	5
1.3.5 Tratamiento.....	6
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVOS	7
4. METODOLOGÍA	8
4.1 METODOLOGÍA PARA LA BÚSQUEDA BIBLIGRÁFICA.....	8
4.2 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	10
4.2.1 Herramientas para el análisis de secuencias.....	10
4.2.2 Metodología para el análisis de secuencias.....	11
4.3 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
6.1 RESULTADOS PARA LA REEVALUACIÓN DE LA PENETRANCIA.....	14
6.2 RESULTADOS PARA EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	15
6.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	17
6. CONCLUSIONES	22
7. CONCLUSIONS	22
8. BIBLIOGRAFÍA	23
9. ANEXOS	26

RESUMEN

La Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON) es la enfermedad mitocondrial más común, caracterizada por desencadenar atrofia óptica y pérdida de la visión central. Se produce por mutaciones puntuales en el DNA mitocondrial de las cuales tres, que comprenden el 90 % de los casos, afectan al complejo I mitocondrial y son consideradas como primarias: m.3460G>A, m.11778G>A y m.14484T>C. Sin embargo, su penetrancia es incompleta, otros factores adicionales, genéticos y/o ambientales, pueden influir su manifestación fenotípica. El presente estudio busca determinar, dentro de estos factores genéticos, el papel que pudieran desempeñar variantes particulares o privadas en las diferencias de penetrancia observadas en distintas familias portadoras de la mutación m.11778G>A. Requiriéndose para ello una amplia revisión de la literatura, seguida de un detallado análisis de secuencias y culminando con un tratamiento estadístico. Se logró generar una población artificial que se sometió a una reanálisis de la penetrancia. Se registraron las variantes presentes en la población determinándose su relevancia en base a criterios particulares del estudio. Se sometieron a un test exacto de Fisher que arrojó resultados cercanos a la significación y una prueba X^2 que aportó resultados significativos, aceptándose con ello la hipótesis planteada en el estudio. No obstante, futuros estudios funcionales continúan siendo necesarios para corroborar que determinadas variantes particulares puedan ser realmente responsables del incremento de penetrancia observado en familias con la mutación m.11778G>A.

ABSTRACT

Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is the most common mitochondrial disease, characterized by optic atrophy and loss of central vision. It is produced by point mutations in the mitochondrial DNA. Three of them, encompassing 90 % of the cases, affect the mitochondrial complex I and are considered as primary mutations: m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C. However, its penetrance is incomplete, other genetic and / or environmental factors may influence its phenotypic manifestation. The present study seeks to determine within these genetic factors the role that particular or private variants could play in the penetrance differences observed in different families carrying the m.11778G>A mutation. To carry out this study, an extensive review of the literature, followed by a detailed sequence analysis and culminating in a statistical treatment is required. We reached to generate an artificial population that underwent a reanalysis of penetrance. Variants present in the population were recorded, and their relevance was determined based on particular study criteria. They underwent a Fisher's exact test that yielded results close to significance and an X^2 test that provided significant results, thereby accepting the hypothesis raised in the study. However, future functional studies continue to be necessary to corroborate if certain particular variants may actually be responsible for the increased penetrance observed in families with the m.11778G>A mutation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MITOCONDRIA Y OXPHOS

Las mitocondrias son orgánulos fundamentales para el metabolismo celular por su papel en la **producción de energía**. Están presentes en todas las células eucariotas y en su membrana interna se localiza el sistema de fosforilación oxidativa, **OXPHOS**, encargado de la síntesis de la mayor parte del ATP que la célula emplea para desempeñar sus funciones. [17]

Por otro lado, la mitocondria participa de muchos otros procesos como la producción de calor, regulación de la muerte celular programada o apoptosis, el transporte de proteínas a la matriz mitocondrial, la homeostasis y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). [17]

La energía es producida por OXPHOS en forma de ATP mediante la generación de un **gradiente electroquímico** que se forma con el transporte de electrones a través de la membrana interna mitocondrial acoplado al bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana. Esto se lleva a cabo por la coordinación de 5 complejos enzimáticos (complejos respiratorios I, II, III, IV y V) y dos transportadores móviles (Coenzima Q y Citocromo C) que conforman el sistema OXPHOS. [28]

Estos complejos respiratorios están constituidos por muchas subunidades proteicas de las cuales unas están codificadas en el del **DNA nuclear** y son importadas a la mitocondria, mientras que otras son codificadas en el propio **DNA mitocondrial** (mtDNA). Por lo que, alteraciones en cualquiera de los dos sistemas génicos partícipes en la biogénesis del sistema OXPHOS dan lugar a lo que se conoce como enfermedades mitocondriales: enfermedades caracterizadas por un defecto en la síntesis de ATP, con afectación multisistémica y consiguientes cuadros clínicos variados. [22]

1.2 DNA MITOCONDRIAL Y PATOLOGÍAS

El DNA mitocondrial es una molécula de doble hebra, cerrada y con una longitud de 16.569 pares de bases (bp). No posee intrones y sólo tiene una región no codificante denominada región control, por albergar los orígenes de replicación, transcripción y elementos reguladores de la expresión. Codifica para los RNA ribosómicos 12S y 16S (rRNAs), 22 RNAs de transferencia (tRNAs) y 13 de las subunidades proteicas del sistema OXPHOS (Figura 1). [1,22]

Se caracteriza y diferencia del genoma nuclear por presentar **herencia exclusivamente materna** (sólo las mitocondrias del gameto femenino son transmitidas a la descendencia) y una **mayor tasa de mutación**. Esto último, debido a la falta de protección del DNA mitocondrial por histonas, y una mayor exposición a especies reactivas de oxígeno. [23,25]

Además de la alta tasa de mutación, la mayoría de los tejidos poseen entre 1.000 y 10.000 copias del mtDNA por célula y cada mitocondria entre 2 y 10 moléculas organizadas en nucleoides. [6]

Estos factores y la segregación al azar posibilitan que en el momento de la aparición de una mutación puedan coexistir poblaciones de mtDNA normales y mutadas (**heteroplasmia**). Lo cual conlleva a que el grado de heteroplasmia de cada tejido determine su funcionamiento. [17]

En el momento en el cual se supera un determinado **umbral** de copias mutantes aparecen los síntomas y el fenotipo patológico. Por otro lado, no todos los tejidos tienen las mismas necesidades energéticas y, por tanto, no se verán afectados por igual al pasar un determinado umbral de porcentaje mutado. [17]

Todo ello contribuye a que las enfermedades mitocondriales sean complejas, en las que suelen verse involucrados muchos tejidos, donde una mutación puede dar fenotipos diferentes o distintas mutaciones un mismo fenotipo, para acabar recogidas en síndromes muy definidos.

Uno de los casos de enfermedad mitocondrial asociada a un tejido específico, es el de la **Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber (LHON)**. [17,29]

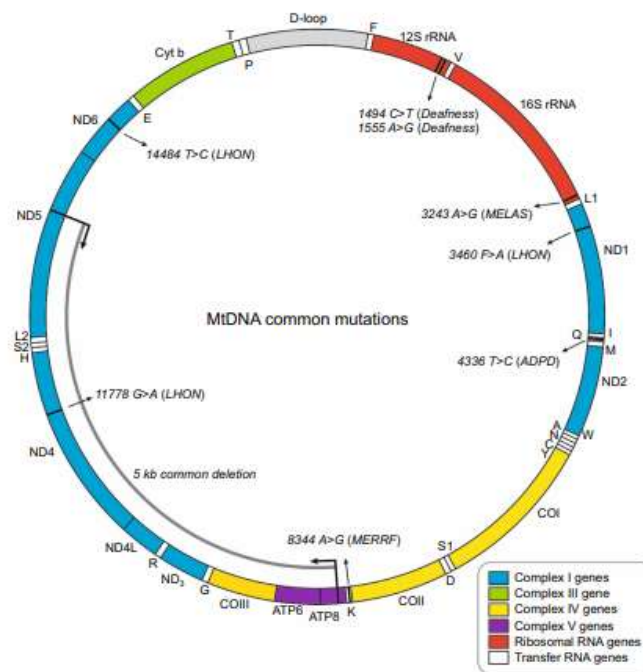


Figura 1. Genoma mitocondrial humano. Representación esquemática del mtDNA donde se advierte la región no codificante como D-loop, los dos rRNA en rojo, 22 tRNAs en blanco y nombrados con código de una sola letra. Los genes codificantes de las subunidades del complejo I (ND1–ND6 y ND4L) en azul; el citocromo b (Cyt b) del complejo III en verde; citocromo C oxidasa (COI–COIII) en amarillo; y los genes codificantes de las subunidades de la ATP sintasa (ATP6 and ATP8) en morado. Las posiciones de las principales mutaciones mitocondriales están señaladas mediante flechas y asociadas a su fenotipo. ADPD: Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer. LHON: Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber. MELAS: Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares al ictus. MERRF: Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas. [4]

1.3 NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER.

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON, OMIM 535000) es la enfermedad mitocondrial más frecuente. Se caracteriza por una degeneración selectiva de las células ganglionares de la retina que culmina con atrofia óptica y pérdida de la visión central. [31]

1.3.1 Epidemiología

Fue descrita en 1871 por el oftalmólogo Theodor Leber y constituye la primera enfermedad asociada al genoma mitocondrial. Consta de una prevalencia en la población de **1 - 9/100.000 individuos**, por lo que se encuentra catalogada dentro de enfermedades raras. [31]

1.3.2 Descripción clínica

Entre sus **síntomas** se encuentran: visión borrosa con inicio unilateral o bilateral, que con el tiempo afecta o empeora en ambos ojos hasta alcanzar pérdida de agudeza visual y de colores. Es indolora y debida fundamentalmente a la degeneración del nervio óptico encargado de la transmisión de información ojo-cerebro. [20,27,29]

El inicio clínico del LHON se da generalmente en la **edad adulta joven** (18 - 30 años) y se divide **en etapas**, subaguda (< 6 meses desde el inicio) y dinámica (6 - 12 meses). Otros síntomas extraoculares (trastornos motores, distonía, temblor postural y ataxia cerebelosa) son poco frecuentes, pero cuando están presentes se conocen como enfermedad de **Leber plus**. [15]

1.3.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad comienza con el estudio del **historial familiar** y un **examen oftalmológico** donde se valora la agudeza visual, visión del color, campos visuales y tomografía de coherencia óptica (OCT) que confirma la inflamación de la capa de fibras nerviosas de la retina. Posteriormente se realiza una búsqueda de las tres mutaciones más comunes de los genes del Complejo I del mtDNA. En caso negativo, se sigue con una secuenciación completa del mtDNA. La evaluación bioquímica no suele formar parte de la investigación de rutina de los pacientes de LHON, pero se emplea en el caso de hallazgo de nuevas variantes con posible efecto patogénico. [27,29,31]

1.3.4 Etiología

Se han descrito tres mutaciones homoplásmicas en el mtDNA consideradas como **primarias**, que afectan aproximadamente al 90 % de los pacientes LHON y están localizadas en genes del complejo I mitocondrial: m.3460G>A en el gen *MT-ND1*, m.11778G>A en *MT-ND4* y m.14484T>C en *MT-ND6*. De todas ellas, la mutación más prevalente en la población es la **m.11778G>A**, que convierte una arginina muy conservada en histidina en el codón 340 de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria mitocondrial, y rara vez es heteroplásmica.

Genera un defecto en la NADH deshidrogenasa que hace que pierda actividad, con la consiguiente disminución de la síntesis de ATP y aumento en la producción de ROS. [22]

Se ha visto, al mismo tiempo, que las mutaciones LHON poseen **una penetrancia incompleta**, es decir, que factores adicionales, genéticos o ambientales, están implicados en el desarrollo de la enfermedad. [22]

❖ Factores genéticos

Dentro de los factores genéticos encontramos la afectación clínica diferencial según el **género** y la modificación fenotípica dependiendo del **haplogrupo mitocondrial**. [22]

La enfermedad se manifiesta preferentemente en hombres. Sólo el 10 % de las mujeres portadoras sufren la enfermedad frente al 50 % de los hombres. [10] Una de las explicaciones que se han atribuido a este efecto se encuentra en la posible sinergia entre **mutaciones recesivas en el cromosoma X** y la mutación mitocondrial. Así, hombres que heredaran ambas mutaciones se verían afectados, mientras que para mujeres tendría que darse homocigosis en el locus del cromosoma X para que se desarrolle la patología.

Otra de las hipótesis, sin embargo, apunta al **papel protector de los estrógenos** y las diferencias hormonales entre hombres y mujeres.[7] Los estrógenos parecen presentar una acción directa sobre la cadena de transporte de electrones (CTE) incrementando la síntesis de ATP, disminuyendo la producción de ROS y consecuentemente la tasa de apoptosis [7]

También, debido a la alta tasa de mutación y la falta de recombinación, el mtDNA acumula mutaciones con el tiempo, formando lo que se conoce como **haplogrupos**. Así, un haplogrupo se puede definir como un grupo de genotipos mitocondriales filogenéticamente relacionados. Cada vez hay más evidencias del efecto modulador de éstos haplogrupos o Fondos Génicos Mitocondriales en la manifestación clínica de la patología. [8,18]

En la población europea los más abundantes son el H (40 %), el U (20 %) y el T (10 %). El haplogrupo H está relacionado con una menor predisposición a padecer LHON. Pero, por otro lado, los haplogrupos mitocondriales también pueden estar definidos por polimorfismos que, aunque no estén categorizados como patológicos, pueden conferir unas características metabólicas particulares que aumentan el riesgo a desarrollar LHON. [16,18]

Éste es el caso del **haplogrupo europeo J**, pero también el haplogrupo **chino M7b**, que poseen una frecuencia aproximada en la población de 9 % y 5 % respectivamente. El haplogrupo J está asociado con polimorfismos en el gen *MT-CYB* que parecen alterar la estructura del complejo y la eficiencia de la CTE, induciendo un aumento de la penetrancia de las mutaciones LHON. De esta manera, aquellos pedigríes que contengan los polimorfismos característicos de estos haplogrupos tendrán una penetrancia más alta, independientemente del resto de factores que influyen sobre ella. [5,12,18]

❖ Factores ambientales

Ciertos estudios en los últimos años han demostrado como un elevado consumo de **alcohol** y **tabaco** acaban induciendo una mayor expresión de la enfermedad, aumentando la penetrancia de la mutación m.11778G>A incluso en haplogrupos caracterizados como de riesgo, como el haplogrupo J. [11, 24]

1.3.5 Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento definitivo para el LHON. Varios compuestos han mostrado resultados positivos en la recuperación de la visión, pero todavía están en estudio. Uno de éstos es la **Idobenona**, un análogo sintético de la coenzima Q₁₀, que ha mostrado mejorar la visión en algunos pacientes al cabo de un año, hecho que ha invitado a que también se estén probando tratamientos con quinonas de tercera generación (restauran el flujo de electrones y aumentan las defensas antioxidantes). [9]

Por otro lado, y teniendo en cuenta sus implicaciones en la manifestación clínica, de gran importancia son las recomendaciones a los pacientes de abstenerse al consumo de alcohol y tabaco, así como ciertos antibióticos que se ha visto que interfieren con la fosforilación oxidativa mitocondrial.

2. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta que la Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber es una patología mitocondrial que viene modulada por diversas influencias ambientales y genéticas, y que el estudio de los haplogrupos mitocondriales ha venido arrojando numerosas evidencias en cuanto al papel que polimorfismos antiguos junto con mutaciones primarias tienen en la expresión de la enfermedad, nos llevan a plantear la siguiente hipótesis:

- Variantes privadas o particulares localizadas en el mtDNA pueden estar asociadas con un aumento de la penetrancia en individuos que tienen la mutación m.11778G>A.

3. OBJETIVOS

El presente Trabajo de Fin de Grado se corresponde con un meta-análisis de la literatura, lo cual implica que se trata de una investigación o análisis estadístico de una amplia serie de estudios individuales que tiene como fin último integrar sus hallazgos y responder a la hipótesis planteada.

En base a esto, se proponen los siguientes objetivos principales:

1. Realizar una búsqueda exhaustiva, objetiva y reproducible en bases de datos electrónicas, así como en la literatura de secuencias de mtDNA publicadas de pacientes con la mutación m.11778G>A.
2. Acceder a los estudios de los cuales proceden las secuencias y seleccionar aquellos que poseen información familiar disponible: pedigrees. Reanalizar la penetrancia de las familias en base a criterios propios previamente definidos.
3. Elaborar una lista de criterios de exclusión/inclusión objetiva y realizar un estudio en profundidad para aplicarla a la literatura encontrada.
4. Analizar las secuencias y estudiar las mutaciones en genes codificantes de proteínas que inducen cambio de aminoácido y tRNAs. Establecer las variables de efecto de interés, que van a clasificar a las mutaciones en relevantes y no relevantes.
5. Definir el estadístico o medida que se va a utilizar para determinar la respuesta a la hipótesis y aplicar el parámetro analítico a los datos obtenidos.

4. METODOLOGÍA

4.1 METODOLOGÍA PARA LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.

Busca responder a los tres primeros objetivos propuestos para este Trabajo de Fin de Grado y que se resumen en el acopio y análisis de la bibliografía relacionada con la penetrancia de LHON y la mutación *m.11778G>A*. Para ello, se hacen uso de base de datos especializadas como MITOMAP (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>) que ofrece amplia información acerca del mtDNA, así como las mutaciones descritas en el mismo, pero también otras bases científicas de gran relevancia, como PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para finalmente completar la bibliografía con artículos obtenidos del estudio de referencias de otros trabajos, tesis y libros, encontrados empleando el buscador AlcorZe, disponible en la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza y que integra tanto fuentes internas como información procedente de bases de datos.

Se comenzó realizando una búsqueda por alelos desde **MITOMAP**, introduciendo la mutación ***m.11778G>A*** y accediendo posteriormente a todas las secuencias registradas dentro de la base de datos como poseedoras de la mutación. Se obtuvieron un total de **185 secuencias** y se analizaron individualmente las referencias al estudio del que procedían. Tras el análisis se determinó que procedían de **24 artículos** y que varias secuencias pertenecían a la misma familia. Se guardaron los artículos que contenían información de las familias y se desecharon aquellos en los que no se proporcionaba el pedigrí. Se obtuvieron **6 artículos** que cumplían el requisito.

Como el tamaño de muestra era demasiado reducido para llevar a cabo el estudio, se decidió ampliar la búsqueda a bases de datos bibliográficas y repositorios. Se hizo uso principalmente de **PUBMED**, base de datos bibliográfica multidisciplinar actualizada, de acceso libre y gratuito. Para la búsqueda se emplearon palabras clave como: *m.11778G>A penetrance*, *m.11778G>A pedigree*, *LHON penetrance* y *LHON pedigree*. Y para obtener artículos que contuvieran ambos términos, se hizo uso del operador booleano "AND", obteniéndose los siguientes resultados: 30 artículos para *m.11778G>A AND penetrance*, 34 artículos para *m.11778G>A AND pedigree*, 170 artículos para *LHON AND penetrance* y 299 artículos para *LHON AND pedigree*.

Se obtuvo un total de **533 artículos** se eliminaron los duplicados y se filtraron en base a la información accesible. Se desecharon aquellos que no proporcionaban el pedigrí de las familias a estudio y/o la secuencia de mtDNA o tabla de variantes perteneciente a un integrante de la familia (Figura 2).

Como resultado del filtrado se obtuvieron **48 artículos** que validar en base a criterios de exclusión / inclusión definidos para este estudio.

Criterios de inclusión/exclusión:

A) Heteroplasmia. Es la presencia, en un mismo individuo, de diferentes tipos de mtDNA (tipo salvaje y mutado) causada por mutaciones que se dan a nivel de oocito y que se transmiten a la descendencia en niveles variados debido a la segregación aleatoria. Esto provoca que el fenotipo de LHON no solo dependa de la patogenicidad específica de la mutación, sino de su proporción presente en las mitocondrias, células o tejidos del individuo. [20]

Si se quiere valorar la penetrancia de una determinada mutación, es importante seleccionar aquellas familias en las que ésta se encuentre en condiciones de homoplasmia.

B) Edad. Los síntomas de LHON aparecen normalmente entre los 15 y 35 años de edad, por lo que es considerable descartar aquellos artículos que tengan pedigríes donde se consideren individuos por debajo de los 10 años pues podrían suponer falsos negativos para el cálculo de la penetrancia de la mutación.

C) Tratamiento. Aunque actualmente no existe un tratamiento definitivo para el LHON, la administración de fármacos como la Idebenona se ve como una posible terapia de prevención de la pérdida de visión o para la recuperación de la misma. [9] La administración de este tipo de fármacos puede inducir la consideración de falsos negativos en la determinación de la penetrancia por lo que se consideró obviar los artículos cuyas familias estaban recibiendo un tratamiento.

D) Tamaño de pedigrí. Puede existir cierto sesgo en el cálculo de la penetrancia de la mutación si se consideran pedigríes con un tamaño pequeño. Para evitarlo se desechan todos los artículos que contienen pedigríes en los que sólo había un descendiente (paciente).

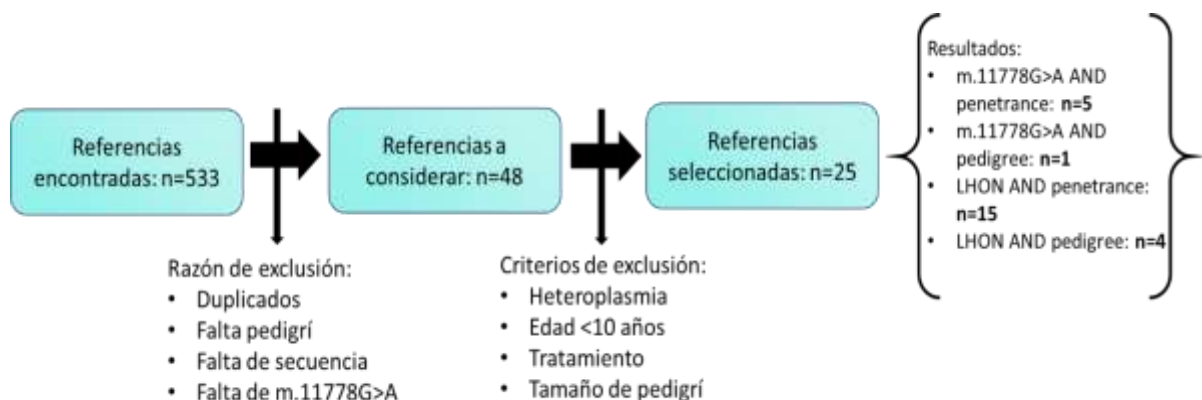


Figura 2. Proceso de selección de bibliografía. Distintas etapas en la obtención de bibliografía a partir de PUBMED relacionadas con las búsquedas y los criterios aplicados para la selección.

Finalmente, de la base de datos PUBMED se obtienen **25 artículos** que cumplen con los criterios establecidos. Se realizó posteriormente una búsqueda en AlcorZe con los términos *LHON* y *penetrance*, a fin de encontrar anteriores Trabajos Fin de Grado, máster, tesis o libros entre cuyas referencias obtener otros artículos seleccionables. Se obtuvieron de este modo **3 artículos** y **1 libro** que albergaban la información deseada.

Por último, el meta-análisis incluyó **35 artículos** que proporcionaban datos acerca de **100 familias** diagnosticadas con la enfermedad del LHON en las cuales estaba presente la mutación m.11778G>A, consiguiendo con ello un tamaño de muestra adecuado, teniendo en cuenta las limitaciones del estudio.

4.2 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Reevaluación de la penetrancia

Uno de los objetivos principales de este Trabajo de Fin de Grado reside en el reanálisis de la penetrancia que posee la mutación m.11778G>A en familias con pedigrí publicado en estudios anteriores, en base a criterios particulares.

Los diferentes estudios sobre la penetrancia incompleta de las mutaciones en LHON a lo largo del tiempo han revelado que existe **una penetrancia específica de sexo** debida a que en mujeres los estrógenos tienen un efecto neuroprotector sobre las células ganglionares de la retina haciendo que aumenten las defensas antioxidantes, la biogénesis mitocondrial y el número de copias de mtDNA. Esto se refleja en el ratio 5:1 hombre/mujer que se advierte en los pedigríes. [7]

Para evitar el efecto del género, y que el valor de penetrancia de la enfermedad para una determinada familia sea función únicamente de las variantes genéticas, se decidió realizar el análisis de la penetrancia en 100 pedigríes únicamente para **varones emparentados por vía materna**.

Herramientas para el análisis de las secuencias.

- MITOMASTER (<https://www.mitomap.org/mitomaster/index.cgi>). Para aquellos artículos que presentaban un número de acceso a las secuencias depositadas en GenBank ([GenBank Overview \(nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) se descargaron en formato FASTA y se realizó un alineamiento de secuencias con la secuencia de referencia de Cambridge revisada del mtDNA humano, rCRS ([NC_012920](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012920)) empleando la herramienta MITOMASTER. [30]
- MITOWHEEL (<http://mitowheel.org/mitowheel.html>). Herramienta que permite localizar cualquier mutación en el mtDNA. [33]
- PhyloTree (<http://www.phylotree.org/>). Árbol filogenético del mtDNA. [32]
- HelixMTdb. Base de datos de sobre la frecuencia poblacional de las mutaciones del mtDNA encontradas en 195.983 individuos. [2]
- MOESMB. Índices de conservación de las distintas posiciones aminoacídicas de las proteínas codificadas en el mtDNA. [14]

Metodología para el análisis de secuencias.

Se llevó a cabo el análisis de 100 secuencias. Para aquellas obtenidas de MITOMAP se empleó la herramienta MITOMASTER para realizar alineamientos y obtener una tabla en la que quedaban reflejadas las mutaciones, su significado y su localización. Para artículos sin secuencia publicada, se empleó MITOWHEEL para determinar la localización de las mutaciones, si implicaban o no cambio de aminoácido y la posición en la secuencia de aminoácidos en las que se producía. Se elaboró una tabla con todas las variantes encontradas en las cien secuencias analizadas y sus características.

1. Se **descartaron** las mutaciones en la región **no codificante**, así como las mutaciones en genes codificantes de proteínas que son **sinónimas**, porque se busca caracterizar aquellas que pudieran tener un efecto funcional.
2. Las mutaciones en el **rRNA** también fueron **descartadas**, ya que debido a su estructura variable es difícil el estudio de la conservación. Sólo se registraron las secuencias que presentaban las mutaciones m.1555A>G y m.1494C>T en el rRNA de 12S que son variantes conocidas y descritas como patológicas, que producen sordera mitocondrial desencadenada por tratamiento con aminoglucósidos.
3. Se estudiaron las mutaciones en genes **codificantes** de proteínas que implican cambio de aminoácido y posteriormente las que afectan **tRNAs**.
4. Se repasó la calidad de las secuencias en PhyloTree y se estableció el **haplogrupo mitocondrial** al que pertenecían.

Se establecieron las **variables** de efecto de interés que clasifican a las mutaciones en **relevantes o no relevantes**:

- Frecuencia poblacional. Se analizaron las frecuencias poblacionales para cada mutación empleando la base de datos HelixMTdb, que cuenta el nº de veces que la variante aparece en 195.983 individuos. Se estableció un **límite de frecuencia menor a 1/10.000** para definir aquellas variantes que, por ser raras en la población, puedan ser consideradas como mutaciones con efecto funcional. Este límite fue aplicado tanto a mutaciones en genes codificantes de proteínas como en tRNA. Se descartaron las variantes cuya frecuencia supera el límite.
- Índice de conservación. Se analizó el porcentaje de conservación para cada posición aminoacídica en la cual se había registrado una variante.

Para ello se hizo uso de la base de datos MOESMB que presenta el índice de conservación para cada uno de los aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de las subunidades proteicas codificadas en el mtDNA. Se calculó el porcentaje medio de conservación para cada gen para tener una visión de la conservación global y establecer un límite de conservación (Tabla 1). Se dividió la muestra en quintiles y se decidió emplear el segundo quintil de conservación como criterio de selección de variantes, al observar un porcentaje de conservación muy alto en el primer quintil.

Se supuso así que una mutación en una posición con un porcentaje de conservación que **supera el valor del segundo quintil** es un cambio que puede tener relevancia funcional, y se descartaron las variantes que no están dentro del segundo quintil.

LOCALIZACIÓN	ND1	ND2	ND3	ND4	ND4L	ND5
MEDIA %	59,3	41,0	49,6	51,7	73,4	48,8
PRIMER QUINTIL %	94,8	74,4	90,8	86,1	74,5	80,8
SEGUNDO QUINTIL %	78,4	49,5	67,0	64,0	59,8	63,0

LOCALIZACIÓN	ND6	CO1	CO2	CO3	CYB	ATP6	ATP8
MEDIA %	28,9	81,0	60,9	72,8	66,3	48,0	23,2
PRIMER QUINTIL %	57,8	99,5	96,8	97,3	97,1	86,1	37,2
SEGUNDO QUINTIL %	24,3	97,4	85,0	91,4	90,7	63,5	15,9

Tabla 1. Límites de conservación. Cálculo de la media de conservación para cada gen y distribución en función de quintiles. Elección del límite de consideración de relevancia de conservación en el 2º Quintil.

4.3 METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico está pensado para integrar e inferir relaciones entre los datos obtenidos sobre la penetrancia de la mutación m.11778G>A en las familias a estudio y las variantes presentes, previamente seleccionadas y catalogadas como relevantes o no relevantes. Y, en última instancia, proporcionar una respuesta a la hipótesis.

Para llevarlo a cabo se distribuyen los datos en **tablas de contingencia 2x2** (Figura 3) cuyo objetivo es obtener un patrón que indique la relación o falta de ella, entre las variables estudiadas. Se aplica el **test exacto de Fisher**, para el contraste de hipótesis de variables cualitativas. Se basa en comparar las frecuencias observadas frente a una frecuencia esperada o teórica. Para nuestro caso concreto, el cálculo de las frecuencias teóricas para cada celdilla se realiza de la siguiente manera:

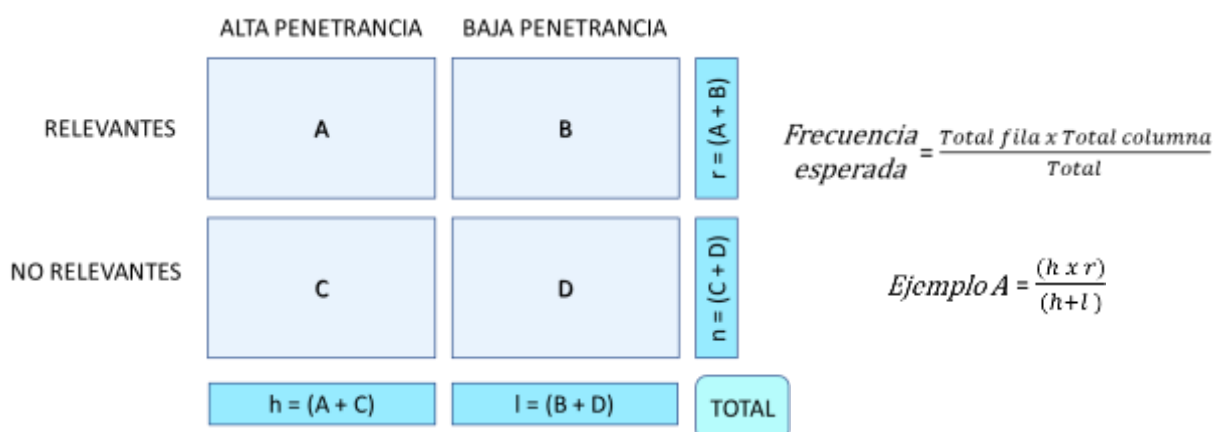


Figura 3. Tabla de contingencia. Ejemplo aplicado al estudio incluyendo la fórmula aplicada para el cálculo de la frecuencia por celdilla.

El valor del estadístico y la probabilidad (p), que invita a aceptar o rechazar la hipótesis nula se calculó empleando la herramienta online Easy Fisher Exact Test Calculator. (<https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>)

Cuando $p < 0,05$ existe significación, y por tanto se rechaza la hipótesis nula que defiende que no existe relación entre las variables consideradas.

Para confirmar la información también se aplicaron los datos a una tabla de contingencia 2x3 (penetrancia alta, media y baja en función de mutaciones relevantes y no relevantes) y se analizó la distribución de las variantes, terminando el análisis con un test X^2 . (<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx>)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RESULTADOS PARA LA REEVALUACIÓN DE LA PENETRANCIA

Una vez culminada la búsqueda bibliográfica se consiguió definir una **población de estudio** que consistía en cien familias que procedían de distintas regiones del planeta y que albergaban en su secuencia de mtDNA la mutación m.11778G>A. El siguiente paso consistía en la valoración de la penetrancia de los distintos pedigríes.

Del análisis de la penetrancia de la mutación m.11778G>A en las cien familias, considerando para el cálculo únicamente los varones emparentados por vía materna, se obtuvieron resultados de penetrancia en el **rango 0-100%**. El valor de cero se correspondía con aquellos pedigríes en los que todos los familiares emparentados por vía materna que desarrollaban la enfermedad eran mujeres.

Se realizó una primera clasificación de los pedigríes en alta y baja penetrancia, tomando el **50%** como **aproximación inicial** del efecto de las variantes, para posteriormente considerar una **penetrancia más restrictiva**. Se acabó dividiendo la muestra en pedigríes de muy alta penetrancia, penetrancia media y penetrancia baja (Tabla 2).

N.º pedigríes	PENETRANCIA		
	BAJA < 50 %		ALTA ≥ 50 %
	57		43
N.º pedigríes	BAJA ≤ 25 %	MEDIA (> 25 y < 75) %	ALTA ≥ 75 %
	32	56	12

Tabla 2. Distribución de la penetrancia. Clasificación de los pedigríes en función de su penetrancia, necesaria para el estudio del efecto de las variables sobre la misma.

Se advirtió, con esta clasificación, como la muestra se **distribuía** entre los distintos niveles de penetrancia de manera **natural**, no existiendo una sobre selección de pedigríes de alta penetrancia.

Al mismo tiempo, teniendo en cuenta que cada pedigrí del estudio pertenecía a un haplogrupo mitocondrial determinado, y que éste hecho podía ensombrecer la influencia de las variantes privadas sobre la penetrancia, se pasó a evaluar la **distribución** de la muestra en función del **haplogrupo**.

En este Trabajo de Fin de Grado, se logró generar una “**población artificial**” en la que se puede advertir una **mezcla de haplogrupos** de distintas partes del mundo, principalmente Europa, Asia y América, que no alcanza a constituir una representación fiel de la población natural por la ausencia de algunos haplogrupos fruto de la inaccesibilidad a la secuenciación en distintas regiones del mundo (Figura 4).

Se valoró el porcentaje medio de pedigríes con haplogrupos J y M7b dentro de la población artificial y se obtuvo una **frecuencia de 6%** para el **haplogrupo J** y **3%** para el **haplogrupo M7b**, las cuales representan frecuencias inferiores a las que los haplogrupos abarcan dentro de la población natural (9 % para el haplogrupo J y 5 % para el haplogrupo M7b). Con ello, se puede determinar que **no existía una sobrerrepresentación** de haplogrupos asociados con una alta penetrancia del LHON dentro de la población a estudio.

Este hecho, sumado a la consideración de que las mutaciones que definen un determinado haplogrupo tendrán una **elevada frecuencia** dentro de la población y, por tanto, no serán determinadas como relevantes para la penetrancia dentro de este estudio, predispone a pensar que la población estudiada es **independiente del efecto del haplogrupo** y que el efecto en la penetrancia que se pueda observar va ser función de las variantes privadas presentes en los pedigrís.

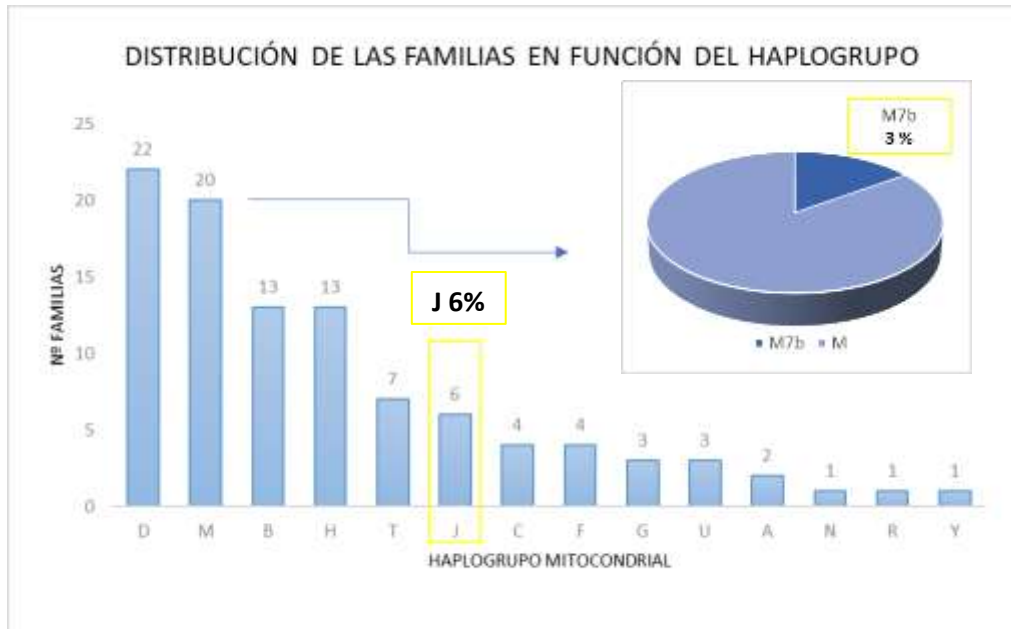


Figura 4. Representación gráfica de la distribución en haplogrupos. Análisis de los haplogrupos presentes en la población de estudio, con especial cálculo de la frecuencia para el haplogrupo M7b y J relacionados con elevada penetrancia.

5.2 RESULTADOS PARA EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Del análisis de las cien secuencias se obtuvo una tabla de variantes que se filtraron en función de criterios previamente determinados de frecuencia poblacional e índice de conservación (Tabla 3). Se aplicó una **frecuencia menor a 1/10.000** individuos y un **índice de conservación** dentro del **segundo quintil** para cada gen. Las variantes positivas para estos criterios se recogen en dicha tabla.

POSICIÓN	MUTACIÓN			LOCALIZACIÓN (MITOWHEEL)	IC % (MOESMB)	FRECUENCIA (195.983 personas)	PENETRANCIA (100 familias) Baja ≤25% y Alta ≥75%
3362	T	C	F19S	<i>MT-ND1</i>	91,810	0	BAJA
3364	C	T	L20M	<i>MT-ND1</i>	79,516	11	ALTA
3416	G	A	P37H	<i>MT-ND1</i>	99,671	0	BAJA
3472	T	C	F56L	<i>MT-ND1</i>	84,743	6	MEDIA
3632	C	T	S109F	<i>MT-ND1</i>	79,748	0	MEDIA
8821	T	G	S99A	<i>MT-ATP6</i>	68,223	1	MEDIA
9519	A	G	S105G	<i>MT-CO3</i>	94,302	0	ALTA
9559	C	G	P118R	<i>MT-CO3</i>	97,783	0	BAJA
13702	C	G	R456G	<i>MT-ND5</i>	64,373	0	MEDIA
14578	C	T	L32S	<i>MT-ND6</i>	74,966	6	BAJA
15395	A	G	K217E	<i>MT-CYB</i>	91,800	8	ALTA
15635	T	G	S297A	<i>MT-CYB</i>	93,585	2	BAJA
4316	insT		tRNA-Ile	<i>MT-TI</i>	-	1	MEDIA
12140	A	G	tRNA-His	<i>MT-TH</i>	-	6	ALTA
12302	C	T	tRNA-LeuCUN	<i>MT-TL2</i>	-	1	BAJA

Tabla 3. Tabla de variantes. Recoge las variantes de las cien secuencias, consideradas como relevantes y los datos en los cuales se apoya su consideración (valores de conservación y frecuencia poblacional). Además, se presenta su localización en el genoma mitocondrial y la penetrancia de la familia en la que se han encontrado.

Se realizó una búsqueda en la literatura de cada una de las variantes y se advirtió como la mayoría de las ellas eran “nuevas” y en el artículo del cual se extrae el pedigrí aparecían por primera vez. Mientras que, para otras, se disponía de una bibliografía anterior donde son retratadas como factores de riesgo asociados al LHON. Las mutaciones para las cuales se han encontrado referencias se detallan a continuación:

- **m.3472T>C:** Se trata de una mutación en el gen *MT-ND1* que cambia una fenilalanina muy conservada en la posición 56 por una leucina. Ha sido anteriormente definida como **variante patogénica** capaz de desencadenar los síntomas de LHON en ausencia de las tres mutaciones consideradas como primarias. [13, 26] Se realizaron estudios en cíbridos mitocondriales con la mutación, basando los criterios de consideración en las diferencias de potencial de membrana, actividad del complejo I y niveles del mtDNA respecto del control. [13] Sin obtener diferencias significativas en el consumo de oxígeno, producción de ROS y niveles de ATP. Otros estudios realizados en fibroblastos y plaquetas de paciente y basados en programas de predicción de la patogenicidad (PolyPhen-2) y estudios funcionales, sí determinaron diferencias en el ratio de consumo de oxígeno de las líneas celulares con la mutación y las líneas control. [26] Así, la mutación **m.3472T>C** encontrada en este Trabajo fin de Grado en pedigrí de **penetrancia media**, podría ser considerada como factor de incremento de la penetrancia cuando se encuentra junto a m.11778G>A en un genoma.

- **m.15395A>G:** Consiste en una mutación en el gen *MT-CYB* que cambia una lisina muy conservada en la posición 217 por una glutamina lo cual se traduce en un cambio de carga para esa posición aminoacídica, que parece conllevar a desestabilizar la interacción con la subunidad 8 del CIII. Esta mutación fue caracterizada en base a tratamientos estadísticos con two-tailed Student's t-test, obteniendo un resultado significativo. [3] En el presente estudio se ha encontrado en **pedigríes de muy alta penetrancia** por lo que podría tener un efecto sinérgico con la mutación m.11778G>A.
- **m.15635T>G:** mutación en *MT-CYB* que cambia una serina muy conservada en la posición 297 por una alanina. Se ha caracterizado como factor modificador de la manifestación de la mutación m.11778G>A únicamente en base a criterios de conservación y, en este caso, parece asociarse a un **factor beneficioso**. [19] Se encuentra en pedigríes de baja penetrancia en este estudio, por lo que podría considerarse su posible efecto en la **disminución de la penetrancia** de la mutación m.11778G>A.

Finalmente, estos hallazgos sirven para poner de manifiesto que variantes privadas dentro del mtDNA que se presentan junto a una mutación primaria podrían influir en aumentar la penetrancia.

Para las dos últimas mutaciones, así como el resto variantes encontradas y catalogadas como relevantes dentro de las secuencias de este estudio, serían necesarias distintas **pruebas funcionales** para poder asegurar su efecto. Para poder predecir la posible presencia o ausencia de este efecto, en este meta-análisis se decidió ajustar los datos a un **tratamiento estadístico**.

5.3 RESULTADOS PARA EL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un análisis estadístico de las variantes encontradas en las secuencias de los distintos pedigríes junto con la penetrancia de los mismos conforme a lo detallado en el apartado de metodología estadística, teniendo como objeto último, responder a la hipótesis planteada para este Trabajo de Fin de Grado.

Se comenzó llevando los datos a tablas de contingencia 2x2 a las cuales se aplicaba el **test exacto de Fisher** en base a:

- **Hipótesis nula (H_0):** el aumento de la penetrancia en individuos con la mutación m.11778G>A **no está afectado** por la presencia de variantes privadas relevantes en el mtDNA.
- **Hipótesis alternativa (H_1):** el aumento de la penetrancia en individuos con la mutación m.11778G>A **está afectado** por la presencia de variantes privadas relevantes en el mtDNA.

Se comenzó con una aproximación inicial para advertir el efecto de las variantes tomando como criterio una **penetrancia del 50 %** (Tabla 4). Se distribuyeron las variantes y se calculó la **frecuencia esperada** para cada celdilla, que representa el número de variantes que deberían encontrarse en cada celdilla dependiendo de la distribución de la tabla.

Cuanto mayor es la diferencia entre frecuencia observada / esperada, mayor es la posibilidad de encontrar significación, y rechazar con ello la hipótesis nula.

Test de Fisher 50 % CDS	Alta penetrancia	Baja penetrancia	Test de Fisher 50 % CDS + tRNA	Alta penetrancia	Baja penetrancia
Relevantes	6 (7)	8 (8)	Relevantes	8 (8)	9 (9)
No relevantes	327 (327)	373 (374)	No relevantes	333 (333)	383 (383)

Tabla 4. Tablas de contingencia para 50 %. Se presenta la distribución de variantes en función de la penetrancia. (Alta penetrancia $\geq 50\%$ y Baja penetrancia $< 50\%$) A la izquierda se encuentra la tabla correspondiente a las variantes en la secuencia codificante de proteínas (CDS) y a la derecha incluyendo las variantes en tRNAs. En azul se presenta la frecuencia observada y en rojo la frecuencia esperada para cada celdilla.

Se comenzó estudiando únicamente las variantes en las regiones codificantes de proteínas del mtDNA que cambian aminoácido para pasar posteriormente a estudiarlas en conjunto con las mutaciones en los tRNAs.

Finalmente se calculó haciendo uso de herramientas informáticas el valor de p para cada tabla:

Test de Fisher 50 % CDS: $p = 1$
Test de Fisher 50 % CDS + tRNA: $p = 1$

Apenas se obtuvieron diferencias en las frecuencias observadas / esperadas para ambas tablas y el resultado del estadístico no mostraba significación. Se decidió probar con una penetrancia más restrictiva.

Se consideró el **límite de penetrancia en el 75 %** y se distribuyeron las variantes (Tabla 5). Se calcularon frecuencias esperadas y el valor de p tanto para las variantes en secuencias codificante de proteínas como para éstas y variantes en tRNAs.

Test de Fisher 75 % CDS	Alta penetrancia	Baja penetrancia	Test de Fisher 75 % CDS + tRNA	Alta penetrancia	Baja penetrancia
Relevantes	3 (1)	9 (11)	Relevantes	4 (2)	11 (13)
No relevantes	80 (82)	622 (620)	No relevantes	83 (85)	635 (633)

Tabla 5. Tablas de contingencia para 75 %. Se presenta la distribución de variantes en función de la penetrancia. (Alta penetrancia $\geq 75\%$ y Baja penetrancia $< 75\%$) A la izquierda se encuentra la tabla correspondiente a las variantes en la secuencia codificante de proteínas (CDS) y a la derecha incluyendo las variantes en tRNAs. En azul se presenta la frecuencia observada y en rojo la frecuencia esperada para cada celdilla.

Del análisis de las frecuencias se destaca como las frecuencias observadas para las mutaciones relevantes en alta penetrancia son superiores a las esperadas, lo cual indica que las variantes relevantes tienen una **tendencia a acumularse en los pedigríes de alta penetrancia** reforzando la teoría de que estas mutaciones que se acumulan son las responsables de la elevada penetrancia que se advierte en el pedigrí.

Se llevó a cabo el cálculo del valor de p con herramientas informáticas y se obtuvo:

Test de Fisher 75 % CDS: p = 0,1541 Test de Fisher 75 % CDS + tRNA: p = 0.0908

El análisis estadístico culminó así con un **resultado no significativo**.

Se obtuvo **una p = 0.0908** superior a 0,05, pero donde se advertía cierta **proximidad a la significación**. Se valoraron todos los factores que pudieron haber influido y se adoptaron nuevas aproximaciones.

Limitaciones del estudio estadístico

Diversos factores pudieron haber influido en que, para las cien familias analizadas, el estadístico se localizara cerca de la significación, pero no siendo significativo y no permitiendo rechazar la hipótesis nula.

- **Tamaño de muestra.** El tamaño de muestra empleado para este estudio era de cien familias, obtenidas teniendo en cuenta las limitaciones de la búsqueda bibliográfica y que pudieron haber representado una muestra **demasiado pequeña** para un adecuado análisis estadístico. Se podría considerar repetir el estudio empleando un tamaño de muestra más grande.
- **Efecto del haplogrupo.** A pesar de que la distribución del haplogrupo en la población muestra no puso de manifiesto una sobrerepresentación de haplogrupos, al **considerarse todas las mutaciones** encontradas en las cien secuencias de mtDNA, el efecto del haplogrupo **no pudo eliminarse matemáticamente**.
- **Criterios de selección.** Otro posible factor limitante puede residir en que los criterios de **selección de las mutaciones que se consideran como relevantes** no hayan sido los adecuados. Frecuencia poblacional demasiado baja y/o índice de conservación demasiado alto.
- **Factores ambientales.** Otros factores relacionados con el **estilo de vida** de los pacientes como el fumar, la ingesta de alcohol, etc., que parecen tener también una influencia sobre la penetrancia de LHON.

- **Mutaciones beneficiosas.** Se conoce la existencia de haplogrupos mitocondriales como el haplogrupo H, que está definido por polimorfismos en el mtDNA para los que se propone que **disminuyen el riesgo a padecer LHON**. La presencia de estos polimorfismos podría suponer una disminución de la penetrancia en las familias que poseen la mutación m.11778G>A. Existe un **13%** de representación del haplogrupo H en la población a estudio frente al 40% que abarca dentro de la población europea, por lo que tampoco se encuentra una sobrerrepresentación del haplogrupo.

Teniendo en cuenta las limitaciones, así como los resultados obtenidos del test exacto de Fisher, se propuso realizar una **nueva aproximación**, en la cual aplicar un tratamiento estadístico a los datos valorando no solo los **efectos de aumento** de la penetrancia por posibles variantes de riesgo, sino también los **efectos de disminución** de la penetrancia por posibles variantes protectoras.

Perspectivas

Se propuso, al mismo tiempo, estudiar la presencia de otras variantes privadas consideradas como relevantes que pudieran tener un **efecto protector** frente al riesgo de padecer LHON.

Para ello, se distribuyeron todas las variantes encontradas en el análisis de las secuencias de la población a estudio, en una **tabla de contingencia 2x3** (Tabla 6), a la cual se le aplicó como **tratamiento estadístico una X²**.

Test X ² CDS + tRNA	Alta penetrancia	Penetrancia media	Baja penetrancia
Relevantes	4 (2)	5 (9)	6 (4)
No relevantes	83 (85)	451 (447)	184 (186)

Tabla 6. Tabla de contingencia 2x3. Se presenta la distribución de variantes en función de la penetrancia tanto para las encontradas en secuencia codificante de proteínas (CDS) como para los tRNAs. (Alta penetrancia $\geq 75\%$, Penetrancia media $> 25\%$ y $< 75\%$, y Baja penetrancia $\leq 25\%$). En azul se presenta la frecuencia observada y en rojo la frecuencia esperada para cada celdilla.

Una vez obtenida la distribución, se destaca como existe **una frecuencia observada superior a la esperada** tanto para variantes con tendencia a acumularse en pedigríes de alta penetrancia como para las variantes en baja penetrancia. El acúmulo de variantes relevantes en pedigríes de alta penetrancia predispone a pensar que existe un **aumento del riesgo a padecer LHON** por la presencia de las mismas.

Mientras que, para los pedigríes de baja penetrancia se esperaba que hubiera un déficit de mutaciones relevantes. Esto último no se cumple y en cambio, se advierte un acúmulo de mutaciones relevantes también para los pedigríes de baja penetrancia, lo que parece manifestar la presencia en la población a estudio **de mutaciones de resistencia**, cuyo efecto sería beneficioso, disminuyendo el riesgo a padecer LHON.

Se calcularon los parámetros estadísticos y se obtuvo: **X² = 6,05 y P = 0,0486**

Se advierte como para esta última distribución se obtiene un **resultado significativo** ($p < 0,05$) lo cual permitió rechazar la **hipótesis nula**. El aumento de la penetrancia en individuos con la mutación m.11778G>A está afectado por la presencia de variantes privadas relevantes en el mtDNA.

Y además de ello, permitió plantear una nueva hipótesis, acerca de la existencia de **variantes privadas de compensación** que cuando están presentes junto con la mutación m.11778G>A disminuyen su penetrancia.

Apuntamos con este meta-análisis a que las variantes privadas o propias de cada familia, al igual que muchos otros factores, también puede tener su influencia en la penetrancia de las mutaciones LHON.

A lo largo de los últimos años, se han llevado a cabo muchos estudios que intentan respaldar esta teoría. Uno de los investigadores centrados en la investigación de cómo variantes particulares en el mtDNA modulan la expresión fenotípica del LHON es el Dr. **Min-Xing Guan** de la Universidad de Zhejiang. En los últimos años ha publicado varios estudios basados en **análisis de conservación, predictores de estructura y tratamientos estadísticos** que permiten, en cierta medida, poder inferir el posible efecto modulador de las variantes. En uno de sus estudios, define la mutación **m.15395A>G** considerada también en este meta-análisis, como variante de actuación sinérgica con m.11778G>A empeorando la manifestación fenotípica del LHON.

Sin embargo, la base de estos estudios puede no ser suficientemente concluyente para definir variantes, pruebas funcionales a nivel de laboratorio continúan siendo necesarias.

Se invita con ello a una futura posible **investigación** de cada una de las **variantes relevantes** encontradas en pedigríes de alta y baja penetrancia en este meta-análisis, mediante pruebas funcionales siguiendo las siguientes etapas:

1. Generación de cíbridos transmitocondriales portadores de la variante a estudio junto con la mutación m.11778G>A en homoplasmia.
2. Medida de la masa mitocondrial y cuantificación del mtDNA de los cíbridos comparando con cíbridos control conteniendo únicamente la mutación m.11778G>A y líneas celulares control no mutantes.
3. Estudio de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria y comparación para las tres líneas celulares.
4. Estudio funcional de la actividad de OXPHOS y comparación para las tres líneas celulares.
5. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno y comparación para las tres líneas celulares.

Una vez finalizadas las pruebas funcionales, si se determinaran diferencias significativas entre los cíbridos con variante privada y m.11778G>A, y los cíbridos que contienen únicamente m.11778G>A, se podría afirmar que la variante estudiada tiene un efecto en la penetrancia de la mutación.

De esta manera se determinaría el efecto fenotípico para cada una de las variantes.

CONCLUSIONES

El estudio bibliográfico de la penetrancia de la mutación m.11778G>A permitió obtener una población de familias LHON de distintas regiones geográficas, con diferencias en el porcentaje de penetrancia de la mutación y haplogrupos variados, es decir, una población con la suficiente heterogeneidad como para que los factores que afectan a la penetrancia de la mutación se manifestaran con naturalidad. El análisis de las secuencias de mtDNA permitió encontrar mutaciones con posible influencia sobre la manifestación fenotípica, y el análisis estadístico permitió resolver la hipótesis. Con la aplicación a los datos de un test exacto de Fisher se consiguió advertir una aproximación a la significación para el planteamiento de que variantes privadas o particulares pueden tener un efecto en el aumento de la penetrancia. Y, finalmente con una prueba X^2 , se obtuvieron resultados significativos confirmando la dependencia entre la presencia de variantes particulares con baja frecuencia en la población y alto índice de conservación y la penetrancia de LHON.

El presente Trabajo de Fin de Grado consiguió poner de manifiesto la existencia de un efecto tanto de aumento del riesgo como protector que variantes pueden desempeñar en sinergia con la mutación primaria m.11778G>A, siendo todavía necesarios futuros estudios funcionales para determinar cuáles son las mutaciones que modulan el efecto fenotípico.

CONCLUSIONS

The bibliographic study for the penetrance of the m.11778G>A mutation allowed to obtain a population of LHON families from different geographical regions, showing differences in the percentage of penetrance for this mutation and varied haplogroups. This population is sufficiently heterogeneous as so that the factors that affect the penetrance of the mutation manifest themselves naturally. The analysis of the mtDNA sequences allowed the confirmation of mutations with a possible influence on the phenotypic manifestation, and the statistical analysis allowed the confirmation of the hypothesis. With the application of a Fisher's Exact Test to the data, it was possible to notice an approximation to the significance for the statement that private or particular variants may have an effect on increasing penetrance. And, finally, with an X^2 test, significant results were obtained confirming the dependence between the presence of particular variants with low frequency in the population and a high conservation index and the penetrance of LHON.

The present Final Degree Project succeeded in showing the existence of an effect of both risk increase and protective that variants can play in synergy with the primary mutation m.11778G>A, and future functional studies are still necessary to determine which mutations modulate the phenotypic effect.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landázuri MO, Enríquez JA. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab.* 2012 Sep 5;16(3):378-86. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.015. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22902835.
2. Bolze A, Mendez F, White S, et al. A catalog of homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA variants in humans. *bioRxiv*; 2019. DOI: 10.1101/798264.
3. Cai W, Fu Q, Zhou X, Qu J, Tong Y, Guan MX. Mitochondrial variants may influence the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy-associated ND4 G11778A mutation. *J Genet Genomics.* 2008 Nov;35(11):649-55. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60086-7. PMID: 19022198.
4. Chen C, Chen Y, Guan MX. A peep into mitochondrial disorder: multifaceted from mitochondrial DNA mutations to nuclear gene modulation. *Protein Cell.* 2015 Dec;6(12):862-70. doi: 10.1007/s13238-015-0175-z. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26084519; PMCID: PMC4656216.
5. Chen F, Wang SY, Zhang RZ, Hu YH, Gao GF, Liu YH, Kong QP. Analysis of mitochondrial DNA polymorphisms in Guangdong Han Chinese. *Forensic Sci Int Genet.* 2008 Mar;2(2):150-3. doi: 10.1016/j.fsigen.2007.10.122. PMID: 19083810.
6. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Nov;77(11):6715-9. doi: 10.1073/pnas.77.11.6715. PMID: 6256757; PMCID: PMC350359.
7. Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, Caparrotta L, Martinuzzi A, Ragazzi E, Ghelli A, Sadun AA, d'Amati G, Carelli V. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain.* 2011 Jan;134 (Pt 1):220-34. doi: 10.1093/brain/awq276. Epub 2010 Oct 13. PMID: 20943885; PMCID: PMC3025718.
8. Gorostiza L. A. Atlas topogenético de grupos indígenas mesoamericanos: una aproximación molecular. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, 2011.
9. Haefeli RH, Erb M, Gemperli AC, Robay D, Courdier Fruh I, Anklin C, Dallmann R, Gueven N. NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PLoS One.* 2011 Mar 31;6(3): e17963. doi: 10.1371/journal.pone.0017963. PMID: 21483849; PMCID: PMC3069029.
10. Hudson G, Carelli V, Horvath R, Zeviani M, Smeets HJ, Chinnery PF. X-Inactivation patterns in females harboring mtDNA mutations that cause Leber hereditary optic neuropathy. *Mol Vis.* 2007 Dec 21;13:2339-43. PMID: 18199976.
11. Kirkman MA, Yu-Wai-Man P, Korsten A, Leonhardt M, Dimitriadis K, De Coo IF, Klopstock T, Chinnery PF. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain.* 2009 Sep;132(Pt 9):2317-26. doi: 10.1093/brain/awp158. Epub 2009 Jun 12. PMID: 19525327; PMCID: PMC2732267.

12. Kivisild T. Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investig Genet.* 2015 Mar 10;6:3. doi: 10.1186/s13323-015-0022-2. PMID: 25798216; PMCID: PMC4367903.
13. Martínez-Romero Í, Herrero-Martín MD, Llobet L, Emperador S, Martín-Navarro A, Narberhaus B, Ascaso FJ, López-Gallardo E, Montoya J, Ruiz-Pesini E. New MT-ND1 pathologic mutation for Leber hereditary optic neuropathy. *Clin Exp Ophthalmol.* 2014 Dec;42(9):856-64. doi: 10.1111/ceo.12355. Epub 2014 May 30. PMID: 24800637.
14. Martín-Navarro A, Gaudio-Simón A, Álvarez-Jarreta J, Montoya J, Mayordomo E, Ruiz-Pesini E. Machine learning classifier for identification of damaging missense mutations exclusive to human mitochondrial DNA-encoded polypeptides. *BMC Bioinformatics.* 2017 Mar 7;18(1):158. doi: 10.1186/s12859-017-1562-7. PMID: 28270093; PMCID: PMC5341421.
15. Meyerson C, Van Stavern G, McClelland C. Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Clin Ophthalmol.* 2015 Jun 26;9:1165-76. doi: 10.2147/OPHTH.S62021. PMID: 26170609; PMCID: PMC4492634.
16. Montiel-Sosa F, Ruiz-Pesini E, Enríquez JA, Marcuello A, Díez-Sánchez C, Montoya J, Wallace DC, López-Pérez MJ. Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene.* 2006 Mar 1;368:21-7. doi: 10.1016/j.gene.2005.09.015. Epub 2005 Dec 1. PMID: 16326035.
17. Montoya J, López-Gallardo E, Herrero-Martín MD, Martínez-Romero I, Gómez-Durán A, Pacheu D, Carreras M, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system. *Adv Exp Med Biol.* 2009;652:47-67. doi: 10.1007/978-90-481-2813-6_5. PMID: 20225019.
18. Pello R, Martín MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M, Torroni A, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Martinuzzi A, Smeitink JA, Arenas J, Ugalde C. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet.* 2008 Dec 15;17(24):4001-11. doi: 10.1093/hmg/ddn303. Epub 2008 Sep 19. PMID: 18806273.
19. Qu J, Wang Y, Tong Y, Zhou X, Zhao F, Yang L, Zhang S, Zhang J, West CE, Guan MX. Leber's hereditary optic neuropathy affects only female matrilineal relatives in two Chinese families. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Oct;51(10):4906-12. doi: 10.1167/iovs.09-5027. Epub 2010 Apr 30. PMID: 20435583; PMCID: PMC3066600.
20. Reche-Sainz, J. A., De-Pablo-Gómez-de-Liaño, L., Morales-Conejo, M., Domínguez-González, C., Álvarez-Fernández, M., & Ferro-Osuna, M. (2019). Trastornos mitocondriales con repercusión ocular. *Acta Estrabológica*, 48(2), 79-98.
21. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, Yi C, Kreuziger J, Baldi P, Wallace DC. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue): D823-8. doi: 10.1093/nar/gkl927. Epub 2006 Dec 18. PMID: 17178747; PMCID: PMC1781213.
22. Ruiz-Pesini E, López-Gallardo E, Dahmani Y, Herrero MD, Solano A, Díez-Sánchez C, López-Pérez M, Montoya J. Enfermedades del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial humano [Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system]. *Rev Neurol.* 2006 Oct 1-15;43(7):416-24. Spanish. PMID: 17006861.

23. Sacconi S, Salviati L, Nishigaki Y, Walker WF, Hernandez-Rosa E, Trevisson E, Delplace S, Desnuelle C, Shanske S, Hirano M, Schon EA, Bonilla E, De Vivo DC, DiMauro S, Davidson MM. A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet.* 2008 Jun 15;17(12):1814-20. doi: 10.1093/hmg/ddn073. Epub 2008 Mar 12. PMID: 18337306; PMCID: PMC2900892.
24. Sadun AA, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Quiros PA, Sadun F, DeNegri AM, Andrade R, Moraes M, Passos A, Kjaer P, Pereira J, Valentino ML, Schein S, Belfort R. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol.* 2003 Aug;136(2):231-8. doi: 10.1016/s0002-9394(03)00099-0. PMID: 12888043.
25. Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 2002 Aug 22;347(8):576-80. doi: 10.1056/NEJMoa020350. PMID: 12192017.
26. Sheremet NL, NevinitSYna TA, Zhorzholadze NV, Ronzina IA, Itkis YS, Krylova TD, Tsygankova PG, Malakhova VA, Zakharova EY, Tokarchuk AV, Panteleeva AA, Karger EM, Lyamzaev KG, Avetisov SE. Previously Unclassified Mutation of mtDNA m.3472T>C: Evidence of Pathogenicity in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Biochemistry (Mosc).* 2016 Jul;81(7):748-54. doi: 10.1134/S0006297916070117. PMID: 27449621.
27. Touitou V, LeHoang P. Diagnostic approach in optic neuropathy. *Rev Neurol (Paris).* 2012 Oct;168(10):691-6. doi: 10.1016/j.neurol.2012.08.002. Epub 2012 Sep 19. PMID: 22999102.
28. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:297-348. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314. PMID: 20078222; PMCID: PMC3245719.
29. Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol.* 2007 Oct;20(5):564-71. doi: 10.1097/WCO.0b013e3282ef58cd. PMID: 17885446.

BASES DE DATOS

30. Lott, M.T., Leipzig, J.N., Derbeneva, O., Xie, H.M., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V., and Wallace, D.C. 2013: mtDNA variation and analysis using MITOMAP and MITOMASTER. *Current Protocols in Bioinformatics* 1(123):1.23.1-26. PMID: 25489354 URL: <http://www.mitomap.org>
31. Orphanet: an online database of rare diseases and orphan drugs. Copyright, INSERM 1997. Available at http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=104
32. Van Oven M, Van Geystelen A, Kayser M, Decorte R, Larmuseau MH. 2014. Seeing the wood for the trees: a minimal reference phylogeny for the human Y chromosome. *Hum Mutat* 35(2):187-191. doi:10.1002/humu.22468
33. Zsurka, G., Csordás, A. MitoWheel, visualizing the human mitochondrial genome. *Nat Prec* (2009). <https://doi.org/10.1038/npre.2009.3167.1>

ANEXOS

ARTÍCULOS QUE CONTIENEN LOS PEDIGRÍES DEL ESTUDIO		
ARTÍCULO	REFERENCIA	ACCESO
1	Carelli, Valerio et al. 2006	https://doi.org/10.1086/501236
2	La Morgia, C et al. 2008	https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000295505.74234.d0
3	Wang, Hua-Wei et al. 2008	https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.06.004
4	Zhang, A-Mei et al. 2008	https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.128
5	Khan, Nahid Akhtar et al. 2013	PMCID: PMC3692426
6	Caporali, Leonardo et al. 2018	https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007210
7	Cai, Wanshi et al. 2008	https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60086-7
8	Jiang, Pingping et al. 2015	https://doi.org/10.1167/iovs.14-16158
9	Li, Ronghua et al. 2006	https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.02.014
10	Phasukkijwatana, Nopasak et al. 2006	https://doi.org/10.1007/s10038-006-0073-6
11	Qian, Yaping et al. 2005	https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.003
12	Qiao, Chen et al. 2015	https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3714
13	Qu, Jia et al. 2005	https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.062
14	Qu, Jia et al. 2006	https://doi.org/10.1167/iovs.05-0665
15	Qu, Jia et al. 2007	https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.015
16	Qu, Jia et al. 2009	https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.10.022
17	Qu, Jia et al. 2010	https://doi.org/10.1167/iovs.09-5027
18	Xie, Shipeng et al. 2017	https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1136304
19	Zhang, Juanjuan et al. 2010	https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.135
20	Zhang, Minglian et al. 2010	https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.07.014
21	Zhou, Xiangtian et al. 2010	https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.04.013
22	Jiang, Pingping et al. 2016	https://doi.org/10.1093/hmg/ddw199
23	Brown, M D et al. 2001	https://doi.org/10.1007/s004390100538
24	Brown, Michael D et al.	https://doi.org/10.1007/s00439-001-0660-8
25	Ding, Yu et al. 2019	https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10844
26	Howell, Neil et al. 2003	https://doi.org/10.1086/375537
27	Ji, Yanchun et al. 2016	https://doi.org/10.1167/iovs.16-19243
28	Jiang, Pingping et al. 2013	https://doi.org/10.1167/iovs.14-16158
29	Jiang, Pingping et al. 2016	https://doi.org/10.1093/hmg/ddv498
30	Liang, Min et al. 2014	https://doi.org/10.1167/iovs.13-13011
31	Simon, D K et al. 1999	https://doi.org/10.1212/wnl.53.8.1787
32	Volodko, N.V et al . 2006	https://doi.org/10.1134/S102279540601011X
33	Yan-Jiao Yao et al. 2020	https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-101558/v1
34	Yu, Jialing et al. 2020	https://doi.org/10.1172/JCI134965
35	VANSENUS A. H. (1963)	https://doi.org/10.1007/BF00573524

Tabla 1. Tabla de referencias. Se presentan los artículos de los que se han extraído los pedigríes que han servido de base a este estudio junto con su enlace de acceso directo.