



11262  
29

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESPECTRO CLINICO DE NIÑOS MEXICANOS CON SOSPECHA DE  
MITOCONDRIOPATIA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA.  
CORRELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE ACIDO LACTICO EN  
LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO Y LA BRECHA ANIONICA SERICA.

T E S I S

Que para obtener el grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

presenta:

VIOLETA CAROLINA MEDINA CRESPO

México, D. F.

2002 3

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Ruben Lisker Yourkowitzky  
Secretario: Dr. Diego González Halphen  
Vocal: Dr. Roberto Suástegui Roman  
Suplente: Dra. Cecilia Ridauro Sanz  
Suplente: Dr. Antonio Velázquez Arellano

**SUSTENTANTE:** Violeta Medina Crespo. Neuróloga Pediatra  
Adscrita al Servicio de Neurología del INP.

**TUTOR:** Diego González Halphen Investigador Titular B de TC  
Departamento de Genética Molecular. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

A todos mis maestros, con especial afecto y gratitud:

Dr. Sergio Ponce de León Rosales  
Dra. Florencia Vargas Voráková  
Dr. Pedro Gutiérrez Castellón.

A mi maestro, tutor y amigo

Dr. Diego González Halphen

Especial gratitud

Servicio de Neurofisiología, INP. Dra. Luz María Cordero Guzmán, Dra. Patricia Rodríguez Herrera.

Servicio de Endocrinología, INP. Dra. Nelly Altamirano Bustamante.

Departamento de Patología, INP: Dra. Cecilia Ridarua Sanz, Dra. Beatriz De León Bojorge

Departamento de Anestesiología, INP: Dr. Andrés de la Rosa, Dra. Ofelia Ham,  
Dra. Guadalupe Guadarrama

Servicio de Cardiología, INP: Dr. Luis Martín Garrido García

Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto Investigaciones Biomédicas, UNAM - INP:  
Dr. Antonio Velázquez Arellano, Dra. Marcela Vela Amieva,  
Dra. Amida Báez Saldaña, QFB. Martha Elva Perez Andrade, M en C.  
Isabel Ibarra González

Unidad de Resonancia Magnética, Fundación Médica Sur, IAP  
Dr. Oscar Quiroz Castro, Dr. Manuel Martínez López

Asociación para Prevenir la Ceguera en México, IAP:  
Dr. Juan Manuel Jiménez Sierra

A todos mis compañeros de la Maestría en Ciencias Médicas.

A todos los pacientes y a sus familiares que participaron en este estudio protocolizado.

## INDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO.....	5
RESUMEN.....	6
I. ANTECEDENTES.....	7
1. Introducción.....	7
2. Historia.....	8
3. Genética.....	9
4. Metabolismo.....	15
5. Clasificación.....	27
6. Estudio clínico.....	28
7. Estudio metabólico.....	30
8. Estudios neurofisiológicos y de imagen cerebral.....	33
9. Estudios histopatológicos.....	35
10. Diagnóstico.....	37
A. Defectos del genoma nuclear.....	37
B. Defectos del genoma nuclear y mitocondrial.....	46
C. Mutaciones del DNA mitocondrial.....	53
11. Seres de casos.....	63
12. Antecedentes particulares.....	66
II. JUSTIFICACIÓN.....	66
III. OBJETIVOS.....	67
IV. HIPÓTESIS.....	68
V. MATERIAL Y METODOS.....	68
VI. RESULTADOS.....	77
VII. DISCUSIÓN.....	113
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	128
IX. ANEXO.....	137

## ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

AA -	acetoacetato
ATP -	trifosfato de adenosina
BOH -	beta-hidroxitirato
BOH/AA -	relación beta-hidroxitirato/acetoacetato
COX -	citocromo oxidasa
TAC -	tomografía computarizada
CPEO -	oftalmoplejía externa crónica progresiva
DNAmt -	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DNAn -	ácido desorribonucleico nuclear
EEG -	electroencefalograma convencional
EEGc -	electroencefalograma computarizado
EGO -	examen general de orina
EMG -	electromiografía
EMM -	encefalomiopatía mitocondrial
ERG -	electrorretinograma
EVC -	enfermedad vascular cerebral
FRR -	fibras rojas, rasgadas
FIRDA	Ritmos intermitentes de actividad delta frontal
IAP -	Institución de asistencia privada
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INP -	Instituto Nacional de Pediatría
kpb -	kilo pares de bases
KSS	Síndrome de Kearns Sayre
L -	lactato
L/P -	relación lactato/piruvato
LCR -	líquido cefalorraquídeo
LHON	neuropatía óptica hereditaria de Leber
MM -	miopatía mitocondrial
MELAS	encefalomiopatía, acidosis láctica, apoplejía
MERRF -	epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas
MNGIE -	neuropatía mitocondrial, desórdenes gastrointestinales y encefalopatía
IRM	imagen por resonancia magnética
SRM -	espectroscopía por resonancia magnética
NADH -	dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NARP -	neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa
P -	piruvato
pb -	pares de bases
PCR -	reacción en cadena de la polimerasa
PEAT -	potenciales evocados auditivos del tallo
PEM -	prueba de esfuerzo metabólico
PESS -	potenciales evocados somatosensoriales
PEV -	potenciales evocados visuales
RNAr -	ácido ribonucleico ribosomal
RNAt -	ácido ribonucleico de transferencia
SNC -	sistema nervioso central
SPECT	tomografía computarizada por emisión de fotón único
S S -	Secretaría de Salud
TAC -	tomografía axial computarizada
TP -	tiempo de protrombina
TGO -	transaminasa glutámico oxalacética
TGP -	transaminasa glutámico pirúvica
UNAM -	Universidad Nacional Autónoma de México
VCN -	velocidad de conducción nerviosa

## RESUMEN

Las disfunciones mitocondriales se conocieron genéricamente como encefalomiopatías, sin embargo, estudios posteriores demostraron alteraciones en varios órganos y sistemas, por lo que en la actualidad, se prefiere el término de citopatía mitocondrial, ya que prácticamente en todo el organismo existen mitocondrias. En la mitocondria se llevan a cabo muchas funciones del metabolismo intermediario para la obtención de energía, vital para la sobrevivencia. Las manifestaciones de las citopatías mitocondriales se presentan a cualquier edad y tienen patrones clínicos y morfológicos muy heterogéneos, que dependen de la edad de inicio y la severidad del cuadro. Una de las características más constantes en estas alteraciones es el incremento de lactato corporal, por lo que si éste se asocia a manifestaciones encefalomiopáticas aunque sean inespecíficas, con o sin afección en otros órganos, se debe sospechar una mitocondriopatía. El incremento de lactato (L), se presenta con alteraciones también del piruvato (P) con una relación L / P elevada, aunque también se puede presentar una disminución en la relación del  $\beta$ -hidroxi-butarato y el acetoacetato (BOH/AA). Algunas de estas alteraciones solo se evidencian por pruebas de reto o esfuerzo metabólicas. La mayoría de los estudios neurofisiológicos (electroencefalograma, electromiografía, electroretinograma) y de neuroimagen (tomografía computarizada, resonancia magnética, espectroscopia) no son específicos, sin embargo son de gran utilidad para el abordaje inicial ante la sospecha clínica, ya que optimizan el resto de los exámenes, que son más especializados e invasivos. La biopsia muscular y el cultivo de fibroblastos son los estudios de elección para el diagnóstico definitivo, con ellos se pueden detectar alteraciones histopatológicas, bioquímicas y de genética molecular.

Desde 1997 el estudio de niños con sospecha de enfermedad mitocondrial se lleva a cabo gracias a la colaboración de un grupo de trabajo multidisciplinario, que reúne 15 expertos en diferentes áreas procedentes de: el Instituto Nacional de Pediatría, la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Mexicano del Seguro Social, la Fundación Médica Sur y la Asociación para Prevenir la Ceguera en México.

Todo este trabajo requiere la coordinación apropiada, que inicia con la sospecha y evaluación clínicas, y continúa con estudios laboriosos y altamente especializados de varias instituciones de salud en México.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# I. ANTECEDENTES

## 1. INTRODUCCIÓN

Se piensa que en algún momento de la evolución de los seres vivos las mitocondrias tuvieron vida extracelular independiente. Varias evidencias apoyan esta teoría, llamada *endosimbótica*<sup>1</sup>, entre las que se encuentran las siguientes: presencia de genoma interno en las mitocondrias, presencia de una doble membrana, reproducción binaria, capacidad de desplazamiento, sensibilidad y toxicidad hacia algunos antimicrobianos intracelulares. Así mismo estudios de biología molecular, indican que las mitocondrias se originaron a partir de un ancestro de las bacterias del género *Rickettsia*<sup>2</sup>.

En las mitocondrias ocurren las transformaciones energéticas más importantes de la aerobiosis: la oxidación de sustratos y la fosforilación de ADP para formar ATP. Ambos fenómenos se conocen conceptualmente como fosforilación oxidativa<sup>3</sup>.

El número de mitocondrias y su actividad, relacionada con el número de crestas internas y su contorno, varían de un tejido a otro dependiendo de los requerimientos energéticos oxidativos. En el humano, los tejidos con mayor actividad oxidativa son el sistema nervioso y el sistema muscular estriado (esquelético y cardíaco). Dichos sistemas generalmente se afectan en las enfermedades mitocondriales, por lo que en un inicio se les denominó *encefalomiopatías*<sup>4</sup>. En la actualidad, se prefiere utilizar el término de *citopatías mitocondriales* ya que, prácticamente ningún tejido de los organismos multicelulares aeróbicos carece de mitocondrias, y cada vez más se describen cuadros clínicos multisistémicos.



El conocimiento acerca de la función mitocondrial aún está incompleto, sin embargo, se sabe que tiene que ver con muchas y muy variadas funciones metabólicas, que implican mecanismos más complejos de lo que originalmente se pensaba.

## 2. HISTORIA<sup>5</sup>

En 1898, Benda identificó granulos filiformes en el citoplasma celular, a los que llamó mitocondrias. Posteriormente en el siglo XIX, se inició el estudio de la función mitocondrial.

En 1925, Keilin describió el sistema mitocondrial de los citocromos y en 1929, Warburg y Negelein describieron los procesos de oxidoreducción. En 1937, se identificaron las enzimas que conforman el ciclo de Krebs, y 20 años más tarde, Krebs y Konberg refinaron el papel de la fosforilación oxidativa dependiente de oxígeno.

Las características ultraestructurales de la mitocondria (membrana interna, externa, espacio intermembranal y matriz) fueron descritas por Palade en 1953. Al paso del tiempo, se reconocieron los mecanismos especiales para la traslocación de metabolitos y proteínas a través del espacio intermembranal hacia la matriz.

En 1961, Mitchell propuso la teoría quimiosmótica que explicó como el flujo de protones se acopla a la síntesis de ATP. En 1963, Nass y Nass detectaron por primera vez la presencia de material genético en la mitocondria, y ese mismo año, Engel y Cunningham describieron en biopsias de músculo humano, fibras deshilachadas con acumulos anormales de mitocondrias teñidas de rojo denominadas posteriormente *fibras rojas rasgadas*.

Desde la década de los sesenta se publicaron cuadros clínicos ocasionados por algún tipo de disfunción mitocondrial, el primero de ellos fue referido por Luft en 1962 como hipermetabolismo no tiroideo. Para finales de los noventa se habían referido cerca de 1500 citas bibliográficas sobre disfunción mitocondrial.

En 1978, Fine encontró que todo el DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) proviene del óvulo sin fecundar y postenormente en 1980, Giles y cols. describieron los patrones de herencia mitocondrial y citoplásmica de las mitocondriopatías Anderson y cols publicaron en 1981, la secuencia y organización del genoma mitocondrial humano

En 1991, Schatz describió el proceso energético para la introducción de proteínas a través de las membranas mitocondriales hacia la matriz por medio de transportadores y de proteasas específicas. La relevancia de este fenómeno radica en que más del 95% de las proteínas mitocondriales son de origen nuclear se sintetizan en el citoplasma, y se introducen a la mitocondria a través de este proceso

En la actualidad y cada vez con mayor frecuencia, se publican cuadros clínicos muy variados debidos a disfunción mitocondrial por mutaciones tanto del DNA nuclear (DNAn) como del DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>)

### **3. GENETICA**

El DNA mitocondrial humano (DNAm<sub>t</sub>) es una molécula circular pequeña de dos cadenas con 16,569 pares de bases que se replican y transcriben usando un origen de replicación y un promotor para cada una de las dos cadenas. Cada mitocondria posee de 2 a 10 copias de su propio genoma y pueden existir más de 10,000 copias de DNAm<sub>t</sub> por cada célula somática, ya que ésta posee cientos o miles de mitocondrias<sup>6</sup>.

El DNAm<sub>t</sub> humano contiene 37 genes que codifican para dos RNAs ribosomales (RNAr) 16S y 12S, veintidos RNAs de transferencia (RNAt) y trece genes estructurales. Los 13 genes estructurales codifican a 13 polipéptidos de los aproximadamente 85 que se requieren para la fosforilación oxidativa. Con excepción del complejo II, estos 13 polipéptidos constituyen parte integral de los complejos de esta importante función<sup>6,7</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La **figura 1A** muestra la representación gráfica del genoma mitocondrial humano, publicada por Zeviani y cols. en 1989. Se muestran la cadena pesada externa y la cadena ligera localizada en la parte interna, las flechas señalan el origen de replicación y promotor para cada una de las cadenas

La **figura 1B** muestra la representación gráfica del genoma mitocondrial humano, publicada por DiMauro y cols. En 1996<sup>9</sup>. Señala los sitios de los genes que codifican la cadena respiratoria y los RNAs de transferencia y ribosomal

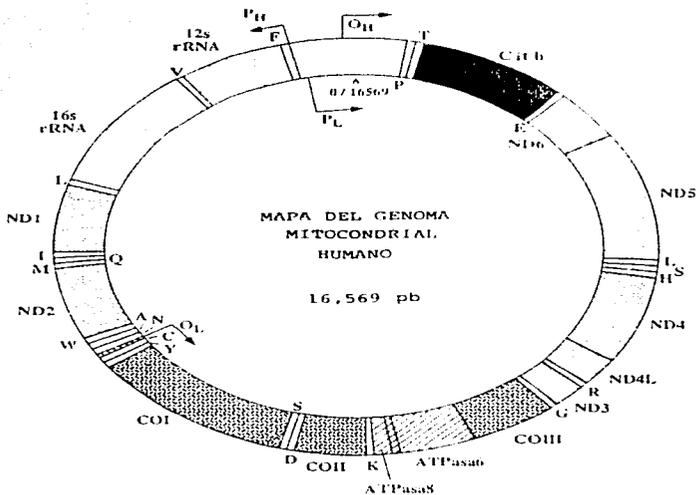
Más del 90% de las proteínas que son indispensables para el adecuado funcionamiento mitocondrial, se sintetizan en el citoplasma celular y tienen que ser importadas hacia las membranas de la mitocondria a través de un intrincado mecanismo de translocación, el cual también depende de proteínas codificadas en el DNA nuclear (DNA<sub>n</sub>)<sup>10</sup>.

Existen diferencias importantes entre el DNA<sub>m</sub> y el DNA<sub>n</sub>, entre las que destacan las siguientes: el DNA<sub>m</sub> carece de intrones y de regiones intergénicas, es decir todo su material genético codifica para alguna proteína o RNA, con excepción de 1,000 pb que son el punto de origen para la replicación región conocida como el asa D. El DNA<sub>m</sub> es poliploide en las células somáticas y cada mitocondria posee de 2 a 10 copias; el origen de replicación del DNA<sub>m</sub> es asimétrico y su código genético difiere en algunos trinucleótidos del código universal<sup>11</sup>.

En proporción a la cantidad de información genética total del ser humano, el genoma mitocondrial representa únicamente el 0.00006%, del material genético<sup>5</sup>, sin embargo, resulta indispensable para la replicación, transcripción y síntesis de algunas proteínas claves de la fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria<sup>12</sup>.



**Figura 1B. Genoma mitocondrial humano. Muestra los sitios de los genes de la cadena respiratoria y del RNA**



Genes del Complejo I

Genes del Complejo III

Genes del RNA transferencia

Genes del Complejo IV

Genes del Complejo V

Genes del RNA ribosomal

Publicada por DiMauro y cols. en 1996\*. Señala los sitios de los genes que codifican la cadena respiratoria y los RNAs de transferencia y ribosomal.

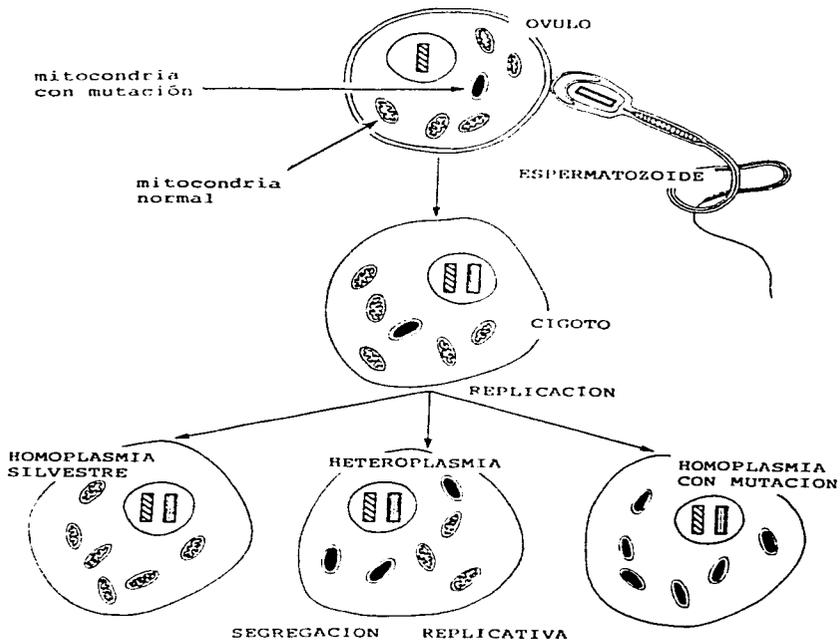
En vertebrados, el DNAm<sup>t</sup> tiene una frecuencia de mutación 10 a 17 veces mayor que el DNAn<sup>13</sup>. Este ritmo más rápido de mutaciones puede deberse a diversos factores, entre otros: la falta de mecanismos mitocondriales eficientes para reparar el DNAm<sup>t</sup>, la alta concentración de radicales libres de oxígeno en la mitocondria y la carencia de proteínas del tipo de las histonas<sup>14</sup>.

La totalidad del DNAm<sup>t</sup> proviene del ovulo, por lo que las mitocondrias del ser humano son de origen materno<sup>15</sup>. En la formación del cigoto, el espermatozoide prácticamente no contribuye con material genético mitocondrial. Una mutación que afecte algunos de los DNA mitocondriales del oocito será transmitida al azar a las células hijas, algunas de las cuales no recibirán ningún genoma alterado, fenómeno llamado homoplasmia normal o silvestre; mientras que otras células recibirán poblaciones mixtas de genomas mutados y normales, lo que se denomina heteroplasmia, y otras más recibirán predominantemente genomas mutados, por lo que presentarán homoplasmia con mutación<sup>16</sup>.

La **Figura 2** presenta un esquema que ejemplifica la herencia materna.

El DNAm<sup>t</sup> presenta mutaciones espontáneas con mucha frecuencia, algunas de las cuales son neutrales, es decir no son patológicas, y tienden a perpetuarse en un mismo individuo e incluso en poblaciones étnicas. A este tipo de mutaciones neutrales se les denomina polimorfismo, son homoplasmicas y tienen características antropológicas regionales<sup>17</sup>. Una de las teorías sobre el envejecimiento normal del cuerpo se basa en la acumulación de este tipo de mutaciones durante vida del individuo, lo que probablemente origina algunos de los cambios degenerativos que ocurren con la edad<sup>18,19</sup>.

**Figura 2. Herencia materna de mutaciones mitocondriales y el fenómeno de segregación replicativa**



Modificado de DiMauro y cols 1996<sup>9</sup>. En la barra sombreada clarase representa el cromosoma del óvulo y en la barra oscura el del espermatozoide. La mitocondria con genoma alterado aparece con relleno oscuro

Las mutaciones patológicas del DNAm generalmente son heteroplásmicas y pueden ser de dos tipos uno, caracterizado por la ablación o pérdida de un segmento de las cadenas circulares del genoma mitocondrial, generalmente de presentación esporádica, y el otro, de tipo puntual donde solo se substituye una base nitrogenada por otra, estas mutaciones generalmente son de herencia materna<sup>12</sup>

Cuando por un fenómeno llamado segregación replicativa la cantidad de DNAm mutado llega a sobrepasar la cantidad de DNAm normal (heteroplasmia con mutación) se origina una alteración en la función celular. Esta alteración puede permanecer subclínica hasta que se rebasa un umbral, que es específico para cada tejido y para determinado momento o edad del individuo afectado. Al rebasar ese umbral aparecen las características clínicas que pueden llegar a ser fenotípicas de una mitocondriopatía, muchas de ellas ya han sido descritas en la literatura<sup>4,20</sup>

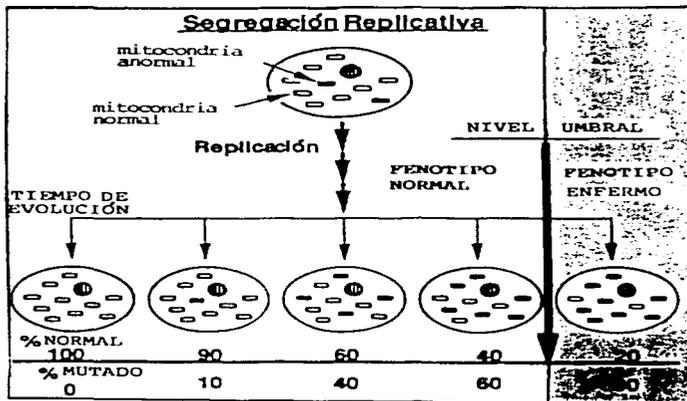
La **Figura 3** muestra el esquema del umbral clínico relacionado con una mutación mitocondrial<sup>20</sup>

Las enfermedades mitocondriales (>95%) pueden heredarse en forma mendeliana, autosómica o ligadas al cromosoma X. Esta gran diversidad de tipos de herencia se debe a que las mutaciones del DNAm afectan gran parte de la función mitocondrial. La gran mayoría de las mutaciones nucleares que afectan a la mitocondria aún son desconocidas<sup>21</sup>.

#### 4. METABOLISMO

Dentro de la mitocondria se llevan a cabo múltiples actividades, entre las que destacan el metabolismo intermedio y el energético, así como el transporte de metabolitos importantes<sup>22,23</sup>.

**Figura 3. Segregación replicativa y transformación fenotípica al rebasar el nivel umbral.**



Esquema del umbral clínico relacionado con una mutación mitocondrial. Modificado de Ballinger SW y Cols.<sup>20</sup>

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

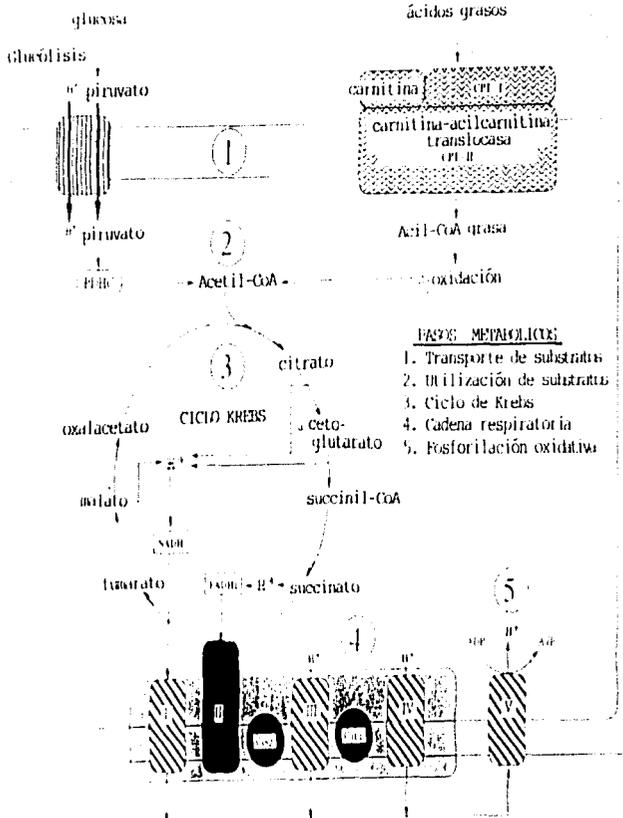
Las tres principales vías metabólicas que confluyen en la mitocondria son: el metabolismo del piruvato, la oxidación de ácidos grasos y la formación de acetil coenzima A (CoA) que entra al ciclo de Krebs. Estas tres vías contribuyen a generar la energía a través de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, necesarias para el óptimo funcionamiento celular. Dichas actividades se resumen en 5 pasos esenciales del metabolismo mitocondrial que se muestran en la *Figura 4*

En cada uno de estos pasos, se han logrado identificar defectos moleculares que provocan patologías específicas en las diferentes vías, el transporte y la utilización de sustratos, el Ciclo de Krebs, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa<sup>3,9,22,23,24,25,26,27</sup>

#### 1) Transporte de Sustratos.

En forma específica los ácidos grasos de cadena larga requieren de transporte activo para introducirse a la mitocondria. Debido a que la membrana interna de la mitocondria es impermeable al paso de ciertos sustratos hacia la matriz mitocondrial se necesitan sistemas de transporte, generalmente de naturaleza proteica (translocasas), localizadas en las membranas mitocondriales. El transporte de ácidos grasos de cadena larga requiere de un circuito que involucra a dos complejos enzimáticos, la carnitina palmitil transferasa I (CPT I) y II (CPTII), ambas localizadas en la cara interna de la membrana externa de la mitocondria. Estos complejos están acompañados de una molécula acarreadora, la L-carnitina y de una translocasa que lleva ácidos grasos largos acil-Co A hacia la matriz mitocondrial y carnitina libre hacia el citoplasma celular. Aproximadamente el 90% de las reservas de carnitina del organismo se encuentran en el músculo esquelético, cuya concentración es 60 veces más alta que la serica.

Figura 4. Principales vías metabólicas mitocondriales en el humano



MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

Esquema de DiMauro y cols. The mitochondrial disorders, 1969\*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Además de la deficiencia de carnitina que puede ser primaria o secundaria, existen cuatro defectos genéticamente determinados del transporte de sustratos. El primero afecta al transportador de la carnitina, el segundo a la carnitina palmitoil-transferasa I, el tercero a la carnitina-acil carnitina translocasa y el cuarto a la carnitina palmitoil transferasa II. La alteración de la beta oxidación de los ácidos grasos desencadena vías alternas hepáticas que originan una oxidación anormal denominada oxidación omega, la cual provoca la formación de ácidos dicarboxílicos que se manifiestan como aciduria dicarboxilica. Para compensar el secuestro de la Co A, por el acumulo de tioesteres de acil Co A, se incrementan los esterres de acilglicina y acilcarnitina. Debido a esto, puede producirse un agotamiento de las reservas sericas y tisulares de carnitina, aunque aumente la fracción de carnitina ligada. Por otro lado, cuando el defecto es por alteración misma del ciclo de la carnitina, se presenta una reducción absoluta de las fracciones libre y total de carnitina. Los defectos de la oxidación de los ácidos grasos originan una subproducción de acetil coenzima A, con la consiguiente disminución tanto del piruvato en el ciclo de Krebs como de la formación de cuerpos cetónicos, que se manifiestan como hipoglucemia hipocetogenica. La acumulación de metabolitos intermedianos del piruvato y de los ácidos grasos también provoca distinción del SNC, que se manifiesta como encefalopatía.

## 2) Utilización de Sustratos.

Dentro de la matriz mitocondrial, el piruvato y los ácidos grasos se transforman en acetil Co A. Todas las reacciones de carboxilación tienen lugar en las mitocondrias, excepto la carboxilación de la acetil-Co A. Las carboxilasas que incluyen la piruvato carboxilasa, propionil-coenzima A carboxilasa, betametiloctonil-coenzima A carboxilasa y la acetil-

coenzima A carboxilasa y la holocarboxilasa sintetasa, todas ellas dependen del metabolismo de la biotina.

Piruvato: la descarboxilación del piruvato es catalizada por un complejo enzimático, denominado piruvato deshidrogenasa (PDHC), que consiste de tres enzimas:

- 1.- Piruvato deshidrogenasa E<sub>1</sub> (con 1 subunidad  $\alpha$ ) su coenzima es la tiamina pirofosfato.
- 2.- Lipoato acetiltransferasa E<sub>2</sub>, con ácido lipoico de coenzima.
- 3.- Lipoamida deshidrogenasa E<sub>3</sub>, dependiente del dinucleotido de adenina flavina (FAD).

Este complejo se activa a través de fosforilación (PDH cinasa) y se inhibe por desfosforilación (PDH fosfatasa)

Los defectos descritos en este paso están relacionados con deficiencias de la PDHC y piruvato carboxilasa (PC)

Acidos Grasos la  $\beta$ -oxidación provoca la descarboxilación de los ácidos grasos en 4 reacciones que se repiten cíclicamente. Esta actividad es una deshidrogenación secuencial a través de varias enzimas que rompen las cadenas de ácidos grasos, en diferentes sitios del esqueleto de carbono, algunas de ellas dependientes de FAD. El resultado de estas reacciones da lugar a la formación de cetoácidos o cuerpos cetónicos. El poder reductor generado en la  $\beta$ -oxidación, se transfiere a la cadena respiratoria, la reacción que depende del dinucleotido de nicotinamida adenina (NAD), transfiere electrones al complejo I, mientras que la que depende de FAD los lleva a la coenzima Q (CoQ), a través de una electrotransferencia que involucra una flavoproteína.

Los defectos relacionados con esta vía corresponden a cualquiera de las 4 reacciones del ciclo. Se han identificado 8 trastornos genéticamente determinados, cinco de ellos inciden

en el primer paso de la  $\beta$ -oxidación: la acil coenzima A de cadena corta, media y larga respectivamente, y la flavoproteína oxidoreductasa. Afectan al tercer paso de la  $\beta$ -oxidación las deficiencias de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD) y la otra de cadena corta (SCHAD) respectivamente. Recientemente se ha identificado un trastorno relacionado con la deficiencia de la proteína trifuncional, la cual se encuentra en la membrana mitocondrial interna y cuya función es la de catalizar los pasos segundo, tercero y cuarto de la  $\beta$ -oxidación

### 3) Ciclo de Krebs.

Este ciclo se inicia con la condensación de acetil-CoA y el cuarto carbón del oxaloacetato, que forma citrato de 6 carbonos. A través de 7 reacciones enzimáticas secuenciales que generan oxaloacetato, se forman dos moléculas de dióxido de carbono y poder reductor en forma de NADH y FADH<sub>2</sub>.

Los defectos descritos en el Ciclo de Krebs se relacionan con la deficiencia de cualquiera de sus enzimas: la fumarasa, la aconitasa y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.

El complejo II o succinato deshidrogenasa es una enzima que representa el eslabón de enlace fundamental del Ciclo de Krebs con la cadena respiratoria.

### 4) Cadena respiratoria.

Los electrones de alta energía provenientes del NADH y FADH<sub>2</sub>, generados durante las reacciones de la  $\beta$ -oxidación y del Ciclo de Krebs, permiten el flujo de electrones en la cadena respiratoria hacia el oxígeno molecular, cuyo paso final oxidativo termina con la formación de agua



La cadena respiratoria está formada por 5 complejos enzimáticos multiméricos, localizados en la membrana interna mitocondrial. Estas enzimas contienen flavinas, coenzima Q<sub>10</sub> (ubiquinona), moléculas de hierro-azufre, hemos y proteínas que unen cobre. Los cinco complejos de la fosforilación oxidativa son el complejo I (NADH-deshidrogenasa), el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III (ubiquinol -citocromo c oxidoreductasa), el complejo IV (citocromo c oxidasa) y el complejo V (ATP sintetasa). Los primeros 4 (I-IV) transportan electrones de manera acoplada con la translocación de protones y el último (V) cataliza la síntesis de ADP para formar ATP. Además hay 2 acarreadores de electrones importantes, la ubiquinona y coenzima Q y el citocromo c. Cada uno de los primeros cuatro complejos contienen un número variado de subunidades: el complejo I más de 40, el II tiene 4, el complejo III tiene 11 y el IV tiene 13. Además del citocromo c, existen otros cuatro citocromos en la cadena respiratoria, a saber: el citocromo b y el citocromo c<sub>1</sub>, que son componentes del complejo III, mientras que los citocromos a y a<sub>3</sub>, son componentes del complejo IV. Los complejos I, II y III también contienen uno o más centros hierro-azufre, el complejo I tiene un grupo FMN y el complejo II un grupo FAD.

El transporte de electrones en la cadena respiratoria está acoplado a un bombeo de protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. El gradiente electroquímico resultante se utiliza para generar ATP a través del complejo V.

En la **Figura 5** se muestra una representación esquemática de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa.

Los defectos de la cadena respiratoria están relacionados con deficiencias en cualquiera de los complejos I al IV o de sus cofactores. También existen deficiencias combinadas de los complejos I, III y IV.

### 5) Síntesis de ATP.

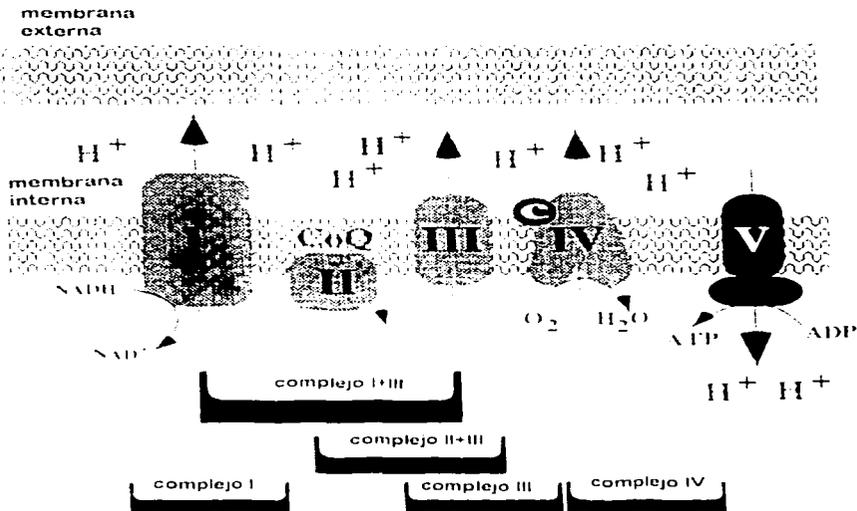
El gradiente electroquímico de protones formado por la cadena respiratoria, se disipa hacia la matriz mitocondrial a través de un complejo proteico llamado ATP sintetasa o complejo V. La ATP sintetasa contiene 12 subunidades, que forman un canal de protones transmembranal (F<sub>0</sub>) y una proyección esférica sobre la cara interna de la membrana interna mitocondrial. La energía liberada por el contraflujo de protones, es aprovechada por el complejo V para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato. El defecto por la pérdida del acoplamiento de la fosforilación oxidativa en la mitocondria muscular, se le conoce como enfermedad de Luft, la primera enfermedad mitocondrial descrita en la literatura. Desde entonces, se han descrito en forma aislada otras deficiencias de la ATP sintetasa.

### 6) Importación de proteínas.

El proceso de importación de proteínas consume energía y requiere que las proteínas se desplieguen antes de que puedan atravesar las membranas mitocondriales, y que posteriormente se vuelvan a plegar después de penetrar la matriz mitocondrial. La secuencia guía que orienta al polipeptido hacia la matriz es escindida posteriormente por una proteasa específica mitocondrial. Existen macromoléculas guías llamadas chaperoninas que intervienen en la presentación y orientación espacial que deben adquirir ciertas proteínas para poder introducirse en la mitocondria. Aunque una enzima se encuentre catalíticamente intacta no podrá cumplir su función biológica si está orientada en el compartimento equivocado. Los defectos en este tipo de transporte esencial se están convirtiendo en un buen ejemplo de esta categoría de alteraciones mitocondriales y en un futuro pueden llegar a formar un subgrupo importante de enfermedades mitocondriales bien diferenciadas. Ejemplo de lo anterior lo constituye una de las causas de la acidosis



**Figura 5. Complejos de la cadena respiratoria I al IV y la fosforilación oxidativa donde interviene el complejo V**



Modificado de Sznajder JM 1999 <sup>29</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

metilmalónica que provoca hiperoxaluria primaria tipo I, algunos defectos de la ornitina transcarbamilasa y de la carbamilofosfato sintetasa I del ciclo de la urea, entre otros.

#### 7) Señalización intergenómica.

La mayoría de las funciones mitocondriales dependen de la información y control del genoma nuclear. Recientemente se han descrito diversos mecanismos de comunicación entre el genoma nuclear y el genoma mitocondrial que son esenciales para la adecuada función de la mitocondria. Los defectos relacionados con la señalización intergenómica son muy interesantes, debido a que a pesar de tener herencia autosómica mendeliana, se pueden manifestar por alteraciones en el genoma mitocondrial en forma de ablación por pérdida total del DNA.

#### 8) Relación Lactato/ Piruvato.

Con pocas excepciones, el incremento del lactato (L) corporal es una de las características más constantes de las mitocondropatías. Generalmente esta elevación se detecta primero en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y tiempo después en el plasma sérico de pacientes con alteraciones mitocondriales. Los valores de referencia de lactico y pirúvico en sangre y LCR publicados en concentración milimolar (mM) por algunos grupos de investigación son:

En sangre

Láctico(L)	Pirúvico(P)	L/P	(Bergmeyer 1988, Sadubray 1976)
1.0-1.8	0.11-0.17mM	10-15	
0.6-1.2mM	0.07-0.12mM	10-15	

En LCR:

Láctico(L)	Pirúvico(P)	L/P	(Bergmeyer 1988, Sadubray 1976)
1.2-1.6mM	0.08-0.13mM	9-15	
0.5-2.8mM	0.02-0.13mM	11-15	

En la disfunción mitocondrial el incremento del lactato se asocia a una disminución del piruvato, con una relación L/P elevada

Por otro lado, las enfermedades mitocondriales que afectan el metabolismo de los ácidos grasos alteran la formación de los cuerpos cetónicos, con disminución del  $\beta$ -hidroxibutirato (BOH), en relación con el acetoacetato (AA), generando una disminución de la relación BOH/AA

Los valores de referencia de BOH y AA en sangre publicados en milimolar (mM) por algunos grupos de investigación son

En sangre

BOH	AA	BOH/AA	(Bergmeyer 1988, Sadubray 1976)
60-300mM	20-100mM	2-4	

No existen en la literatura mundial los valores de referencia en LCR para los cuerpos cetónicos. Aún no se han publicado en nuestro medio los valores de referencia para ninguno de estos estudios en pacientes mexicanos.

## 5. CLASIFICACIÓN

Aunque no hay una clasificación universal para las enfermedades mitocondriales se han agrupado de diferente forma dependiendo del foco de interés con que se analicen. Desde el punto de vista del metabolismo intermediario, se incluyen defectos del DNA nuclear así como del DNA mitocondrial con sus respectivos receptores, acarreadores y cofactores, y se pueden dividir en 3 categorías principales<sup>6</sup>:

- 1) Defectos en la oxidación de ácidos grasos.
- 2) Defectos del metabolismo del piruvato.
- 3) Defectos de la cadena respiratoria.

La clasificación genética molecular separa las mutaciones del DNAmt en 2 grupos<sup>6</sup>:

A. Ablaciones ("deletions" en inglés) y/o duplicaciones:

- 1) Re-arreglos de gran escala esporádicos.
- 2) Re-arreglos de gran escala transmitidos.

B. Mutaciones puntuales, casi siempre de origen materno

- 1) Mutaciones puntuales que afectan genes estructurales
- 2) Mutaciones puntuales que afectan genes de la síntesis de RNA.

La *Figura 6* presenta los sitios de las mutaciones identificadas en el DNA humano con repercusión clínica.

La *Tabla 1* muestra la clasificación *bioquímico-genética* de los trastornos mitocondriales, propuesta por De Vivo y DiMauro en 1996<sup>5</sup> donde mencionan no sólo las alteraciones genéticas y bioquímicas sino también los trastornos adquiridos que puede sufrir una mitocondria.

## 6. ESTUDIO CLÍNICO DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

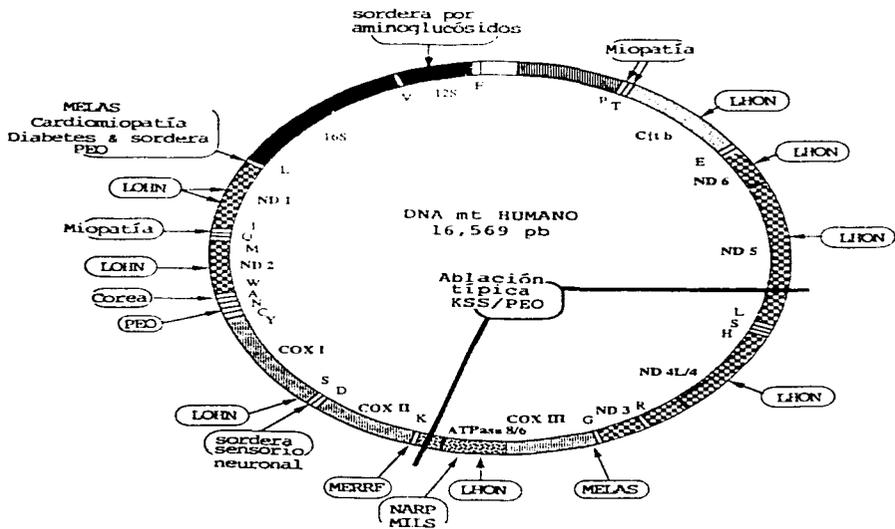
El abordaje clínico suele ser muy difícil debido a la presencia de cuadros bizarros y heterogéneos, generalmente acompañados de un compromiso multiorgánico con elevación del lactato corporal<sup>26,29,29</sup>. En cualquier momento de la vida, debido a los fenómenos de segregación replicativa y efecto umbral, el individuo afectado va agregando en forma paulatina los signos y síntomas que serán reconocibles y finalmente diagnosticados como citopatía mitocondrial<sup>20</sup>.

Las manifestaciones clínicas de las citopatías mitocondriales son tan heterogéneas, que no solamente dependen de la alteración de la vía metabólica involucrada, sino también de otros factores como: edad de inicio, severidad de la mutación, grado de heteroplasmia, afección clínica o subclínica de otros órganos de la economía además del encéfalo y el músculo<sup>12,15,21,30,31,32</sup>. Estos factores, juntos o en forma aislada, determinan la sobrevivencia del individuo afectado.

En los familiares de los pacientes con ciertas mutaciones puntuales del DNAm<sub>t</sub> se deben investigar intencionadamente posibles manifestaciones "aisladas", generalmente de la rama materna como son: talla baja, sordera neurosensorial, cefalea vascular migrañoide, enfermedad cerebrovascular en menores de 40 años, así como tubulopatía renal entre otras. Diversos miembros de una familia, aún con la misma mutación, pueden no tener los mismos órganos afectados y por lo tanto presentar características clínicas, de evolución, de severidad y pronóstico diferentes<sup>33,34</sup>.

La clínica de una enfermedad mitocondrial se basa en el reconocimiento de las características fenotípicas de las mutaciones ya referidas en la literatura, tanto del DNAm<sub>t</sub>

**Figura 6. Principales mutaciones identificadas del DNA mitocondrial**



Modificado de DiMauro, 1995 \*

TESIS CON  
TALLA DE ORIGEN

como del DNAn<sup>26</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se ha detectado el 100% de los posibles defectos que nos permitan conocer la totalidad de sus manifestaciones; sin contar aquellas enfermedades mitocondriales que son adquiridas o debidas a la deficiencia de algún transportador y/o cofactor, de la gran cantidad que se requieren, para que la mitocondria funcione adecuadamente

## 7. ESTUDIO METABOLICO

Generalmente cuando se sospecha una citopatía mitocondrial se tiene un paciente con afección multisistémica y repercusión importante de la función muscular y/o encefálica, sin una explicación clara del conjunto de signos y síntomas, casi siempre acompañada de grados variables de acidosis metabólica compensada o grave, debida en la mayoría de los casos a hiperlactatemia<sup>29,36,38</sup>. Un paciente puede mantenerse relativamente asintomático o con manifestaciones incipientes y poco específicas si solo rebasa ligeramente el umbral clínico, hasta que sufre una descompensación que incrementa sus requerimientos metabólicos por infección, trauma y/o ejercicio físico intenso. Esta descompensación metabólica eleva el lactato corporal, causante del cuadro agudo de acidosis<sup>21,36,39</sup>.

El paciente con alta sospecha clínica de enfermedad mitocondrial, sin elevación del lactato corporal, debe ser sometido idealmente a pruebas especiales mediante ejercicio físico o cargas exógenas de glucosa<sup>40</sup>. Estas pruebas provocan una descompensación artificial y monitorizada que se denomina prueba de esfuerzo o reto metabólico y demuestran la incapacidad de adaptación del organismo. La prueba seleccionada se considera positiva cuando desencadena acidosis metabólica, ésta última puede ser severa por lo que sólo debe realizarse en lugares que cuenten con unidad de cuidados de terapia intensiva

21,38,40,41,42

**Tabla 1. Clasificación Genética-bioquímica de los trastornos Mitocondriales**

**TRASTORNOS HEREDITARIOS**

**DEFECTOS DEL DNA NUCLEAR**

- Defectos del transporte de sustratos
- Defectos de la utilización de sustratos
- Defectos del ciclo de Krebs
- Defectos del acoplamiento de la oxidación-fosforilación
- Defectos de la cadena respiratoria
- Defectos de la importación de proteínas
- Defectos de la señalización intergenómica

**DEFECTOS DEL DNA MITOCONDRIAL**

- Ablaciones de tipo esporádico
- Ablaciones transmitidas
- Mutaciones puntuales que afectan genes estructurales (proteínas)
- Mutaciones puntuales que afectan genes de la síntesis (RNAs)

**TRASTORNOS ADQUIRIDOS**

- Infecciosos
- Tóxicos
- Farmacológicos
- Envejecimiento

Modificado de De Vivo & DiMauro, 1996 \*

El estudio correcto del lactato es delicado y laborioso, ya que necesita entre otros requerimientos: su obtención sin ligadura; tubos con solución amortiguadora especial para sangre y LCR, respectivamente; análisis inmediato despues de su obtención en laboratorios con experiencia

En muchos lugares no se tienen los recursos para medir lactato en forma adecuada, por lo que se puede utilizar la brecha aniónica como prueba sencilla y fácil que probablemente refleje en forma indirecta la concentración de lactato, ya que este es el anión no medible más abundante en el organismo. La brecha anionica se obtiene de la resta de electrolitos (cationes y aniones) medibles en sangre  $(Na+K)-(Cl+HCO_3)$ , y tiene como intervalo de referencia: 10 - 14 mEq / L. Un incremento significativo es  $\geq 16$  mEq / L<sup>43</sup>.

Para evitar falsos positivos en la medición de lactato o brecha aniónica, el paciente debe estar libre de crisis convulsivas, infección, fiebre y/o trauma físico, condiciones que incrementan el metabolismo basal<sup>43,44</sup>.

No existen referencias en la literatura que correlacionen a la brecha aniónica con los niveles de lactato corporal en pacientes con enfermedad mitocondrial.

Otros substratos, metabolitos y ácidos también deben medirse para complementar el estudio del metabolismo intermediano, tales como:

- 1.- El piruvato en sangre y LCR para conocer la relación L/P la cual se encuentra elevada cuando está  $\geq 35$  en muchos casos relacionados con citopatía mitocondrial<sup>36</sup>.
- 2.- Los cuerpos cetónicos en sangre y LCR ya que pueden estar disminuídos o ausentes en algunas mitocondriopatías<sup>36,45</sup>.
- 3.- Ciertos aminoácidos como alanina y leucina entre otros, pueden estar elevados en orina y sangre de pacientes con disfunción mitocondrial<sup>46</sup>.

La determinación de ácidos orgánicos y aminoácidos en orina y sangre son esenciales en pacientes con sospecha de enfermedad metabólica<sup>47</sup>. Ejemplos de ello son la hiperalaninemia o la aciduria dicarboxilica que son resultado de alteración del metabolismo energético<sup>46</sup>.

Algunos casos de citopatías mitocondriales se pueden acompañar de disfunción de uno o varios de los siguientes órganos cardíaco (disrritmias y/o bloqueos), renal (acidosis, hipofosfatuna, aminoaciduria) y/o hepático (hipoglucemia, hiperamonemia). Así mismo pueden presentarse alteraciones respiratorias (especialmente apnea central) y/o de tipo endócrino (diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipoparatiroidismo y deficiencia aislada de hormona de crecimiento)<sup>12,29,30,46,48,49</sup>.

## 8. ESTUDIOS NEUROFISIOLÓGICOS Y DE IMAGEN CEREBRAL

La mayoría de los exámenes de laboratorio y gabinete son inespecíficos. Sin embargo en varios trabajos<sup>21,40,42</sup> se mencionan estudios de apoyo diagnóstico no invasivo, especialmente relacionados con neurofisiología e imagen, ya que son de gran utilidad para orientar el abordaje inicial ante la sospecha clínica de encefalomiopatía. De esta forma se pueden optimizar los recursos especializados e invasivos (bioquímicos, histopatológicos y de genética molecular). Los estudios neurofisiológicos reflejan indirectamente algunas alteraciones del SNC periférico y muscular. El electroencefalograma (EEG) puede detectar identificación del ritmo de base, episodios paroxísticos de origen epiléptico<sup>50,51,52,53,54</sup>, y con menor frecuencia un patrón pseudopendolico<sup>55</sup>. Los potenciales evocados (PE) muestran hasta en un 76% de los casos disminución en la amplitud y retraso en la latencia de los PESS, PEV y ERG, mientras que en los PEAT se refieren alterados en un 47% de los mitocondriopatías<sup>51,56,57,58</sup>. Los hallazgos de la electromiografía (EMG) son muy

heterogéneos en las diferentes series referidas <sup>42,49,51</sup> a saber miopáticos, neuropáticos, la combinación de ambos. También pueden presentar cambios inespecíficos, por lo que aún falta una evaluación más profunda al respecto. La velocidad de conducción nerviosa (VCN) se refiere anormal en el 100% de los casos, aunque aún no se define si su origen es primario o secundario<sup>42,51,59</sup>. Un estudio polisomnográfico realizado a un paciente con citopatía mitocondrial de tipo NARP mostró apnea central, así como apnea-hiponea e hipoventilación por obstrucción de la vía aérea superior<sup>60</sup>.

Por neuroimagen se han descrito diversas alteraciones en TAC e IRM, esta última muestra mayor sensibilidad para detectar anomalías. Las imágenes referidas tanto supra como infratentoriales son inespecíficas<sup>61,62,63</sup>, de ellas destacan los cambios heterogéneos en la densidad o intensidad de las sustancias blanca o gr<sup>63,64</sup>, calcificaciones<sup>67</sup>, atrofia e incluso imágenes que semejan eventos vasculares de tipo isquémico<sup>66,68</sup>. Las imágenes en IRM generalmente muestran aumento del agua libre en el lugar afectado en regiones temporo-occipitales (córtico subcorticales) como en el síndrome de MELAS<sup>6,66</sup> o en las áreas que corresponden a los núcleos basales y/o tallo cerebral como ocurre frecuentemente en el síndrome de Leigh <sup>67</sup> y con menor ocurrencia en MELAS<sup>66</sup> o el síndrome de Keams-Sayre<sup>69</sup>. En ocasiones la señal semeja los cambios sólo en la sustancia blanca de los centros semiovoides. Es importante señalar que al inicio del cuadro clínico se pueden encontrar imágenes normales o con atrofia cortical mínima<sup>64,67</sup>. Cabe destacar que en el síndrome de MELAS, las imágenes anormales detectadas por IRM son altamente variables en su localización en un mismo paciente, situación que se ha denominado "migratoria"<sup>66</sup>. Actualmente con la técnica de espectroscopía por resonancia

magnética (SRM) es posible estudiar al metabolismo oxidativo en forma no invasiva<sup>69,70,71,72,73</sup>.

## 9. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

El músculo estriado es el tejido corporal que más se ha utilizado en el humano para el estudio bioquímico y morfológico mitocondrial<sup>74,75</sup>.

La presencia y en ocasiones la ausencia de ciertos marcadores histoquímicos e inmunohistoquímicos pueden ser altamente sugestivos de enfermedad mitocondrial. Las tinciones más comúnmente utilizadas para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales son las siguientes

\*Tinción de Gomori es la más famosa históricamente hablando, tiñe de rojo las mitocondrias que tienen proliferación anormal en el sarcolema y entre las miofibrillas, algunas de estas últimas se encuentran rotas y rasgadas, por lo que se les conoce como "fibras rojas rasgadas" (FRR)<sup>15</sup>. La presencia de estas fibras en el músculo de pacientes con miopatía o enfermedades sistémicas es diagnóstica de citopatía mitocondrial, especialmente en los defectos de la cadena respiratoria. Cabe señalar, que la detección de FRR en biopsias musculares depende de la evolución y el estadio clínico del enfermo, ya que en algunos tipos de miopatía infantil benigna desaparecen en el curso de la enfermedad; mientras que en otros casos, se requiere un tiempo prolongado de sintomatología para encontrarlas. Es muy importante considerar que la ausencia de FRR no descarta la posibilidad de una mitocondriopatía<sup>76,77</sup>. Más aún, la mayor parte de los defectos mitocondriales no tienen positivo este marcador tisular, ejemplos de ello son: la deficiencia de piruvato deshidrogenasa (PDHC), piruvato carboxilasa (PC), palmitoil transcarbamilasa (CPT), así como la mayoría de los pacientes con síndrome de Leigh (SL), LHON y NARP<sup>78</sup>.

\*Tinción de citocromo c oxidasa (COX): la ausencia de color en esta tinción sugiere una anomalía de la actividad bioquímica de COX en la cadena respiratoria. Ejemplos de ello son las miopatías con deficiencia específica o generalizada de COX como en algunos casos de SL y en miopatías COX deficientes benignas o fatales<sup>76</sup>. La tinción COX negativa acompañada de FRR es característica de ciertas citopatías mitocondriales relacionadas con mutaciones del DNAm, con excepción de una mutación específica denominada encefalomiopatía con episodios cerebrales pseudoictícos (MELAS), en donde las FRR se acompañan de tinción COX positiva.

\*Tinción de succinato deshidrogenasa (SDH): es la tinción histoquímica más sensible de todas para detectar el funcionamiento anómalo mitocondrial en las biopsias de músculo estriado<sup>9</sup>.

La microscopía electrónica del músculo estriado puede detectar las alteraciones ultraestructurales de la mitocondria así como inclusiones anómalas dentro de la misma. Las inclusiones pueden ser laminares, granulares o vacuoladas<sup>21</sup>. Este recurso aunque inespecífico, en su momento fue el único estudio que podía apoyar el diagnóstico de mitocondriopatía, sin embargo pierde cada día valor si lo comparamos con las tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas específicas que se utilizan en la actualidad<sup>78</sup>.

Aunque desde el punto de vista bioquímico y morfológico el metabolismo oxidativo del músculo representa estrechamente al del cerebro<sup>34</sup>; los estudios de autopsia de pacientes en quienes por biopsia muscular se habían detectado FRR, mostraron cambios cerebrales inespecíficos como atrofia, gliosis, infartos, así como cambios espongiiformes difusos en la sustancia blanca (leucoencefalopatía) y en la gris (núcleos basales y del tallo)<sup>79,80</sup>.

El tejido muscular de 4 niños estudiados por Pastoris y cols<sup>77</sup>, con diagnóstico clínico y bioquímico que confirmó disfunción mitocondrial (elevación de lactato y alteración de COX), mostró que los diámetros de las fibras musculares eran mas pequeños que en los controles. Arpa y cols<sup>49</sup> estudiaron 15 casos, y las alteraciones mas importantes que encontraron en orden de frecuencia fueron variación en el tamaño de las fibras musculares (60%), inclusiones lipidicas (33.3%), agregados subsarcolemicos oxidativos (26%), y fibras rojas rasgadas (FRR) (26%). Las FRR estan presentes solo en los defectos bioquimicos que involucran la cadena respiratoria<sup>8</sup>, como las EMM que incluyen MERRF, MELAS y CPEO<sup>80</sup>, este ultimo es el síndrome que con mayor frecuencia se asocia con COX negativo. Existen encefalopatias "puras" sin FRR como LHON, y el complejo ataxia, retinitis pigmentosa-demencia, denominado NARP<sup>78</sup>.

En niños pequeños, durante el periodo de lactancia, las alteraciones histopatologicas pueden ser totalmente inespecificas, como lo demuestran Uusimaa y cols<sup>82</sup>. Estos hallazgos sugieren que en los estadios tempranos de la mayoría de las mitocondropatias, las alteraciones bioquimicas señaladas se reflejan escasamente en los estudios morfologicos. Schroder detecto neuropatia en todos los casos de miopatia mitocondrial en los que estudio el nervio periferico, por analisis morfometrico<sup>89</sup>, queda por determinar si la neuropatia es causada directamente por disfuncion mitocondrial o por otros mecanismos patogénicos. Es interesante señalar que se ha encontrado disfuncion y/o alteracion morfologica mitocondrial en pacientes con afecciones neurologicas aisladas inespecificas como hipotonia, epilepsia, retraso mental, sin otras manifestaciones clinicas ya reconocidas en las citopatias mitocondriales<sup>83</sup>.

## 10. DIAGNÓSTICO

De la Clasificación *bioquímico-genética* de las mitocondriopatías se desprende el estudio clínico y paraclínico específico para el abordaje de las enfermedades hereditarias:

### A. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES POR DEFECTOS DEL GENOMA NUCLEAR

#### 1) Clínica, estudios y manejo de los trastornos del transporte:

##### 1.1 Deficiencia primaria de Carnitina <sup>5,9,46</sup>

\*Herencia autosómica recesiva

\*Inicio: lactantes

\*Cuadro clínico: Manifestaciones generalizadas que alteran la función cardíaca, muscular y/o renal. Hipotonía global, crecimiento inadecuado, alteraciones del estado de alerta que pueden llegar hasta el coma

\*Laboratorio: Hipoglucemia hipocetonica, en suero y músculo niveles bajos de carnitina libre y estenificada. Ausencia de aciduria. En la biopsia muscular infiltración grasa, en cultivo de fibroblastos se pueden detectar portadores heterocigóticos asintomáticos.

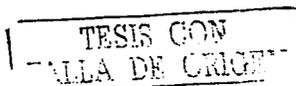
\*Tratamiento: suplementos orales de L-carnitina

##### 1.2 Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa / <sup>5,9,46</sup>

\*Herencia autosómica recesiva

\*Inicio: lactantes

\*Cuadro clínico: alteraciones recurrentes del estado de alerta que pueden llevar al coma acompañadas de hepatomegalia (parecidas al síndrome de Reye), ocasionalmente acidosis tubular renal. Episodios desencadenados por el ayuno o infecciones



\*Laboratorio: Hipoglucemia hipocetónica, hiperamonemia, hipertransaminemia, acidosis tubular renal, niveles normales o altos de carnitina y/o ausencia de aciduria dicarboxilica.

\*Tratamiento: dieta con alimentos que contengan triglicéridos de cadena media.

### 1.3 Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa I<sup>6,9,45</sup>

\*Herencia: autosómica recesiva

\*Inicio: 2 formas la Infantil y la del adulto

\*Cuadro clínico:

**1.3.1 ADULTO:** Forma benigna compatible con la vida. Predominio masculino. Miopatía caracterizada por dolores musculares recidivantes. Los síntomas se desencadenan por el ayuno, el ejercicio prolongado, exposición al frío, infecciones y tensión emocional.

\*Laboratorio: Mioglobina con elevación brusca de CPK, precipitadas por factores desencadenantes. Biopsia muscular generalmente normal al inicio y con el tiempo depósitos grasos. Niveles normales de carnitina. Mutación en sentido erróneo (missense mutation) en el cromosoma 1 (1p32) en población caucásica

Tratamiento: Evitar factores precipitantes. Dieta alta en carbohidratos y baja en grasas.

**1.3.2 INFANTIL:** Forma grave, en recién nacidos es mortal. Sus manifestaciones más frecuentes son la hepatomegalia, la cardiomiopatía y alteraciones del estado de alerta que pueden llevar al coma (semeja al síndrome de Reye).

\*Laboratorio: hipoglucemia hipocetogénica, aciduria orgánica, niveles bajos de carnitina libre y total, con incremento en las concentraciones de lípidos y acil-carnitina de cadena larga.

Tratamiento: candidato a tratarse con terapia génica.

#### 1.4 Deficiencia de acil carnitina-carnitina translocasa<sup>5,9,45</sup>

\*Herencia: autosómica recesiva

\*Inicio: lactante

\*Cuadro clínico: crisis convulsivas, apnea, bradicardia, vómito, alteración del estado de alerta que puede llegar hasta el coma, debilidad generalizada y/o hepatomegalia (parecida al Síndrome de Reye). Cuadro desencadenado por ayuno.

\*Laboratorio: mioglobulina, niveles muy bajos de carnitina libre sérica con incremento de cadenas largas de acil-carnitina, hipoglucemia hipocetónica e hiperamonemia.

\*Tratamiento: evitar ayuno

### 2) Clínica, estudios y manejo de los trastornos de la utilización de sustratos:

#### 2.1 Deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa<sup>5,9,36,84</sup>

La mayoría de los pacientes tienen un defecto en la subunidad  $\alpha$  E<sub>1</sub> del complejo.

\*Herencia: ligada al cromosoma X (Xp22). Se pueden presentar: ablaciones, inserciones y mutaciones con sentido erróneo (missense mutation). Predomina en varones, aunque no es excluyente el género femenino.

\* Inicio: se presenta en 3 formas, la neonatal, la del lactante y de la niñez

\*Cuadro clínico

2.1.1 NEONATAL: se caracteriza por peso bajo al nacimiento, crecimiento inadecuado, hipotonía (succión débil), apnea episódica, crisis convulsivas, alteración del estado de alerta al coma. También se presenta síndrome dismórfico: puente nasal amplio, narinas antevertidas, micrognatia, baja implantación de pabellones auriculares, brazos y dedos cortos, pliegue simiano e hipospadias.

**2.1.2 LACTANTE:** se presenta entre los 3 y 6 meses de edad, con retraso psicomotor, hipotonía con componente distónico, disfagia, crisis convulsivas, ataxia, piramidismo, desaceleración del crecimiento cefálico, oftalmopeljia con ptosis papebral, atrofia óptica, y neuropatía periférica.

**2.1.3 NIÑEZ** Se manifiesta como ataxia fluctuante, fatiga fácil, y paraparesia transitoria. Entre episodios los pacientes pueden estar asintomáticos.

\*Laboratorio: Acidosis láctica con una relación de lactato/piruvato normal. En la forma del lactante se pueden detectar por neuroimagen las lesiones simétricas en núcleos basales, puente y/o mesencefalo que son características del síndrome de Leigh.

\*Tratamiento: puede responder a tiamina especialmente en la niñez. Se sugiere dieta rica en grasa como fuente alternativa de acetilCoA. Otros suplementos son: el ácido lipoico y la L-carnitina.

## **2.2 Deficiencia de piruvato carboxilasa**<sup>6,9,36,84</sup>

\*Herencia: autosómica recesiva, gen localizado en el brazo largo del cromosoma 11.

\*Inicio: lactante

\*Cuadro clínico tiene 3 presentaciones: la francesa, la norteamericana y la benigna.

**2.2.1 Francesa y norteamericana:** cuadros graves y generalmente mortales con hipotonía, retraso psicomotor severo y crecimiento inadecuado.

**2.2.2 Benigna:** cuadro clínico de vómitos y ataxia intermitentes, sin o con retraso psicomotor leve.

\*Laboratorio: las formas francesa y norteamericana tienen ausencia o deficiencia severa de la enzima piruvato carboxilasa, acidosis láctica, cetoacidosis, relación L/P aumentada con

disminución de la relación BOH/AA. La forma francesa se asocia con citrulinemia, hiperfisinemia, hiperamonemia y disminución de aspartato.

\*Tratamiento: No existe. La forma francesa es mortal, la norteamericana es menos severa pero igualmente fatal en la lactancia. Se pueden identificar heterocigotos con cultivo de fibroblastos y es posible el diagnóstico prenatal por amniocentesis.

### 2.3 Deficiencia múltiple de carboxilasas<sup>6,9,36,64</sup>

\*Herencia: autosómica recesiva

\*Inicio: lactante menor

\*Cuadro clínico: respiración irregular, crecimiento inadecuado, alopecia, erupciones cutáneas, convulsiones, atrofia óptica, pérdida de la audición e infecciones frecuentes.

\*Laboratorio: deficiencia de holocarboxilasa sintetasa o de biotinidasa, acidosis metabólica y alteraciones inmunológicas.

\*Tratamiento: los pacientes responden a dosis altas de suplementos de biotina.

### 2.4 DEFECTOS DE LA $\beta$ -OXIDACIÓN:<sup>6,9,45,56,56,57</sup>

Todos estos defectos tienen una herencia autosómica recesiva. El más frecuente es la deficiencia de la acil coenzima A de cadena media.

#### 2.4.1 Deficiencia de la acil coenzima A de cadena media:

\*Herencia: autosómica recesiva. Se debe a la mutación A985 → G del cromosoma 2.

\*Inicio: lactante menor

\*Cuadro clínico: se presenta en forma de episodios de vómitos, hipotonía y alteración del estado de alerta que puede llegar al coma. Enmascara una deficiencia sistémica de carnitina, un síndrome de Reye o una muerte infantil inesperada. En forma crónica puede

manifestarse con convulsiones, desarrollo inadecuado y poca debilidad proximal de las extremidades.

\*Laboratorio típicamente se presenta hipoglucemia hipocetonica recurrente desencadenada por el ayuno o infecciones intercurrentes. Disminucion de la carnitina total y libre, aciduna organica. La biopsia muscular muestra infiltración grasa.

\*Tratamiento Evitar factores precipitantes con estrategias para prevenir ayuno prolongado e infecciones. Dieta alta en carbohidratos y baja en grasas y con suplemento de aceite de triglicéridos de cadena media. Suplemento de cofactores como riboflavina y/o carnitina.

Las manifestaciones del resto de los defectos de la  $\beta$ -oxidacion son muy parecidas a las ya mencionadas para la deficiencia de acil coenzima A de cadena media, con algunas particularidades que se presentari a continuacion.

A diferencia de lo que ocurre con la deficiencia de acil coenzima A de cadena media, el resto de defectos de la  $\beta$ -oxidacion producen mucha mayor debilidad muscular.

#### 2.4.2 Alteracion de la enzima trifuncional y

#### 2.4.3 Deficiencia de acil coenzima A de cadena larga

Ademas de las caracteristicas comunes referidas con anterioridad, esta alteración puede condicionar miocardiopatía neuropatia sensitiva, retinopatía pigmentaria y hepatopatía con elevacion del lactato.

#### 2.4.4 Deficiencia de 3 hidroxi acil coenzima A deshidrogenasa de cadena larga,

#### 2.4.5 Deficiencia de 3 hidroxi acil coenzima A deshidrogenasa de cadena corta, y

#### 2.4.6 Deficiencia de acil coenzima A deshidrogenasa de cadena muy larga:

Se manifiestan típicamente con mioglobulinuria y con disfuncion hepatica severa.

#### 2.4.7 Deficiencia de acil coenzima A deshidrogenasa de cadena corta:

A diferencia de todos los demás defectos de la  $\beta$ -oxidación esta deficiencia produce hipertonia.

#### 2.4.8 Deficiencia de la flavoproteína transferrora de electrones y

#### 2.4.9 Deficiencia de la flavoproteína transferrora de electrones CoQ oxidoreductasa:

Pueden presentar el cuadro clínico de la deficiencia múltiple de acil coenzima A deshidrogenasa (aciduria glutárica tipo II), olor peculiar que recuerda a la acidemia isovalérica (queso rancio) Puede o no acompañarse de malformaciones congénitas y/o dismorfias caracterizadas por baja implantación de pabellones auriculares, hipertelorismo, frente amplia, hipoplasia del tercio medio de la cara, pie en forma de piolet, hemiación de la pared abdominal y malformación de genitales externos. Cuando se acompaña del cuadro dismórfico el pronóstico se agrava. Estos pacientes responden dramáticamente a grandes dosis de riboflavina

### **3) Clínica, estudios y manejo de los trastornos del Ciclo de Krebs: <sup>5,9,84</sup>**

#### 3.1 Deficiencia de fumarasa

\*Herencia autosómico recesivo. Codificado en cromosoma 1. Se ha identificado una mutación puntual (G955C) en dos pacientes.

\*Inicio: lactantes

\*Cuadro clínico: encefalopatía infantil progresiva y severa con crecimiento inadecuado, hipotonía, imitabilidad que alterna con letargia, microcefalia.

\*Laboratorio: acidosis láctica, hiperamonemia, aciduria fumarica y succinica. El defecto de la fumarasa puede detectarse en todos los tejidos tanto en mitocondrias como en isoenzimas citoplasmicas. En microscopia electronica se detecta proliferacion mitocondrial. En forma prenatal puede provocar hidrocefalia y polihidramnios. \*Tratamiento: no existe.

**3.2 Deficiencia succinato deshidrogenasa:** (Esta deficiencia puede considerarse tanto de Ciclo de Krebs como de la cadena respiratoria)

\*Herencia: autosómica recesiva

\*Inicio: Lactante-pre-escolar, adulto.

\*Cuadro clínico: puede ser heterogéneo.

**3.2.1** En niños: retraso del desarrollo, crecimiento inadecuado, hipotonía, letargia, insuficiencia respiratoria, ataxia y mioclonías.

**3.2.2** En adultos: miopatía con debilidad proximal, intolerancia al ejercicio y mioglobinuria recurrente.

\*Laboratorio: acidosis láctica. La neuroimagen de la presentación infantil puede ser compatible con el Síndrome de Leigh. En la biopsia muscular se encuentra disminución de la actividad de la enzima succinato citocromo c reductasa (complejo II de la cadena respiratoria), con técnicas de histoquímica se pueden detectar fibras rojas rasgadas y ausencia de tinción para succinato deshidrogenasa. Concomitantemente en algunos casos se presenta deficiencia de la enzima aconitasa.

Tratamiento: no existe.

**3.3** Otras deficiencias enzimáticas del Ciclo de Krebs son mucho más raras.

**3.3.1 Deficiencia de  $\alpha$ -cetooglutarato deshidrogenasa:**

Esta enzima comparte una subunidad con otras tres enzimas, a saber:  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa, dihidroliipoil deshidrogenasa (E3 de PDHC) y cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada. Se ha descrito en lactantes con cuadro clínico parecido a la deficiencia de fumarasa pero a diferencia de éstos se aprecia aciduria con elevación de los siguientes ácidos orgánicos:  $\alpha$ -cetooglutarato, piruvato, lactato, y  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada.

### 3.3.2 Deficiencia de aconitasa

Esta deficiencia se asocia con alteraciones del metabolismo de grupos hierro-azufre en jóvenes con intolerancia al ejercicio y mioglobinuria

## **B. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES POR DEFECTOS TANTO DEL GENOMA NUCLEAR COMO DEL GENOMA MITOCONDRIAL**

1) Clínica, estudios y manejo de los trastornos de la cadena respiratoria: <sup>6,9,84,85</sup>

### 1.1 Deficiencia del Complejo I (NADH-DeH)

(NADH-coenzima Q oxidoreductasa)

\*Herencia contiene 35 a 40 polipeptidos y varios componentes no proteicos. Siete de estos polipeptidos son codificados por el DNAmít y el resto por el DNAn. Por lo que puede estar asociado a herencia autosómica o mitocondrial

\*Inicio: Infancia, niñez o vida adulta

\*Cuadro clínico Tres síndromes principales

#### 1.1.1 Multisistémico infantil

Hipotonía generalizada neonatal, retraso psicomotor, cardiopatía e insuficiencia  
cardiorespiratoria mortal

#### 1.1.2 Miopatía benigna.

Intolerancia al ejercicio y debilidad estacionaria en niños o adultos.

#### 1.1.3 Encefalomiopatía.

Combinación de signos y síntomas en niños o adultos que pueden incluir: oftalmoplejía, crisis convulsivas (epilepsia parcial continua), sordera neurosensorial, retinosis pigmentaria, ataxia, neuropatía sensitiva, demencia y movimientos involuntarios. En algunos casos episodios pseudoicticos.

\*Laboratorio: acidosis láctica que puede llegar a ser muy alta, especialmente después del ejercicio. En los niños puede encontrarse un patrón de imagen cerebral compatible con síndrome de Leigh. En la biopsia muscular se detectan en la forma infantil mitocondrias anormales e infiltración grasa y en la forma miopática pueden llegar a encontrarse FRR. Así mismo en el músculo se determina la deficiencia enzimática.

\*Tratamiento para la forma infantil no existe y para la forma miopática se utilizan dosis elevadas de riboflavina y succinato sódico.

### 1.2. Deficiencia del Complejo II (SCCR)

(succinato - coenzima Q oxidoreductasa)

Comentada con anterioridad en las alteraciones del Ciclo de Krebs, como succinato deshidrogenasa. Este complejo contiene solo polipéptidos codificados por el ADN.

### 1.3. Deficiencia del Complejo III (CCR)

(Coenzima Q-citocromo c oxidoreductasa)

\*Herencia de las 11 subunidades que se compone este complejo, sólo una (el citocromo b) está codificada por el DNAm. Por lo que su herencia es predominantemente autosómica recesiva.

\*Inicio: lactancia, niñez o vida adulta.

\*Cuadro clínico se han descrito 4 presentaciones:

1.3.1. Encefalomiopática infantil: en esta edad las manifestaciones son severas con hipotonía, postura distónica, crisis convulsivas y estado de coma.

1.3.2. Encefalomiopática de inicio tardío: se presenta desde la niñez o en adultos con la combinación de uno o más de los siguientes signos, en los que en forma vanada pueden

incluir debilidad, talla baja, ataxia, demencia, sordera neurosensorial, neuropatía sensitiva, y retinosis pigmentaria

**1.3.3 Miopática:** se manifiesta por intolerancia al ejercicio y debilidad estacionaria.

**1.3.4 Cardiomiopatía histiocitoide infantil**

\*Laboratorio: acidosis láctica de severidad variable. En la biopsia muscular se puede detectar la deficiencia de la actividad enzimática.

\*Tratamiento en los casos leves las vitamina K y C pueden tener algún beneficio.

#### 1.4 Deficiencia del complejo IV (COX)

(citocromo c oxidasa)

\*Herencia:este complejo esta conformado por 13 subunidades, tres de las cuales (subunidades I, II y III) se codifican por el DNAmt Su herencia es autosómica recesiva.

\*Inicio:lactancia y niñez

\*Cuadro clínico.existen dos presentaciones

**1.4.1 Encefalomiopatía** esta es una de las tres principales causas de síndrome de Leigh, que se caracteriza por demencia, ataxia, atrofia óptica, oftalmoplejía, nistagmus, distonía, síndrome piramidal, e insuficiencia respiratoria El síndrome de Leigh por deficiencia de citocromo c oxidasa es clínicamente diferente al que se presenta por deficiencia del complejo de piruvato deshidrogenasa Este último trastorno inicia los síntomas desde el periodo neonatal y hasta la lactancia, la muerte sobreviene entre los 6 y 12 meses de edad por convulsiones y apnea recurrente. El síndrome de Leigh por deficiencia de citocromo c oxidasa tiene una evolución más lenta con desaceleración del crecimiento cefálico y neuropatía periférica, rara vez se presentan crisis convulsivas. Existen otras causas no mitocondriales del síndrome de Leigh, que son menos frecuentes.

**1.4.2 Miopatía:** en esta forma hay dos variantes, una fatal y una benigna, con hipotonía generalizada e insuficiencia respiratoria. En la variante fatal la muerte ocurre en la mayoría de los casos antes del año de edad y en la forma benigna puede mejorar espontáneamente entre los 2 y 3 años de edad. Se puede asociar al síndrome renal De Tony - Fanconi.

\*Laboratorio: acidosis láctica cuya intensidad está relacionada con la severidad del cuadro clínico. El síndrome renal De Tony - Fanconi se caracteriza por glucosuria, fosfatúria y aminoaciduria. En la biopsia muscular pueden detectarse FRR en las formas miopáticas sintomáticas, que pueden desaparecer al normalizarse la actividad enzimática de COX. Sin embargo, las FRR son infrecuentes en el síndrome de Leigh.

En la biopsia muscular se detectan grados variables de deficiencia de COX. La tinción histoquímica para COX y la inmunohistoquímica con anticuerpos contra la subunidad VIIa son formas específicas para hacer el diagnóstico.

#### 1.5 Deficiencia del complejo V (ATPasa):

(ATP sintetasa)

\*Herencia: este complejo está formado por 12 a 14 subunidades, dos de las cuales (ATP6 y ATP8) están codificadas por el DNAm. Se han descrito deficiencias en la subunidad ATP6.

\*Inicio: sólo se ha descrito en adultos.

\*Cuadro clínico: existen hasta ahora dos presentaciones, una como miopatía congénita de muy lenta progresión y la otra caracterizada por demencia, retinopatía, ataxia, neuropatía periférica y debilidad muscular.

\*Laboratorio: en la forma miopática se pueden detectar FRR.

\*Tratamiento: no descrito.

#### 1.6 Deficiencia de la coenzima Q<sub>10</sub>:

La coenzima Q actúa como lanzadera de electrones entre los complejos I y II y el complejo III.

\*Herencia: probablemente autosómica recesiva

\*Inicio: infancia

\*Cuadro clínico: descrito en dos hermanas que presentaban retraso mental, crisis convulsivas, debilidad progresiva, intolerancia al ejercicio.

\*Laboratorio: lactato y CPK elevados en sangre. Disminución de la concentración de la coenzima Q en el músculo, sin embargo en fibroblastos y suero las concentraciones fueron normales.

\*Tratamiento: coenzima Q<sub>10</sub>

### 1.7 Defectos del acoplamiento oxidación / fosforilación:

(Enfermedad de Luft)

\*Herencia: esporádica. Los dos casos referidos en la literatura son del género femenino.

\*Inicio: adolescencia.

\*Cuadro clínico: se caracteriza por un estado de hipermetabolismo no tiroideo, con fiebre, intolerancia al calor, transpiración profusa, polifagia, polidipsia, taquicardia. A pesar de que existe intolerancia al ejercicio, la debilidad muscular es leve.

\*Laboratorio: hipermetabolismo con pruebas tiroideas normales. Aumento del índice respiratorio mitocondrial, incluso en ausencia de ADP. En la biopsia muscular se detectan FRR y proliferación capilar intramuscular.

2) Clínica, estudios y manejo de los trastornos de la importación de proteínas:<sup>5,8,94</sup>

\*Herencia: sólo hay pocos casos con pruebas mitocondriales indirectas, por lo que no se conoce el tipo de herencia. Sin embargo, dado que toda la maquinaria de importación es de origen nuclear, probablemente esté asociada a herencia medeliana.

\*Inicio: 2 casos descritos en pacientes adolescentes que iniciaron desde la infancia.

\*Cuadro clínico: miopatía progresiva que llevó a la postración y a la alimentación por gastrostomía.

\*Laboratorio: Elevación corporal del lactato. En la biopsia muscular no se encontraron FRR, algunas fibras con tinción para COX negativa y el total de las fibras fue negativa a la tinción para SDH. En uno de los casos se detectó una deficiencia combinada de las enzimas de la cadena respiratoria. El complejo sulfuro-férrico de la SDH y del complejo III se encontró normal en el citoplasma y el defecto fue detectado solamente en la fracción de mitocondrias aisladas.

\*Tratamiento: no se conoce.

### 3) Clínica, estudios y manejo de los trastornos de señalización intergenómica:<sup>4,8,9</sup>

Estos defectos se manifiestan en dos grandes grupos, el primero con herencia autosómica dominante y el segundo autosómico recesivo, caracterizados por ablaciones múltiples o pérdida total del DNAm:

#### 3.1 Ablaciones múltiples del DNAm

Existen dos tipos, uno con herencia autosómica dominante con oftalmoplejía progresiva sin cardiomiopatía y el otro autosómico recesivo con oftalmoplejía progresiva con cardiomiopatía.

##### 3.1.1 Oftalmoplejía progresiva sin cardiopatía:

\*Herencia autosómica dominante

\*Inicio: niñez y adulto joven

\*Cuadro clínico: intolerancia al ejercicio, miopatía con oftalmoplejía progresiva, cataratas bilaterales y muerte prematura. En dos casos de origen japonés se presentó además atrofia óptica y ptosis palpebral y neuropatía periférica. Un caso francés tuvo incoordinación motora en episodios recurrentes, somnolencia, coma. Se ha descrito una familia finlandesa con depresión mental severa, asociada a defectos del cromosoma 10.

\*Laboratorio: acidosis láctica variable. En los casos del Japón, presentaron mioglobinuria recurrente, el caso francés se asoció cetoacidosis. En la biopsia muscular se detectan FRR y deficiencia parcial combinada de enzimas de la cadena respiratoria.

\*Tratamiento: no reportado

### 3.1.2 Oftalmoplejía progresiva con cardiopatía:

\*Herencia: autosómica recesiva

\*Inicio: lactancia

\*Cuadro clínico: se describió en dos familias de Arabia Saudita, una de ellas con antecedentes de consanguinidad. Tanto la oftalmoplejía como la cardiomiopatía hipertrófica tuvieron una evolución progresiva, ésta última de intensidad severa que lo llevó a la muerte por insuficiencia cardíaca a temprana edad.

\*Laboratorio: En el músculo se detectaron FRR.

### 3.2 Pérdida total del DNAm

Esta alteración tiene una expresión tisular variable

\*Herencia: probablemente autosómica recesiva

\*Inicio: neonatal y lactantes menores.

\*Cuadro clínico: Existen tres formas clínicas con manifestaciones de:

1) miopatía congénita, 2) miopatía infantil y 3) hepatopatía.

**3.2.1 Miopatía congénita hipotonía neonatal severa con insuficiencia respiratoria y síndrome de De Toni-Fanconi.**

**3.2.2 Miopatía infantil. demencia asociada a debilidad muscular que se presenta al año de edad, que tiene una evolución rápidamente progresiva y mortal.**

**3.2.3 Hepatopatía: hepatomegalia con insuficiencia hepática mortal asociada a miopatía congénita.**

\*Laboratorio: CPK elevada, con acidosis láctica de intensidad variable, incluso leve. En músculo, entre más larga sea la evolución, se pueden detectar FRR, y alteraciones histoquímicas variables caracterizadas por fibras COX negativas o de otras enzimas de la cadena respiratoria.

\*Tratamiento: no reportado

### **C. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES ASOCIADAS A MUTACIONES DEL GENOMA MITOCONDRIAL**

Las manifestaciones sindromáticas de las mutaciones del genoma mitocondrial se dividen en:

- 1) Re-ordenamientos (ablaciones o duplicaciones) a gran escala
- 2) Mutaciones puntuales

Es interesante señalar que algunos re-ordenamientos se pueden asociar a manifestaciones clínicas de algunas mutaciones puntuales.

- 1) Clínica, estudios y manejo de los trastornos por re-ordenamiento del DNAm: 5, 9, 26, 74, 94, 96



Las mutaciones por re-ordenamiento comparten características esenciales: la mayoría se presentan en forma esporádica (no hereditaria) y se producen por pérdida de material genético.

Existen dos tipos de re-ordenamientos: las ablaciones y las duplicaciones

1.1 ABLACIONES, (en inglés deletions) generalmente esporádicas.

1.1.2 Síndrome de Keams-Sayre:

Es la mutación del DNAmT más frecuentemente detectada. Existe un sitio de ablación común, de aproximadamente 5 kb.

\*Herencia: no tiene, casi invariablemente es de presentación esporádica.

\*Inicio: antes de los 20 años.

\*Cuadro clínico: se manifiesta con oftalmoplejía externa progresiva y retinosis pigmentosa, más alguna de las siguientes características: demencia, sordera neurosensorial, síndrome cerebeloso, trastorno del ritmo cardíaco, talla baja, hipoparatiroidismo que puede provocar crisis convulsivas en forma ocasional, diabetes mellitus. Se han descrito asociaciones con episodios pseudoictéricos cerebrales (ver más adelante: MELAS), y con menor frecuencia con *miastenia gravis* juvenil.

\*Laboratorio: acidosis láctica, en LCR hiperproteorraquia (>100mg/dl), deficiencia aislada de hormona de crecimiento, en EKG alteraciones de la conducción cardíaca, que pueden ser causa de muerte súbita. Si existe hipoparatiroidismo se pueden detectar por TAC de cráneo calcificaciones en núcleos basales. En la biopsia muscular se aprecian FRR y fibras COX negativas. Se detecta por análisis tipo Southern en músculo y con menor frecuencia en sangre o en pelo.

\***Tratamiento:** La coenzima Q y la carnitina pueden tener algún beneficio, casi todos los pacientes requieren de marcapaso cardiaco en algún momento de su vida.

### 1.1.3 Síndrome de Pearson

(médula ósea-pancreas)

\***Herencia** no tiene, generalmente es una alteración esporádica.

\***Inicio** lactancia

\***Cuadro clínico:** desnutrición y palidez severas por insuficiencia pancreática exócrina y anemia sideroblástica, con emaciación y muerte en la infancia. Pueden presentar insuficiencia hepática y renal. Algunos sobrevivientes han desarrollado el síndrome de Kearns-Sayre (este es un ejemplo de heteroplasmia tisular del DNAm)

\***Laboratorio:** pancitopenia, deficiencia de las enzimas pancreáticas (función exócrina).

\***Tratamiento** no referido

### 1.1.4 Oftalmoplejia externa progresiva con FRR

(CPEO)

\***Herencia** es una alteración esporádica. Esta presentación puede ser la única diferencia con las otras oftalmoplejias con herencia mendeliana

\***Inicio:** adolescencia - adulto joven

\***Cuadro clínico:** cuadro muy lentamente progresivo caracterizado por debilidad muscular proximal, ptosis y oftalmoplejia externa. Se asocia con mutaciones del DNAm de tipo puntual como MELAS nt-3243 (ver más adelante)

\***Laboratorio:** elevación del lactato en reposo con un incremento característico exorbitante después del ejercicio. En la biopsia muscular FRR y COX negativo.

\***Tratamiento** no establecido

1.2 DUPLICACIONES. generalmente transmitidas por herencia, pero pueden ser esporádicas.

Representa un grupo de trastornos referidos en la literatura con características especiales. Probablemente sean la causa de las "ablaciones" (en inglés deletions) transmitidas del DNAm.

\*Herencia: herencia materna

\*Inicio: variable

\*Cuadro clínico: ataxia, diabetes mellitus y sordera. Se asocia a otras ablaciones como el síndrome de Kearns-Sayre o a mutaciones puntuales en la posición 3243 del RNA de transferencia para la leucina (ver más adelante).

\*Laboratorio: hallazgos compatibles con diabetes mellitus y/o síndrome de Kearns-Sayre, referido arriba

\*Tratamiento: control de la diabetes mellitus

## 2) Clínica, estudios y manejo de los trastornos por mutaciones puntuales del DNAm:

6, 9, 36, 74, 84, 89

Las mutaciones puntuales comparten características esenciales: son de transmisión materna y se producen por el cambio de un nucleótido por otro, sin pérdida de material genético. Las más importantes se denominan por las iniciales de sus características clínicas. Se han publicado un sinnúmero de enfermedades relacionadas con mutaciones puntuales, hasta mediados de la década de los noventa se habían referido 30 síndromes y al paso del tiempo se detectan más mutaciones novedosas.

Las mutaciones puntuales pueden clasificarse en dos tipos:

1) Mutaciones puntuales del DNAm<sup>t</sup> que afectan los mecanismos de síntesis proteica a través del RNA de transferencia

2) Mutaciones puntuales del DNAm<sup>t</sup> que alteran genes estructurales del genoma mitocondrial.

La acumulación de dos o más mutaciones puntuales patógenas en un mismo paciente aumenta de forma progresiva las probabilidades de expresión clínica del genotipo.

## 2.1 MUTACIONES PUNTUALES DE DNAm<sup>t</sup> DE GENES ENCARGADOS DE LA SÍNTESIS PROTEICA <sup>6,9,36,74,84,86</sup>

Los 2 trastornos clínicos más frecuentes que afectan al RNA de transferencia, MERRF y MELAS han sido ampliamente descritos en la literatura. Sin embargo cada día se acumulan descripciones de nuevas mutaciones puntuales que afectan al RNA de transferencia con características clínicas distintivas

1) Epilepsia mioclónica con Fibras Rojas Rasgadas (MERRF)

2) Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios pseudoicticos (MELAS)

Otros trastornos menos frecuentes son

3) Miopatía y Cardiomiopatía

4) Síndrome de Diabetes mellitus y sordera neurosensorial transmitida por la madre.

5) Encefalomiopatía y cardiomiopatía

Todos ellos comparten características como: la herencia materna, la denominación por sus características clínicas más relevantes y la presencia muy frecuente de FRR en el estudio muscular de estos pacientes. Sin embargo cabe señalar que algunos fenotipos de MELAS y MERRF no tienen mutaciones puntuales y por el contrario, mutaciones puntuales en el gen

de esos mismos RNA de transferencia produce fenotipos diferentes, menos frecuentes, recientemente detectados.

#### 2.1.1 *Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas:*

##### **(MERRF)**

\*Herencia: materna. Cambio de la base nitrogenada A por G, en el nucleótido nt-8344 (A8344G) en el gen que codifica al RNA de transferencia para la lisina (tRNA<sup>Lys</sup>). Otra mutación que provoca **MERRF** en el mismo gen es T8356C.

\*Inicio: desde la niñez hasta la vida adulta

\*Cuadro clínico: epilepsia parcial continua, mioclono, ataxia cerebelosa y por alteración de los cordones posteriores (alteración de la sensibilidad profunda), y miopatía. Otros signos asociados son: talla baja, demencia, sordera, atrofia óptica, neuropatía periférica y espasticidad. Existen casos que presentan lipomas en cuello y tronco. Es importante destacar que no todos los pacientes con este fenotipo presentan la mutación puntual.

\*Laboratorio: acidosis láctica. En la biopsia muscular las FRR son muy características, intercaladas con fibras COX negativas.

\*Tratamiento: no referido.

#### 2.1.2 *Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios pseudolicticos:*

##### **(MELAS)**

\*Herencia: materna. La mutación más frecuente es A3243G en el gen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Sin embargo se han identificado otras mutaciones puntuales en el gen estructural que codifica para la subunidad de COX III. Mutaciones puntuales en el gen de ese mismo RNA de transferencia pueden producir otros fenotipos (miopatía, cardiopatía, diabetes mellitus y/o sordera).

\*Inicio: desde la niñez y hasta la vida adulta antes de los 40 años.

\*Cuadro clínico: la sílaba "ME", abrevia las palabras "mitochondrial encephalopathy" y la "S" de las siglas MELAS, se refiere al término en inglés "stroke-like" que significa pseudoictus vascular cerebral, el cual se manifiesta como hemiparesia o hemianopsia. Así mismo pueden presentarse episodios migrañoides. Convulsiones parciales o generalizadas y demencia son hallazgos constantes precedidos por vómitos cíclicos e intolerancia al ejercicio. Puede asociarse oftalmoparesia externa en 10% de los casos.

\*Laboratorio: la sílaba "LA", abrevia las palabras "lactic acidosis", ya que la acidosis láctica es una característica constante. Puede haber elevación de proteínas en el LCR. La biopsia muscular demuestra FRR, COX y SDH positivos. Por neuroimagen (TAC/IRM) se detectan hallazgos característicos.

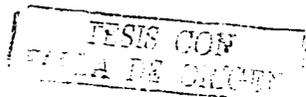
\*Tratamiento: no referido.

### 2.1.3 Miopatía y Cardiomiopatía

Herencia: materna, mutación puntal en el genoma mitocondrial que codifica para el RNA de transferencia<sup>lev(UUR)</sup>, que aunque es una mutación diferente, afecta al mismo gen que produce MELAS.

\*Inicio: tercera década de la vida.

\*Cuadro clínico: Inicialmente intolerancia al ejercicio con o sin disnea y posteriormente debilidad muscular generalizada de los músculos esqueléticos de las extremidades y datos clínicos de cardiomiopatía con cardiomegalia y edema hepático. Sin afección del sistema nervioso central. Se han descrito casos con cataratas, diabetes insulino dependiente y síndrome pre excitación Wolff-Parkinson White.



\*Laboratorio: pueden estar elevados CPK , y el lactato. EMG anormal sólo en algunos casos. Ecocardiograma muestra cardiomegalia En músculo hay FRR y disminución de la actividad de COX.

\*Tratamiento: No referido.

#### 2.1.4 Síndrome de diabetes mellitus y sordera neurosensorial transmitida por la madre.

\*Herencia materna Mutación en la posición 3243 del genoma mitocondrial que codifica para RNA de transferencia<sup>leu(UUR)</sup>, mismo que provoca MELAS.

\*Inicio: variable

\*Cuadro clínico: diabetes mellitus, sordera neurosensorial y cardiomiopatía sin afección muscular ni del sistema nervioso central. Puede asociarse retinopatía.

\*Laboratorio: La mayoría presentan acidosis láctica, resistencia a la insulina, alteración de los potenciales evocados auditivos, cardiomegalia y en la biopsia muscular se pueden detectar FRR.

\*Tratamiento: sintomático

#### 2.1.5 Encefalomiopatía y cardiomiopatía

\*Herencia: probablemente materna

\*Inicio: lactancia

\*Cuadro clínico: demencia, crisis convulsivas, paresia de extremidades, hipotonía con hiporreflexia que evoluciona a espasticidad, nistagmus. Cardiomiopatía hipertrófica.

\*Laboratorio: hiperproteinoorraquia, hiperlactatemia, TAC de cráneo con atrofia cortico-subcortical progresiva, el EEG con descargas punta-onda, la biopsia muscular sin FRR. Ecocardiograma con cardiomiopatía hipertrófica. Esta entidad tiene evolución fatal.

\*Tratamiento: sintomático.

## 2.2 MUTACIONES PUNTUALES DE GENES ESTRUCTURALES DEL DNAm:

### 2.2.1 Neuropatía óptica hereditaria de Leber

(LHON)

\*Herencia: materna. La mayor prevalencia de varones (85%) sugiere que probablemente exista un efecto modulador relacionado con el cromosoma X, como factor para la expresión de esta mutación. Se han identificado aproximadamente una docena de mutaciones en distintos sitios del DNAm, algunas de estas "mutaciones primarias" en forma aislada pueden ocasionar la enfermedad, sin embargo otras llamadas "mutaciones secundarias" sólo se manifiestan si coexisten con mutaciones del DNAm diferentes. Existe una variante que se acompaña de distonía, la cual se asocia a una mutación puntual G14459A. La primera mutación descrita afectaba al gen de la subunidad ND4 del complejo I

\*Inicio: adultos jóvenes alrededor de los 20 años, aunque se han referido de 5 años de edad.

\*Cuadro clínico: pérdida de la agudeza visual súbita, generalmente bilateral. Se presenta edema de papila con microangiopatía. Con poca frecuencia pueden asociarse alteraciones psiquiátricas, signos de afección piramidal, incoordinación motora por distonía y/o neuropatía periférica. El trastorno tiende a estabilizarse después de la pérdida subaguda de la visión.

\*Laboratorio: se han descrito casos con bloqueo cardiaco en el EKG, característicamente no se eleva el lactato. En la biopsia muscular no se detectan FRR, sin embargo aumenta la tinción para SDH. En un caso familiar se encontraron alteraciones ultraestructurales.

\*Tratamiento: no referido.

### 2.2.2 Neuropatía, ataxia, retinosis pigmentaria

**(NARP)**

\*Herencia: materna, descrita en una familia. Mutación puntual del DNAm<sup>t</sup> heteroplásmica T8993G de la subunidad 6 de la ATPasa mitocondrial. Algunos parientes de enfermos con **NARP**, pueden padecer **MILS** (ver más adelante).

\*Inicio: desde la etapa pre-escolar hasta la adultez.

\*Cuadro clínico: retraso en el desarrollo, ataxia y piramidalismo (hipertonía, hiperreflexia y Babinski), retinopatía pigmentaria, demencia, convulsiones, neuropatía sensitiva. Evolución lentamente progresiva.

\*Laboratorio: la acidosis láctica no es constante. En la biopsia muscular no se detectan FRR, sino atrofia neurogénica. Correlación bioquímica con síndrome de Leigh.

\*Tratamiento: no referido.

**2.2.3 Síndrome de Leigh con herencia materna**

**(MILS)**

Esta es una de las causas más frecuente del denominado síndrome de Leigh. Después de que se han descartado deficiencia de PDHC y deficiencia de COX, respectivamente.

\*Herencia:materna. Algunos familiares maternos pueden ser portadores de **NARP**. De hecho la mutación relacionada con este síndrome es la misma que para **NARP** (T8993G), pero con una afección de mucho mayor número de genomas mitocondriales (>90%). Otras mutaciones detectadas menos frecuentes son: en el mismo nucleótido(T8993C) y diferente mutación en el mismo genoma (T9176C), con cuadros clínicos similares a Leigh pero menos severos.

\*Inicio:lactancia

\*Cuadro clínico: retraso psicomotor, hipotonía, signos piramidales, crisis convulsivas, ataxia, oftalmoparesia, retinitis pigmentosa. Esta última es característica distintiva solo de MILS.

\*Laboratorio: acidosis láctica, en neuroimagen (TAC-IRM) se demuestran lesiones compatibles con necrosis bilateral del núcleo estriado, en el estudio muscular no se detectan FRR

\*Tratamiento sintomático. Este síndrome es progresivo y los pacientes no sobreviven más de 2 años

#### 2.2.4. Oftalmoplejia externa progresiva por herencia materna:

(PEO materna)

\*Herencia: materna en donde se observa la mutación A3243G típica de **MELAS**, en otras se pueden ver en forma aislada o asociada a síntomas multisistémicos.

\*Inicio semejante a **MELAS**.

\*Cuadro clínico: la oftalmoplejia es el dato más sobresaliente. Sin embargo, se acompaña de otros signos como sordera, endocrinopatía, ataxia, retinopatía pigmentana.

\*Laboratorio: acidosis láctica que es menos frecuente que en **MELAS**, bloqueo cardíaco. En la histología de la biopsia muscular aparecen FRR, y fibras COX negativas más frecuentes que en **MELAS**. \*Tratamiento: No refendo

## 12. SERIES DE CASOS DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

\*\* Serie de Holt y cols (1989)<sup>30</sup> con 72 casos (niños y adultos) de mitocondriopatías con descripción clínica y bioquímica en pacientes desde el nacimiento hasta los 61 años.

\*\* Serie de Tulinius y cols (1991)<sup>31</sup> de 50 casos pediátricos seleccionados prolectivamente sobre criterios clínicos (enfermedad SNC o neuromuscular) y de laboratorio (hiperlactatemia) que sugerían mitocondriopatías. Se categorizaron los pacientes en tres

grupos basados en criterios diagnósticos. De los 50 casos estudiados se confirmaron 20 con mitocondriopatía.

\*\* Serie de Mathews y cols (1991) <sup>70</sup> estudiaron el músculo gastrocnemio "in vivo" de 17 pacientes con una técnica no invasiva con fósforo-MRS, concluyen que esta técnica es específica y sensible, que apoya en forma importante el diagnóstico asociada a otras estudios.

\*\* Serie de Santorelli y cols (1993) <sup>69</sup> refiere 12 pacientes con síndrome de Leigh presentes en 10 familias.

\*\* Serie de Arpa y cols (1994) <sup>49</sup> refiere 15 pacientes, agrupados por 5 características: clínicas, intolerancia al ejercicio, miopatía, PEO, encefalopatía y acidosis con cardiomiopatía. Se les realizó evaluación ergométrica por bicicleta, estudios neurofisiológicos (EMG y VCN), neuroimagen, biopsia muscular y en algunos autopsia, ensayos bioquímicos y un estudio genético molecular. Concluye que el espectro clínico de las mitocondriopatías es cada vez mayor. El diagnóstico depende de la sospecha clínica apoyada en estudios bioquímicos apropiados, de la biopsia del músculo esquelético y de las técnicas de genética molecular

\*\* Serie de Jackson y cols (1995) <sup>42</sup> menciona 51 pacientes con enfermedades mitocondriales de la cadena respiratoria, el estudio consideró los exámenes clínicos rutinarios disponibles que incluyeron metabolitos intermedios del ayuno (lactato, piruvato, cuerpos cetónicos) en sangre y LCR, CPK, EMG, EEG, CT, MRI y estudio histoquímico y morfológico de biopsia muscular. Sugiere cómo deben de ser investigados los pacientes sospechosos en centros no especializados.

\*\* Serie de Anan y cols (1995)<sup>90</sup> describen 17 pacientes con MERRF, MELAS, miopatía ocular. Comentan las alteraciones cardíacas, que son variables en los diferentes subgrupos de mitocondriopatías

\*\* Servidein S (1997)<sup>91</sup> recopiló todas las mutaciones genéticas de las encefalomiopatías mitocondriales descritas en la literatura hasta 1997

\*\* Serie de Uusimaa (2000)<sup>92</sup> estudio prospectivamente 116 niños finlandeses con retraso mental inexplicable asociado a encefalopatía y/o miopatía en un periodo de 7 años. Encontrando que el 15% de estos pacientes eran portadores de alguna citopatía mitocondrial

\*\* Serie de Vladutiu (2001)<sup>93</sup> realizó un estudio retrospectivo de 1025 biopsias musculares de pacientes con sospecha de mitocondriopatía (310 adultos, 501 niños y 214 lactantes). Demuestra que el aumento de la actividad de la enzima citrato sintetasa tiene una discriminación estadísticamente significativa, en los pacientes con deficiencia de la cadena respiratoria en todos los grupos de edad estudiados. Refiere que a diferencia de los adultos, en los niños hubo menor afección muscular y mayor alteración del desarrollo

\*\* Dann N y cols (2001)<sup>94</sup> publican los siguientes índices epidemiológicos de una población pediátrica sueca de 37 casos estudiados en 14 años:

Incidencia: en niños menores de 16 años es de 1 en 11.000, en pre-escolares de 1 en 32.000 para el síndrome de Leigh y de 1 en 51.000 en pre-escolares con síndrome de Alper y deficiencia de COX. Prevalencia: encefalomiopatías mitocondriales en pacientes menores de 16 años es de 1 en 21.000

### **13. ANTECEDENTES PARTICULARES QUE MOTIVARON LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE ESTUDIO.**

En el Servicio de Neurología del Instituto Nacional de Pediatría se llevó a cabo un estudio de 1989 a 1994, sobre el síndrome demencial en niños, de una población de 99 casos, se detectaron 8 con encefalomiopatía sugestivos de disfunción mitocondrial<sup>94</sup>. A 2 de éstos se les realizó estudio genético molecular, con el apoyo del Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México uno con una interrupción del genoma mitocondrial en el Síndrome de Kearns-Sayre<sup>95</sup> y el otro con una mutación nueva de tipo puntual, nunca antes referida en la literatura<sup>96</sup>.

### **II. JUSTIFICACIÓN**

El estudio de las enfermedades mitocondriales constituye un reto diagnóstico por su heterogénea presentación clínica, bioquímica y molecular. Cada día se describen nuevos casos en todo el mundo, provocados por mutaciones tanto del genoma nuclear como del mitocondrial. Se han propuesto flujogramas para su diagnóstico, sin embargo, para llevarlos a cabo se necesita infraestructura altamente especializada, lo que limita su detección.

El lactato es el anión más abundante del cuerpo y la hiperlactorraquia es un hallazgo muy frecuente en pacientes con disfunción mitocondrial. El examen cuantitativo del lactato requiere condiciones especiales desde su obtención y transporte hasta su análisis.

Con base en lo anterior, el presente trabajo propone el estudio de la brecha aniónica sérica para medir en forma indirecta y sencilla la concentración de lactato corporal. La elevación del lactato es una de las bases para sospechar el diagnóstico de enfermedad mitocondrial hasta en 90% de los casos referidos. La determinación de la brecha aniónica permitiría

iniciar el abordaje diagnóstico de pacientes con sospecha de mitocondriopatías en forma económica, accesible y confiable

El presente trabajo protocolizado reunió a un grupo multidisciplinario de especialistas en diferentes áreas (médicas y paramédicas) de diversas instituciones de gran prestigio en México (Secretaría de Salud, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Mexicano del Seguro Social, e instituciones de asistencia privada) que se unieron para llevar a cabo el diagnóstico de enfermedades energéticas y mitocondriales de niños en nuestro país.

### **III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Conocer el espectro clínico y paraclínico, la brecha aniónica sérica y su relación con el lactato en líquido cefalorraquídeo en niños con sospecha de mitocondriopatía.

#### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Conocer las características en sangre y LCR de los cuerpos cetónicos (BOH y AA) en niños con sospecha de mitocondriopatía
2. Correlacionar la concentración del lactato en sangre y LCR respectivamente con los valores de la brecha aniónica sérica
3. Correlacionar los índices L/P en sangre y LCR respectivamente con los valores de la brecha aniónica sérica
4. Describir los estudios neurofisiológicos y de imagen cerebral que apoyaron la sospecha de enfermedad mitocondrial
5. Describir el espectro clínico y las características histopatológicas, histoquímicas y de genética molecular en el diagnóstico de mitocondriopatías en niños.

#### **IV. HIPÓTESIS**

1. Existe correlación significativa de los valores de lactato en sangre y LCR con la brecha aniónica sérica de niños con sospecha de enfermedad mitocondrial
2. La brecha aniónica sérica puede ser una herramienta útil para el diagnóstico de mitocondriopatías (en ausencia de acceso a exámenes cuantitativos de lactato). Dicha prueba muestra sensibilidad, especificidad y valores predictivos

#### **V. MATERIAL Y METODOS**

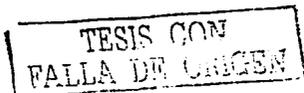
##### **1. POBLACIÓN OBJETIVO**

Estudio comparativo de tipo transversal y prolectivo que se realizó en la Ciudad de México de marzo 1997 a marzo del 2000, con pacientes de ambos géneros mayores de 30 días y menores de 19 años de edad con expediente clínico en el Instituto Nacional de Pediatría, valorados en hospitalización o consulta externa de Neurología Pediátrica, con diagnóstico presuncional de mitocondriopatía.

##### **2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Pacientes con manifestaciones clínicas de miopatía y/o encefalopatía con al menos una de las siguientes condiciones:

- a) Inexplicable asociación patológica (clínica y/o bioquímica) de órganos o tejidos no relacionados en un mismo paciente (dysfunción hepática, renal y/o miocárdica).
- b) Curso progresivo igual o mayor de 3 meses, sin diagnóstico etiológico establecido después de 3 meses de estudios en hospital pediátrico de tercer nivel.



### 3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron aquellos casos que presentaran por lo menos una de las siguientes condiciones que pudieran incrementar la brecha aniónica y la determinación de lactato:

- a) Meningitis bacteriana o viral
- b) Diabetes en descontrol
- c) Estado hiperosmolar
- d) Hipokalemia o hiponatremia no corregidas
- e) Descontrol de crisis convulsivas (48 hrs próximas a la determinación de lactato)
- f) Insuficiencia circulatoria (estado de choque)

### 4. CRITERIOS PARA CONSIDERAR EL DIAGNÓSTICO DE MITOCONDRIOPATÍA

Al menos uno de los siguientes

- 1) Disfunción mitocondrial por deficiencia en la actividad de la cadena respiratoria mínima (< 50%), parcial (50-75%), total (>75%).
- 2) Disfunción de la beta oxidación por incapacidad para formar cuerpos cetónicos.
- 3) Presencia de fibras rojas rasgadas en el tejido muscular por tinción de Gomori.
- 4) Presencia de ablación del genoma mitocondrial por biología molecular (no se exploraron exhaustivamente presencia de mutaciones puntuales)

### 5. VALORACIONES

La selección de los pacientes se llevo a cabo por la misma neuróloga pediatra a través de historia clínica completa y bajo los criterios antes mencionados, con carta informativa y autorización firmada por los padres

Con excepción de la valoración neurológica, existió cegamiento de los resultados entre los diferentes investigadores de los estudios de laboratorio y gabinete.

Se realizaron valoraciones cardíaca y endocrinológica por cardiólogo y endocrinólogo peditras del INP.

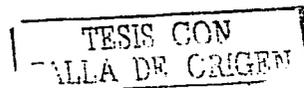
Todos los pacientes tuvieron biometría hemática completa, química sanguínea, electrolitos séricos (Na, K, Cl,  $\text{PCO}_2$ , P, Ca Mg,  $\text{HCO}_3$ ), determinación de pruebas de función hepática (transaminasas, albúmina, amonio) y de función renal (depuración de creatinina, examen general de orina, gasometría venosa y fracciones excretadas de sodio y potasio). Dichos exámenes se realizaron en los laboratorios centrales del INP. Hematología, Autoanalizador y Nefrología

## 6. ESTUDIOS ESPECIALIZADOS DE LABORATORIO

Cuantificación, simultánea de lactato, piruvato, betahidroxibutirato y acetoacetato en sangre y LCR (5ml y 2ml respectivamente) bajo sedación anestésica con propofol. Se utilizaron tubos previamente preparados con solución amortiguadora, transportados en hielo para su análisis inmediato en el laboratorio de Genética de la Nutrición del INP, donde una misma persona realizó el análisis cuantitativo de todos los casos, con la técnica descrita por Bemeyer en 1988<sup>31</sup>. En el mismo Servicio de Genética de la Nutrición se llevó a cabo la cromatografía líquida de alta resolución para aminoácidos (HPLC)<sup>90,99</sup>, y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para ácidos orgánicos (CGEM) en orina, medida en unidades mmol/mol creatinina<sup>100,101,102</sup>.

A partir de orina tomada al azar e inmediatamente congelada a  $-20^\circ\text{C}$  después de su obtención, se realizó la determinación de los ácidos orgánicos por CGEM después de su extracción en fase sólida

*Extracción en fase sólida*



Para la extracción de los ácidos orgánicos se utilizaron cartuchos de silica-gel (Spe-ed 1000 / 6ml), que fueron acondicionados lavándolos primero con 4 ml de HCl 0.1 M en metanol y después con 4ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM en metanol. Los cartuchos se secaron con vacío antes de su uso. La orina fue acidificada y cada muestra (volumen necesario de orina para tener 0.5 μmol de creatinina) fue aplicada a un cartucho acondicionado. Cada cartucho se secó con vacío por 15 mins. los ácidos orgánicos se eluyeron con 2ml de 20% (v/v) t-butanol/cloroformo, que fueron recolectados en tubos de vidrio con tapón de rosca. Se adicionaron 100 μl de NaOH 0.05 N en metanol y se llevaron a sequedad en un rotoevaporador

#### *Procedimiento de silanización*

Los derivados trimetilsilano fueron formados adicionando 100 μl de N, O-bis-(trimetilsilil)-acetamida (BSTFA) y calentando las muestras durante 30 minutos a 60 °C.

#### *Análisis de los derivados por CGEM*

Se obtuvo el perfil de ácidos orgánicos inyectando 1 μl de cada muestra a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890, acoplado a un detector de masas Hewlett-Packard modelo 5971A. Se usó una columna de metilfenilsilicón de 25m, 25μ de espesor de película, 0.25mm de diámetro. El programa de temperatura de la columna fue: temperatura inicial 40 °C por 5 min, temperatura final 280 °C por 2 min, velocidad de calentamiento 10 °C por min. La temperatura del inyector fue de 250 °C, la de la línea de transferencia 280 °C y de la fuente 150 °C. El tipo de inyección fue Spitless con un tiempo de encendido de la purga de 2 min. Se realizó monitoreo total de iones ("scan") en el intervalo m/z de 45 a 650. La concentración fue calculada con el uso de factores de respuesta determinados a partir de las curvas de calibración de los estándares, en las mismas condiciones de análisis, a

través de las áreas de los cromatogramas de extracción iónica de iones únicos (o cercanamente únicos)<sup>102, 103, 104</sup>.

## 7. ESTUDIOS DE GABINETE

Los estudios neurofisiológicos, con excepción del electroretinograma, se realizaron en el INP. Electroencefalograma digital con un equipo de Voyageur, Nicolet; potenciales evocados visuales, auditivos, somatosensoriales con Amplaid MK 15, así como electromiografía y VCN con Viking IV.

Los potenciales evocados en sus tres modalidades (visuales, auditivos y somatosensoriales) se categorizaron por grado de la alteración, que dependió de la amplitud, latencia, conducción e integridad de las ondas detectadas:

- Grado I. Prolongación de latencia.
- Grado II. Prolongación de latencia y tiempo de conducción central, ↓ de la amplitud.
- Grado III. Dispersión de la onda
- Grado IV. Ausencia de respuesta

El estudio de electroretinograma se llevó a cabo en la Asociación para Prevenir la Ceguera en México

La imagen por tomografía axial computarizada de cráneo simple y contrastada se realizó en el Servicio de Radiología del INP con un equipo Toshiba de 4ª. Generación modelo TCT-600 XT. Por otro lado, en la Unidad de Resonancia Magnética de Médica Sur se efectuaron resonancia magnética cerebral, imágenes de T1 - T2 y espectroscopía con equipo Somatom de 1.5 tesla. Los pacientes fueron sometidos a sedación anestésica con propofol para la realización de los estudios de neuroimagen.

## 8. ESTUDIOS MUSCULARES

Prevía autorización por escrito de los familiares, todos los pacientes fueron sometidos a punción venosa y lumbar, para la cuantificación de lactato en sangre y LCR. Inmediatamente después se les realizó biopsia muscular a cielo abierto del cuádriceps derecho, con infiltración local de xilocaína con epinefrina al 0.9%. Ambos procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de asepsia y antisepsia bajo sedación anestésica intravenosa con propofol.

El espécimen muscular fue cortado en cuatro fragmentos, dos de ellos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron llevada a los siguientes laboratorios:

\*Laboratorio del Servicio de Patología del INP, donde las secciones obtenidas con el criostato se tiñeron con HE (tinción con alaninas), con la técnica tricrómica de Gomori modificada, ATPasa a pH 4.6 y 10.4, NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa. Un pequeño fragmento del tejido de biopsia se fijó con glutaraldehído, se postfijó con OsO<sub>4</sub> al 1% y se embebió en epóxido (Epon™) para los estudios ultraestructurales de microscopía electrónica.

\*Laboratorio de Investigación del Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI, para efectuarse los análisis cuantitativos de la cadena respiratoria (complejos I al IV). Las actividades de los complejos respiratorios fueron medidas en presencia de 20 a 40 µl de homogenado de tejido, de acuerdo con el método descrito por DiMauro y cols en 1987<sup>106</sup>, utilizando un espectrofotómetro de doble rayo SLM-Aminco DW-2c.

*Succinato deshidrogenasa. (Complejo II)*

Se siguió la reducción de DCPIP al 0.003% DCPIP en presencia de KCN 1.5mM, succinato 16 mM y fosfato de potasio 0.05 M (pH 7.0).

*Succinato-citocromo c reductasa.* (Complejo II y III)

La actividad fue medida en presencia de citocromo c 0.1 mM, KCN 0.5mM, succinato 3 mM y fosfato de potasio 0.05 M (pH 7.5). La reducción del citocromo c se siguió a 550/540 nm. La reacción se midió en presencia y en ausencia de antimicina A 10  $\mu$ M.

*NADH deshidrogenasa.* (Complejo I)

La oxidación de NADH 0.2 mM se midió a 340 nm en presencia de ferricianuro de potasio 0.85 mM y fosfato de potasio 0.035 mM (pH 7.5).

*NADH-citocromo c reductasa.* (Complejo I - III)

La actividad se midió en presencia de citocromo c 0.1 mM, NADH 0.2 mM, KCN 0.5 mM y fosfato de potasio 0.025 M (pH7.5). La reducción del citocromo c se siguió a 550/540 nm. La actividad se midió en ausencia y en presencia de rotenona 1mM.

*Ubiquinol-citocromo c reductasa.* (Complejo III)

La actividad fue medida en ausencia y presencia de antimicina 10  $\mu$ M en una cubeta que contenía citocromo c de corazón de caballo 0.1% en fosfatos de potasio 0.01M (pH 7.0), siguiendo la reducción del citocromo a 550/540 nm en presencia de DBH 30-50  $\mu$ M.

*Citocromo c oxidasa.* (Complejo IV)

La actividad se midió en presencia de citocromo c reducido 0.1% en fosfato de potasio 0.01 M (pH 7.0), siguiendo la oxidación del citocromo a 550/540 nm. La actividad se evaluó en ausencia y presencia de KCN 0.5 mM.

\*Laboratorio del Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM, donde se llevaron a cabo los estudios de análisis tipo Southern con DNA total digerido con enzimas de restricción para la búsqueda de ablaciones del genoma mitocondrial como lo describen Vázquez-Acevedo y cols<sup>66</sup> :

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### *Preparación de DNA total a partir de las biopsias.*

El DNA total fue aislado a partir de 20 mg de tejido muscular congelado obtenido a partir de la biopsia del paciente y de un sujeto control, de acuerdo con la técnica de Davis y cols<sup>106</sup> con las modificaciones descritas por Zeviani y cols<sup>107</sup>. El tejido muscular se homogenizó y se digirió durante la noche a 37°C en presencia de 0.5 ml de Tris-HCl 10mM (pH 7.4), NaCl 10mM, EDTA 25 mM, dodecil sulfato de sodio al 1% y proteinasa K (1 mg/ml). Se agregaron 50 µl de NaCl a la mezcla, se extrajo con una mezcla de fenol-Sevag (250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo alcohol isomérico 24:1) y se centrifugó en una centrifuga Eppendorf durante 10 mins. Se recuperó la fase acuosa y se extrajo una vez más con fenol-Sevag y después con éter saturado con agua. El DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se centrifugó 10 mins a 4°C para después resuspenderse en Tris-HCl 10 mM (pH 8.5) en presencia de EDTA 1 mM. El DNA se conservó a -70°C hasta su utilización.

#### *Replicas tipo Southern*

El DNA total se digirió con la enzima de restricción *PvuII* y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, para luego transferirlo a una membrana de nylon como lo describen Sambrook y cols<sup>100</sup>. La réplica tipo Southern se decoró con una sonda biotinilada correspondiente a un producto de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de DNAmt normal correspondiente a los nucleótidos 126 al 1776.

#### *Mapeo con endonucleasas de restricción*

Con el fin de identificar el sitio donde se llevó a cabo la interrupción génica, se llevó a cabo un mapeo con enzimas de restricción como lo describen Zeviani y cols<sup>107</sup>. Cinco µg de DNA se digirieron con una batería de enzimas de restricción: *Pst* I, *Kpn* I, *Xba* I, *Hind* III, *EcoR* I y

*Stu I.* Los productos de la digestión se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.8%, se transfirieron a una membrana de nylon<sup>100</sup> y se decoró con un fragmento biotinilado de un amplificado por PCR de DNAm normal comprendido entre los nucleótidos 126 y 1776.

*Densitometría con laser*

La densitometría de las placas autorradiográficas se llevó a cabo en un densitómetro laser UlroScan XL (LKB) utilizando el programa GelScan XL.

*Amplificación por PCR y secuenciación*

En los casos seleccionados por sospecha clínica de mutación puntual del genoma mitocondrial se efectuó amplificación por PCR.

Los desoxiologonucleótidos utilizados fueron sintetizados por la casa comercial Operon Technologies, Inc (Alameda, California) y se utilizaron como cebadores en la reacción de amplificación: 140F-Hind (nucleótidos 126-150 complementarios a la cadena H, 5'-ATCAAGCTTTGATTCTGCCTCATC-3'); 1768B-Hha (nucleótidos 1754-1776 complementarios a la cadena L, 5'-CTATTGCGCCAGGTTTCAATTC-3'); 7973F-Bst (nucleótidos 7955-7979 complementarios a la cadena H, 5'-CCCCATTATTCCTAGAACCCAGGCG-3'); 9910F-Asu (nucleótidos 9902-9923 complementarios a la cadena H, 5'-CTTTGGCTTCGAAGCCGCGCC-3') Y 16048B-Kpn (nucleótidos 16033-16060 complementarios a la cadena L, 5'-CTTGGGTGGTACCCAAATCTGCTTCCCC-3').

El DNA total obtenido de la biopsia muscular se utilizó como templado para la amplificación por PCR. Para llevar a cabo la amplificación, las mezclas de reacción se desnaturalizaron a

94°C durante 10 mins. Posteriormente se llevaron a cabo 25 ciclos con 1 min de desnaturalización a 94 °C, 2-mins de apareamiento a 60 °C y 2 mins de extensión a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron en geles de agarosa y se ligaron en el plásmido pCRII™ (Invitrogen) Celulas transformadas de *Eschenchia coli* DH  $\alpha$ 5 se plaquearon en cajas de Petn con medio de Luria y ampicilina, seleccionando los plásmidos recombinantes por pérdida de actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Las subclonas así obtenidas a partir de dos reacciones de amplificación diferentes, fueron secuenciadas automatizadamente.

#### *Sondas biotiniladas*

Se generó una sonda a partir de DNA total de musculo estrnado por amplificación de PCR utilizando los desoxioligonucleotidos 140F-Hind y 1768B-Hha. El producto resultante de 1.650 pares de bases (comprendido entre los nucleótidos 126 y 1776) fue marcado con biotina utilizando el sistema Bionick Labeling System (Gibco BRL)

## VI. RESULTADOS

Se incluyeron 37 niños con manifestaciones clínicas de encefalopatía y/o miopatía con sospecha de padecer una mitocondropatía. Todos los pacientes incluidos carecían de un diagnóstico definitivo, despues de haber sido estudiados por tres meses o más en el Instituto Nacional de Pediatría (hospital pediátrico de tercer nivel) donde se llevó a cabo el estudio. Se eliminaron 4 casos por no haberse realizado biopsia muscular y/o cuantificación de lactato en LCR. Al finalizar el estudio, los 33 casos restantes fueron categorizados en 3 grupos de acuerdo a los criterios establecidos para considerar el diagnóstico de mitocondropatía, refendos en la **tabla 2**.

**Tabla 2. Criterios para apoyar el diagnóstico de mitocondriopatía**

<b>Grupo 1. (N=14)</b>	Pacientes con ablación del genoma mitocondrial, o con probables mutaciones puntuales en el DNA nuclear o mitocondrial, que provocaron deficiencia del 75% o más, en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria.
<b>Grupo 2. (N=14)</b>	Pacientes en quienes no se logró confirmar, pero tampoco se descartó una mitocondriopatía, por los métodos utilizados en el presente trabajo.
<b>Grupo 3. (N=5)</b>	Pacientes en quienes se sospechó mitocondriopatía, pero se descartó al confirmarse otros diagnósticos.

El tercer grupo (N=5) lo integraron pacientes que después de haber sido estudiados durante el presente protocolo, con sospecha inicial de enfermedad mitocondrial, ésta se descartó por establecer otros diagnósticos: alteración del metabolismo de los ácidos biliares (caso 16), miastenia gravis juvenil (caso 17), ptosis congénita familiar (caso 20), síndrome dismórfico con secuelas de encefalopatía hipóxico isquémica perinatal (caso 29), y secuelas de infarto medular cervical (caso 33).

## **ANTECEDENTES Y HALLAZGOS CLÍNICOS.**

### **EDAD**

La edad media referida al iniciar los síntomas, y la que los pacientes presentaron al momento de ingresar al estudio, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio, con la prueba ANOVA de una vía y ajuste Bonferroni como se muestra la tabla 3. Sin embargo, como lo muestra la gráfica 1, el grupo de

pacientes con mitocondriopatía confirmada, tuvo una tendencia hacia los menores de 3 años de edad ( $p = 0.071$   $\chi^2$  Pearson).

**Tabla 3. Edad al inicio de los síntomas y al momento de ingresar al estudio**

Al iniciar síntomas	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de $p$
Promedio y DE	1 año $\pm$ 3	3 años $\pm$ 4	9 meses $\pm$ 9	0.295
Mínima	14 días	1 día	1 día	
Máxima	10 años	11 años	1 año	
<b>Al ingresar</b>				
Promedio y DE	5 años $\pm$ 4	7 años $\pm$ 3	6 años $\pm$ 4	0.140
Mínima	6 meses	4 meses	7 meses	
Máxima	16 años	15 años	10 años	

DE=desviación estándar

#### GENERO

El género se distribuyó de manera muy uniforme entre toda la población estudiada (N=33), con 14 varones y 19 mujeres. Sin embargo, al categorizar los casos por grupos 1, 2 y 3 se detecta una tendencia para el género femenino en el grupo de pacientes con mitocondriopatía confirmada ( $p = 0.071$ ,  $\chi^2$  Pearson).

La tabla 4 muestra la distribución del género por grupos.

**Tabla 4. Género entre los grupos de estudio**

<b>Género</b>	<b>Grupo 1. N=14</b>	<b>Grupo 2. N=14</b>	<b>Grupo 3. N=5</b>	<b>Valor de p 0.071</b>
Masculino	3	9	2	
Femenino	11	5	3	

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada  
Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía  
Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

#### **ANTECEDENTES FAMILIARES**

Excepto un caso de adopción, se registraron los siguientes antecedentes familiares:

En 13 de los 32 casos se refinieron parientes de primero y/o segundo orden, con afecciones similares al cuadro del paciente estudiado, sugestivas de alteración mitocondrial:

Cuatro niños del grupo 1 (casos: 3, 9, 14 y 10), seis del grupo 2 (casos: 7, 15, 23, 28, 32) y tres del grupo 3 (casos: 16, 20, 2).

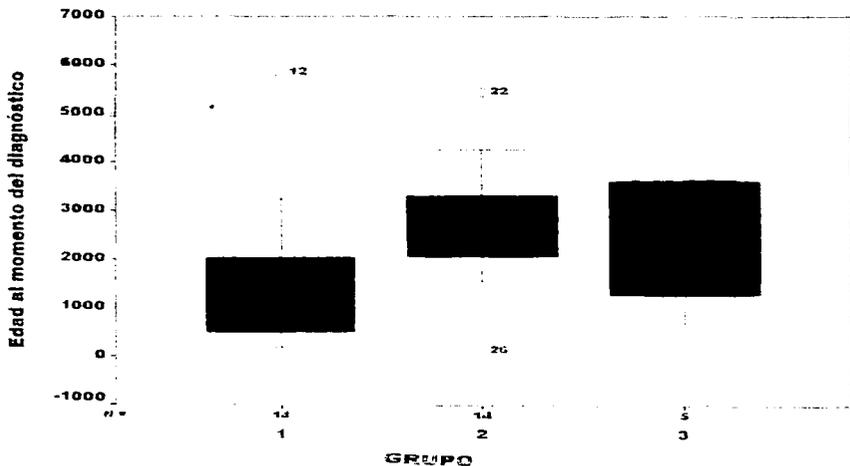
En 4 de 32 casos se mencionó consanguinidad y 7 de 32 pacientes provenían de poblaciones endogámicas. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos estudiados con la prueba  $\chi^2$  Pearson.

La frecuencia absoluta de familiares de primero y segundo orden con alteraciones oculares, sugestivas de mitocondriopatía, así como antecedentes consanguíneos y endogámicos referidos en nuestra población se muestran en la tabla 5.

#### **ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS**

Algunos pacientes tuvieron el antecedente de patología previa antes de ingresar a nuestro estudio.

**GRAFICA 1. Edad (días de vida) al momento del diagnóstico de mitocondriopatía. Grupos 1, 2 y 3. ( N=33 )**



$p=.071, X^2$  Pearson

N=33

Edad promedio:

6 años ± 3.9

Mediana:

5 años 6 meses.

Edad mínima- máxima:

3 meses - 16 años

**Tabla 5. Antecedentes: familiares (primero y/o segundo orden) con alteraciones oculares sugestivas de mitocondriopatía, consanguíneos y endogámicos.**

Antecedente	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
Familiar (ocular) 11/32	2	7	2	0.337
Consanguíneo 4/32	2	1	1	0.751
Endogámico 5/32	2	3	0	0.474

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

La tabla 6 destaca las patologías previas más frecuentes, ninguna de ellas mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Sin embargo, algunas mostraron una tendencia hacia la significancia estadística como la hipoxia perinatal para el grupo 3, y la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) para el grupo 1.

Cabe mencionar que, la intolerancia al ejercicio sólo se pudo valorar en 25 de los 33 niños de nuestra serie, probablemente por la corta edad de algunos pacientes.

Es importante señalar otras patologías pre-existentes que se presentaron en forma aislada: En el grupo 1, el caso 8 tenía el diagnóstico de miastenia gravis juvenil, confirmada por la presencia de anticuerpos contra acetilcolina, fue tratada con piridostigmina durante 6 años. Sin embargo, ya que su sintomatología era predominantemente ocular (ptosis y oftalmoplejia externa) y su respuesta terapéutica muy limitada, se decidió incluir en el

presente estudio, detectándose por estudio molecular el síndrome de Kearns-Sayre, durante su evaluación se le diagnosticó también bocio por tiroiditis.

**Tabla 6. Patologías previas más frecuentes**

Patología	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
Hipoxia perinatal	2	0	2	0.069
ERGE	6	2	0	0.082
Apnea	3	0	0	0.107
Infección recurrente	4	2	0	0.321
Vómito	4	1	0	0.380
Intolerancia al ejercicio	1	4	1	0.525
Acidosis persistente	2	1	0	0.600
Estado epiléptico	1	1	0	0.827

ERGE: enfermedad por reflujo gastroesofágico

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

En el grupo 2, el caso 26 fue remitido de un hospital regional de segundo nivel con el diagnóstico de miastenia gravis por ptosis palpebral y presencia de anticuerpos contra acetilcolina con nula respuesta al endrofonio y neostigmina, al estudiar este caso se detectó el síndrome de Leigh con deficiencia total de COX y NADH. El caso 30 había sido intervenido quirúrgicamente por cataratas bilaterales, desarrolladas postnatalmente, y el

caso 24 había presentado episodios severos de asma bronquial, esta paciente también desarrolló bocio por tiroiditis durante su evaluación en el presente estudio.

En el grupo 3, el caso 29 tenía dismorfias menores múltiples y había sido intervenida quirúrgicamente por cardiopatía congénita acianógena.

### MANIFESTACIONES CLINICAS

La talla baja fue la manifestación general más frecuente, presentó una diferencia estadísticamente significativa con la prueba  $\chi^2$  Pearson. El resto de las manifestaciones referidas, no tuvieron diferencias significativas entre los grupos.

#### \* Manifestaciones hepáticas

En el grupo 1, una niña con hepatomegalia (caso 3) y, otras dos con asociación de hepatomegalia e hipertransaminemia (caso 5 y 14).

En el grupo 3, un lactante con insuficiencia hepática y cirrosis colestásica, por alteración del metabolismo de los ácidos biliares (caso 16).

#### \* Manifestaciones cardíacas

En el grupo 1, un niño tuvo bloqueo de rama incompleto (caso 11) y, una niña presentó pericarditis (caso 5).

En los grupos 2 y 3, se presentaron respectivamente, un caso de disritmia inespecífica (casos 2 y 16).

#### \* Manifestaciones renales - urinarias:

El síndrome de Fanconi fue la manifestación más frecuente:

En el grupo 1, tres pacientes (caso 9, 10 y 36). En el grupo 2, tres niños (caso 2, 30 y 32).

En el grupo 3, dos (caso 16 y 29). La insuficiencia renal se encontró en un paciente del

grupo 1 (caso 3) y uno del grupo 2 (caso 6). Otras alteraciones renales - urinarias fueron acidosis tubular renal (caso 5) y retención urinaria aguda (caso 14), ambas del grupo 1.

\* Manifestaciones endócrinas:

Se realizó evaluación endocrinológica cuando se tuvo la sospecha clínica de afección endócrina. Se confirmaron y trataron las siguientes alteraciones:

En el grupo 1, tiroiditis (caso 8) e hipensulinismo (caso 3).

En el grupo 2, resistencia a la insulina (caso 13) e hiperinsulinismo más bocio hipotiroideo (caso 32).

\* Manifestaciones neurológicas (ver tabla más adelante)

Las manifestaciones neurológicas se dividieron en sindromáticas y no sindromáticas. Para fines prácticos y de presentación, separamos a la encefalomiopatía en la característica clínica predominante para cada caso, a saber, encefalopatía como manifestación del sistema nervioso central, y a la miopatía como alteración del sistema nervioso periférico.

\* Manifestaciones inmunológicas

Se detectó un caso con tiroiditis (caso 24), presencia de oftalmoparesia y anticuerpos séricos contra receptores de Ach en dos pacientes (caso 8 y 26), con y sin manifestaciones miasténicas.

La tabla 7 muestra las manifestaciones generales de los pacientes por grupo 1, 2 y 3.

En la tabla 8 A se resumen las manifestaciones oculares. La tabla 8 B muestra las manifestaciones neurológicas no sindromáticas de los pacientes por grupo 1, 2 y 3 con sus respectivos valores absolutos y de probabilidad con la prueba  $\chi^2$  de Pearson. La presencia de encefalopatía fue más frecuente que la miopatía, con una diferencia estadísticamente significativa para el grupo 1, formado por pacientes con mitocondriopatía confirmada. Las

alteraciones oculares también mostraron diferencias estadísticamente significativas para los grupos 1 y 2. El resto de las manifestaciones neurológicas no sindrómicas, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

**Tabla 7. Manifestaciones generales**

Manifestación	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
Talla baja	10	4	4	0.035 *
Hepática	3	0	1	0.186
Cardíaca	2	1	2	0.211
Renal-urinaria	6	4	2	0.722
Endócrina	2 / 5	3 / 7	1 / 2	0.971

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada  
 Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía  
 Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

**Tabla 8 A. Manifestaciones oculares**

Manifestación	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
Déficit visual	3	7	0	0.083
Retinopatía	4	1	0	0.139
Atrofia óptica	3	5	2	0.571
Ptosis	5	3	2	0.625
Oftalmoparesia	5	4	2	0.870

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada  
 Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía  
 Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

La **tabla 9** muestra las manifestaciones neurológicas sindrómicas de los pacientes por grupo 1, 2 y 3, analizados con la prueba  $\chi^2$  de Pearson Ninguno de los síndromes neurológicos tuvo diferencias estadísticamente significativas

La **figura 7** muestra algunas de las características clínicas del caso 10, paciente con ablación del DNAm<sub>t</sub>.

**Tabla 8 B. Manifestaciones neurológicas no sindrómicas**

Manifestación	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de $p$
Encefalopatía	14	10	2	0.013*
Alteraciones oculares	9	9	5	0.056*
D C y D	11	5	3	0.071
Hipotrofia	12	7	4	0.104
Retraso psicomotor	2	5	0	0.173
Miopatía	13	11	4	0.544
Alteraciones auditivas	2	1	0	0.562
Microcefalia	5	5	3	0.592
Pares craneales**	5	6	2	0.858

D C y D: Detención del crecimiento y desarrollo

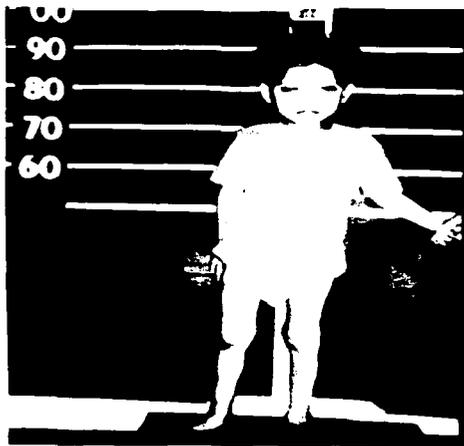
\*\*=Excepto nervios oculomotores y óptico

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

**FIGURA 7.** Características clínicas sobresalientes del caso 10 con deficiencia del 50% de COX y ablación del DNAm.



La iconografía clínica de paciente de 6 años, caso 10. Destacan la talla baja, el hipotrofismo muscular generalizado, la ptosis palpebral bilateral, hipomimia facial.

Con permiso y autorización de los padres de la paciente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 9. Manifestaciones neurológicas sindrómicas**

<b>Síndrome</b>	<b>Grupo 1. N=14</b>	<b>Grupo 2. N=14</b>	<b>Grupo 3. N=5</b>	<b>Valor de p</b>
Neuropático	0	1	1	0.274
Cerebeloso	2	4	0	0.321
Extrapiramidal	3	1	0	0.341
Mielopático	0	1	0	0.497
Hipotónico	12	11	5	0.514
Demencial	2	4	1	0.582
Piramidal	9	9	2	0.592
Convulsivo	5	5	1	0.790

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

#### **HALLAZGOS DE LA BRECHA ANIONICA, LACTATO Y PIRUVATO.**

En nuestra población (N=33) se detectó la elevación de lactato, en suero y/o LCR, en 18 casos: nueve del grupo 1 (n=14), siete del grupo 2 (n=14) y dos del grupo 3 (n=5). De estos 18 pacientes, seis tuvieron además del incremento de lactato disminución de los cuerpos cetónicos, en suero y/o LCR: tres del grupo 1 y tres del grupo 2. Sólo el caso 26 presentó elevación simultánea tanto de lactato como de cuerpos cetónicos. En cuatro casos, dos del grupo 1 y 2, respectivamente se encontraron las cetonas disminuidas. Sólo el caso 3 tuvo cetonas ausentes.

La **tabla 10** resume los valores de la brecha anionica, lactato, piruvato y su relación, tanto en sangre como en LCR. Se utilizo la prueba ANOVA de 1 vía para el análisis de los promedios de los valores referidos. Sin embargo, los promedios de lactato y piruvato séncos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis, por no encontrarse homogeneidad en sus varianzas. Los pacientes con mitocondriopatia confirmada, tuvieron los valores más altos de lactato tanto en sangre como en LCR. Los grupos 1 y 2, que correspondieron a mitocondriopatas confirmados y sospechosos, tuvieron valores de piruvato en suero y en LCR mas bajos que en el grupo 3 de pacientes con mitocondriopatia descartada, con una diferencia estadísticamente significativa.

La **tabla 11** resume los valores de los cuerpos cetonicos en suero y LCR medidos en mM, con sus valores de referencia séncos, cabe señalar, que aun no se han mencionado en la literatura los correspondientes al LCR. Los valores de los cuerpos cetonicos se analizaron con la prueba de Kruskal - Wallis, ya que sus varianzas carecian de homogeneidad. Ninguno de estos valores tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1, 2 y 3.

#### **HALLAZGOS DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS POR CROMATOGRAFÍA**

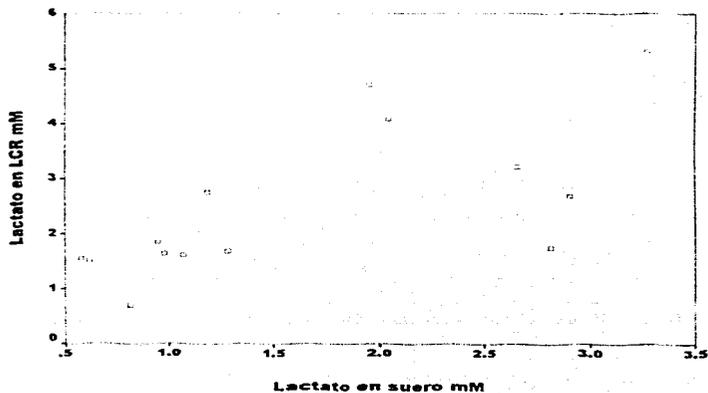
En la **tabla 12** se muestran los resultados anormales en la cromatografia de aminoácidos en sangre por HPLC, cromatografia liquida de alta resolución y cromatografia de gases acoplada a espectrometria de masas para acidos organicos en orina.

**Tabla 10. Brecha aniónica, lactato, piruvato y sus valores de referencia.**

	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valores de p
<b>Brecha aniónica en suero</b>				
IR: 14 -16 mEq/L				
Promedio y DE	15.88 ± 2.67	15.18 ± 2.77	19.11 ± 6.65	0.135
Min - Max	9.6 - 20.2	11.8 - 21.3	9.6 - 27.2	
<b>Lactato en suero</b>				
IR: 1.0 -1.8 mM				
Promedio y DE	1.654 ± 0.935	1.081 ± 0.545	1.471 ± 1.594	0.276
Min - Max	0.58 - 3.27	0.46 - 2.13	0.53 - 4.30	
<b>Lactato en LCR</b>				
IR: 1.2 -1.6 mM				
Promedio y DE	2.500 ± 1.361	2.067 ± 1.381	2.174 ± 1.136	0.688
Min - Max	0.70 - 5.30	0.65 - 5.87	1.49 - 4.16	
<b>Piruvato en suero</b>				
IR: 0.11 - 0.17				
Promedio y DE	0.1369 ± .04015	0.1367 ± 0.143	0.1894 ± 0.214	0.174
Min - Max	0.09 - 0.23	0.05 - 0.61	0.05 - 0.56	
<b>Piruvato en LCR</b>				
IR: 0.08 -0.13mM				
Promedio y DE	0.1448 ± .04088	0.1046 ± .03830	0.1352 ± .03757	0.034
Min - Max	0.10 - 0.24	0.05 - 0.21	0.11 - 0.20	
<b>Relación L/P en suero</b>				
IR: 10 - 15 mM				
Promedio y DE	11.48 ± 4.30	11.36 ± 4.98	12.74 ± 8.09	0.873
Min - Max	6 - 20	4 - 23	1 - 23	
<b>Relación L/P en LCR</b>				
IR: 9 -15 mM				
Promedio y DE	16.60 ± 6.17	21.14 ± 17.83	15.40 ± 3.20	0.542
Min - Max	5.9 - 29.9	8.4 - 79.3	12.5 - 20.8	

MEq/L=miliequivalentes por litro, mM = milimolar, L/P = relación lactato/piruvato, LCR = líquido cefalorraquídeo, IR: intervalo de referencia DE= desviación estándar, Min=mínimo, Max=máximo  
 Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada  
 Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía  
 Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

**Gráfica 3. Correlación entre lactato en suero y en LCR**  
**Grupo 1. Mitochondriopatia confirmada N=14**



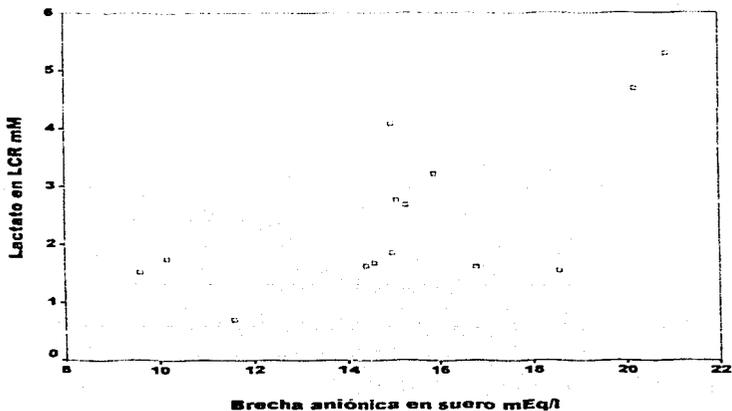
	Promedio	DS
Lactato		
En LCR	2.50 mM	1.36
En suero	1.65 mM	0.93

Correlación de Pearson  
0.676

$p < 0.01$  (2 colas)

LCR: líquido cefalorraquídeo  
 mM: unidades milimolar  
 DS: desviación estandar

**Gráfica 4. Correlación entre lactato en LCR y brecha aniónica sérica  
Grupo 1 Mitocondriopatía confirmada N=14**



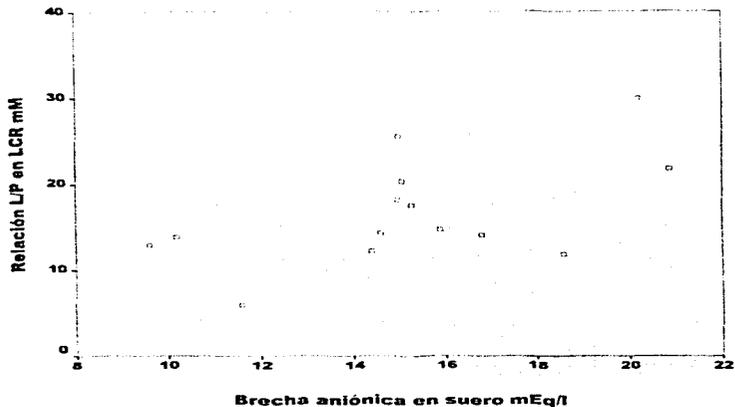
	Promedio	DS
Lactato en LCR	2.50 mM	1.36
Brecha aniónica	15.3 mM	3.31

Correlación de Pearson  
0.676

$p < 0.01$  (2 colas)

LCR: líquido cefalorraquídeo  
mM: unidades milimolar, mEq/l: miliequivalentes por litro  
DS: desviación estándar

**Gráfica 5. Correlación entre brecha aniónica y relación L/P en LCR  
Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada N=14**



	Promedio	DS	Correlación de Pearson
Brecha aniónica	15.23 mEq/l	3.31	0.565
L/P en LCR	16.60	6.17	$p < 0.01$ (2 colas)

LCR: líquido cefalorraquídeo, L/P: relación lactato / piruvato  
mM: unidades milimolar,  
mEq/l: miliequivalentes por litro  
DS: desviación estándar

**Tabla 11. Betahidroxibutirato, acetoacetato en suero y LCR.**

	<b>Grupo 1.</b> N=13	<b>Grupo 2.</b> N=14	<b>Grupo 3.</b> N=5	<b>Valor de p</b>
<b>BOH en suero</b> IR 60 - 300 mM Promedio y DE Min - Max	164.54 ± 195.10 7 - 606	127.86 ± 134.07 4 - 437	78.59 ± 53.20 18 - 139	0.934
<b>BOH en LCR</b> IR. no referido Promedio y DE Min - Max	54.59 ± 97.220 1.3 - 360	21.97 ± 18.890 3.4 - 68.1	39.95 ± 42.646 8.6 - 110.5	0.587
<b>AA en suero</b> IR 20 - 100 mM Promedio y DE Min - Max	80.42 ± 89.15 5 - 292	67.51 ± 63.27 10 - 222	45.24 ± 31.45 17 - 98	0.959
<b>AA en LCR</b> IR no referido Promedio y DE Min - Max	30.18 ± 44.51 1 - 164	15.87 ± 11.74 3 - 40	25.14 ± 22.60 9 - 63	0.747
<b>Relación BOH/AA en suero</b> IR 2-4 mM Min - Max	2.16 ± 1.79 0.37 - 6.53	1.69 ± 0.992 0.15 - 3.28	1.90 ± 1.00 0.50 - 3.00	0.677
<b>Relación BOH/AA en LCR</b> IR no referido Promedio y DE Min - Max	1.97 ± 1.34 0.29 - 5.17	1.63 ± 0.897 0.23 - 3.13	1.49 ± 0.573 0.51 - 1.89	0.350

BOH=betahidroxibutirato, AA= acetoacetato, mM = milimolar. BOH/AA = relación betahidroxibutirato/ acetoacetato, LCR = líquido cefalorraquídeo

IR: intervalo de referencia DE= desviación estándar, Min=mínimo, Max=máximo

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

**Tabla 12. Resultados anormales de la cromatografía de aminoácidos en sangre (HPLC) y ácidos orgánicos en orina por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.**

	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
Aminoácidos en sangre	n=12 1	n=8 0	n=2 0	0.400
Ácidos orgánicos en orina	n=10 6	n=5 1	n=2 0	0.150

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

En el Grupo 1, el caso 14 presentó aumento del ácido 4-hidroxifenilacético y el caso 21 tuvo elevación del ácido láctico y el 4-hidroxifenilacético, mientras que el caso 25, además de los anteriores, presentó también aumento del ácido 3-hidroxi-isovalérico. En el caso 26 se detectó incremento tanto de hidroxibutirato como de acetoacetato. El caso 8 presentó incremento de alanina y el caso 10 tuvo aminoaciduria. En el grupo 2, sólo un paciente, (caso 6) de los cinco estudiados presentó incremento de la excreción del ácido 4-hidroxifenilacético. En el grupo 3 no se detectaron anomalías en ninguno de los tres casos en que se realizó esta búsqueda. No existieron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, es importante mencionar que el número de pacientes que participaron en este estudio fue muy reducido, por la dificultad para recolectar la orina, referida por los padres.

## HALLAZGOS DE NEUROIMAGEN

La tabla 13 presenta los resultados anormales de la tomografía axial computarizada de cráneo simple y contrastada. El grupo 1, de pacientes con mitocondriopatías confirmadas, tuvo el mayor número de imágenes cerebrales anormales, con una tendencia estadísticamente significativa con la prueba de  $\chi^2$  de Pearson. Los resultados anormales de resonancia magnética cerebral y espectroscopia por resonancia magnética no tuvieron diferencias significativas entre los grupos 1, 2, y 3. Es importante destacar que la IRM y la espectroscopia por IRM sólo se pudieron realizar en poco menos del 50% de nuestra población, por no contar con suficientes anestesiólogos para la sedación fuera del hospital sede del estudio.

El hallazgo más frecuente por neuroimagen fue el aumento del espacio subaracnoideo (atrofia cerebral) en ocho casos del grupo 1, tres del grupo 2 y dos del grupo 3. Otra imagen anormal, detectada sólo en el grupo 1, fue la alteración de los núcleos basales (caso 5, 10, 11, 25 y 26). La alteraciones en la señal de la sustancia blanca se encontraron en tres casos, uno del grupo 1 (caso 26), y dos del grupo 2 (casos 6 y 7). En sólo 2 pacientes se presentaron calcificaciones subcorticales, de los grupo 1 y 2 (caso 5 y 12).

Excepto en dos pacientes (casos 26 y 33) de los grupo 1 y 3, la IRM mostró las mismas alteraciones, aunque con mejor definición, que las que se detectaron por TAC. Estas alteraciones (hipo - hiper intensidades en  $T_1$  -  $T_2$ ) estuvieron localizadas en el tallo cerebral y médula cervical. La espectroscopia por IRM fue anormal en 2 pacientes del grupo 1, uno con disminución de la señal de colina (caso 14) y el otro aumento de la señal del lactato en los núcleos basales (caso 25), así mismo un paciente del grupo 2 (caso 6), presentó incremento del lactato en el centro semioval.

**Tabla 13. Estudios anormales de neuroimagen**

Estudio de neuroimagen	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
TAC simple y contrastada anormal	n=14 12	n=12 9	n=4 1	0.053*
IRM anormal	n=9 8	n=6 3	n=1 1	0.196

TAC=tomografía axial computarizada de cráneo  
IRM=imagen por resonancia magnética cerebral.  
\* = valor estadísticamente significativo de p

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada  
Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía  
Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

La figura 8A (caso 25) corresponde a imágenes axiales de IRM en T<sub>2</sub> y la figura 8B muestra la IRM coronal en T<sub>2</sub>, del mismo caso, con incremento de lactato por espectroscopia. Ambas imágenes señalan los núcleos basales anormales.

#### HALLAZGOS DE NEUROFISIOLOGÍA

En las tablas 14, 15 y 16 se señalan las alteraciones encontradas en los estudios neurofisiológicos. Estas variables se analizaron con  $\chi^2$  de Pearson.

La lentificación y el patrón generalizado en el EEG fueron las anomalías más frecuentes en el grupo 1, integrado por pacientes con mitocondriopatía confirmada, con una diferencia estadísticamente significativa, al compararlos con los grupos 2 y 3.

La figura 9, muestra un fragmento representativo del trazo electroencefalográfico con ritmos intermitentes de actividad delta frontal (FIRDA) del caso 8. Este hallazgo es la primera vez que se encuentra en un paciente con mitocondriopatía confirmada.

**FIGURA B A.** Imágenes por resonancia magnética cerebral  
caso 25 con deficiencia del 50% de COX

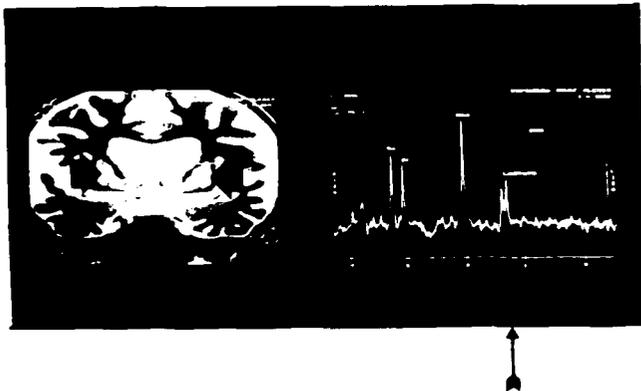


IRM en T<sub>2</sub> corte axial. Muestra con flechas hiperintensidad anormal heterogénea en núcleos caudados y globo pálido.

Imágenes por cortesía de los Drs Oscar Quiroz y Manuel Martínez. Fundación Médica Sur.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 8 B. Espectroscopia por resonancia magnética cerebral  
caso 25 con deficiencia del 50% de COX



IRM en T<sub>2</sub>

Izquierda. Corte coronal, la flecha muestra imagen anormal en los núcleos basales.

Derecha. Gráfica del análisis espectroscopico, la flecha muestra pico anormal de lactato.

Imágenes por cortesía de los Drs. Oscar Quiroz y Manuel Martínez. Fundación Médica Sur.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 14. Resultados anormales en el electroencefalograma.**

	Grupo 1. N=14 (n=14)	Grupo 2. N=14 (n=11)	Grupo 3. N=5 (n=3)	Valor de p
EEG con lentificación	14	7	1	0.012*
EEG generalizado	14	7	2	0.047*
EEG focal	2	0	1	0.211
EEG paroxístico	2	3	1	0.638

EEG:electroencefalograma

\* = valor estadísticamente significativo de p

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

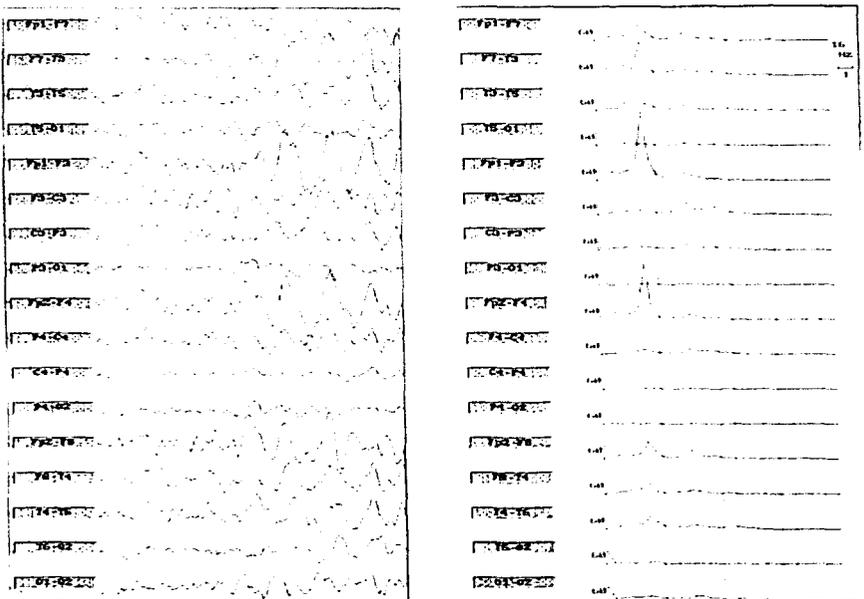
Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

El resto de las variables de los estudios neurofisiológicos no tuvieron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Es interesante señalar que el patrón miopático de la EMG se presentó en sólo cinco pacientes: dos del grupo 1 (caso 1 y 10), dos del grupo 2 (caso 12 y 13) y uno del grupo 3 (caso 16). Solamente un paciente (caso 11) tuvo un patrón neuropático en la EMG.

La retinosis pigmentana se confirmó en 4 pacientes, de los sólo ocho electroretinogramas que se lograron realizar. En las tres pacientes del grupo 1 que presentaron ablaciones del genoma mitocondrial (caso 8,10 y 37) y en un niño del grupo 2 (caso 34). Sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 2 ( $p= 0.157$ ).

**FIGURA 9.** Trazo electroencefalográfico montaje interhemisférico, técnica 10 x10  
 Caso 8 con . del 60% de la actividad de COX y 50% de NADH.  
 Diagnóstico molecular: Síndrome Kears-Sayre.



El trazo muestra ritmos intermitentes de actividad delta frontal (FIRDA). La flecha señala la actividad delta frontal.

Cortesía de la Dras. Luz María Cordero y Patricia Rodríguez, Servicio de Neurofisiología del INP.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Tabla 15. Resultados anormales de electromiografía y velocidad de conducción nerviosa.**

	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
EMG	(n=10) 3	(n=10) 2	(n=4) 1	0.875
VCN motora	(n=12)	(n=12)	(n=3)	
amplitud	2	1	0	0.656
velocidad	2	1	0	0.656
VCN sensitiva	(n=7)	(n=10)	(n=3)	
amplitud	1	0	0	0.376
velocidad	0	0	0	-

EMG: electromiografía, VCN: velocidad de conducción

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada

Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía

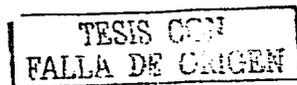
Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

### HALLAZGOS DE LOS ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

Se tienen 30 resultados de las 33 biopsias musculares realizadas. El grupo 1, de niños con mitocondriopatía confirmada, presentó el mayor número de resultados anormales con por lo menos alguna de las técnicas utilizadas, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.003$  con  $\chi^2$  Pearson) con respecto a los otros dos grupos.

En la **tabla 17** se presentan los resultados anormales de los estudios histopatológicos con las diferentes técnicas utilizadas. Se analizaron con  $\chi^2$  de Pearson.

Las alteraciones histoquímicas del músculo estirado que se encontraron en los grupos 1 y 2 fueron las siguientes en orden de frecuencia: alteraciones inespecíficas de las fibras musculares, en cinco niños del grupo 1 (caso 9,11, 10, 18, y 26).



**Tabla 16. Resultados anormales en los potenciales evocados**

	<b>Grupo 1. N=14</b>	<b>Grupo 2. N=14</b>	<b>Grupo 3. N=5</b>	<b>Valor de p</b>
<b>PEV</b>	(n=13)	(n=12)	(n=3)	
amplitud	8	7	1	0.669
latencia	10	9	2	0.934
grado de alteración				0.918
I	2	2	1	
II	5	3	1	
III	3		0	
IV	0		0	
<b>PEAT</b>	(n=13)	(n=12)	(n=3)	
amplitud	4	6	0	0.238
latencia	6	5	1	0.916
grado de alteración				0.662
I	0	2	0	
II	2	3	1	
III	3	1	0	
IV	1	0	0	
<b>PESS</b>	(n=10)	(n=13)	(n=2)	
amplitud	7	7	0	0.186
latencia	4	6	0	0.463
grado de alteración				0.386
I	2	3	0	
II	0	2	0	
III	5	3	0	
IV	0	0	0	

PEV:potenciales evocados visuales, PEAT:potenciales evocados auditivos de tallo, PESS:potenciales evocados somatosensoriales.

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada  
 Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía  
 Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

Atrofia selectiva de fibras tipo II, en dos pacientes del grupo 1 (caso 14 y 25) y tres del grupo 2 (caso 6,32, y 34). Atrofia selectiva de fibras tipo I, en un paciente del grupo 1 y el otro del grupo 2 (caso 36 y 30). Alteración difusa en dos niños del grupo 1 (caso 1 y 3).

Las alteraciones enzimáticas detectadas por la técnicas de histoquímica se presentaron en: La ATPasa en cinco pacientes cuatro del grupo 1 (caso 1,3,26, y 36) y uno del grupo 2 (caso 30). La SDH en dos niños, uno del grupo 1 (caso 10) y el otro del grupo 2 (caso 32). La NADH en un paciente del grupo 2 (caso 2) Es importante señalar que la actividad de COX no fue estudiada por técnicas histopatológicas

La figura 10, muestra el patrón típico de fibras rojas rasgadas en el tejido muscular con la técnica de Tricromico de Gomori del caso 8, del cual se confirmó síndrome de Kearns-Sayre.

La figura 11, del mismo caso, corresponde a los hallazgos de microscopía electrónica que muestra inclusiones anormales paraclistas en el tejido muscular

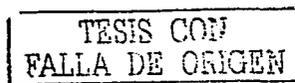
**Tabla 17. Resultados anormales de histopatología en las biopsias musculares**

Técnica	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
Histoquímica	(n=13) 10	(n=14) 4	(n=5) 0	0.004*
Actividad enzimática	(n=10) 5	(n=14) 4	(n=5) 0	0.137
Microscopía electrónica	(n=8) 4	(n=14) 6	(n=5) 0	0.156
Tricromico Gomori (FRR)	(n=13) 1	(n=14) 4	(n=0) 0	0.470

FRR: fibras rojas rasgadas

\* = valor estadísticamente significativo de p

Grupo 1. Mitochondriopatía confirmada  
 Grupo 2. Sospechosos de mitochondriopatía  
 Grupo 3. Mitochondriopatía descartada



**FIGURA 10.** Estudio histopatológico de la biopsia muscular  
Caso 8 con . del 60% de la actividad de COX y 50% de NADH.  
Diagnóstico molecular: Síndrome Kears-Sayre.



Microfotografía del estudio histoquímico con tricromico de Gomori modificado.  
La flecha senala las fibras rojas, el asterisco muestra una fibramuscular deshilachada

Cortesía Dras. Beatriz De León Bojorge y Cecilia Ridaura, Departamento de Patología INP.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FIGURA 11. Microscopia electrónica de la biopsia muscular  
Caso 8 con ↓ del 60% de la actividad de COX y 50% de NADH.  
Diagnóstico molecular: Síndrome Kears-Sayre.**



La flecha muestra inclusiones paracristalinas entre las mitocondrias del tejido muscular.

Cortesía Dras. Beatriz De León Bojorge y Cecilia Ridaura, Departamento de Patología, INP.

## HALLAZGOS DE LA CADENA RESPIRATORIA

La actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria, medida en tejido muscular estrado, fue uno de los criterios para apoyar el diagnóstico de mitocondriopatía, y lo utilizamos para categorizar los grupos del presente estudio. Se consideró deficiencia parcial cuando la disminución de la actividad enzimática fue igual o mayor al 50% de su actividad normal. La deficiencia total se basó en una disminución enzimática igual o mayor al 75% del total de su actividad normal. Todos los pacientes con deficiencia total fueron categorizados en el grupo 1, correspondiente a mitocondriopatía confirmada.

La **tabla 18** muestra el resumen de los valores de la actividad de los complejos I - IV de la cadena respiratoria de los grupos 1, 2 y 3, medidos en milimol por minuto por gramo de tejido. Los resultados de cada valor se dividieron entre la actividad de citrato sintetasa, la cual refleja indirectamente la cantidad de mitocondrias existentes en el tejido muscular estudiado (marcador de proliferación mitocondrial).

Los resultados de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria y de citrato sintetasa, entre los grupos del estudio, se analizaron con la prueba ANOVA de una vía. Para las enzimas SDH, NADHCCR sensible a rotenona y COX se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, debido a la heterogeneidad en sus varianzas. En el grupo 1, hubo una disminución estadísticamente significativa en la actividad enzimática de COX y NADHCCR sensible a rotenona, en comparación con el resto de las enzimas de los complejos de la cadena respiratoria entre los grupos 2 y 3.

## HALLAZGOS DE GENÉTICA MOLECULAR

La réplica tipo Southern se realizó en toda las biopsias musculares de nuestra población, con excepción de una paciente (caso 26). Las mutaciones detectadas por esta técnica permitieron confirmar el diagnostico de mitocondriopatía en tres casos y categorizarlos en el grupo 1 (N=14):

El caso 8 presentó una ablación de 4,989 pares de bases. La ablación se extiende desde el nucleótido 8470 del gen *atp8* hasta el nucleótido 13459 del gen que codifica para *nad 5*.

El caso 10 tuvo una ablación de 8,049 pares de bases. La ablación se extiende desde el nucleótido 6582 del gen *cox 1* hasta el nucleótido 1462 del gen que codifica para *nad 5*.

En el caso 37 se detectó una ablación de 6,000 pares de bases comprendida entre los sitios de restricción *Asu* 7440 y *Kpn* 16,048. No se determinó el lugar exacto de la ablación.

En la tabla 19 se resumen los resultados de los pacientes con mitocondriopatía confirmada por deficiencia igual o mayor al 50% de alguno de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria y/o mutación del DNA mitocondrial. Cabe señalar que tres pacientes (casos 8, 26 y 36) tuvieron deficiencias combinadas de complejos de cadena respiratoria. Por lo anterior el número total de alteraciones supera al número total de pacientes del grupo 1.

La tabla 20 resume los resultados bioquímicos, patológicos, moleculares y clínicos de toda la población incluida en el presente estudiado.

**Tabla 18. Resumen de la actividad enzimática de los complejos ( I - IV ) de la cadena respiratoria**

	Grupo 1. N=14	Grupo 2. N=14	Grupo 3. N=5	Valor de p
<b>Citrato Sintetasa</b> IR:81-203 mM/min Promedio y DE Min - Max	274.21 ± 96.56 90 - 403	239.29 ± 107.95 65 - 414	200.40 ± 100.75 55 - 414	0.361
<b>NADH-DH/sc</b> IR:2.79-3.13mM/min/sc Promedio y DE Min - Max	1.63 ± 0.873 0.22 - 3.40	2.30 ± 0.792 1.31 - 3.83	2.01 ± 0.923 0.71 - 2.96	0.123
<b>SDH/sc</b> IR:0.108-0.123mM/min/sc Promedio y DE Min - Max	0.062 ± 0.030 0.014 - 0.119	0.073 ± 0.027 0.046 - 0.134	0.154 ± 0.135 0.045 - 0.345	0.393
<b>SCCR/sc</b> IR:0.052-0.090mM/min/sc Promedio y DE Min - Max	0.078 ± 0.101 0.004 - 0.407	0.066 ± 0.035 0.022 - 0.131	0.058 ± 0.035 0.027 - 0.119	0.846
<b>NADHCCR/sc</b> IR:0.337-0.456mM/min/sc Promedio y DE Min - Max	0.231 ± 0.086 0.132 - 0.410	0.263 ± 0.133 0.017 - 0.610	0.322 ± 0.118 0.166 - 0.454	0.315
<b>NADHCCR, s. rotenona/sc</b> IR:0.030-0.154mM/min/sc Promedio y DE Min - Max	0.044 ± 0.018 0.025 - 0.090	0.077 ± 0.035 0.019 - 0.132	0.124 ± 0.123 0.039 - 0.341	0.011*
<b>COX/sc</b> IR:0.290-0.331mM/min/sc Promedio y DE Min - Max	0.145 ± 0.096 0.046 - 0.394	0.342 ± 0.102 0.140 - 0.486	0.262 ± 0.132 0.146 - 0.413	0.001*

NADH:nicotinamida deshidrogenasa, SDH:succinato deshidrogenasa, SCCR:succinato citocromo c reductasa, NADHCCR:nicotinamida deshidrogenasa citocromo c reductasa, s: sensible a, COX: citocromo c oxidasa, CS: citrato sintetasa, DE:desviación estándar, Min:mínimo, Max:máximo mM/min/sc:milimolas por minuto por gramo de tejido muscular dividido entre la actividad de citrato sintetasa.

\* = valor estadísticamente significativo de p

Grupo 1. Mitocondriopatía confirmada  
Grupo 2. Sospechosos de mitocondriopatía  
Grupo 3. Mitocondriopatía descartada

**Tabla 19. Resultados de los pacientes del Grupo 1 con mitocondriopatía confirmada.**

<b>GRUPO 1. N=14</b>	<b>Número de alteraciones</b>
↓ COX	10
↓ NADH	3
Ablación del DNA mitocondrial*	3
↓ SDH	3
↓ NADH - CCR	1
Alteración de la beta oxidación mitocondrial	1

NADH - DH: nicotinamida deshidrogenasa  
 SDH: succinato deshidrogenasa  
 NADH - CCR: nicotinamida deshidrogenasa citocromo c reductasa  
 COX: citocromo c oxidasa  
 \*: por la técnica de Southern blot

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 20. Resultados bioquímicos, histopatológicos y moleculares. Diagnóstico clínico

Caso Genero (edad de inicio)	Bioquímico	Cadena respiratoria		Tinción	Mutación	Características clínicas, diagnóstico, y/o órganos afectados
		Músculo	Músculo	patología	genómica mt Músculo	
<b>Sangre o LCR</b>						
<b>Cpo. 1. N°14</b>						
1 F (4m)	↑ lactato	↓ Cox 70%	↑ act oxidat	-	-	EM, DCyD, CC, vómito
3 F (7d)	Cetonas ausentes	Sin alteración	↑ act oxidat	-	-	EM, DCyD, hígado, riñón
5 F (3m)	↑ cetonas	↓ Cox 82%	-	-	-	Hipoglicemia hipocitogenica
8 F (10a)	↑ lactato	↓ Cox 60%	FRR +	S. K-S	-	EM, DCyD, corazón, ATR
9 F (8m)	↑ lactato	↓ NADH DH 50%	-	-	-	EM, talla baja, troiditis, oftalmoplejía, ptosis, R
10 F (6m)	↑ lactato	↓ NADH 50%	-	-	-	EM, riñón*, talla baja
11 M (3m)	↑ lactato	↓ Cox 72%	↑ act oxidat	-	-	EM, riñón*, DCyD, oftalmoplejía, ptosis, R
14 F (1m)	↑ cetonas	↓ Cox 70%	atrofia tipo II	-	-	EM, hígado, estado epiléptico
18 F (1a2m)	Sin alteración	↓ Cox 60%	-	-	-	Pseudoctus, oftalmoplejía, ptosis
21 F (6m)	↑ cetonas	↓ Cox 60%	-	-	-	EM hígado, talla baja
25 M (2a2m)	↑ lactato, ↓ cetonas	↓ Cox 50%	atrofia tipo II	-	-	EM, DCyD, ptosis
26 F (1m)	↑ lactato, ↑ cetonas	↓ Cox 84%	↑ ATPasa	-	-	EM, DCyD, oftalmoplejía, ptosis, CC
26 M (1a)	↑ lactato, ↓ cetonas	↓ SDH 80%	↑ act oxidat	-	-	EM, vómitos, DCyD, riñón*
37 F (3a)	↑ lactato, ↓ cetonas	↓ SDH 82%, ↑ NADH DH 60%, ↓ SDH 52%	-	-	S. K-S	EM, talla baja, oftalmoplejía, ptosis, R
		↓ NADH CCR 42%				
<b>Cpo. 2. N°14</b>						
7 F (2a)	↑ lactato, ↑ cetonas	Sin alteración	↑ NADH	-	-	M, talla baja, riñón*
9 M (1a2m)	↑ lactato, ↓ cetonas	Sin alteración	-	-	-	E, hígado, riñón, oftalmoplejía, CC
7 F (4a5m)	↑ lactato	Sin alteración	-	-	-	E, talla baja, oftalmoplejía
12 M (3a)	↑ cetonas	Sin alteración	-	-	MELAS +	EM pseudoctus, CC
13 M (nacim)	↑ lactato	Sin alteración	-	-	-	EM, oftalmoplejía, ptosis
15 F (2a2m)	Sin alteración	Sin alteración	↑ SDH	MERRF	-	EM, estado epiléptico, demencia
22 M (9m)	Sin alteración	Sin alteración	-	-	-	EM, DCyD, ptosis
24 F (1a2m)	Sin alteración	Sin alteración	-	-	-	M, intolerancia ejercicio, troiditis, asma
27 F (4a)	↑ lactato	Sin alteración	-	-	-	E, visual progresiva, atrofia óptica
28 M (nacim)	Sin alteración	Sin alteración	-	-	-	EM, vómitos, DCyD
3 M (nacim)	Sin alteración	Sin alteración	↑ act oxidat	-	-	EM, DCyD, cataratas, riñón*
31 M (9a)	↑ lactato	Sin alteración	-	-	-	Enfermedad de Menkes
35 M (10m)	↑ lactato, ↓ cetonas	Sin alteración	↑ SDH	-	-	EM, sordera, oftalmoplejía, ptosis, riñón*
34 M (1a2m)	Sin alteración	Sin alteración	atrofia tipo II	-	-	EM, sordera, demencia, CC, R
<b>Cpo. 3. N°6</b>						
15 M (15a)	↑ lactato	Sin alteración	-	-	-	AT. Metabolismo ácido bilares
17 F (1a5m)	Sin alteración	Sin alteración	-	-	-	Mastena gravis juvenil
23 M (nacim)	↑ lactato	Sin alteración	-	-	-	Ptosis familiar congénita
26 F (1a2m)	Sin alteración	Sin alteración	-	-	-	Síndrome drafnorico
31 F (15m)	Sin alteración	Sin alteración	-	-	-	Intacto ceneal medular

M: masculino, F: femenino, mt: mitocondrial, nacim: nacimiento, a/año: meses, días, ↑: aumento, ↓: disminución, act oxidat: actividad oxidativa, atrofia tipo I/II: atrofia selectiva de fibras tipo I/II, Cox: citocromo oxidasa, NADH+: nicotinamida deshidrogenasa, SDH: succinato deshidrogenasa, FRR: fibras rojas resgadas, S. K-S: síndrome de Kearns-Sayre, MELAS: Encefalomiopatía con pseudoctus, MERRF: encefalomiopatía con fibras rojas resgadas, R: retinopatía, EM: encefalomiopatía, DCyD: demencia del crecimiento y desarrollo, E: encefalopatía, ATR: atrofiosis tubular renal, M: miopatía, CC: crisis convulsivas, riñón\*: Síndrome de Fanconi renal, ALT: alteración

Grupo 1: Mitochondriopatía confirmada  
Grupo 2: Sospechosas de mitochondriopatía  
Grupo 3: Mitochondriopatía descartada

TESIS CON  
A DE ORIGEN

## VII. DISCUSIÓN

El diagnóstico de las enfermedades mitocondriales y energéticas constituye un reto para la ciencia médica mundial, ya que a pesar del avanzado conocimiento que se tiene del genoma mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>), la mayoría de las funciones energéticas están reguladas por un gran número de mecanismos aún por descubrir, regidos por el genoma nuclear (DNA) <sup>10</sup>. El DNAm<sub>t</sub> representa únicamente el 0.00006% del material genético total del ser humano. Mas del 90% de las proteínas que forman parte del funcionamiento energético de la mitocondria se sintetizan en el citoplasma celular, por lo que tienen que ser importadas hacia la membrana mitocondrial a través de intrincados mecanismos, de traslocación y otros aún no totalmente conocidos que dependen de señales, acarreadores y proteínas codificadas por el DNA<sub>n</sub> <sup>10,12</sup>

Debido a la regulación predominantemente nuclear, la mayor parte de las investigaciones sobre enfermedades relacionadas con el metabolismo energético, incluyendo la presente, contienen un grupo de pacientes (grande o pequeño, dependiendo de los recursos de cada estudio) en quienes a pesar de una búsqueda exhaustiva del mecanismo patogénico, no se logra confirmar, y más aún, descartar una enfermedad mitocondrial <sup>21,42,82,88,93</sup>. Como ha sucedido en otras poblaciones pediátricas, en nuestra población se identificaron principalmente deficiencias en la actividad enzimática de la cadena respiratoria y menor de mutaciones del DNAm<sub>t</sub> <sup>82,92,93</sup>

Aunque el DNAm<sub>t</sub> de un individuo proviene casi en su totalidad del óvulo, la herencia materna especialmente relacionada con las mutaciones puntuales, es sólo una de las formas en que puede transmitirse una enfermedad mitocondrial <sup>15</sup>. La literatura refiere un número limitado de lactantes con mutaciones puntuales y herencia materna comprobada.

Sin embargo, en los últimos años se están descubriendo paulatinamente nuevas mutaciones puntuales en pacientes pequeños, estos hallazgos muchas veces han requerido secuenciar las 16,500 pares de bases del DNAm<sup>91</sup>.

Ya que las alteraciones del genoma nuclear son la principal causa de disfunción mitocondrial y energética, la herencia también puede ser autosómica dominante o recesiva, ligada al X, o incluso mutación de novo<sup>20,109</sup>. Una tercera parte de los pacientes confirmados o con sospecha de mitocondriopatía de nuestro estudio tuvo más de un individuo afectado por familia, por lo menos un hermano o alguno de sus padres, otra tercera parte tuvo el antecedente de consanguinidad y/o endogamia, lo que nos hace suponer que existen diversos tipos de herencia en la presente serie de casos. En 1998, Von Kleist-Retzow y cols<sup>110</sup> detectaron una frecuencia del 20-30% de consanguinidad en pacientes con deficiencia de COX y/o NADH. En nuestra serie encontramos consanguinidad y/o endogamia en tres pacientes (casos: 1,11,14) con deficiencia de COX y dos (casos: 9 y 36) con deficiencia de NADH, tres niños más sin alteración identificable de la cadena respiratoria o mutación del DNAm. (Casos: 7,12 y 32).

En los adolescentes y adultos jóvenes se han caracterizado fenotipos plenamente identificados en el DNAm, tanto de ablaciones como de mutaciones puntuales<sup>36</sup>. El inicio de muchos de estos fenotipos sucede durante la infancia pero al principio con características clínicas inespecíficas<sup>46</sup>. Aunque con resultados negativos, en nuestro estudio buscamos intencionadamente dos mutaciones puntuales, para el tipo más frecuente de MELAS, mutación del tRNAleu G3243A en un paciente con episodios pseudoictales, y otras, para el más frecuente de MERRF, mutación del tRNAleu A8344G en una niña con

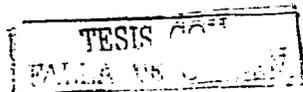
epilepsia continua y demencia. Aún se encuentran en proceso, la búsqueda de los otros sitios de mutaciones puntuales de nuestra serie.

Las alteraciones de un paciente pueden permanecer subclínicas hasta que la reserva energética se agote, por ciertos retos metabólicos que incrementen su demanda, en especial el encéfalo y el músculo consumen la mayor parte de la energía proveniente de la fosforilación oxidativa<sup>21,27</sup>.

El diagnóstico de un paciente pediátrico con sospecha de disfunción mitocondrial puede retrasarse debido a que se requiere cierto tiempo de evolución para que por el fenómeno de segregación replicativa, se acumule la mutación del DNAm<sup>t</sup>, y que la disfunción mitocondrial rebace el umbral clínico que repercute en los diferentes órganos afectados para manifestar así el fenotipo enfermo<sup>4,20</sup>. En nuestro estudio, uno de los antecedentes patológicos más frecuentes en el grupo de pacientes con enfermedad mitocondrial confirmada fue la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), generalmente aunada a una mala respuesta al tratamiento médico convencional. Consideramos que probablemente el vómito cíclico, y no el reflujo, fue el síntoma inicial ya relacionado con la enfermedad mitocondrial aún no identificada<sup>46</sup>.

En los pacientes menores de edad resulta difícil valorar ciertos síntomas que pueden ser claves del diagnóstico, como la intolerancia al ejercicio<sup>28,30</sup> que se refiere en muchos adultos, este dato sólo lo detectamos en 11% de los escolares y adolescentes de nuestra población.

Al igual que lo refieren Munnich y cols<sup>46</sup>, en su serie de 160 niños con deficiencia de la cadena respiratoria, nosotros también encontramos que después de la alteración del SNC, la afección significativa más frecuente fue la detención del crecimiento postnatal (talla baja),



probablemente debido al reto metabólico que implican ciertas etapas fisiológicas aceleradas del crecimiento corporal durante la infancia. La talla baja es un síndrome pediátrico inespecífico que se presenta en un sin número de patologías en la niñez. Lo cual confirma lo difícil que puede resultar la evaluación de un paciente sobre bases exclusivamente clínicas y explicaría porqué, la edad promedio de sospecha diagnóstica de citopatía mitocondrial en nuestra población, casi sextuplicó a la del inicio de los síntomas.

Con excepción de los síndromes encefálico y miopático, ninguno de los otros síndromes neurológicos<sup>111</sup> que buscamos intencionalmente tuvieron una frecuencia significativa.

En el presente estudio encontramos que los signos encefalopáticos fueron significativamente más frecuentes que lo miopáticos. Estos resultados concuerdan con otras series pediátricas como la referida por Tulinius y cols en 1991<sup>88</sup>, corroborada por Jackson y cols en 1995<sup>42</sup> y posteriormente por Uusimaa y cols en el 2000<sup>82</sup>. Robinson BH<sup>111</sup> explica este fenómeno al proponer que en los niños pequeños, el SNC tiene una mayor proporción de masa corporal en comparación con el sistema músculo-esquelético, aunado al elevado consumo de energía que se requiere para el proceso de maduración cerebral.

Aunque las alteraciones oculares son inespecíficas, en nuestra serie y en otras publicaciones se presentaron significativamente más frecuentes en los pacientes sospechosos o confirmados de mitocondriopatía<sup>42,88,82</sup>. A diferencia de lo que ocurre en el adulto, nosotros detectamos más niños con algún tipo de déficit en la vía visual que con oftalmoparesia.

Debido a la ubicuidad de las mitocondrias en todo el organismo, Munnich y cols<sup>29</sup> enfatizaron que en diversas enfermedades mitocondriales existe la frecuente asociación de signos y síntomas en diferentes órganos, sin relación médica aparentemente lógica.

El riñón fue el tercer órgano más frecuentemente afectado en nuestra población, relacionado con tubulopatía proximal (síndrome De-Toni-Debré-Fanconi) que se asoció con ciertas deficiencias enzimáticas de la cadena respiratoria: deficiencia de NADH (casos: 2,9,36), de SDH (casos: 32 y 36) y de COX (casos 10 y 30), uno de ellos con ablación del genoma mitocondrial (caso 10). Este hallazgo difiere de la serie de niños con deficiencia de alguno de los complejos de la cadena respiratoria, que fue referida por Munnich y cols<sup>46</sup> en el 2000, quien detectó manifestaciones renales en sexto lugar, precedidas en orden de frecuencia por el SNC, crecimiento corporal, el sistema muscular, el hígado y el corazón.

A pesar de la búsqueda tanto clínica como por laboratorio, no encontramos como en otras series, alteraciones con frecuencia significativa de otros órganos o sistemas diferentes del nervioso y muscular, sin embargo cabe señalar que el tamaño de nuestra población aún es sólo la quinta parte de la publicada por Munnich<sup>46</sup>.

En nuestra serie observamos, ciertas asociaciones interesantes, aunque infrecuentes en las mitocondriopatías, como la presencia de miastenia gravis con anticuerpos positivos contra receptores de acetilcolina (Ach) (caso 8), en quien se corroboró síndrome de Keams-Sayre (SKS) y una paciente con síndrome de Leigh (caso 26) con presencia de anticuerpos contra Ach sin manifestaciones miasténicas, en quien se detectó deficiencia de más del 80% de la actividad de COX y SDH. Varios autores han confirmado la asociación de enfermedades inmunológicas con alteraciones mitocondriales secundarias<sup>113,114</sup>. Plewnia y cols<sup>116</sup> identificaron un paciente adulto con SKS y miastenia gravis con anticuerpos contra Ach. Aún no se ha establecido si la alteración inmunológica asociada al SKS es primaria o secundaria a la mutación del DNAm, ya que también se han referido pacientes con SKS que desarrollan miastenia gravis, varios años después de haberse detectado la enfermedad

mitocondrial. Hasta el momento no se han referido en la literatura la asociación de anticuerpos contra Ach con deficiencia enzimática de COX y SDH.

Gracias a los grandes avances científicos y tecnológicos obtenidos durante los últimos siglos, se han descubierto diversos mecanismos que provocan enfermedades relacionadas con el metabolismo energético. El estudio metabólico de un paciente con sospecha de mitocondriopatía, puede llegar a requerir varias líneas de investigación relacionadas con el transporte y la utilización de sustratos, ciclo de Krebs, la cadena respiratoria y/o la fosforilación oxidativa<sup>6</sup>.

El número de publicaciones sobre enfermedades mitocondriales incrementó dramáticamente durante la última década del Siglo XX<sup>SM</sup>, especialmente aquellas relacionadas con mutaciones del DNAm<sup>t</sup> y deficiencias enzimáticas de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Con pocas excepciones, una de las características más sobresalientes del estudio metabólico de estas patologías, lo constituye la elevación del lactato (L) corporal, acompañado o no de modificaciones en los niveles del piruvato (P) y los cuerpos cetónicos: en especial el  $\beta$ -hidroxibutirato (BOH) y el acetoacetato (AA). La combinación de estos productos y sus índices de relación nos orientan sobre la posible vía metabólica afectada<sup>40,46</sup>

En nuestra serie, sólo una paciente (caso 3) del grupo 1, tuvo datos sugestivos de alteración de la beta oxidación al presentar disfunción hepática con episodios comatosos recurrentes e hipoglucemia sin formación de cetonas y niveles normales de camitina.

Las alteraciones de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa provocan generalmente elevaciones simultáneas de los índices L/P mayor de 20 y BOH/AA mayor de 2<sup>112</sup>.

En una población de 50 niños, Tulinius y cols<sup>21</sup> refieren incremento estadísticamente significativo en los niveles de lactato (sérico y LCR) de los pacientes con mitocondriopatía confirmada (n=20), en comparación con los que tuvieron otras enfermedades no mitocondriales (n=20). En nuestra serie, encontramos que los niños con mitocondriopatía confirmada (n=14) tuvieron los valores promedio más altos de lactato, tanto en sangre como LCR. No hubo diferencias significativas al comparar los niveles promedio de lactato con los pacientes sin enfermedad mitocondrial (n=5). Sin embargo, no se pudieron realizar comparaciones con valor estadístico debido tal vez a que el número de falsos positivos en nuestra población es aún muy reducido.

En nuestra serie de 33 casos, el incremento de lactato se detectó en 18 niños, predominantemente en LCR, ya que como se ha demostrado, las elevaciones de lactato en LCR se detectan generalmente antes que las séricas<sup>39,41</sup>. En el grupo de mitocondriopatas confirmados encontramos 9 casos con elevación de lactato, todos ellos con una o más deficiencias enzimáticas de la cadena respiratoria. Tres pacientes tuvieron acidemia láctica acompañada de una relación L/P mayor de 20, únicamente en LCR. En contraste, sólo un caso con L/P superior a 20 tanto en sangre como LCR. Uno de los lactantes con síndrome de Leigh, con menos del 80% de la actividad de COX y SDH, presentó discreta elevación de lactato en LCR con incremento importante del BOH y AA en el suero, LCR y orina, sin alteración de los índices L/P ni BOH/AA. Tampoco encontramos, como se esperaba, que todos aquellos casos con síndrome de Fanconi tuvieran simultáneamente niveles normales o bajos de lactato en sangre secundario a su elevada excreción urinaria<sup>48</sup>.

Es importante destacar que este número tan reducido de pacientes con acidemia láctica y L/P elevada, probablemente se debe a que la determinación de lactato y piruvato se realizó

en la mayoría de nuestros pacientes en condiciones de reposo, ayuno y sin reto metabólico secundario o inducido<sup>21</sup>. Bajo estas condiciones, los índices L/P y BOH/AA se encontraron elevados únicamente en tres pacientes, uno del grupo de mitocondriopatía confirmada y dos del grupo de sospechosos.

La elevación del lactato corporal también puede detectarse en forma indirecta a través de la cromatografía de aminoácidos, con la cual es posible encontrar la elevación sérica de  $\alpha$ -alanina o prolina y ocasionalmente hipermetioninemia, así como hipocitrulinemia en la deficiencia del complejo V<sup>46</sup>. Sólo en uno de los tres pacientes con SKS (el caso 8) se detectó elevación sérica de alanina, acompañada de alta excreción urinaria de lactato. El estudio de los ácidos orgánicos nos ayudó a descartar otras causas de acidemias orgánicas que provocan aumento de lactato<sup>36,39,116</sup>.

Encontramos en cuatro casos elevación urinaria de los ácidos 4-hidroxifenilacético y 3-hidroxi-isovalérico estos hallazgos pueden detectarse en población normal o por contaminación bacteriana<sup>116</sup>.

La mayoría de los exámenes para estudiar enfermedades del metabolismo, como la cuantificación de lactato, piruvato,  $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato, requieren de laboratorios altamente especializados con riguroso control de calidad. La significativa correlación biológica y estadística de los valores de la brecha aniónica sérica con los de lactato en LCR, y con su relación L/P de nuestros pacientes con mitocondriopatía confirmada, corrobora nuestra primera hipótesis. Este hallazgo podría ser de utilidad en nuestro medio, para capturar pacientes sospechosos de tener alteraciones de la cadena respiratoria, antes de realizar estudios más costosos y sofisticados. Como se sabe, la brecha aniónica es un estudio muy sencillo y accesible, que calcula en forma indirecta y

aproximada la cantidad de aniones en la sangre, siendo el lactato el principal anión corporal. La brecha aniónica se determina cuantificando el resultado de sodio más potasio, menos cloro más bicarbonato, en ausencia de factores como fiebre, infección, convulsiones, intoxicación por salicatos, entre otras<sup>42</sup>. Para proponer a la brecha aniónica sérica como herramienta diagnóstica, como lo proponemos en nuestra segunda hipótesis se necesita extender este estudio para captar un mayor número de pacientes falsos positivos, que nos permitan realizar una evaluación para pruebas diagnósticas relacionadas con sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Los resultados de los estudios complementarios de laboratorio clínico y gabinete generalmente son inespecíficos<sup>21,40,42</sup>. Sin embargo, debido al carácter multiorgánico de las citopatías mitocondriales, se realizan en todo paciente sospechoso para detectar cuáles son los órganos o sistemas afectados, así como para determinar la gravedad y evolución de los mismos<sup>46</sup>.

Aunque los estudios neurofisiológicos<sup>41,51,52,53,56,60</sup> y de imagen<sup>56,61,62,63,64,66,68,69</sup> son inespecíficos, nos permiten evaluar el sistema nervioso, tanto central como periférico y el muscular. La información y sensibilidad de los mismos dependen de los recursos tecnológicos de cada institución.

Todos los pacientes del grupo 1, con mitocondriopatía confirmada, tuvieron lentificación en la actividad de base del electroencefalograma (EEG), con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los otros dos grupos de estudio (sospechosos y descartados). La lentificación de la actividad eléctrica cerebral es la alteración electroencefalográfica más frecuente en los pacientes con citopatías mitocondriales. Tulinius y cols<sup>60</sup> también la encontró este patrón en el 100% de su población.

La actividad cortical delta intermitente del ritmo frontal (FIRDAs) es un hallazgo electroencefalográfico inespecífico y poco frecuente en Neurofisiología, este fenómeno se encuentra ocasionalmente en pacientes con encefalopatías metabólicas, alteraciones difusas del funcionamiento cerebral y alguna de las siguientes patologías: neoplasias intracraneanas de la línea media o fosa posterior, absceso o infarto cerebrales, demencia o diálisis peritoneal <sup>117</sup>. Una de nuestras pacientes con SKS (caso 8) presentó FIRDAs en su registro electroencefalográfico, de nuestro conocimiento es la primera vez que se detecta esta actividad en una enfermedad mitocondrial.

Al igual que la serie de casos de Van Erven y cols <sup>81</sup>, en cuya población predominaron las alteraciones de la cadena respiratoria, nosotros también encontramos una baja frecuencia de epilepsia con o sin EEG paroxístico. La frecuencia de epilepsia referida en las diferentes series de mitocondriopatías, se incrementa en aquellas poblaciones que tienen mayor número de pacientes con síndromes mitocondriales que se caracterizan por presentar episodios paroxísticos epilépticos como MERFF, MELAS y Alper <sup>60</sup>.

Diversos estudios refieren alteraciones en los potenciales evocados (PE) de pacientes con citopatías mitocondriales. Las respuestas más frecuentes se relacionan con disminución en la amplitud y retraso en la latencia, hasta un 75% de los casos en las modalidades visual (PEV) y somatosensorial (PESS), y sólo en un 47% en los PE auditivos de tallo (PEAT)

<sup>51,56,57,58</sup>

En nuestra serie encontramos resultados similares tanto en los trazos como en las diferentes modalidades de PE, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de mitocondriopatías confirmados y sospechosos o descartados. Probablemente

se podrán realizar comparaciones estadísticas al incrementar el número de pacientes en cada grupo de nuestro estudio.

Los hallazgos electromiográficos (EMG) y de velocidad de conducción nerviosa (VCN) que se han referido en la literatura son muy heterogéneos de un paciente a otro, incluso con el mismo tipo de mitocondropatía<sup>51,52</sup>. Los patrones de la EMG en pacientes con diagnóstico confirmado varían desde francamente miopáticos, neuropáticos o la combinación de ambos, hasta cambios inespecíficos o con respuestas normales<sup>42,49,51</sup>.

Como lo refieren Van Erven y cols, en su serie de 12 casos con síndrome de Leigh<sup>51</sup>, nuestra población también tuvo una mínima frecuencia de alteraciones tanto en la EMG como la VCN. Cabe señalar que en ambas series, los resultados de EMG y VCN no correspondieron con la hipotonía y/o hiporreflexia detectadas clínicamente. Es interesante mencionar, que en estudios neuropatológicos, ultraestructurales y morfométricos, se ha encontrado afección del nervio periférico en el 100% de pacientes adultos con diversas mutaciones del DNAm<sup>53</sup>. Estos estudios no se han realizado en poblaciones pediátricas. Teóricamente es probable que en el adulto, a diferencia del niño, se acumule mayor cantidad de DNAm mutado a través de los años, lo que podría explicar la neuropatía durante la historia natural de estas enfermedades<sup>14,15,19</sup>. Sin embargo, para poder comprobarlo se necesitan más estudios que correlacionen los cambios neuropatológicos con la edad, evolución y VCN.

A través de la tomografía axial computarizada (TAC) y la imagen por resonancia magnética (IRM), se han descrito diversas alteraciones, todas ellas inespecíficas, tanto corticales como subcorticales que comprometen a la sustancia blanca y/o gris<sup>51,52,53</sup>. La TAC fue el recurso de imagen más accesible en nuestro medio, que detectó el mayor número de alteraciones (85.7%) con significancia estadística para el grupo de pacientes con mitocondriopatías

confirmadas. Los hallazgos más frecuentes fueron los relacionados con cambios sugestivos de atrofia córtico-subcortical, también se observaron hiperdensidades subcorticales compatibles con depósitos minerales anormales. Como se sabe, la IRM tiene mejor definición y sensibilidad para visualizar las estructuras del tallo cerebral y la sustancia blanca<sup>63,64</sup>. Aunque la IRM nos permitió delimitar y entender mejor la naturaleza de las alteraciones, el número aun limitado de estos estudios en nuestra población, no permitió realizar análisis comparativo entre la TAC y la IRM.

En el 2001, Vladutiu y cols<sup>92</sup> revisaron en forma retrospectiva (16 años) las IRM cerebrales de lactantes y pre-escolares con sospecha de mitocondriopatía, detectando anomalías sólo en 63% de los casos confirmados. Probablemente este bajo porcentaje se debe, a que hace una década se tenía menor definición de imagen por unidades Tesla en la IRM, lo que repercutía en la sensibilidad del instrumento.

Actualmente la espectroscopia por resonancia magnética (SRM) permite detectar, en forma no invasiva, algunos substratos y productos del metabolismo oxidativo en el músculo y el SNC<sup>69,70,71,73</sup>. Con esta técnica identificamos, en el grupo de mitocondriopatías confirmadas, un caso con disminución en la señal de colina y dos más con aumento de lactato.

En un futuro se esperan perfeccionar las técnicas de SRM muscular in vivo, que tendrá ventajas en poblaciones pediátricas de pacientes sospechosos, al no requerir sedación anestésica<sup>118</sup>.

El músculo estirado es el tejido que más se ha utilizado en el humano para el estudio morfológico, bioquímico y molecular de la mitocondria<sup>74,75,92</sup>. Los resultados positivos de uno o más de estos estudios nos permitieron apoyar en nuestra población el diagnóstico de enfermedad mitocondrial.

En nuestros casos y el de otras series pediátricas con mitocondriopatías confirmadas, los hallazgos histopatológicos más frecuentes fueron inespecíficos<sup>44,77, 82</sup>.

Las tinciones inmunohistoquímicas han logrado identificar, en forma indirecta, algunas de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. DiMauro y cols<sup>8</sup>, refieren que la tinción para succinato deshidrogenasa (SDH) ha sido la más sensible para detectar anomalías mitocondriales en sus biopsias de músculo estriado. En nuestra serie, la mayoría de los estudios histoquímicos del tejido muscular tuvieron resultados inespecíficos. Es importante destacar, que aún está pendiente de realizar la tinción de COX en nuestra población. El aumento en la actividad oxidativa fue la principal alteración referida en cinco pacientes, sólo tres casos fueron positivos para SDH, uno para NADH y otro para ATPasa, sin correlación con el diagnóstico enzimático cuantificado de la cadena respiratoria, como ya ha sido referido en la literatura<sup>82</sup>. La presencia y en ocasiones la ausencia, de ciertos marcadores histoquímicos e inmunohistoquímicos en el músculo pueden ser altamente sugestivos de enfermedad mitocondrial. Aunque la presencia de fibras rojas rasgadas (FRR) es diagnóstica, su ausencia no la descarta. Descubrir FRR en el músculo de un paciente, depende en algunos casos, de la evolución y el estadio clínico en el que se encuentre, ya que en ciertos tipos de miopatías mitocondriales desaparecen en el curso de la enfermedad, y en otros se requieren estadios avanzados para detectarlas<sup>76,77</sup>. La mayoría de las biopsias musculares de lactantes y niños pequeños con enfermedades mitocondriales, no tienen FRR y es por esto que en nuestra serie, sólo las detectamos en una adolescente de los tres casos de SKS.

Es importante destacar, que muchos defectos mitocondriales carecen de marcadores tisulares, como en la deficiencia de las enzimas piruvato deshidrogenasa (PDHC), piruvato

carboxilasa (PC), camitina palmitoil transferasa (CPT) o síndrome LHON y NARP<sup>76</sup>, lo que dificulta más su identificación

En diversas poblaciones pediátricas con citopatías mitocondriales, la microscopía electrónica se considera el estudio histopatológico de mayor utilidad diagnóstica, ya que las alteraciones ultraestructurales se detectan en más del 70% de las biopsias musculares<sup>71,82,92,93</sup>. Hasta el momento, el número de casos con microscopía electrónica en nuestra serie es aún limitado, por lo que en un futuro realizaremos el análisis comparativo estadístico

El estudio cuantitativo de la actividad enzimática de la cadena respiratoria, en niños y en adultos, es uno de los recursos diagnósticos más importantes para apoyar una mitocondriopatía, en ausencia de mutaciones demostrables en el DNAm<sup>71,82,89,92,93</sup>.

Con excepción de un paciente con probable alteración de la beta oxidación, la deficiencia cuantitativa parcial o total de una o más enzimas de la cadena respiratoria, nos permitió agrupar a la mayoría de los pacientes con citopatía mitocondrial confirmada en nuestro estudio. Los pacientes que iniciaron sintomatología desde la lactancia, tuvieron una frecuencia significativa mayor de deficiencia parcial o total de COX, seguida de la NADH. Marin-García<sup>83</sup> encontró resultados similares a los nuestros, sin embargo, en su serie la deficiencia de NADH fue más frecuente que la de COX. Es interesante señalar que la actividad de los complejos I y III (NADHCCR) no se modifica con la edad como lo hace la actividad del complejo IV (COX). Ya que la actividad de citrato sintetasa se mantiene constante a lo largo de la vida, diversos estudios consideran que es el único discriminador, con significancia estadística para diagnosticar defectos en la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa<sup>82</sup>. En nuestros pacientes, los valores promedio de la actividad de

citrato sintetasa no mostraron diferencias estadísticamente significativas, entre los mitocondriopatas confirmados y los otros dos grupos (sospechosos y descartados), probablemente porque la muestra del presente estudio aún es pequeña.

En un futuro incluiremos en nuestro estudio, técnicas para detectar otras enzimas importantes del metabolismo energético correspondientes al complejo PDHC y PC.

A todos los pacientes de nuestra serie se les realizó la réplica tipo Southern en sangre y músculo para detectar posibles ablaciones y/o duplicaciones del DNAm<sup>t</sup>. Sólo a dos se les buscaron por PCR las mutaciones puntuales más frecuentes de MERRF y MELAS respectivamente. Con estas técnicas fueron identificados en toda nuestra población (N=33) sólo tres mutaciones del DNAm<sup>t</sup>. Aún debemos explorar en los dos pacientes sospechosos, la posibilidad de otras mutaciones puntuales, menos frecuentes, que también provocan MERRF y MELAS<sup>9</sup>.

Aunque el músculo esquelético ha sido el tejido de elección en la mayoría de los estudios sobre citopatías mitocondriales, publicaciones recientes recomiendan el estudio de mayor número de tejidos posibles, en especial aquellos clínicamente más afectados para aumentar la sensibilidad diagnóstica antes de descartar una mitocondriopatía<sup>29</sup>. Esto no siempre es posible debido a las limitaciones biológicas y técnicas de ciertos tejidos como la retina, el nervio óptico, el músculo liso etc. Actualmente se han propuesto nuevas pruebas diagnósticas, aún sofisticadas, que incluyen estudios polarográficos y espectrofotométricos con tejidos en fresco y congelados en nitrógeno líquido respectivamente, que requieren muy poca cantidad de músculo (10-100 mgs)<sup>46</sup>. Estas y otras nuevas pruebas serán prometedoras especialmente en el estudio de lactantes y niños pequeños.

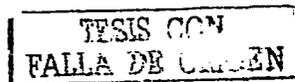
El espectro de las citopatías mitocondriales en la niñez es cada vez mayor, por lo que el diagnóstico inicial depende de una alta sospecha clínica, apoyada en estudios bioquímicos y morfológicos seleccionados en forma apropiada<sup>49</sup>. Con ello se pretende, por un lado aprovechar al máximo los tejidos que se sometan a estudio, y por otro lado optimizar los recursos diagnósticos más sofisticados.

### VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gray MW. The Endosymbiont Hypothesis Revisited. *International Rev Cytol.* 1992;141:233-357.
- 2.- Gray MW. Origin and Evolution of Organelle Genomes. *Curr Op Genet & Devel* 1993; 3:884-890.
- 3.- Capaldi R A. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1982;694:291-306
- 4.- DiMauro S, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch. Neurol* 1993;50:1197-1208
- 5.- De Vivo DC, DiMauro S. Alteraciones mitocondriales. En Swaiman KF ed. *Neurología Pediátrica: principios y practicas.* Madrid: Mosby/Doyma Libros, S.A., 1996.
- 6.- Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, deBruijn M H L, Coulson A R, Drouin J, Eperon I C, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465
- 7.- Manottini P, Chomyn A, Riley M, Contrell B, Doolittle R F, Attardi G. Identification of the polypeptides encoded in the unassigned reading frames 2, 4, 4L and 5 of the human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:1563-1567.
- 8.- Zeviani M, Bonilla E, De Vivo DC, et al. Mitochondrial diseases. *Neurol Clin* 1989; 7:123-56
- 9.- DiMauro S, Hirano M, Bonilla E, De Vivo DC. The mitochondrial disorders. En Berg BO ed. *Principles of Child Neurology.* New York: McGraw-Hill 1996.
- 10.- Shanke S. Mitochondrial encephalomyopathies: defects of nuclear DNA. *Brain Pathol* 1992;2:159-62

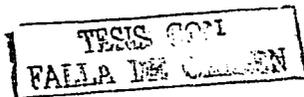
- 11.- Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *J Bioenerg Biomem* 1994;26:251-259.
- 12.- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985, 17:521-38.
- 13.- Necklemann N., Li K, Wade R P., Shuster R., Wallace DC. cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:7580-7584
- 14.- Brown M D, y Wallace D C Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *J Bioenerg Biomem* 1994;26 273-289
- 15.- DeVivo DC, DiMauro S Mitochondrial defects of brain and muscle. *Biol Neonate* 1990;58 (suppl) 54-69
- 16.- DiMauro S, Bonilla E, Lombes A, Moraes CT et al Mitochondrial encephalomyopathies *Neurol Clin* 1990;8 483-506
- 17.-Torrioni A, Wallace DC Mitochondrial DNA variation in human population and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *J Bioenerg Biomembr* 1994;26 261-277
- 18 - Nagley P, Zhang C, Martinus RD, et al Mitochondrial DNA mutation and human aging: Molecular biology, bioenergetics, and redox therapy. En DiMauro S, Wallace DC eds: *Mitochondrial DNA in Human Pathology* New York, Raven Press 1993, pp 137-157.
- 19.- Richter C Role of mitochondrial DNA modifications in degenerative disease and aging. En Lee CP ed: *Current topics in Bioenergetics Molecular basis of mitochondrial pathology* San Diego, Academic Press 1994, pp1-15.
- 20.- Ballinger SW, Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial Myopathies:genetic aspects. En Lee CP ed. *Current topics in Bioenergetics Molecular basis of mitochondrial pathology*. San Diego, Academic Press 1994, pp 59-92
- 21.- Tulinius MH, Holme E, Oldfors A. Mitochondrial encephalomyopathies in childhood.I Biochemical and morphologic investigations. *J Pediatr* 1991;119:242-50.
- 22.- Scholte H.R. The biochemical basis of mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomed* 1988;20 161-191.
- 23 - Nicolls DG Interacción de los orgánulos bioenergéticos con su entorno. En *Bioenergética. Introducción a la Teoría Quimiosmótica*. Barcelona 1987, Reverté.S.A. pp 177-187.

- 24.- Shanske S, DiMauro S Mitochondrial Myopathies. Biochemical aspects. En Lee CP: Current topics in bioenergetics. Molecular basis of mitochondrial pathology. San Diego, Academy Press 1994. pp 21-51
- 25.- Capaldi R A Mitochondrial myopathies and respiratory chain proteins. TIBS 1988;13:144-148.
- 26.- Shoffner JM Oxidative phosphorylation disease diagnosis. Seminars in Neurology 1999; 19 341-351
- 27.- Zeviani M. Nucleus-driven mutations of human mitochondrial DNA. J Inheret Metab Dis 1992,15456-471
- 28.- Johns DR. Mitochondrial DNA and disease. N Engl J Med. 1995 ;333:638-644.
- 29.- Munnich A, Rotig A, Chretien D et al. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. J Inheret Metab Dis. 1996,19:521-527.
- 30.- Holt I J, Harding A E, Cooper, Morgan-Huges J.A. Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with mayor deletions of muscle mitochondrial DNA. Ann Neurol 1989,26 699-708.
- 31.- Zeviani M, Didonato S. Neurological disorders due to mutations of the mitochondrial genome. Neuromuscular Disord 1991,1 165-172
- 32.- DeVivo DC, DiMauro S Mitochondrial encephalomyopathies. Int Pediatr. 1990;5:112-120
- 33.- Inui K, Fukushima H, Okada S et al. Mitochondrial encephalomyopathies with the mutation of the mitochondrial tRNA (leu)(URR) gene. J Pediatr 1992;120:62-66.
- 34.- Hanna MG, Nelson I, Morgan-Hughes JA, et al. Congenital encephalomyopathy and adult-onset myopathy and diabetes mellitus: different phenotypic associations of new heteroplasmic mtDNA tRNA glutamic acid mutation. Am J Hum Genet 1995; 56:1026-33
- 35.- Shapira Y. Clinical aspects of mitochondrial encephalomyopathies. Int Pediatr 1993;8 225-232
- 36.- Robinson BH. Lactic Acidemia (disorders of piruvate carboxilase, piruvate dehidrogenase) En Scriver CR et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. McGraw Hill Inc. New York 1995. pp1479-1499.
- 37.- Evans OB. Lactic Acidosis in Childhood: Part II. Pediatr Neurol 1986;2:5-12
- 38.- Evans OB. Lactic Acidosis in Childhood: Part I. Pediatr Neurol 1985;1:325-8.

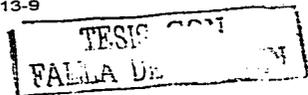


- 39.- Jordan GW, Statland B, Halsted C. CSF lactate in diseases of the CNS. Arch Intern Med; 1993;143:85-88.
- 40.- Karpati G, Arnold D, Matthews P, Shoubridge E et al. Correlative multidisciplinary approach to the study of mitochondrial encephalomyopathies. Rev Neurol 1991;147:455-461.
- 41.- Hutchesson A, Preece MA, Gray G, Green A. Measurement of lactate in cerebrospinal fluid in investigation of inherited metabolic disease. Clinical Chemistry 1997;43:158-161.
- 42.- Jackson MJ, Schaefer JA, Bindoff LA, et al. Presentation and clinical investigation of mitochondrial respiratory chain disease. A study of 51 patients. Brain 1995;118 (pt2): 339-57
- 43.- Emmett M & Nanns R. Clinical use of the anion gap. Medicine 1977;56:38-54.
- 44.- Oh MS & Carroll HJ. The anion gap. New Eng J Med 1977;297:814-817.
- 45.- Roe CR, Coates PM. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. En Scriver CR et al. The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw Hill Inc. New York 1995, pp1501-1533
- 46.- Munnich A, Roting A, Cormier-Daire V, Rustin P. Clinical presentation of respiratory chain deficiency, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill, 2001, p 2261-2274.
- 47.- Velázquez A, Vela-Amieva M, Ciceron-Arellano Y, Ibarra-González Y, Pérez-Andrade ME, Olivares-Sandoval Z, Jiménez-Sánchez G. Diagnosis of inborn of metabolism. Arch Med Res 2000. 31: 145-150.
- 48.- Zeviani M, Taroni F. Mitochondrial disease. Baillière's Clin Neurol 1994; 3:315-334.
- 49.- Arpa-J, Campos-Y, Cruz-Martinez-A, Barreiro-P, et al. Clinical and investigative approaches in mitochondrial diseases. A review of 15 cases. Neurología 1994;9:324-36.
- 50.- Tulinius MH, Hagne I. EEG findings in children and adolescents with mitochondrial encephalomyopathies. A study of 25 cases. Brain Develop 1991;13:167-173.
- 51.- Van Erven PMM, Colon EJ, Gabreels FJM, Renier OW, Vingerhoets DM. Neurophysiological studies in the Leigh syndrome. Brain Dev 1986;8:590-5.
- 52.- Serra G, Piccinu R, Tondi M, Muntoni F, Zeviani M, Mastropalo C. Clinical and EEG findings in eleven patients affected by mitochondrial encephalomyopathy with MERRF-MELAS overlap. Brain & Develop 1996;18:185-191.
- 53.- Fujimoto S, Kumiko M, Shibata H, Kanayama, Kobayashi M et al. Serial electroencephalographic findings in patients with MELAS. Pediatr Neurol 1999;20: 43-48.

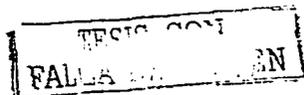
54. - Navaux RK, Nyhan W, Barshop BA, Poultn J, et al. Mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann Neurol* 1999;45: 54-58.
55. - Isozumi K, Fukuuchi Y, Tanaka K, Sakuta R, et al. MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)mtDNA mutations that induces subacute dementia which mimicks Creutzfeldt-Jakob disease. *Intern Med* 1994;33:543-6
56. - Tanaka S, Osari S, Ozawa M, Yamanouchi H, Goto Y, et al. Recurrent pain attacks in a 3-year-old patient with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF): a single-photon emission computed tomographic (SPECT) and electrophysiological study *Brain & Develop* 1997;19 205-208
57. - Seki A, Nishino Y, Goto Y, Maegaki Y, Koeda T. Mitochondrial encephalopathy with 15915 mutation: clinical report *Pediatr Neurol* 1997;17:161-164.
58. - Sartucci F, Rossi B, Murni L. Evoked potentials in the evaluation of patients with mitochondrial myopathy *Eur Neurol* 1993;33 428-35
59. - Schroder JM. Neuropathy associated with mitochondrial disorders. *Brain Pathol* 1993;3 177-90
60. - Sembrano E, Barthlen GM, Wallace S, Lamm C. Polysomnographic findings in a patient with the mitochondrial encephalomyopathy NARP. *Neurology* 1997; 49:1714-1717
61. - Barkovich AJ, Good WV, Berg BO, et al. Mitochondrial disorders: analysis of their clinical and imaging characteristics. *AJRN Am J Neuroradiology* 1993; 14:119-37.
62. - Huang CC, Wai YY, Wei YH, et al. Mitochondrial encephalomyopathies:CT and MRI findings and correlations with clinical features. *Eur Neurol* 1995;35:199-205.
63. - Barkovich AJ. Toxic and metabolic brain disorders. En Barkovich AJ ed: *Pediatric Neuroimaging*. 3a. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 2000. pp 71-156.
64. - Leutner C, Layer G, Reiser M, et al. Cerebral MR in ophthalmoplegia plus. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994;15 5812-7
65. - Chen RS, Huang CC, Lee CC, Wei YH. Overlapping syndrome of MERRF and MELAS: Molecular and neuroradiological studies. *Acta Neurol Scand*. 1993; 87:494-498.
66. - Rosen L, Phillips S, Enzmann D. Magnetic resonance imaging in MELAS syndrome. *Neuroradiology* 1990;32 168-171.



- 67.- Absalon MJ, Harding CO, Fain D, Li L, Mack KJ. Leigh syndrome in an infant resulting from mitochondrial DNA depletion. *Pediatr Neurol* 2001;24:60-63.
- 68.- Nakagawa E, Hirano S, Yamanouchi H, Goto Y, Nonaka Y et al. Progressive brainstem and white matter lesions in Kearns-Sayre syndrome: case report. *Brain & develop* 1994;16:416-8.
- 69.- Krageloh-Mann I, Grodd W, Ruitenbeek W, et al. Assessment and therapy monitoring of Leigh disease by proton spectroscopy. *Pediatr Neurol* 1992;8:60-4.
- 70.- Matthews PM, Allaire C, Arnold DL, et al. In vivo muscle magnetic resonance spectroscopy in the clinical investigation of mitochondrial disease. *Neurology* 1991; 41:114-120
- 71.- Matthews PM, Andermann F, Arnold DL et al. Proton MR spectroscopic characterization of differences in regional brain metabolic abnormalities in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology* 1993;43 2484-2490
- 72.- Tzika AA, Ball WS, Kirks DR, et al. Clinical proton MR spectroscopy of neurodegenerative disease in childhood. *AJNR AM J Neuroradiol* 1993;14:1267-81; discussion 1282-4
- 73.- Kuhl CK, Layer G, Reiser M et al. Mitochondrial encephalomyopathy: correlation of P-31 exercise MR spectroscopy with clinical features. *Eur Neurol* 1995;35:199-93.
- 74.- Dubowitz V. *Muscle disorders in childhood*. 2a. ed. Saunders London 1995, pp 217-265
- 75.- DiMauro S. Mitochondrial Encephalomyopathies. *Brain Pathol* 1992; 2:111-112.
- 76.- Zeviani M, Antozzi C. Defects of mitochondrial DNA. *Brain Pathol* 1992;2:141-7.
- 77.- Pastoris O, Dossena M, Bianchi E et al. Infantile mitochondria encephalomyopathies: Report on 4 cases. *Eur Neurol* 1993;33:54-61.
- 78.- Collings S, Byrne E, Dennett X. Contrasting histochemical features of various mitochondrial syndromes. *Acta Neurol Scand* 1995;91:287-93.
- 79.- McKelvie PA, Morley JB, Marzuki S et al. Mitochondrial encephalomyopathies: A correlation between neuropathological findings and defects in mitochondrial DNA. *J Neurol Sci* 1991;102:51-60
- 80.- Terauchi A, Tamagawa K, Morimatsu Y, Kobayashi M et al. An autopsy case of mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) with a point mutation of mitochondrial DNA. *Brain & Develop* 1996;18:224-229.
- 81.- Bonilla E, Sciacco M, Moraes CT, et al. New morphological approaches to the study of mitochondrial encephalomyopathies. *Brain Pathol*. 1992 2:113-9



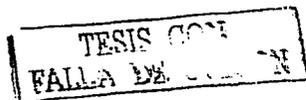
- 82 - Uusimaa J, Remes AM, Rantala H, Vainiopaa L, Herva R et al. Childhood encephalopathies and myopathies: A prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics* 2000, 105: 598-603.
- 83 - Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal M, Sarnat HB et al. Skeletal muscle mitochondrial defects in nonspecific neurologic disorders. *Pediatr Neurol* 1999;21:538-542
- 84 - Lyon G, Adams RD, Kolodny EH. *Neurology of hereditary metabolic diseases of children*. 2a ed McGraw-Hill New York 1996
- 85 - Shoffner JM, Wallace DC. Oxidative phosphorylation diseases. En Scriver CR et al. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7a. De McGraw-Hill New York 1995. pp 1535-1609
- 86 - Roe CR & Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8<sup>th</sup> ed New York, McGraw-Hill 2001, p 2297-2326
- 87 - Fremman FE, Goodman SI. Nuclear-encoded defects of the mitochondrial respiratory chain, including glutaric acidemia type II. En Scriver CR et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill New York 1995, pp1611-1629.
- 88 - Tulinius MH, Holme E, Oldfors A et al. Mitochondrial encephalomyopathies in childhood. II. Clinical manifestations and syndromes. *J Pediatr* 1991,119:251-9
- 89 - Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, Darryl C et al. The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Ann Neurol* 1993;34:827-834
- 90 - Anan R, Nakagawa M, Tanaka H, et al. Cardiac involvement in mitochondrial disease. A study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation* 1995, 91: 955-61.
- 91 - Servadei S. Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscular dis* 1997,7 XII-XVII
- 92 - Vladutiu GD. The laboratory diagnosis of mitochondrial disease: a 16 year experience. *Mitochondrion* 2001, 1: 598-597
- 93 - Dann N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 2001,49: 377-383
- 94 - Medina-Crespo V, Gonzalez-Astazarán A. Síndrome demencial en niños, evaluación diagnóstica. Tesis para el título de especialista en Pediatría Médica 1994. Universidad Nacional Autónoma de México - Instituto Nacional de Pediatría, SS, México D.F.



- 95.- Vázquez-Acevedo M , Coria R , González-Astiazarán A , Medina-Crespo V., Ridaura-Sanz C , González-Halphen D Characterization of a 5025 base pair mitochondrial DNA deletion in Kearns-Sayre syndrome *Biochim Biophys Acta* 1995, 1271. 363-368
- 96.- Santorelli FM., Mak SC , Vázquez-Acevedo M , Gonzalez-Astiazarán A , Ridaura-Sanz C., González-Halphen D , DiMauro S A novel mitochondrial DNA point associated with mitochondrial encephalomyopathy *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 216:835-840
- 97.- Bergmeyer HU *Methods of Enzymatic Analysis* 1988, Vol VI 3a ed pp 588-592
- 98.- Deyl Z, Hyanek J, Horakova M. Profiling of amino acid in body and tissues by means of liquid chromatography *J Chromatogr* 1986, 374 177-250
- 99 - Meier-Augenstein W, Hoffmann GF, Holmes B, Nyhan WL, Sweetman L. Use of thick-film capillary column for the analysis of organic acids in body fluids *J Chromatogr* 1993, B 615 127-135
- 100 -Tanaka K, Hine DG, west-Dull A, Lynn TB Gas-chromatography method of analysis for urinary organic acids I Retention indices of 155 metabolically important compounds. *Clin Chem* 1980, 26 1839 1845
- 101 -Tanaka K, West-Dull A, Hine DG, Lynn TB, Lowe T Gas-chromatography method of analysis for urinary organic acids II Description of the procedure, and its applications to diagnosis of patients with organic acidurias *Clin Chem* 1980,26 187-53
- 102 -Sweetman L Qualitative and Quantitative analysis of organic acids in fluids for diagnosis of the organic acidurias. En Nyhan WL ed *Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine* Appleton-Century-Crofts 1984, Norwalk pp 419-53.
- 103 -Gates SC Dendramis N,Sweeley CC Automated metabolic profiling of organic acid in human urine I Description of Methods *Clin Chem* 1978, 24 1674-1679
- 104 -Hoffmann G, Aramakis, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L Quantitative analysis for organic acids in biological samples, batch isolation followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis *Clin Chem* 1989,35 587-595.
- 105 -DiMauro S , Servide S , Zeviani M , *Ann Neurol* 1987, 22 498-506
- 106 -Davis LG , Dibner MD , Battey JF *Basic methods in molecular Biology*, Elsevier, Nueva York, pp 47-50
- 107 -Zeviani M , Moraes CT , DiMauro S , Nakase MD , Bonilla E , Schon EA., Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38:1339-1346
- 108 -Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2a. ed Cold Spring Harbor 1989.



- 109.- Menkes JH. Metabolic diseases of the Nervous System. En Menkes JH & Samat HB. Child Neurology. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 2000, pp 33-169.
- 110.- Von Kleist-Retzow JC, Cormier-Daire V, De Lonlay P, Parfait B, Chrétien D, Rustin P, Feingold J, Roting A, Munnich A. A high rate of parental consanguinity (20.30%) in cytochrome oxidase deficiency. Am J Hum Genet 1998, 63:428
- 111.- Zeviani M, Bertagnolio B, Uziel G. Neurological presentations of mitochondrial diseases. J Inher Metab Dis 1996, 19:504-520
- 112.- Robinson BH. Lactic acidemia disorders of pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill, 2001, p 2275 - 2295
- 113.- Ohno K, Yamamoto M, Engel AG, Harper CM, Roberts LR et al. MELAS and Kearns-Sayre - type comutation with myopathy and autoimmune polyendocrinopathy. Ann Neurol 1996, 39:762-766
- 114.- Oldfors A, Larsson NG, Lindberg C, Holme E. Mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis. Brain 1993, 116:325-336
- 115.- Plewnia K, Dotti MT, Malandrini A. A rare association of myasthenia gravis and mitochondrial myopathy. A clinical, biochemical and morphologic study of one case. J Submicrosc Cytol Pathol 1977, 29:335-8
- 116.- Chalmers RA, Lawson AM. Organic Acids in Man. New York, Chapman & Hall, 1982, p 212-426, 164-168, 175-184, 192-195
- 117.- Zifkin BG, Gracco RG. An Orderly approach to the abnormal EEG, in Daly DD & Pedley TA (eds). Current Practice of Clinical Electroencephalography 2d ed. New York, Raven Press, 1990, p 253-267
- 118.- Lefai E, Ternier-Cayre A, Vincent A, et al. Enzymatic activities of mitochondrial respiratory complexes from children muscular biopsies: age related evolutions. Biochem Biophys Acta 1995, 1228:43-50
- 119.- Radda GK, Odoom J, Kemp G, Taylor DJ, Thomson C, Styles P. Assessment of mitochondrial function and control in normal and disease states. Biochim Biophys Acta 1995, 1271:15



## **IX. ANEXO**

Flujograma que resume la serie de fases por las que se sugiere debe evaluarse un paciente con sospecha de enfermedad mitocondrial, propuesta por diversos autores<sup>26,32,40,42,46,49</sup>. En la primera fase, es donde la brecha aniónica podría ser una herramienta diagnóstica, la cual en un futuro someteremos a un análisis apropiado.

### **FLUJOGRAMA PARA EL ESTUDIO DE PACIENTES CON SOSPECHA DE CITOPATÍA MITOCONDRIAL**

---

#### **PRIMERA FASE**

Se puede llevar a cabo en centros hospitalarios de segundo nivel de atención médica

- 1.- Para evidenciar alteraciones, incluso subclínicas de aparatos y sistemas de la economía se recomienda realizar
  - \* Biometría hemática completa
  - \* Pruebas de funcionamiento renal (examen general de orina, depuración de creatinina, determinación de los índices de fracción excretada de sodio y de potasio, gasometría venosa)
  - \* Pruebas de funcionamiento hepático (amonio, transaminasas, bilirrubinas, albúmina y globulina, tiempo de protrombina)
  - \* Pruebas tiroideas (TSH, T3, T4 y gamagrama tiroideo y edad ósea por rayos X).
  - \* Valoración cardiológica (rayos X de tórax y electrocardiograma).
- 2.- Para apoyar compromiso muscular.



- **Determinación sérica de la enzima creatinfosfoquinasa.**
- 3.- Para detectar compromiso cortico - subcortical cerebral:**
- **Electroencefalograma**
  - **Tomografía axial computarizada de cráneo, simple y contrastada.**
- 4 - Para apoyar sospecha de elevación indirecta de lactato corporal :**
- **Calculo de la brecha anionica (Na + K) - (Cl + HCO<sub>3</sub>) En ausencia de fiebre, crisis convulsivas, intoxicación por salicilatos, infección, trauma o cirugía**

## **SEGUNDA FASE**

Se llevan a cabo en centros hospitalarios de tercer nivel de atención médica

- 1 - Neuroimagen para detectar lesiones encefálicas características :**
- **Imagen por resonancia magnética nuclear con espectroscopia de los sitios alterados.**
  - **SPECT cerebral con énfasis en tálamos**
- 2 - Estudios neurofisiológicos para delimitar alteraciones del SNC y periférico:**
- **Potenciales evocados multimodales (auditivos de tallo, visuales y somatosensoriales)**
  - **Electrorretinograma**
  - **Electromiografía y velocidad de conducción motora y sensitiva**
- 3 - Biopsia de músculo 1.0 x 1.5cms**
- **El tejido muscular se debe fragmentar en por lo menos 4 partes para los diferentes estudios**
  - **Microscopia de luz, tricolor de Gomori, microscopia electrónica**
  - **Es importante congelar inmediatamente por lo menos 2 fragmentos de tejido fresco en nitrógeno líquido o hielo seco y conservarlo a menos 70 grados, para poder determinar**

la actividad enzimática de la cadena respiratoria y los estudios de genética molecular.

### TERCERA FASE

Se lleva a cabo en instituciones de investigación (UNAM, IMSS, INP)

1.- Para evidenciar alteraciones del metabolismo intermedio:

- Determinación de ácidos orgánicos por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas en orina
- Determinación de aminoácidos séricos por HPLC
- Determinación de ácid carnitinas séricas
- Determinación de actividad enzimática de la piruvato deshidrogenasa

2.- Histoquímica del tejido muscular:

- Tinciones inmunohistoquímicas para SDH, NADH y COX
- Actividad enzimática de la cadena respiratoria (complejos I - IV)
- Actividad de la enzima citrato sintetasa
- Cultivo de fibroblastos para determinar ATPasa

3.- Genética molecular del músculo y leucocitos para detectar mutaciones del genoma mitocondrial

- Replica tipo Southern para detectar ablaciones
- PCR para detectar mutaciones puntuales.