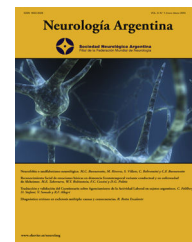




Sociedad Neurológica Argentina
Filiat de la Federaci3n Mundial
de Neurología

Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



Artículo original

Diagnóstico de las enfermedades mitocondriales: utilidad de un abordaje clínico-molecular sistematizado incorporando secuenciación de alto rendimiento



Julieta Rosales^{a,*}, Nancy Medina^a, Nerina Martínez^a, Sergio Rodríguez-Quiroga^{a,c}, Marta Córdoba^{a,b}, Cecilia Vazquez-Dusefante^a, Patricia Vega^a, Ana Lía Taratuto^d, Marcelo Andrés Kauffman^{a,b} y Dolores González-Morón^a

^a Consultorio de Neurogenética, Centro Universitario de Neurología «José María Ramos Mejía», División Neurología, Hospital J.M. Ramos Mejía, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina

^b Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional-CONICET, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires, Argentina

^c Área de Trastornos del Movimiento, Centro Universitario de Neurología «José María Ramos Mejía», División Neurología, Hospital J.M. Ramos Mejía, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina

^d Neuropatología, FLENI, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 20 de marzo de 2017

Aceptado el 2 de julio de 2017

On-line el 6 de septiembre de 2017

Palabras clave:

Enfermedades mitocondriales

Genética

Fenotipo

Algoritmo

Diagnóstico

R E S U M E N

Introducción y objetivos: Las enfermedades mitocondriales comprenden un conjunto de trastornos multisistémicos que afectan al normal funcionamiento de la maquinaria energética celular. Su diagnóstico acabado requiere de una aproximación que, además de un alto índice de sospecha, involucre distintas técnicas de biología molecular y una cuidadosa selección del tejido a estudiar. Con un objetivo general de evaluación de su abordaje diagnóstico, exploramos la utilidad de un nuevo algoritmo diagnóstico y estandarizamos herramientas moleculares necesarias para su implementación.

Material y métodos: Se realizó un estudio prospectivo, analítico y observacional en una cohorte de 73 pacientes con sospecha de desorden mitocondrial, asistidos en nuestro centro en el período comprendido entre mayo del 2008 y junio del 2016. Pusimos a punto desarrollos diagnósticos moleculares que incluyeron técnicas clásicas monogénicas y novedosas genómicas de alto rendimiento.

Resultados: Caracterizamos las manifestaciones neurológicas y extraneurológicas de nuestra cohorte; 61 pacientes fueron clasificados en síndromes mitocondriales clásicos, siendo LHON, MELAS y CPEO los más frecuentes. Siguiendo el algoritmo propuesto, obtuvimos un rendimiento diagnóstico molecular de un 51%, pudiendo identificar alteraciones en 37 pacientes. Mutaciones puntuales en el ADNmt fueron individualizadas en 30 pacientes, alteraciones estructurales en el genoma mitocondrial en 3 y mutaciones en genes nucleares en 4.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: Julietarosales1987@gmail.com (J. Rosales).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2017.07.001>

1853-0028/© 2017 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Conclusiones: Nuestros resultados confirman la utilidad del algoritmo propuesto utilizado y de las herramientas moleculares empleadas, manifestado en un alto rendimiento diagnóstico. Esto resulta de gran valor para una asistencia médica más eficiente e integral de los pacientes y familias afectados por desórdenes mitocondriales.

© 2017 Sociedad Neurológica Argentina. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Diagnosis of mitochondrial diseases: Utility of a clinical-molecular approach systemized incorporating high performance sequencing

A B S T R A C T

Keywords:
Mitochondrial diseases
Genetics
Phenotype
Algorithm
Diagnosis

Introduction and objectives: Mitochondrial diseases encompass a group of multi-systemic disorders affecting the normal function of the cellular energetic machine. Diagnosis requires an approach that, in addition to a high index of suspicion, involves molecular techniques and a careful selection of the tissue to be studied. With an overall objective assessment and diagnostic approach, we explored the utility of a new algorithm and standardized the molecular diagnostic tools needed for its implementation.

Material and methods: A prospective, analytical, observational study was conducted in a cohort of 73 patients with suspected mitochondrial disorder who were treated at our hospital between May 2008 and June 2016. We developed molecular diagnostic tools that included classical monogenic techniques and novel high-performance genomic techniques.

Results: We characterized the neurological and extra-neurological manifestations noted in our cohort. 61 patients were classified into classical mitochondrial syndromes, being LHON, MELAS and CPEO the most frequent. Following the proposed algorithm, we obtained a molecular diagnostic performance of 51%, identifying mutations in 37 patients. DNAmT mutations were identified in 30 patients. Structural rearrangements in mitochondrial genome were found in three and four in nuclear genes, respectively.

Conclusions: Our results confirm the utility of the proposed algorithm and the molecular tools used, as evidenced by a high diagnostic performance. This is of great value to a more efficient and comprehensive medical care of patients and families affected by mitochondrial disorders.

© 2017 Sociedad Neurológica Argentina. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las enfermedades mitocondriales comprenden un conjunto de trastornos multisistémicos que afectan al normal funcionamiento de la maquinaria energética celular. Dado que las proteínas pertenecientes a los procesos de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa (CR/OXPHOS) son codificadas por 2 genomas diferentes e independientes (ADN mitocondrial [ADNmt] y ADN nuclear [ADNn]); este grupo de enfermedades pueden deberse a mutaciones en cualquiera de ellos y seguir un modelo de herencia mitocondrial o mendeliano. Además, el ADNmt puede verse afectado por grandes rearrreglos estructurales (deleciones parciales o duplicaciones), generalmente responsables de síndromes de presentación esporádica. Sumando complejidad, tanto las mutaciones puntuales del ADNmt como los grandes rearrreglos suelen ser heteroplásmicos (cualidad dada por coexistencia de ADNmt salvaje y mutado en una mitocondria, célula o tejido) y cada tejido presenta un umbral de expresión clínica diferente¹. Todo esto lleva a la necesidad de

implementar distintas técnicas de biología molecular y una cuidadosa selección del tejido a estudiar a fin de incrementar la chance de identificar un defecto causal en las enfermedades mitocondriales¹.

Con respecto a la presentación clínica, es característico su amplio pleomorfismo, pudiendo ser diagnóstico diferencial de diversos trastornos neurológicos y extraneurológicos. En consecuencia, su diagnóstico requiere de un alto índice de sospecha. Existen múltiples algoritmos propuestos, tanto a nivel local² como a nivel internacional³⁻⁵. Sin embargo, estos deben ser actualizados teniendo en cuenta la disponibilidad de nuevas técnicas de secuenciación (como la secuenciación de alto rendimiento conocida como NGS por sus siglas en inglés) y el mayor acceso a las pruebas moleculares en general. Por otro lado, existe escasa experiencia local en esta población de pacientes en Argentina. Comprendiendo a la enfermedad mitocondrial como una patología genética, su diagnóstico no concluye hasta la detección de la mutación patogénica, lo cual excede los fines diagnósticos y la consejería genética, sino que implica el reconocimiento de posibles blancos terapéuticos objeto de ulteriores desarrollos.

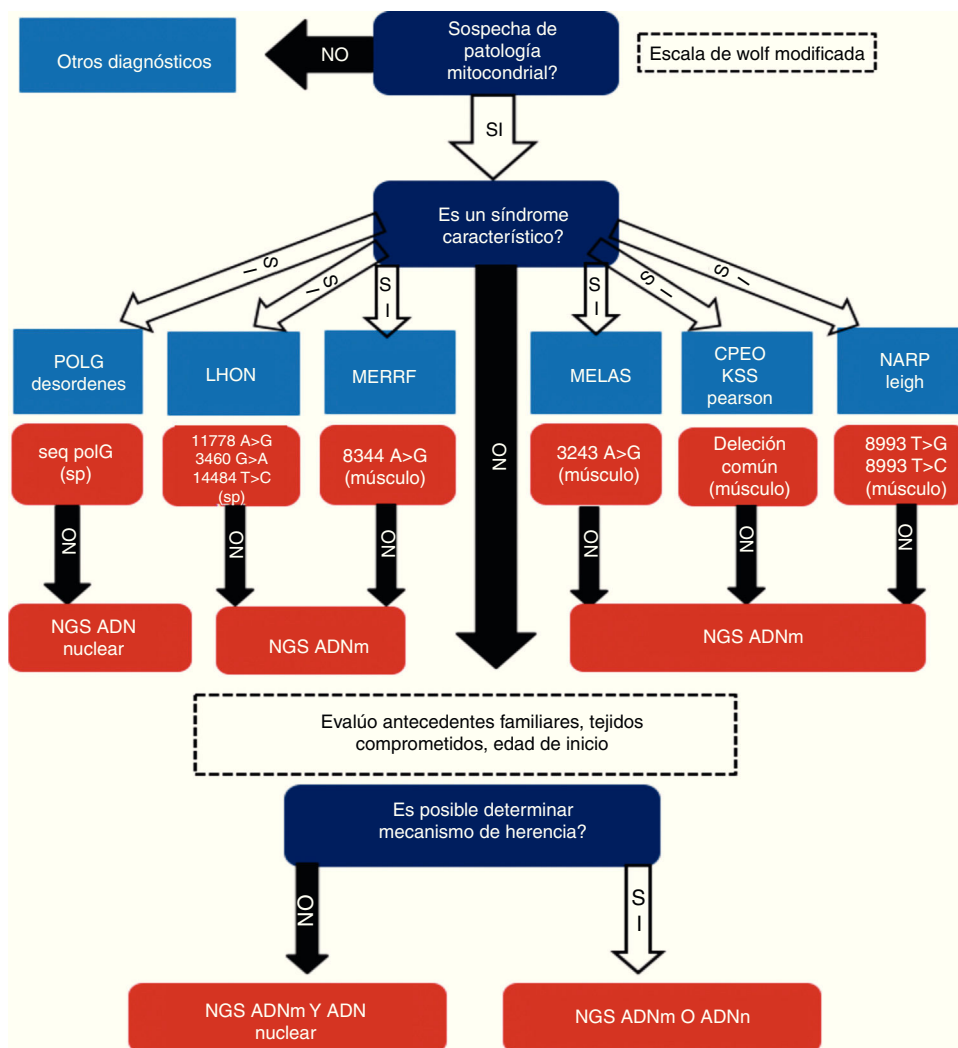


Figura 1 – Algoritmo de selección de estudios moleculares para el diagnóstico etiopatogénico de la enfermedad mitocondrial.

En este trabajo, nuestro *objetivo general* es evaluar el abordaje diagnóstico de los desórdenes mitocondriales con manifestaciones en el sistema nervioso haciendo uso de una aproximación estandarizada, tanto en términos clínicos como moleculares. Para ello, como *objetivos específicos* nos proponemos:

- Explorar la utilidad de un nuevo algoritmo diagnóstico de enfermedades mitocondriales.
- Estandarizar herramientas de diagnóstico molecular necesarias para la implementación del mismo.
- Ilustrar mediante casos representativos el pleomorfismo fenotípico y la utilidad de dichas herramientas en el diagnóstico de enfermedades mitocondriales.

Pacientes y métodos

Pacientes. Tipo de Estudio. Algoritmo diagnóstico

Se realizó un estudio prospectivo, analítico y observacional en una cohorte de 64 pacientes con sospecha de desorden

mitocondrial asistidos en nuestro centro en el período comprendido entre mayo del 2008 y junio del 2016. Todos los pacientes brindaron consentimiento informado mediante formulario aprobado por el Comité de Ética institucional previamente a su participación en el estudio. En todos los casos se recabó información demográfica, familiar, clínica y paraclínica. En cada uno de los pacientes se siguió un enfoque diagnóstico basado en 3 etapas, modificado de una propuesta previa de uno de los autores de este trabajo². Este algoritmo es presentado en la [figura 1](#). Brevemente, consiste en etapas sucesivas de caracterización y direccionamiento de procedimientos diagnósticos orientados a la individualización del defecto molecular etiopatogénico. El primer paso consiste en determinar cuál es la probabilidad de que el paciente tenga una enfermedad mitocondrial. Se seleccionó la escala de Wolf⁶ para estratificar esta probabilidad mediante la sumatoria de signos y síntomas y de los hallazgos en pruebas bioquímicas e histopatológicas ([fig. 2](#)). En el segundo paso se determina si tiene presentación fenotípica correspondiente a un síndrome clásico o no (MELAS, MERRF, CPEO, Leigh, SANDOS, etc.). Si el paciente presenta un fenotipo clásico se realiza la búsqueda

I. Signos y síntomas clínicos (1 punto por síntoma, máximo 4 puntos)		
Afectación muscular (max 2 puntos)	Afectación SNC (max 2 puntos)	Afectación multisistémica (max 3 puntos)
Oftalmoplegia*	Retraso madurativo	Afectación hematológica
Facies miopática	Pérdida de pautas madurativas	Disfunción gastrointestinal
Intolerancia al ejercicio	Episodios stroke-like	Disfunción endocrinológica
Debilidad muscular	Migraña	Afectación cardíaca
Rabdomiolisis	Convulsiones	Afectación renal
EMG patológico	Miclonías	Hipoacusia
	Ceguera cortical	Neuropatía
	Signos piramidales	Recurrencia familiar
	Signos extrapiramidales	
	Afectación tronco encéfalo	
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 etimaloníca		
Imágenes compatibles con stroke-like en IRM		
Imágenes compatibles con Leigh en IRM*		
Aumento de lactato en espectroscopia 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 2 – Criterios de probabilidad de disfunción mitocondrial a partir de datos clínicos y de estudios complementarios. Modificada de Wolf et al. ⁶.

de mutaciones puntuales y/o alteraciones estructurales en el ADNmt (2-10 kb) o la secuenciación de genes nucleares candidatos como C10orf2 o POLG, según corresponda. En caso de que estos estudios resulten negativos, se continúa con la secuenciación de exoma completo y/o de genoma mitocondrial, según pudiera indicar el patrón de herencia observado en la familia estudiada y evaluada en el paso 3.

Estudios moleculares

Se obtuvo de cada paciente 5 ml de sangre entera por venopuntura y en casos seleccionados se obtuvo tejido muscular mediante biopsia. Las muestras se conservaron codificadas a -20°C y/o nitrógeno hasta su posterior procesamiento. Se purificó luego ADN genómico total utilizando sistemas comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante. Este fue conservado anonimizado hasta su posterior procesamiento. A partir de la direccionalidad propuesta por el algoritmo utilizado pudieron realizarse distintas pruebas de diagnóstico molecular, a saber:

- 1) Búsqueda de mutaciones puntuales en el ADNmt: se amplificaron fragmentos flanqueantes a regiones del genoma mitocondrial donde se localizan mutaciones causantes de síndromes clásicos (p. ej., 3.243, 8.344, 8.993, etc.) por PCR. Luego los amplificados purificados fueron secuenciados por método de Sanger. Detalles particulares de cada reacción individual están disponibles para ser requeridos a los autores.
- 2) Secuenciación completa del genoma mitocondrial: se obtuvo la secuencia completa del genoma mitocondrial mediante enriquecimiento por Long Range PCR (LR-PCR) y NGS en sistemas GS-FLX 454 e Illumina Miseq como se describe en Kauffman et al. ⁷.
- 3) Detección de alteraciones estructurales (deleciones/duplicaciones) del ADNmt: se amplificaron por LR-PCR 3 fragmentos, que solapados abarcan en su totalidad el ADNmt. Los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0,9% para evaluar visualmente la presencia de deleciones o duplicaciones en el ADNmt.
- 4) Búsqueda de mutaciones puntuales en el ADNn: se amplificaron fragmentos flanqueantes a regiones del genoma nuclear donde se localizan mutaciones causantes en genes nucleares de síndromes clásicos (p. ej., C10orf2, POLG, etc.) por PCR. Luego los amplificados purificados fueron secuenciados por método de Sanger. Detalles particulares de cada reacción individual están disponibles para ser requeridos a los autores.
- 5) Secuenciación completa del exoma humano: a partir de 1 μg de ADN se construyó una biblioteca de secuenciación mediante fragmentación de la muestra por nebulización en tamaños de 350-400 pb. Posteriormente, se enriqueció la biblioteca con aquellos fragmentos representativos del exoma humano completo mediante la utilización de un sistema de hibridación en solución (Nimblegen V3). Se amplificaron por PCR todos los fragmentos seleccionados y finalmente, se secuenció el exoma utilizando un equipo

Tabla 1 – Características demográficas y modelos de herencia presentes en nuestra cohorte

Número total de pacientes	73
Género	
Masculino	35
Femenino	38
Sitio de defecto molecular	
ADN nuclear	7
ADN mitocondrial	66
Edad de inicio de los síntomas (años)	22 (0,3-59)

llumina Hiseq 2000. Además de identificarse variantes en el genoma nuclear, se extrajo secuencia del genoma mitocondrial e se identificaron variantes en el mismo siguiendo procedimientos descritos en Picardi et al.⁸.

Análisis bioinformático

Se utilizaron las siguientes herramientas bioinformáticas para la caracterización de las secuencias obtenidas e inferencia de patogenicidad: ENSEMBL⁹, MUTATION @A GLANCE¹⁰, SIFT¹¹, POLYPHEN2¹², MUTATION TASTER^{13,14}, gsMapper (Roche[®]), Tablet¹⁵, MITOMAP¹⁶ y PHYLOTREE¹⁷. Para el procesamiento y análisis de los exomas se utilizaron procedimientos desarrollados por nuestro grupo y descritos en Cordoba et al.¹⁸.

Análisis estadístico

Las distintas herramientas bioinformáticas utilizadas involucran el uso de algoritmos particulares que incluyen pruebas estadísticas que habitualmente son no paramétricas y basadas en permutaciones. Una descripción detallada de cada algoritmo puede encontrarse en cada una de las referencias de las herramientas mencionadas arriba.

Resultados

Cohorte

Entre mayo del 2008 y junio del 2016 se incluyó en este estudio a un total de 73 pacientes con sospecha de desorden mitocondrial, de los cuales 39 fueron esporádicos, mientras que 34 presentaban antecedentes en la familia de trastornos similares (mitocondrial: 27 pacientes, mendeliana AD: 7 pacientes). Hubo una similar representación de sexos, donde 38 fueron mujeres. La edad promedio de inicio de los síntomas fue de 22 años, con un mínimo de 3 meses y un máximo de 59 años (tabla 1). Sesenta y un pacientes presentaron fenotipo compatible con un síndrome mitocondrial clásico, el más frecuente fue LHON (24 pacientes), seguido de CPEO (17 pacientes), MELAS (7 pacientes), CPEO Plus (4 pacientes), KSS (3 pacientes), MERRF (3 pacientes), Leigh (2 paciente) y SANDOS (un paciente) (tabla 1 y tabla 2).

Manifestaciones clínicas

La manifestación neurológica más frecuente fue la debilidad muscular en miembros (26 pacientes), seguida de neuropatía óptica bilateral (25 pacien-

tes), ptosis-oftalmoparesia (21 pacientes), encefalopatía (11 pacientes), ptosis aislada (9 pacientes), epilepsia (9 pacientes), ataxia (8 pacientes), episodios stroke like (5 pacientes), neuropatía (5 pacientes), disfagia con otros síntomas bulbares (4 pacientes), mioclonías (3 pacientes), retinopatía pigmentaria (2 pacientes), y con mucho menos frecuencia cefalea y distonía en un paciente, respectivamente. Entre las manifestaciones extraneurológicas se incluye la sordera neurosensorial bilateral en 16 pacientes, las arritmias (6 pacientes), la intolerancia a la glucosa (5 pacientes), las cardiomiopatías (4 pacientes), los lipomas (2 pacientes), baja talla (un paciente) y hepatopatía en un paciente (tabla 2).

Rendimiento diagnóstico molecular

Siguiendo el algoritmo propuesto, obtuvimos un rendimiento diagnóstico molecular de un 51%, pudiendo identificar alteraciones en 37 pacientes. Mutaciones puntuales en el ADNmt fueron individualizadas en 30 pacientes. Alteraciones estructurales en el genoma mitocondrial en 3 y mutaciones en genes nucleares en 4 (tablas 3 y 4).

Casos ilustrativos

Se describen 2 casos clínicos que creemos relevantes por que compartiendo una misma mutación presentan fenotipos bien diferentes, siendo ilustrativos del pleomorfismo clínico de las enfermedades mitocondriales, su dificultad diagnóstica y la necesidad de herramientas moleculares para su diagnóstico.

Caso 1. Paciente de 34 años, sin antecedentes personales de relevancia, que comenzó a los 17 años con ptosis palpebral bilateral y oftalmoparesia de curso lentamente progresivo. A los 30 años agregó debilidad proximal de 4 miembros y trastornos fonodeglutorios. Su historia familiar era relevante por la presencia de ptosis bilateral en su madre y hermana.

En el examen físico presentaba ptosis palpebral bilateral 2/3, oftalmoparesia moderada, voz nasal. Hipoacusia bilateral. Debilidad proximal de 4 miembros leve (Kendall 3-4/5). Sensibilidad conservada. Normorreflexia generalizada. Los exámenes complementarios confirmaron además la presencia de: hipoacusia neurosensorial, intolerancia a la glucosa, trastorno de la conducción supraventricular cardíaca, aumento de creatinina y ácido láctico en sangre. El fenotipo fue interpretado como compatible con CPEO Plus.

Se realizó biopsia de músculo, la cual evidenció alto porcentaje de FRR, Cox deficientes. Se realizó secuenciación por Sanger de ADNmt, hallándose la mutación para NC.012920:m.3243A>G tanto en sangre periférica como en músculo, por lo que se infiere un alto nivel de heteroplasmia (fig. 3).

Caso 2. Paciente de 26 años, sin antecedentes personales o familiares de relevancia; comenzó a los 8 años con trastornos del aprendizaje, 12 años después agregó ataxia de tronco con lateropulsión a derecha, trastornos conductuales e intolerancia al ejercicio. A los 25 años presentó disartria y hemianopsia homónima derecha asociada a crisis comicial focal motora en el miembro superior derecho. Se le realizó RM de cerebro que evidenció lesión córtico-subcortical parietotemporoccipital izquierda con restricción en difusión, la cual remitió

Tabla 2 – Caracterización clínica de nuestra cohorte

N.º	AF	Sexo	Edad de inicio, años	Sitio de defecto molecular	Fenotipo	Mutación	Síntomas neurológicos	Síntomas extraneurológicos
1	No	F	44	ADN mit	MELAS	3243A>G	Epilepsia, miopatía, ptosis, stroke like, hipoacusia	Intolerancia a la glucosa
2	Sí	M	35	ADN mit	Fenotipo no clásico	8344A>G	Miopatía	
3	Sí	F	11	ADN mit	MERRF	8344A>G	Epilepsia, mioclonías	
4	Sí	F	45	ADN mit	Fenotipo no clásico	sin diagnóstico	Mioclonías	
5	Sí	F	40	ADN nuclear	CPEO	1001G>A	Ptosis, oftalmoparesia	Hipoacusia
6	Sí	F	30	ADN nuclear	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis	Hipoacusia
7	No	F	4	ADN mit	KSS	Delección común	Ptosis, oftalmoparesia, Rp, miopatía, ataxia	Hipoacusia
8	No	F	19	ADN mit	CPEO	Delección común	Ptosis, oftalmoparesia, hipoacusia	Hipoacusia
9	No	M	15	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Epilepsia, hipoacusia, ataxia, atrofia NO	
10	No	F	5	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia	
11	No	F	8	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, hipoacusia	Hipoacusia
12	No	M	15	ADN mit	LHON	3460G>A	NO	
13	Sí	F	1	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía	
14	Sí	F	40	ADN mit	MERRF	Sin diagnóstico	Miopatía, lipoma	
15	No	M	18	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	Hipoacusia, arritmia, intolerancia a la glucosa
16	Sí	M	35	ADN mit	LHON	3460G>A	NO	
17	Sí	F	22	ADN mit	LHON	3460G>A	NO	Hipoacusia, baja talla, arritmia
18	Sí	M	35	ADN mit	LHON	3460G>A	NO	
19	Sí	M	56	ADN nuclear	CPEO	c.907C>T	Ptosis	
20	Sí	F	20	ADN nuclear	CPEO	c. 907 C>T	Ptosis	
21	Sí	F	39	ADN nuclear	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, bulbar	
22	No	M	26	ADN mit	LHON	11778 G>A	NO	Miocardopatía
23	No	M	1	ADN mit	Leigh	Sin diagnóstico	Encefalopatía, distonía, neuropatía	
24	No	M	50	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Miopatía	
25	No	M	29	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
26	No	M	8	ADN mit	MELAS	3243A>G	Epilepsia, stroke like, encefalopatía, ataxia	
27	No	F	28	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis oftalmoparesia, miopatía	
28	No	F	2	ADN mit	CPEO Plus	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía, bulbar	
29	Sí	F	17	ADN mit	CPEO plus	3243A>G	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía, bulbar, neuropatía	Hipoacusia, arritmia, intolerancia glucosa

– Tabla 2 (continuación)

N.º	AF	Sexo	Edad de inicio, años	Sitio de defecto molecular	Fenotipo	Mutación	Síntomas neurológicos	Síntomas extraneurológicos
30	Sí	F	10	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia	
31	No	M	0.5	ADN mit	Leigh	8993T>G	Encefalopatía mitocondrial	
32	No	F	4	ADN mit	MERRF	8344A>G	Miopatía, lipoma, ataxia, neuropatía	
33	No	M	16	ADN mit	LHON	3460G>A	NO	
34	Sí	F	4	ADN mit	MELAS	Sin diagnóstico	Encefalopatía, hipoacusia, convulsiones, stroke like, miopatía	
35	Sí	F	31	ADN mit	MELAS	3243A>G	Cefalea, stroke like, epilepsia	
36	Sí	F	59	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Hipoacusia	DBT, miocardiopatía
37	Sí	F	3	ADN mit	MELAS	3243A>G	Encefalopatía mitocondrial	
38	Sí	F	10	ADN mit	Fenotipo no clásico	3243A>G	Intolerancia a la glucosa	Intolerancia a la glucosa
39	Sí	M	20	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
40	Sí	M	30	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
41	No	F	0.3	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Encefalopatía	
42	No	M	28	ADN mit	SANDOS	Sin diagnóstico	Ataxia asensorial, neuropatía, hipoacusia, miopatía, bulbar, neuropatía	Hipoacusia
43	No	F	50	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia	
44	Sí	F	11	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Miopatía, hipoacusia	Hipoacusia
45	Sí	F	18	ADN mit	MELAS	3243A>G	Ptosis, epilepsia, encefalopatía, hipoacusia, miopatía	Hipoacusia
46	Sí	F	17	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, ataxia	
47	Sí	F	10	ADN mit	CPEO	Delección común	Ptosis, miopatía proximal	
48	No	F	3	ADN mit	Fenotipo no clásico	sin diagnóstico	Encefalopatía, RP	Hipoacusia, baja talla, arritmia
49	Sí	M	6	ADN mit	LHON	Sin diagnóstico	NO	
50	Sí	M	1	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Miopatía, neuropatía, encefalopatía	
51	Sí	F	3	ADN mit	KSS	Sin diagnóstico	Encefalopatía, miopatía, ptosis, oftalmoparesia, piramidalismo, ataxia	

– Tabla 2 (continuación)

N.º	AF	Sexo	Edad de inicio, años	Sitio de defecto molecular	Fenotipo	Mutación	Síntomas neurológicos	Síntomas extraneurológicos
52	No	M	40	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía	Hipoacusia, baja talla, arritmia
53	No	M	12	ADN mit	CPEO plus	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía, epilepsia	
54	No	M	12	ADN mit	KSS	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, ataxia	Hipoacusia, baja talla, arritmia
55	No	F	21	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
56	Sí	F	21	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
57	Sí	M	38	ADN mit	LHON	Sin diagnóstico	NO	
58	Sí	M	31	ADN mit	Fenotipo no clásico	Sin diagnóstico	Miopatía proximal, ptosis, ataxia, neuropatía	
59	Sí	M	31	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía proximal	Miocardopatía
60	Sí	F	39	ADN mit	MELAS	Sin diagnóstico	Stroke like,	
61	No	M	19	ADN mit	LHON	3460G>A	NO	
62	Sí	M	30	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
63	Sí	M	18	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
64	Sí	F	22	ADN nuclear	CPEO plus	Sin diagnóstico	Ptosis, miopatía proximal, bulbar	
65	No	M	33	ADN mit	LHON	Sin diagnóstico	NO	
66	Sí	M	19	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
67	No	M	25	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
68	No	M	26	ADN mit	LHON	14484T>C	NO	
69	No	F	33	ADN mit	LHON	Sin diagnóstico	NO	
70	Sí	M	20	ADN nuclear	CPEO	c.1433T>G	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía proximal	
71	No	M	26	ADN mit	LHON	Sin diagnóstico	NO	
72	No	M	22	ADN mit	LHON	11778G>A	NO	
73	No	F	35	ADN mit	CPEO	Sin diagnóstico	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía proximal	

AD: autosómico dominante; CPEO: Chronic progressive external ophthalmoplegia; KSS: Kearns-Sayre syndrome; LHON: Leber hereditary optic neuropathy; MELAS: Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MERRF: Myoclonic Epilepsy Associated with Ragged Red Fibers; NO: neuropatía óptica.

Tabla 3 – Detalle de los pacientes en los que fue identificado un defecto molecular y su presentación fenotípica.**Referencias:**

N.º	AF	Sexo	Edad de inicio, años	Fenotipo	Síntomas neurológicos	Mutación
1	No	F	44	MELAS	Epilepsia, miopatía, ptosis, stroke like, hipoacusia	NC.012920:m.3243A>G
2	Sí	M	35	Fenotipo no clásico	Miopatía	NC.012920:m.8344A>G
3 ^a	Sí	F	11	MERRF	Epilepsia, mioclonías	NC.012920:m.8344A>G
4	Sí	F	40	CPEO	Ptosis, oftalmoparesia	NM.021830.4 (C10orf2) c.1001G>A (p.Arg334Gln) m.8482.13460del4977
5	No	F	4	KSS	Ptosis, oftalmoparesia, Rp, miopatía, ataxia	m.8482.13460del4977
6	No	F	19	CPEO	Ptosis, oftalmoparesia, hipoacusia	NC.012920:m.3460G>A
7	No	M	15	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
8	No	M	18	LHON	NO	NC.012920:m.3460G>A
9	Sí	M	35	LHON	NO	NC.012920:m.3460G>A
10 ^b	Sí	F	22	LHON	NO	NC.012920:m.3460G>A
11 ^b	Sí	M	35	LHON	NO	NC.012920:m.3460G>A
12	Sí	M	56	CPEO	Ptosis	NM.021830.4 (C10orf2) c.907C>T (p.Arg303Trp) NM.021830.4 (C10orf2) c.907C>T (p.Arg303Trp)
13 ^c	Sí	F	20	CPEO	Ptosis	NC.012920:m.11778G>A
14	No	M	26	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
15	No	M	29	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
16	No	M	8	MELAS	Epilepsia, Stroke like, Encefalopatía, ataxia	NC.012920:m.3243A>G
17	Sí	F	17	CPEO plus	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía, bulbar, neuropatía	NC.012920:m.3243A>G
18	No	M	6 meses	Leigh	Encefalopatía mitocondrial	NC.012920:m.8993T>G
19	No	F	4	MERRF	Miopatía, lipoma, ataxia, neuropatía	NC.012920:m.8344A>G
20	No	M	16	LHON	NO	NC.012920:m.3460G>A
21	Sí	F	31	MELAS	Cefalea, Stroke like, epilepsia	NC.012920:m.3243A>G
22	Sí	F	3	MELAS	Encefalopatía mitocondrial	NC.012920:m.3243A>G
23 ^d	Sí	F	10	Fenotipo no clásico	Intolerancia a la glucosa	NC.012920:m.3243A>G
24	Sí	M	20	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
25 ^e	Sí	M	30	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
26	Sí	F	18	MELAS	Ptosis, epilepsia, encefalopatía, hipoacusia, miopatía	NC.012920:m.3243A>G
27	Sí	F	10	CPEO	Ptosis, miopatía proximal	m.8470.13446del14977
28	No	F	21	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
29	Sí	F	21	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
30	No	M	19	LHON	NO	NC.012920:m.3460G>A
31	Sí	M	30	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
32	Sí	M	18	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
33	Sí	M	19	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
34	No	M	25	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
35	No	M	26	LHON	NO	NC.012920:m.14484T>C
36	No	M	23	LHON	NO	NC.012920:m.11778G>A
37	Sí	M	20	CPEO	Ptosis, oftalmoparesia, miopatía proximal	NM.021830.4 (C10orf2) c.1433T>G; p.F478C

^a Familiar de paciente 2.^b Familiar de paciente 9.^c Familiar de paciente 12.^d Familiar de paciente 22.^e Familiar de paciente 24.

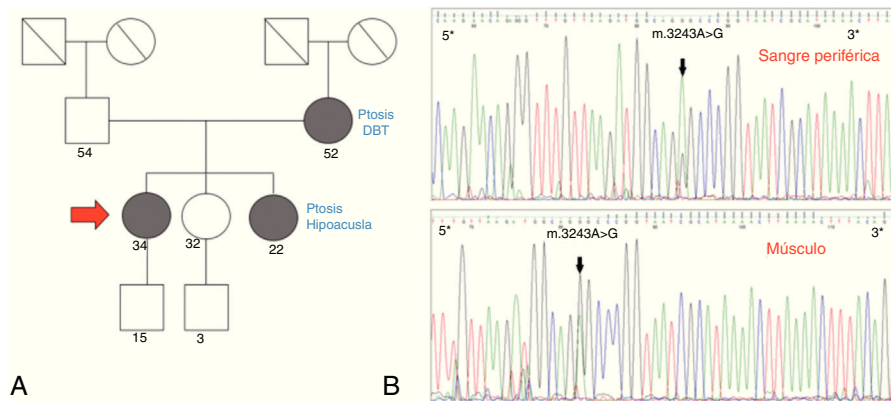


Figura 3 – Caso 1. A) Familigrama. B) Secuenciación por Sanger en sangre periférica y en músculo evidenciando mutación NC.012920:m.3243.

Tabla 4 – Frecuencia de defectos moleculares en nuestra corte

Mutaciones del ADN mitocondrial	33
11778 G>A	12
3243A>G	7
3460G>A	6
8344A>G	3
Delección común (m.8482_13460del4977)	3
14484G>A	1
8993T>G	1
Mutaciones del ADN nuclear	4
C10orf2	4
Total de mutaciones	37

espontáneamente y en forma completa al mes, por lo que se interpretó como episodio «stroke like».

En el examen físico presentaba MiniMental State Examination de 23/30, hipoacusia bilateral, dismetría apendicular de 4 miembros de predominio derecho. Los exámenes complementarios confirmaron además la presencia de: hipoacusia neurosensorial y aumento de ácido láctico en sangre y líquido cefalorraquídeo. El fenotipo fue interpretado como compatible con MELAS.

Se realizó biopsia de músculo, la cual evidenció un alto porcentaje de FRR, Cox deficientes. Se realizó secuenciación por Sanger de ADNmt que puso de manifiesto también en este caso la mutación NC.012920:m.3243A>G en músculo. Se suspendió el ácido valproico y se rotó medicación antiepiléptica a levetiracetam con buen control de la crisis (fig. 4).

Discusión

En el presente trabajo pudimos caracterizar una población adulta de pacientes argentinos con enfermedad mitocondrial implementando un algoritmo propio que pretende ordenar la aproximación diagnóstica, comenzando con un score de probabilidad de etiología mitocondrial del trastorno, siguiendo por una caracterización sindrómica y finalizando con el diagnóstico molecular.

Hasta donde sabemos, esta es la serie más grande reportada en Argentina que incluye datos clínicos y moleculares,

estos últimos obtenidos a través del desarrollo propio de diferentes metodologías que incorporan el estudio de genoma mitocondrial y de exoma completo mediante NGS.

A pesar de que las enfermedades mitocondriales se caracterizan por un marcado pleomorfismo clínico y una escasa correlación fenotipo-genotipo¹, pudimos identificar el defecto causal en 37 pacientes. Nuestros resultados confirman la utilidad del algoritmo diagnóstico propuesto expresada en un alto rendimiento diagnóstico (51%), que deriva en mejor costo-efectividad. A modo de ejemplo, a través de la secuenciación de exoma completo por NGS y extracción del genoma mitocondrial utilizando un pipeline especializado fue posible la identificación de una mutación en el ADNmt no sospechada previamente por el fenotipo en una niña con presentación en forma de síndrome no clásico. La utilización de NGS y LR-PCR nos permitió aumentar la tasa diagnóstica comparando con nuestros propios resultados obtenidos previamente utilizando solamente secuenciación dirigida de fragmento único mediante método de Sanger¹⁹.

Si bien existen otras series reportadas en la literatura, un gran número de ellas analizaron muestras infantiles, por lo que las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyeron encefalopatía y trastornos del aprendizaje, seguidas de debilidad muscular²⁰. Nuestra serie difiere en la inclusión mayoritaria de adultos con un rango de edad más grande, siendo más frecuente la presentación sindrómica clásica que la no clásica, con un predominio de LHON, CPEO y MELAS. Distintos artículos publicados a lo largo de toda una década revelaron una dicotomía molecular entre adultos y niños, en la que los niños frecuentemente portan trastornos autosómicos recesivos debidos a defectos del ADNn, mientras que los defectos del ADNmt se presentan más frecuentemente en la edad adulta^{21,22}. En los últimos años esta separación se ha puesto en revisión, a la luz de que las mutaciones nucleares con herencia mendeliana pueden ocurrir frecuentemente también en adultos. De ahí la importancia de aportar conocimiento científico en este grupo etario incluyendo el estudio de genes mitocondriales del genoma nuclear, tal como hicimos en nuestro trabajo²³.

Los avances en el diagnóstico molecular de las enfermedades mitocondriales han permitido dilucidar nuevos mecanismos en el desarrollo de los fenotipos clínicos que

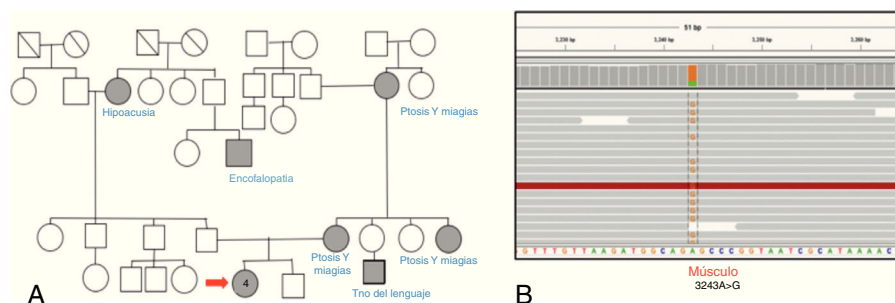


Figura 4 – Caso 1 A) Familigrama. B) Secuenciación por Sanger en músculo evidenciando mutación NC_012920:m.3243.

pueden estar vinculados a la función primaria de la proteína mutada, a la acumulación secundaria de deleciones y mutaciones puntuales o a la depleción del ADNmt. Esto abre las puertas a nuevas terapéuticas orientadas a prevenir y reparar los daños del ADNmt, que podrían ser aplicadas en distintas etapas de la enfermedad²³.

Concluimos que una aproximación ordenada y sistematizada, como la que proponemos, permite confirmar el diagnóstico molecular en un porcentaje alto de pacientes. Esto resulta de gran valor para una mejor comprensión de la patogénesis de las enfermedades neurogenéticas y para una asistencia médica más eficiente e integral de los pacientes y sus familias.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Davis RL, Sue CM. The genetics of mitochondrial disease. *Semin Neurol.* 2011;31:519–30.
- Kauffman MA. Tres preguntas y una respuesta: algoritmo diagnóstico molecular en enfermedades mitocondriales. *Neurol Arg.* 2013;5:19–26.
- Kirby DM, Thorburn DR. Approaches to finding the molecular basis of mitochondrial oxidative phosphorylation disorders. *Twin Res Hum Genet.* 2008;11:395–411.
- Chi CS. Diagnostic approach in infants and children with mitochondrial diseases. *Pediatr Neonatol.* 2015;56:7–18.
- McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. A neurological perspective on mitochondrial disease. *Lancet Neurol.* 2010;9:829–40.
- Wolf NI, Smeitink JA. Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology.* 2002;59:1402–5.
- Kauffman MA, Gonzalez-Morón 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.
- Picardi E, Pesole G. Mitochondrial genomes gleaned from human whole-exome sequencing. *Nat Methods.* 2012;9:523–4.
- Flicek P, Ahmed I, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, et al. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:48–55.
- Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ramadoss SK, et al. Mutation@A Glance: An integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases. *DNA Res.* 2010;17:197–208.
- Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):452–7.
- Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, Parhar RS, Al-Mohanna FA, Meyer BF, et al. Mutation prediction by PolyPhen or functional assay, a detailed comparison of CYP27B1 missense mutations. *Endocrine.* 2011;40:14–20.
- Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7:575–6.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11:361–2.
- Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, Cardle L, et al. Using tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics.* 2013;14:193–202.
- Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, et al. MITOMAP: A human mitochondrial genome database-2004 update. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:611–3.
- Mannis VO. PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2015;5:392–4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.155>
- Cordoba M, Rodriguez-Quiroga S, Vega P, Amartino H, Vazquez-Dusefante C, Medina N, et al. Whole exome sequencing in neurogenetic diagnostic odysseys: An Argentinian experience. *bioRxiv.* 2016, <http://dx.doi.org/10.1101/060319>
- Gomez-Schneider MM, Kauffman MA. Neurología mitocondrial: experiencia en el consultorio de neurogenética de un hospital de la Ciudad de Buenos Aires. *Mar del Plata, Argentina: 52.º Congreso Argentino de Neurología Sección posters; 2013.*
- Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected

- mitochondrial patients in clinical practice. *Inherit Metab Dis.* 2015;38:437-43.
21. Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders I: Mitochondrial DNA defects. *Lancet.* 2000;355:299-304.
 22. Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders II: Neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet.* 2000;355:389-94.
 23. Chinnery PF. Mitochondrial disease in adults: What's old and what's new? *EMBO Mol Med.* 2015;7:1503-12.