

Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



Revisión

Tres preguntas y una respuesta: algoritmo diagnóstico molecular en enfermedades mitocondriales

Marcelo Andrés Kauffman^{a,b,*}

^a Consultorio de Neurogenética, Centro Universitario de Neurología, División Neurología, Hospital José María Ramos Mejía, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^b Instituto de Biología Celular y Neurociencias Eduardo de Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 5 de septiembre de 2012

Aceptado el 6 de octubre de 2012

On-line el 30 de noviembre de 2012

Palabras clave:

Trastornos mitocondriales

Genética mitocondrial

Defectos de la fosforilación oxidativa

R E S U M E N

Introducción: Las enfermedades mitocondriales representan un grupo de trastornos multisistémicos, que frecuentemente incluyen disfunción del sistema nervioso central y periférico entre sus manifestaciones, causados por diversas mutaciones localizadas tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear. La amplia variabilidad observada en su expresión clínica y la amplitud etiopatogénica complica su diagnóstico molecular.

Objetivos: Presentar un algoritmo diagnóstico que permita seleccionar la secuencia de estudios moleculares que pueden realizarse en la individualización diagnóstica molecular de los trastornos mitocondriales con manifestaciones en el sistema nervioso.

Desarrollo: La aproximación diagnóstica de los trastornos mitocondriales puede simplificarse si se contestan en forma secuencial 3 preguntas. ¿Cuál es la probabilidad de que mi paciente tenga un trastorno mitocondrial? Utilizando criterios diagnósticos e índices de sospecha de enfermedad mitocondrial puede estimarse la probabilidad de que la presentación clínica y los resultados de algunos estudios complementarios correspondan a un trastorno mitocondrial. Si tengo esta sospecha, ¿tiene mi paciente una presentación sindrómica clásica? Si mi paciente presenta hallazgos característicos de síndromes mitocondriales clásicos, el orden de estudios moleculares por ser solicitados puede considerarse relativamente establecido. Si no tiene presentación sindrómica, ¿es un defecto aislado de la cadena respiratoria? En esta situación, los resultados de pruebas bioquímicas de funcionamiento de los distintos complejos de la cadena respiratoria dirigirá la sistemática de pruebas moleculares solicitadas.

Conclusiones: La respuesta a estas 3 preguntas permitirá sistematizar y dirigir el orden y extensión de las pruebas moleculares necesarias para la individualización diagnóstica molecular de los trastornos mitocondriales.

© 2012 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marcelokauffman@marcelokauffman.info

1853-0028/\$ – see front matter © 2012 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2012.10.002>

Three questions and one answer: molecular diagnostic algorithm in mitochondrial disorders

A B S T R A C T

Keywords:

Mitochondrial disorders
Mitochondrial genetics
Oxidative phosphorylation disorders

Introduction: Mitochondrial disorders are a group of multisystemic diseases that frequently show central and peripheral nervous system compromise, caused by several mitochondrial and nuclear genome mutations. Diverse and heterogeneous clinical presentations along a broad group of molecular causes make complex its diagnosis.

Objectives: To present a diagnostic algorithm useful in the decision of which molecular test could be ordered in the molecular diagnosis of mitochondrial disorders manifesting in the nervous system.

Main Concepts: Mitochondrial disorders diagnostic's approach could be simplified if three questions are sequentially answered. *Which is the probability that my patient have a mitochondrial disorder?* Using diagnostic criteria and suspicion indexes, a probability of mitochondrial pathology could be estimated from clinical symptoms and complementary tests results. *If I think my patient has a mitochondrial disorder, does he show a classical presentation corresponding to a well-described syndrome?* The group of molecular tests to be ordered in patients showing classical presentations could be considered well established. *If not, does he suffer from an isolated defect of one subunit of the respiratory chain complex?* The results obtained from biochemist tests assessing the function of each subunit of the respiratory complex must direct the molecular tests to be ordered.

Conclusions: The answers to these three questions let systematize and direct the molecular diagnostic approach of mitochondrial disorders.

© 2012 Sociedad Neurológica Argentina. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Cómo ha sido la evolución de los organismos eucariotas en general y de sus mitocondrias en particular es una pregunta importante de la biología evolutiva que no posee una respuesta definitiva todavía¹. Tradicionalmente se acepta que las mitocondrias son un resabio evolutivo de una bacteria endosimbótica perteneciente al grupo de las alfa-proteobacterias, ancestros de *Escherichia* y *Neisseria*, representando una huella de la transición procariota-eucariota en la historia de la vida². Sin embargo, la presencia en nuestros genomas de múltiples genes originarios de distintas especies bacterianas permite cuestionar la validez absoluta de esta teoría monobacteriana³.

De todos modos, el presente de nuestras células eucariotas muestra que coexisten 2 genomas, el nuclear y el mitocondrial⁴. Diversos trastornos del sistema nervioso central y periférico -pleomórficos en sus manifestaciones clínicas- están causados por mutaciones en el genoma mitocondrial⁵. El genoma mitocondrial está formado por 16.569 pares de bases que codifican distintos ARN de transferencia y ribosomales funcionantes en la transcripción de 13 proteínas constituyentes de la cadena respiratoria. Además de la presencia de un código genético independiente, la genética mitocondrial es particular por la transmisión exclusiva matrilineal y la presencia de mutaciones patogénicas en heteroplasmia (coexistencia en distintas proporciones de genomas mitocondriales con variantes en su secuencia) dependiente del tejido⁶. Precisamente las particularidades de la heteroplasmia, así como la relativa gran extensión nucleotídica por ser analizada, dificultan técnicamente el diagnóstico molecular de los trastornos mitocondriales⁷. Por otro lado, el número creciente de enfermedades del sistema nervioso consecuencia de una disfunción mitocondrial causadas por mutaciones

en genes codificados en el núcleo complica aún más la aproximación diagnóstica en esta área⁸.

A continuación presentaré un enfoque diagnóstico secuencial mediante la respuesta a 3 preguntas que intentará servir como una recomendación práctica para el diagnóstico de los trastornos mitocondriales que tienen como manifestación síntomas del sistema nervioso.

¿Cuál es la probabilidad de que mi paciente tenga un trastorno mitocondrial?

Como sucede con otros trastornos de la neurología, existen criterios diagnósticos o escalas de probabilidad diagnóstica que han sido desarrollados con el objetivo de establecer grados de certeza o posibilidad de la existencia de una disfunción mitocondrial como la etiología de la sintomatología experimentada por el paciente asistido. En la [figura 1](#) se presenta una versión resumida de la escala de Wolf modificada⁹. Puede observarse que la suma de signos y síntomas indicativos de afectación muscular, del sistema nervioso central y multisistémica y los hallazgos en las pruebas bioquímicas e histopatológicas permite estratificar la probabilidad diagnóstica de una encefalomiopatía mitocondrial.

Entre los síntomas de afectación muscular, destacan la afectación oculomotora y la intolerancia al ejercicio; la afectación del sistema nervioso central frecuentemente incluye síntomas como ataxia, crisis epilépticas, mioclonías junto a pérdida de pautas madurativas y fenómenos *stroke like*; característicamente otros sistemas se ven afectados con sintomatología que indica disfunción cardíaca, pancreática, renal y auditiva¹⁰⁻¹³.

I. Signos y Síntomas Clínicos (1 punto por síntoma, Máximo 4 puntos)

Afectación Muscular (max 2 puntos)
 Oftalmoplejia*
 Facies miopática
 Intolerancia al ejercicio
 Debilidad Muscular
 Rabdomiolisis
 EMG patológico

Afectación SNC (Max 2 puntos)

Retraso Madurativo
 Pérdida de Pautas Madurativas
 Episodios Stroke-like
 Migraña
 Convulsiones
 Mioclonías
 Ceguera Cortical
 Signos Piramidales
 Signos Extrapiramidales
 Afectación Tronco Encéfalo

Afectación Multisistémica (Max 3 puntos)

Afectación Hematológica
 Disfunción Gastrointestinal
 Disfunción Endocrinológica
 Afectación Cardíaca
 Afectación Renal
 Hipoacusia
 Neuropatía
 Recurrencia Familiar

II. Estudios Complementarios (Máximo 4 puntos)

Aumento de Lactato*
 Aumentado cociente Lactato/Piruvato
 Aumento Alanina*
 Aumento Lactato en LCR*
 Aumento Alanina en LCR*
 Aumento proteínas en LCR
 Aumento excreción Ácidos tricarbóxicos en orina*
 Aciduria Etilmalónica
 Imágenes compatibles con Stroke -like en IRM
 Imágenes compatibles con Leigh en IRM*
 Aumento de Lactato en Espectroscopía por RMN

III. Histopatología (Máximo 4 puntos)

Fibras rojo-rasgadas** (más del 2% en sujetos de 30 a 50 años y cualquier número en menores de 30)
 Fibras COX negativas** (más del 2% en menores de 50 años)
 Reducción en tinción COX**
 Reducción en tinción SDH
 Vasos positivos para SDH
 Mitocondrias anormales en la Microscopía Electrónica

Total: 1 punto, desorden mitocondrial poco probable; 2 a 4 puntos, desorden mitocondrial posible; 5 a 7 puntos, desorden mitocondrial probable; 8 a 12 puntos, Desorden mitocondrial definido.

*Estos hallazgos suman 2 puntos cada uno **Estos hallazgos suman 4 puntos cada uno

Figura 1 – Criterios de probabilidad de disfunción mitocondrial a partir de datos clínicos y de estudios complementarios. Modificada de Wolf et al.⁹.

Algunos hallazgos en las pruebas bioquímicas permiten incrementar la sospecha de enfermedad mitocondrial: elevación de los niveles séricos y en LCR de ácido láctico, aumento en los niveles de alanina en la cromatografía de aminoácidos y aumento en la excreción de ácidos orgánicos como el etilmalónico en la orina^{14,15}. Por otro lado, los aumentos en los niveles de ácido láctico en el sistema nervioso central también pueden observarse por medio de la espectroscopía por RM¹⁶.

Finalmente, la histopatología del tejido muscular constituye uno de los principales métodos complementarios para el enfoque diagnóstico de la enfermedad mitocondrial. Hallazgos característicos son las fibras rojo rasgadas y la disminución de la actividad oxidativa COX y SDH junto a la presencia de acumulaciones mitocondriales subsarcolemales y alteraciones en la morfología mitocondrial en la microscopía electrónica¹⁷.

La suma de los signos y síntomas junto a los hallazgos en los estudios complementarios permite obtener una puntuación total en la escala de Wolf modificada. Cuanto mayor es esta puntuación, mayor resulta ser la probabilidad de disfunción mitocondrial como etiología del trastorno asistido.

¿Tiene mi paciente una presentación sindromática clásica?

Pese a la frecuente heterogeneidad sintomática y genética de la enfermedad mitocondrial, existen síndromes bien reconocidos que permiten seleccionar y dirigir la solicitud de

pruebas moleculares diagnósticas de los trastornos mitocondriales.

MELAS

Este síndrome, originalmente descrito por Pavlakis et al.¹⁸, presenta como manifestación neurológica más frecuente la aparición de fenómenos stroke-like en los cuales sintomatología deficitaria focal se acompaña de lesiones hiperintensas, generalmente parietooccipitales, en las imágenes por RM sin un claro respeto de un territorio vascular y que evolutivamente no resultan persistentes¹⁹. Otras manifestaciones prevalentes en este síndrome son la hipoacusia neurosensorial, la diabetes, el deterioro cognitivo, la baja talla y la migraña²⁰. En la mayoría de los pacientes que presenten este síndrome, una mutación en la posición 3243 del genoma mitocondrial correspondiente al gen codificante del ARN de transferencia para leucina en distintos niveles de heteroplasmia tisular es la causa del trastorno²¹. Los niveles de heteroplasmia suelen ser menores en los tejidos de alto recambio como el sanguíneo, y en consecuencia la búsqueda de esta mutación debe hacerse preferentemente en tejidos de menor recambio como el músculo o el epitelio vesical (sedimento de orina)²².

MERRF

Este síndrome, originalmente descrito por Fukuhara et al.²³, presenta como manifestación neurológica más frecuente el desarrollo de una epilepsia mioclónica progresiva junto a otras manifestaciones indicativas de disfunción mitocondrial:

hipoacusia, miopatía, neuropatía y demencia²⁴. Además, se ha descrito la presencia de lipomas axiales²⁵ y síntomas psiquiátricos en pacientes afectados por este síndrome²⁶. La mutación más frecuentemente causante de MERRF es la sustitución de una adenina por una guanina en la posición 8344 del genoma mitocondrial, codificante del ARN de transferencia para lisina²⁷. Los niveles de heteroplasmia de esta mutación también muestran heterogeneidad tisular, aunque esta mutación particular puede detectarse en sangre con mayor sensibilidad que otras²⁸.

Oftalmoplejía externa crónica progresiva y síndrome de Kearns-Sayre

La oftalmoplejía externa crónica progresiva (CPEO) y el síndrome de Kearns-Sayre (SKS) característicamente muestran compromiso de la motilidad ocular externa: ptosis y oftalmoplejía¹⁰. Un comienzo antes de los 20 años de edad y la presencia de retinopatía pigmentaria junto a la variable aparición de trastornos en la conducción cardíaca, hiperproteíorraquia y ataxia, definen al SKS²⁹. Además, los pacientes afectados por estos síndromes pueden mostrar otra sintomatología característica de disfunción mitocondrial, ya mencionadas en los párrafos precedentes. La mayoría de los sujetos afectados por CPEO y SKS presentan como causa una delección de 4,9 kb en el genoma mitocondrial³⁰. Esta delección no puede ser determinada en muestras provenientes de sangre, requiriéndose tejido muscular para el diagnóstico. La mayoría de los sujetos afectados por estos síndromes y con esta alteración estructural en el genoma mitocondrial no presentan riesgo de recurrencia familiar³¹. Sin embargo, definitivamente existen formas familiares de CPEO. Cuando el análisis del familigramma muestra un patrón de herencia indicativo de afectación autosómica, dominante más frecuentemente y recesivo en menor medida, debe analizarse la secuencia de los genes PEO1, TK y POLG³². En cambio, un familigramma indicativo de herencia materna debe llevar al análisis de la secuencia completa del genoma mitocondrial³³.

Neuropatía óptica hereditaria de Leber

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) característicamente se presenta como una pérdida aguda-subaguda e indolora de la agudeza visual en sujetos jóvenes. Frecuentemente afecta a ambos nervios ópticos en forma secuencial en un lapso de 2 meses y en una proporción de 4:1 afecta más comúnmente a los hombres que a las mujeres³⁴. El fondo de ojo suele mostrar la presencia de telangiectasias peripapilares, microangiopatía y tortuosidad vascular³⁵. La mayor parte de los casos son causados por la mutación 11778 G>A en el genoma mitocondrial en homoplasmia³⁶. En consecuencia, una muestra de sangre es suficiente para realizar el diagnóstico.

Neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria y síndrome de Leigh causado por mutaciones en el ADN mitocondrial

La neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria (NARP) y el síndrome de Leigh causado por mutaciones en el ADN mitocondrial, habitualmente causados por el mismo defecto en

el genoma mitocondrial, representan un espectro de severidad en el grado de afectación del sistema nervioso central y periférico³⁷. Presentan en común el habitual agravamiento o desencadenamiento de la sintomatología en asociación con una infección viral³⁸. La presencia de retinitis pigmentaria y neuropatía sensitiva define al síndrome NARP, mientras que un compromiso más severo con afectación del sistema nervioso central (encefalomielopatía necrosante), manifestado sintomáticamente por movimientos anormales y regresión en las pautas madurativas, junto a características alteraciones en los ganglios de la base en las imágenes por RM en los primeros 3 años de la vida, definen al síndrome de Leigh³⁹. La mayoría de los sujetos que presentan NARP y un 10-20% con síndrome de Leigh tienen mutaciones en el gen MT-ATP6 en el genoma mitocondrial, siendo el cambio en la posición 8993 el más prevalente⁴⁰.

Síndrome de ataxia y neuropatía (ataxia neuropathy spectrum). Ataxia sensitiva-epilepsia mioclónica

Distintos pacientes han sido descritos en los que se combina la presencia de una neuropatía severa generalmente sensitiva con características similares a las descritas en las ganglionopatías dorsales y que sintomáticamente se expresan de manera predominante como un trastorno atáxico⁴¹ junto a una epilepsia mioclónica⁴² y, en muchos casos, crisis migrañosas recurrentes y disfunción hepática⁴³. Estos síndromes de curso progresivo y herencia autosómica recesiva han recibido distintas denominaciones en el pasado. Sin embargo, considerando que comparten como etiopatogenia la presencia de mutaciones en POLG, actualmente son identificados como *trastornos relacionados con POLG*^{44,45}.

Si no tiene presentación sindromática, ¿es un defecto aislado de la cadena respiratoria?

Los defectos aislados de alguno de los componentes de la cadena respiratoria suelen tener una presentación clínica más agresiva y comienzo en los primeros años de vida. Habitualmente se manifiestan como una encefalomiopatía con o sin los hallazgos imagenológicos característicos del síndrome de Leigh, como una insuficiencia hepática, una miocardiopatía o la combinación de la afectación de estos sistemas⁴⁶. Sin embargo, han sido descritos de forma reiterada casos que han mostrado una presentación más indolente en la edad adulta⁴⁷ y que, clínicamente, manifestaban ataxias progresivas, miopatías y/o intolerancia al ejercicio⁴⁸. En particular, debe ser tenido en cuenta que en aquellos pacientes con déficit primarios de CoQ10 (véase más adelante) la única manifestación sintomática puede ser la de una ataxia crónica y progresiva de comienzo más frecuentemente en la primera década de la vida, sin otros elementos clínicos que permitan diferenciarla de la extensa lista de entidades que también pueden expresarse como un trastorno crónico del equilibrio, razón por la que se recomienda la prueba supletoria terapéutica (y eventualmente diagnóstica) con coenzima Q10 en todos los pacientes con ataxias crónicas de etiologías no aclaradas⁴⁹. Además, pueden resultar útiles de mención algunos elementos diferenciales de la intolerancia al ejercicio causada por

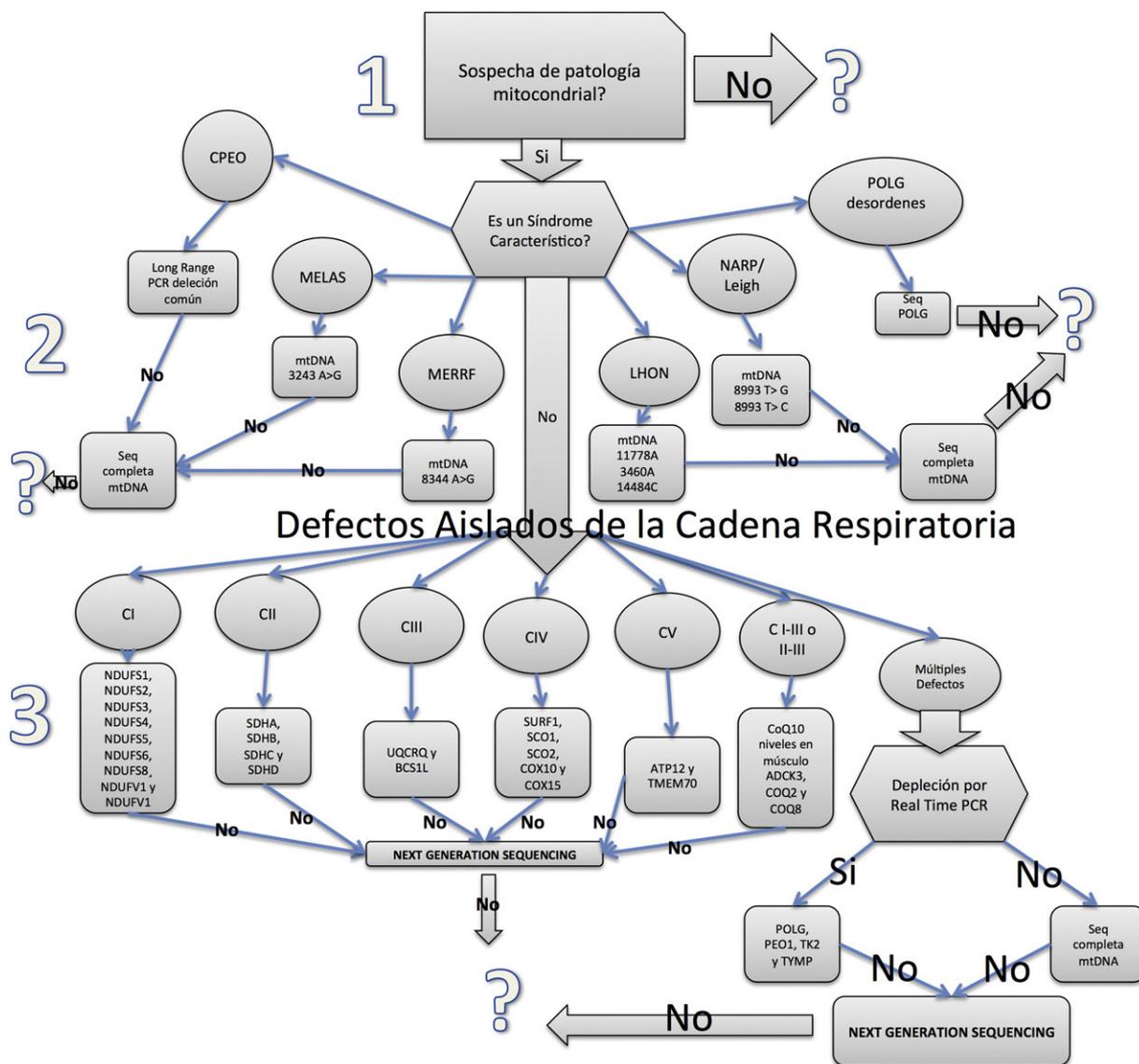


Figura 2 - Algoritmo de selección de estudios moleculares para el diagnóstico etiopatogénico de la enfermedad mitocondrial con manifestación en el sistema nervioso. Adaptada de Wong et al.⁶¹ y McFarland et al.⁶².

disfunción mitocondrial en comparación con similar sintomatología secundaria a glucogenosis: ausencia de fenómeno de «segundo aire», mialgias sin calambres musculares, lactacidosis y reducido consumo máximo corporal de oxígeno⁵⁰.

El enfoque diagnóstico de los pacientes con sospecha de déficit aislados de la cadena respiratoria debe ser dirigido a partir de la confirmación e individualización del o de los complejo/s alterado/s mediante la realización de pruebas bioquímicas funcionales en el tejido clínicamente más afectado (por ejemplo, músculo, hígado, miocardio, etc.)⁵¹. Este estudio funcional permitirá discriminar entre una de 3 posibilidades: un defecto aislado de un complejo de la cadena respiratoria; un defecto del tándem I-III o II-III, y múltiples defectos de la cadena respiratoria.

Ante la presencia de un defecto aislado del complejo I deben buscarse mutaciones en los genes NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS8, NDUFV1 y NDUFV1⁵². Los defectos aislados del complejo II suelen ser

consecuencia de mutaciones en los genes SDHA, SDHB, SDHC y SDHD^{53,54}. Mutaciones en los genes TTC19, UQCRCQ y BCS1L provocan disfunción aislada del complejo III⁵⁵, mientras que defectos aislados del complejo IV suelen ser consecuencia de mutaciones en SURF1, SCO1, SCO2, COX10 y COX15⁵⁶. Mucho menos frecuentes son los defectos aislados del complejo V causados por mutaciones en ATP12 y TMEM70⁵⁷. Cuando las pruebas funcionales indican la presencia de disfunción de los complejos I-III o II-III, deben considerarse fuertemente los déficit primarios de coenzima Q10 (potencialmente reversibles con su suplementación oral), debiendo confirmarse esta sospecha diagnóstica mediante la determinación de su concentración en tejido muscular⁴⁹ y la búsqueda de mutaciones en ADCK3, COQ2 y COQ8⁵⁸. La evidencia de múltiples defectos en la cadena respiratoria debe hacer considerar que el defecto genético más probablemente se encuentra en el genoma mitocondrial, debiendo proseguirse el algoritmo diagnóstico con la secuenciación completa del genoma mitocondrial⁵⁹ o, por

el contrario, de estar en presencia de múltiples deleciones del genoma mitocondrial o de depleción mitocondrial, la búsqueda molecular debe orientarse a mutaciones en los genes nucleares POLG, PEO1, TK2 y TYMP, entre otros⁶⁰.

Algoritmo diagnóstico

Una vez contestadas las 3 preguntas del enfoque diagnóstico presentado, puede seguirse una aproximación ordenada y secuencial de solicitud de pruebas moleculares cuyo gráfico se muestra en la figura 2 (adaptada de Wong et al.⁶¹ y McFarland et al.⁶²) que podrá permitir la individualización del defecto molecular subyacente a la frecuentemente heterogénea y compleja presentación clínica observada. No obstante ello, en un porcentaje significativo de los casos con diagnóstico clínico-patológico de disfunción mitocondrial no podrá individualizarse el defecto molecular causante debido a que este aún es desconocido en la literatura científica o la presentación clínica es lo suficientemente atípica como para no corresponder a la sistematología propuesta^{61,59}.

Avances en el diagnóstico molecular de los trastornos mitocondriales

Entre los avances de la genética molecular se incluye el desarrollo de las nuevas metodologías de secuenciación genómica que han posibilitado la obtención de un vasto volumen de información a un significativo menor coste⁶³. La disponibilidad de estas nuevas tecnologías está significando un cambio paradigmático en los enfoques clásicos utilizados en la investigación y el diagnóstico de los trastornos hereditarios. Es así como resulta factible el escrutinio simultáneo de la secuencia completa de miles de genes codificantes de proteínas de la cadena respiratoria junto a la del genoma mitocondrial a partir de una única muestra biológica y a una fracción del coste que el análisis tradicional de unos pocos genes requiere⁶⁴. El último tiempo mostró distintos ejemplos de la aplicación de estas metodologías en el diagnóstico de los trastornos mitocondriales. Nosotros probamos la alta sensibilidad de la pirosecuenciación masiva en la detección de mutaciones en bajos niveles de heteroplasma en el diagnóstico de MELAS a partir de una muestra sanguínea⁶⁵. Calvo et al.⁶⁶ analizaron la secuencia de 1.034 genes implicados en el funcionamiento mitocondrial junto al genoma completo mitocondrial en 42 pacientes afectados de trastornos de la cadena respiratoria, pudiendo lograr la individualización diagnóstica molecular en más del 50% de los casos. Necesariamente el enfoque diagnóstico molecular de la enfermedad mitocondrial está llamado a modificarse en el futuro cercano.

Financiación

Este trabajo fue financiado con subsidios de investigación de CONICET, GCBA y Fundación Florencio Fiorini. Marcelo Kauffman es miembro de la carrera de investigador de CONICET y del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Thiergart T, Landan G, Schenk M, Dagan T, Martin WF. An evolutionary network of genes present in the eukaryote common ancestor polls genomes on eukaryotic and mitochondrial origin. *Genome Biol Evol.* 2012;4:466-85.
- Godde JS. Breaking through a phylogenetic impasse: a pair of associated archaea might have played host in the endosymbiotic origin of eukaryotes. *Cell Biosci.* 2012;2:29.
- Lloyd AH, Timmis JN. The origin and characterization of new nuclear genes originating from a cytoplasmic organellar genome. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2019-28.
- Kelly RD, Mahmud A, McKenzie M, Trounce IA, St John JC. Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res.* 2012.
- Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet.* 2012;379:1825-34.
- Koopman WJ, Willems PH, Smeitink JA. Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med.* 2012;366:1132-41.
- Li H, Liu D, Lu J, Bai Y. Physiology and pathophysiology of mitochondrial DNA. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:39-51.
- Davis RL, Sue CM. The genetics of mitochondrial disease. *Semin Neurol.* 2011;31:519-30.
- Wolf NI, Smeitink JA. Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology.* 2002;59:1402-5.
- Fratte C, Gorman GS, Stewart JD, Buddles M, Smith C, Evans J, et al. The clinical, histochemical, and molecular spectrum of PEO1 (Twinkle)-linked adPEO. *Neurology.* 2010;74:1619-26.
- Goodfellow JA, Dani K, Stewart W, Santosh C, McLean J, Mulhern S, et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes: an important cause of stroke in young people. *Postgrad Med J.* 2012;88:326-34.
- Finsterer J, Zarrouk Mahjoub S. Epilepsy in mitochondrial disorders. *Seizure.* 2012;21:316-21.
- Zeviani M, Simonati A, Bindoff LA. Ataxia in mitochondrial disorders. *Handb Clin Neurol.* 2012;103:359-72.
- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology.* 2002;59:1406-11.
- Rodenburg RJ. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis.* 2011;34:283-92.
- Jose da Rocha A, Tulio Braga F, Carlos Martins Maia Jr A, Jorge da Silva C, Toyama C, Pereira Pinto Gama H, et al. Lactate detection by MRS in mitochondrial encephalopathy: optimization of technical parameters. *J Neuroimaging.* 2008;18:1-8.
- Filosto M, Tomelleri G, Tonin P, Scarpelli M, Vattei G, Rizzuto N, et al. Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep.* 2007;27:23-30.
- Pavakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol.* 1984;16:481-8.
- Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Kulikova R, Oskoui M, Sproule DM, et al. Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype. *Neurology.* 2011;77:1965-71.
- Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, et al. MELAS: A nationwide prospective cohort

- study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:619–24.
21. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Kärppä M, et al. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet*. 1998;63:447–54.
 22. de Laat P, Koene S, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ, Janssen MC, Smeitink JA. Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A>G mutation. *J Inher Metab Dis*. 2012.
 23. Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light- and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci*. 1980;47:117–33.
 24. Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CS, Arndt RC, Silvado CE, Werneck LCMERRF. Clinical features, muscle biopsy and molecular genetics in Brazilian patients. *Mitochondrion*. 2011;11:528–32.
 25. Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfors A. Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve*. 1995;3:S102–6.
 26. Anglin RE, Garside SL, Tarnopolsky MA, Mazurek MF, Rosebush PI. The psychiatric manifestations of mitochondrial disorders: a case and review of the literature. *J Clin Psychiatry*. 2012;73:506–12.
 27. Whittaker RG, Turnbull DM. A diagnostic tattoo. *Clin Genet*. 2009;75:37–8.
 28. Ozawa M, Goto Y, Sakuta R, Tanno Y, Tsuji S, Nonaka I. The 8,344 mutation in mitochondrial DNA: a comparison between the proportion of mutant DNA and clinico-pathologic findings. *Neuromuscul Disord*. 1995;5:483–8.
 29. Serrano M, Garcia-Silva MT, Martin-Hernandez E, O'Callaghan MM, Quijada P, Martinez-Aragón A, et al. Kearns-Sayre syndrome: cerebral folate deficiency, MRI findings and new cerebrospinal fluid biochemical features. *Mitochondrion*. 2010;10:429–32.
 30. Tonska K, Piekutowska-Abramczuk D, Kaliszewska M, Kowalski P, Tańska A, Bartnik E, et al. Molecular investigations of mitochondrial deletions: evaluating the usefulness of different genetic tests. *Gene*. 2012;506:161–5.
 31. Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, et al. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet*. 2004;364:592–6.
 32. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med*. 2008;59:131–46.
 33. Gamba J, Kiyomoto BH, de Oliveira AS, Gabbai AA, Schmidt B, Tengan CH. The mutations m.5628T>C and m.8348A>G in single muscle fibers of a patient with chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Neurol Sci*. 2012;320:131–5.
 34. Sitarz KS, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Disorders of the optic nerve in mitochondrial cytopathies: new ideas on pathogenesis and therapeutic targets. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012;12:308–17.
 35. Barboni P, Savini G, Feuer WJ, Budenz DL, Carbonelli M, Chicani F, et al. Retinal nerve fiber layer thickness variability in Leber hereditary optic neuropathy carriers. *Eur J Ophthalmol*. 2012;22:985–91.
 36. Achilli A, Iommarini L, Olivieri A, Pala M, Hooshyar Kashani B, Reynier P, et al. Rare Primary Mitochondrial DNA Mutations and Probable Synergistic Variants in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *PLoS One*. 2012;7:e42242.
 37. Kara B, Arikani M, Maras H, Abaci N, Cakiris A, Ustek D. Whole mitochondrial genome analysis of a family with NARP/MILS caused by m.8993T>C mutation in the MT-ATP6 gene. *Mol Genet Metab*. 2012;107:389–93.
 38. Huntsman RJ, Sinclair DB, Bhargava R, Chan A. Atypical presentations of leigh syndrome: a case series and review. *Pediatr Neurol*. 2005;32:334–40.
 39. Lebre AS, Rio M, Faivre d'Arcier L, Vernerey D, Landrieu P, Slama A, et al. A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *J Med Genet*. 2011;48:16–23.
 40. Baracca A, Sgarbi G, Mattiazzi M, Casalena G, Pagnotta E, Valentino ML, et al. Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767:913–9.
 41. Habek M, Barun B, Adamec I, Mitrovic Z, Ozretic D, Brinar VV. Early-onset ataxia with progressive external ophthalmoplegia associated with polg mutation: autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome or SANDO? *Neurologist*. 2012;18:287–9.
 42. Dhamija R, Moseley BD, Wirrell EC. Clinical reasoning: a 10-month-old boy with myoclonic status epilepticus. *Neurology*. 2011;76:22–5.
 43. Uusimaa J, Hinttala R, Rantala H, Päivärinta M, Herva R, Röttä M, et al. Homozygous W748S mutation in the POLG1 gene in patients with juvenile-onset Alpers syndrome and status epilepticus. *Epilepsia*. 2008;49:1038–45.
 44. Milone M, Benarroch EE, Wong LJ. POLG-related disorders: defects of the nuclear and mitochondrial genome interaction. *Neurology*. 2011;77:1847–52.
 45. Berardo A. El espectro clínico de las mutaciones en POLG. *Neurologia Arg*. 2011;3:106–12.
 46. Diaz F, Kotarsky H, Fellman V, Moraes CT. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011;16:197–204.
 47. Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol*. 2008;39:223–35.
 48. Tarnopolsky MA, Raha S. Mitochondrial myopathies: diagnosis, exercise intolerance, and treatment options. *Med Sci Sports Exerc*. 2005;37:2086–93.
 49. Emmanuele V, Lopez LC, Berardo A, Naini A, Tadesse S, Wen B, et al. Heterogeneity of coenzyme q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch Neurol*. 2012;69:978–83.
 50. Berardo A, DiMauro S, Hirano M. A diagnostic algorithm for metabolic myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2010;10:118–26.
 51. van den Heuvel LP, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Biochemical examination of fibroblasts in the diagnosis and research of oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects. *Mitochondrion*. 2004;4:395–401.
 52. Haack TB, Haberberger B, Frisch EM, Wieland T, Iuso A, Gorza M, et al. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet*. 2012;49:277–83.
 53. Baysal BE, Rubinstein WS, Taschner PE. Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorders. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79:495–503.
 54. Rustin P, Rotig A. Inborn errors of complex II—unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1553:117–22.
 55. Ghezzi D, Arzuffi P, Zordan M, Da Re C, Lamperti C, Benna C, et al. Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat Genet*. 2011;43:259–63.
 56. Lee IC, El-Hattab AW, Wang J, Li FY, Weng SW, Craigen WJ, et al. SURF1-associated leigh syndrome: a case series and novel mutations. *Hum Mutat*. 2012;33:1192–200.
 57. Tort F, del Toro M, Lissens W, Montoya J, Fernández-Burriel M, Font A, et al. Screening for nuclear genetic defects in the ATP synthase-associated genes TMEM70, ATP12 and ATP5E in

- patients with 3-methylglutaconic aciduria. *Clin Genet.* 2011;80:297-300.
58. Horvath R, Czermin B, Gulati S, Demuth S, Houge G, Pyle A, et al. Adult-onset cerebellar ataxia due to mutations in CABC1/ADCK3. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83:174-8.
 59. Finsterer J, Harbo HF, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B, et al. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Eur J Neurol.* 2009;16:1255-64.
 60. Graham BH. Diagnostic challenges of mitochondrial disorders: complexities of two genomes. *Methods Mol Biol.* 2012;837:35-46.
 61. Wong LJ, Scaglia F, Graham BH, Craigen WJ. Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. *Mol Genet Metab.* 2010;100:111-7.
 62. McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. A neurological perspective on mitochondrial disease. *Lancet Neurol.* 2010;9:829-40.
 63. Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet.* 2011;129:351-70.
 64. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet.* 2012.
 65. Kauffman MA, Gonzalez-Moron D, Consalvo D, Westergaard G, Vazquez M, Mancini E, et al. Diagnosis of mitochondrial disorders applying massive pyrosequencing. *Mol Biol Rep.* 2012;39:6655-60.
 66. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, Lim SC, Lieber DS, Tucker EJ, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4:10.