

## **PACIENTE DE 7 MESES CON SÍNDROME DE LEIGH.**

### ***Carla Carnicer.***

*Servicio de Bioquímica, Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.*

### ***Paula Fernández.***

*Servicio de Bioquímica, Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.*

## **EXPOSICIÓN DEL CASO**

### **Presentación**

Paciente varón de 7 meses de edad con deterioro progresivo del estado neurológico (hi-poactividad y crisis comiciales) que ingresa a nuestro hospital para estudio de insuficiencia respiratoria.

### **Historia Clínica**

Padres consanguíneos.

1. Antecedentes patológicos: retardo crecimiento intrauterino, hipoglucemia neonatal, retardo pondoestatural.
2. Exploración clínica: al ingreso se observa hipotonía, nistagmo vertical, trastorno respiratorio que precisa ventilación mecánica.

Pruebas clínicas:

- Tomografía computerizada (TC) craneal: lesiones del tronco encefálico.
- Resonancia Magnética (RNM): lesiones graves en los núcleos basales compatibles con síndrome de Leigh.
- Potenciales auditivos y oftalmológicos alterados con afectación central del tronco encefálico.
- Espectrometría de resonancia magnética nuclear (MRS): Marcado pico de lactato.

Según el cuadro presentado se sospecha que pueda tratarse de un síndrome de Leigh.

Éxitus a los 30 días del ingreso.

---

## Pruebas diagnósticas del laboratorio:

### 1. Estudio Bioquímico, pruebas complementarias:

Se realizó un estudio metabólico en el que no se observó aumento de lactato plasmático y el "status redox" es normal. No se observan aumentos de intermediarios del ciclo de Krebs, cuerpos cetónicos o lactato. En el perfil de ácidos orgánicos en orina se observa aciduria dicarboxílica (adípico, subérico, sebácico) con incremento de derivados endógenos. La aciduria dicarboxílica puede indicar trastorno de la beta-oxidación mitocondrial, dieta con triglicéridos de cadena media (MCT), cetonuria, por lo que en este caso el perfil de ácidos orgánicos no aporta información adicional de la sospecha clínica de síndrome de Leigh. El perfil de aminoácidos plasmáticos y urinarios fue normal.

### 2. Estudio enzimático

Ante la sospecha de Síndrome de Leigh, se realizó la medida de actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, tanto en valor absoluto, como normalizado por citrato sintasa (indicador de masa mitocondrial). Los resultados del estudio enzimático se muestran en la tabla 1a y 1b.

**Tabla 1a:** Resultados del estudio enzimático del paciente en valor absoluto (nmol/min·mg).

Actividad en nmol/min.mg (rango normal)	CI (24,4-41,7)	CI+II (13,0-23,4)	CII (44,0-69,8)	CII+III (22,6-34,7)	CIII (101,0-151,4)	CIV (66,7-193,4)	CS (157,0-312,7)
<b>PACIENTE</b>	<b>14,4</b>	<b>0,6</b>	98,4	24,5	141,3	95,2	248

**Tabla 1b:** Resultados del estudio enzimático del paciente normalizados por citrato sintasa (CS).

Actividad normalizada en mU/U CS (rango normal)	CI/CS (108-191)	CI+II/CS (45-129)	CII/CS (171-353)	CII+III/CS (63-209)	CIII/CS (338-883)	CIV/CS (219-1024)
<b>PACIENTE</b>	<b>56</b>	<b>2</b>	397	99	570	384

CI: actividad del complejo CI de la cadena respiratoria; CI+III: actividad combinada de los complejos CI y CIII de la cadena respiratoria; CII: actividad del complejo CII de la cadena; CII+III: actividad combinada de los complejos CII y CIII; CIII: actividad del complejo CIII de la cadena; CIV: actividad del complejo CIV de la cadena respiratoria; CS: actividad de la citrato sintasa (CS).

Los resultados del estudio enzimático muestran un déficit en la actividad del complejo I y de la actividad de complejo I+III, todo ello indica un déficit del complejo CI (NADH ubiquinona oxidoreductasa, CI).

### 3. Estudio genético:

Las mutaciones causantes de síndrome de Leigh se pueden encontrar tanto en el ADN mitocondrial (ADNmt) como en genes nucleares, y afectan tanto a proteínas estructurales de los complejos de la cadena respiratoria, como a factores de ensamblaje y a factores de traducción.

El complejo I está formado por subunidades que están codificadas tanto por el ADNmtl como por el ADN nuclear (ADNn). En este caso, dado que los padres son consanguíneos, se esperaría que el patrón de herencia fuera recesiva por defectos en la subunidades del complejo I codificadas por el ADN nuclear, no de herencia materna (por mutaciones en el subunidades del mismo complejo codificadas por el ADN mitocondrial).

## RESOLUCIÓN DEL CASO

Los resultados enzimáticos indicaban un déficit en el complejo I y dado que los padres son consanguíneos, se esperaría que el patrón de herencia fuera recesiva por defectos en la subunidades del complejo I codificadas por el ADN nuclear.

Para confirmarlo se realizó una aproximación con secuenciación de nueva generación (NGS) en el que se estudiaron los genes nucleares que codifican para las subunidades del complejo I, encontrándose una mutación en homocigosis en el gen *NDUFV1* (NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit V1). Esta mutación ha sido descrita previamente en niños con déficit del complejo I del sistema OXPHOS y fenotipo de síndrome de Leigh.<sup>1</sup>

## ENFERMEDADES MITOCONDRIALES PRIMARIAS / ENFERMEDADES DE CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

Las enfermedades mitocondriales primarias (EM) son causadas por alteraciones en la fosforilación oxidativa celular (sistema OXPHOS), debido a mutaciones bien en el ADN mitocondrial (ADNmt) o en el ADN nuclear (ADNn), dando lugar a una disminución de la producción de ATP.

### La cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa

Estructuralmente, la cadena respiratoria está formada por 5 complejos enzimáticos (NADH ubiquinona oxidoreductasa (CI), succinato ubiquinona oxidoreductasa (CII, SDH), ubiquinol citocromo C oxidoreductasa (CIII), citocromo C oxidasa (CIV) y ATP sintasa). Estos complejos están constituidos por unas 90 subunidades en conjunto, de las cuales 13 están codificadas por el ADNmt y el resto por el ADNn. La cadena respiratoria además, requiere de dos transportadores electrónicos: coenzima Q10 (CoQ) y citocromo c.

La síntesis de ATP se lleva a cabo en dos procesos acoplados: el transporte electrónico y el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana, lo que genera un gradiente electroquímico necesario para la formación de ATP. En el proceso de transporte electrónico, los electrones son transportados, a través de los complejos CI, CII, CIII y CIV, hasta el oxígeno molecular, el cual se reduce a agua. CI y CII median la transferencia de dos electrones provenientes del NADH y FADH<sub>2</sub> (aceptor electrónico de la oxidación del succinato en el ciclo de Krebs), respectivamente, hasta el transportador electrónico CoQ. CoQ también puede recibir electrones, procedentes de la beta-oxidación y de la oxidación de algunos aminoácidos, a través de la ETF ubiquinona oxidoreductasa. El CIII acepta los electrones procedentes del CoQ reducido, y los transfiere individualmente al citocromo c, el cual cede los electrones al CIV, que media la reducción del oxígeno a agua. Este transporte electrónico está acoplado a la formación de un gradiente de protones, que se genera en CI, CIII y CIV, los cuales bombean protones a través de la membrana mitocondrial interna hasta el espacio intermembrana. La síntesis de ATP se produce por la entrada de estos protones de nuevo a la matriz mitocondrial a través del complejo V (ATP sintasa).

El proceso de fosforilación oxidativa se lleva a cabo en la cadena respiratoria mitocondrial, localizada en la membrana mitocondrial interna, y tiene un control genético dual: por un lado el ADNmt codifica, además de ARNribosomales (rARNs) y ARN de transferencia (tARNs), algunos de los componentes estructurales de la cadena respiratoria. Por otro lado el ADNn también codifica para otros componentes estructurales de la cadena respiratoria, y además de genes para el mantenimiento del ADNmt, factores de ensamblaje y otros factores implicados en la biogénesis de la cadena respiratoria, todos necesarios para su correcto funcionamiento.

Más de 100 genes en total controlan la fosforilación oxidativa, y las mutaciones en cualquiera de estos genes pueden producir un defecto en la cadena respiratoria mitocondrial, dando lugar a una disminución de la producción de energía en forma de ATP.

### **Tipos de mutaciones y genética mitocondrial**

Como ya hemos mencionado las enfermedades mitocondriales pueden deberse a mutaciones en el ADNn o en elADNmt, este sería el primer nivel de clasificación.

#### *1. Mutaciones en el ADN nuclear*

Se heredan tanto de forma recesiva como dominante. Se pueden clasificar según el tipo de genes afectados en:

- mutaciones en genes que codifican subunidades estructurales de la cadena respiratoria.
- mutaciones en genes que codifican factores de ensamblaje.
- mutaciones en genes que codifican factores de traducción.
- mutaciones en genes nucleares relacionados con depleción del DNA mitocondrial o con deleciones múltiples del mismo.

#### *2. La genética del ADNmt tiene unas características específicas:*

- Herencia materna: transmisión de madres a hijos.
- El ADNmt presenta el fenómeno de poliplasmia. En una célula existe un número elevado de moléculas de ADNmt que puede variar en número dependiendo del tejido.
- Heteroplasmia y segregación mitótica: presencia de ADN mitocondrial mutado y normal en la misma célula, al dividirse la célula mitocondrias se distribuyen al azar por lo que las células hijas tendrán un número variable de mitocondrias mutadas y normales.
- Efecto umbral: El fenotipo dependerá del porcentaje de ADN dañado que exista en la célula; es decir, del grado de heteroplasmia de una mutación. Cuando el número de moléculas de ADNmt mutadas es pequeño, el ADNmt normal es capaz de mantener la función mitocondrial. Sin embargo, cuando el número de

copias de ADNmt mutado sobrepasa un umbral determinado, la producción de ATP puede llegar a estar por debajo de los mínimos necesarios para el funcionamiento de los tejidos, llevando al desarrollo de patología mitocondrial.

Al igual que ocurría con los genes nucleares, también se pueden clasificar las mutaciones del ADN mitocondrial en varios tipos:

- Reordenamientos: duplicaciones y deleciones.
- Mutaciones de un solo nucleótido, que afectan a genes que codifican para las subunidades de la cadena respiratoria.
- mutaciones en los genes que codifican tARNs.
- mutaciones en los genes que codifican rARNs.

### **Manifestaciones clínicas**

Los defectos en la cadena respiratoria mitocondrial, conllevan una disminución de la producción de energía en forma de ATP que puede producir una afectación en múltiples órganos, aunque los órganos más dependientes de la producción de ATP serán los que manifiesten más estos defectos (sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, órganos endocrinos y riñón).

Las EM pueden presentarse con manifestaciones clínicas características. También es común presentarlas en varios síndromes clásicos formados por distintas agrupaciones de síntomas. Sin embargo, son enfermedades genéticamente y clínicamente heterogéneas, por lo que la presentación clínica es muy variable según la edad en que se manifieste la enfermedad, sintomatología, severidad, pronóstico o velocidad de progresión. También puede existir una elevada variabilidad clínica dentro de una misma familia. Además puede suceder que una misma mutación sea causante de múltiples fenotipos, o un mismo fenotipo pueda ser causado por mutaciones distintas.

Esta elevada heterogeneidad clínica se explica principalmente por el control genético dual de la fosforilación oxidativa, así como por las características particulares de la genética mitocondrial.

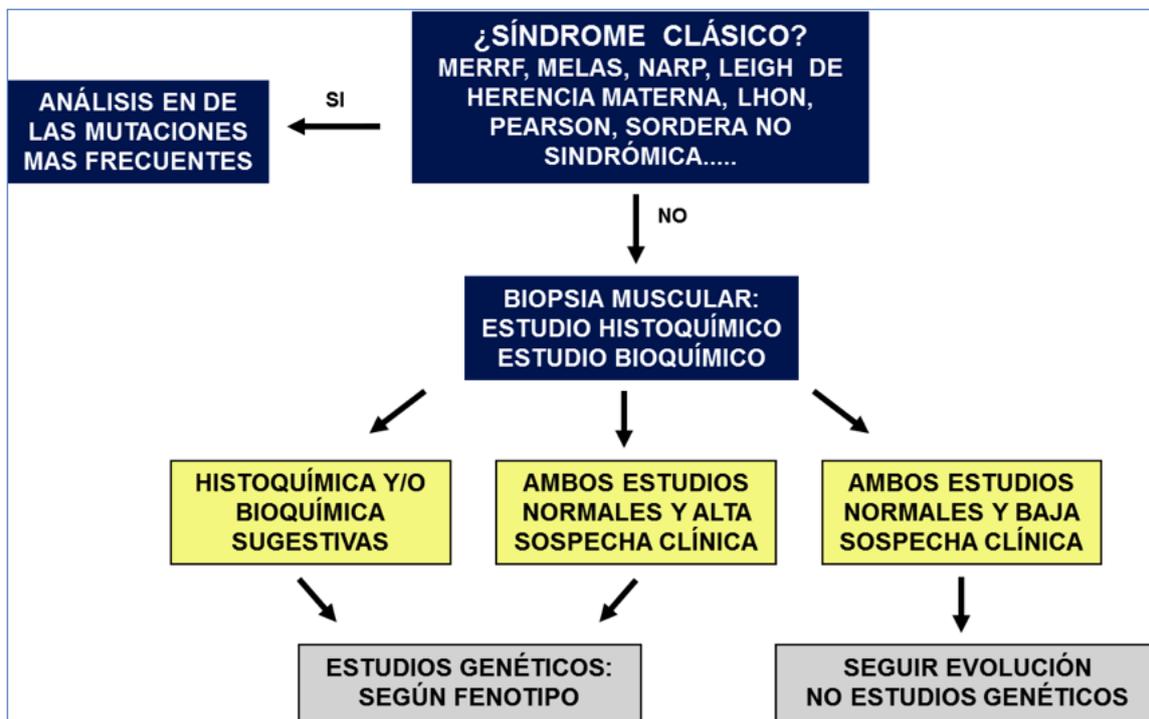
### **Diagnóstico**

Debido a esta alta heterogeneidad genética y clínica de las EM, el diagnóstico requiere una evaluación multidisciplinar que incluye, además de la exploración clínica, distintas pruebas de laboratorio como son: análisis de metabolitos, estudios histológicos, estudios enzimáticos y estudios genéticos. El estudio genético es la demostración final del diagnóstico, pero esto a veces supone un gran desafío debido al elevado número de genes candidatos, requiriendo el soporte o confirmación mediante otras pruebas diagnósticas. A pesar de ello, los resultados obtenidos de estas pruebas no siempre resultan fáciles de interpretar.

El algoritmo diagnóstico (ver Figura 1) empieza con la evaluación clínica. Entre las pruebas

clínicas que pueden orientar al diagnóstico se incluyen la resonancia magnética nuclear de imagen, el Tomografía computerizada (TC) craneal, la espectroscopia de resonancia magnética o la electroencefalografía. También es muy importante realizar una correcta historia familiar que nos permita identificar el patrón de herencia para poder orientar el estudio genético.

En el caso de que se trate de un síndrome clínico "clásico", se puede proceder a realizar directamente el análisis genético. En el resto de casos que presentan rasgos clínicos no característicos que dificultan el diagnóstico definitivo, se suele realizar en primer lugar el estudio histoquímico y bioquímico de la biopsia muscular para intentar encontrar y/u orientar los genes candidatos de estudio.



**Figura 1:** Algoritmo diagnóstico para el estudio de las enfermedades mitocondriales.

### 1. Estudio bioquímico

#### a) Biomarcadores del metabolismo intermediario:

Dentro del estudio bioquímico, los marcadores existentes del metabolismo intermediario no son sensibles ni específicos de enfermedades de cadena respiratoria. No obstante, a veces pueden orientar al diagnóstico. Las magnitudes que más se utilizan son el lactato y el ratio lactato/piruvato.

#### b) Estudios funcionales:

Existen varios estudios bioquímicos, cuantitativos y funcionales, que estudian la función mitocondrial y pueden dar pistas de la localización del defecto mitocondrial. El más comúnmente utilizado para el diagnóstico de enfermedades de cadena respira

toria es el estudio enzimático de los complejos de cadena respiratoria. Éste juega un papel importante dentro del diagnóstico, como podría ser para la pre-selección de gen/genos candidato/s, para los casos en los que el estudio molecular no encuentra una mutación patogénica, o para proporcionar información útil cuando se encuentran variantes desconocidas.

- c) Medida de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial: El Tipo de muestra más utilizada para el estudio enzimático es el músculo, el cual ha de homogeneizarse antes de la determinación de las distintas actividades enzimáticas. Se cuantifican las proteínas del homogeneizado y éste se diluye a una concentración fija de proteínas.

Las actividades de los complejos se miden principalmente por espectroscopia UV-VIS. Para la medida de cada complejo se utilizan reactivos específicos a concentraciones específicas (sustratos, inhibidores, buffers de reacción, estabilizantes, iniciadores de reacción), además de tiempos de incubación y tiempos de reacción distintos. Se monitorizan los cambios de absorbancia a 37°C a longitudes de onda específicas para cada complejo.

Se determinan las actividades de los CI, CII, CIII, CIV por separado, y también se pueden medir las actividades de las combinaciones de CI+CIII y CII+CIII, para poder detectar indirectamente déficits de CoQ10. Es recomendable medir además la actividad de la enzima citrato sintasa (CS), para valorar la masa mitocondrial del tejido, y poder normalizar las actividades absolutas en base a esta actividad.

- d) Enzimología: Interpretación de resultados:

Una actividad enzimática normal no excluye una disfunción mitocondrial primaria (expresión de la alteración en otros tejidos o partes distintas al analizado, efecto umbral...)

Las actividades enzimáticas cercanas al límite inferior de normalidad pueden ser difíciles de interpretar, en algunos casos pueden ser debidas a deficiencias secundarias. En el caso de encontrarse una actividad enzimática por debajo de 1 desviación estándar (SD) en algún complejo, podría sospecharse de una deficiencia primaria, aunque en estos casos es recomendable que haya otros hallazgos que den soporte al resultado obtenido.

Las deficiencias enzimáticas por debajo de 2 SD indican, claramente, que hay una deficiencia primaria.

Se pueden observar deficiencias en complejos aislados de la cadena respiratoria en individuos con mutaciones en los genes codificantes de subunidades estructurales en el ADNmt, o con mutaciones en genes codificantes de subunidades estructurales o proteínas de ensamblaje en el ADNn (excepto en el caso del CII, que sólo está codificado por ADNn).

Como se ha comentado anteriormente, la medida de actividad de las combinaciones de los complejos CI+CIII y CII+CIII puede identificar indirectamente deficiencias de CoQ10. Así, cuando hay una deficiencia de CoQ10, se observa una deficiencia de actividad en ambas combinaciones, junto con actividades normales de los complejos aislados CI, CII y CIII.

Se pueden observar deficiencias múltiples (complejos que contengan subunidades codificadas por mtDNA: CI, CIII, CIV) en mutaciones de genes del ADNmt que controlan la síntesis de proteínas (tRNA o rRNA genes, single deletions) o en mutaciones de genes del ADNn que controlan el mantenimiento del ADNmt

También se pueden observar defectos combinados de los complejos CI, CII y CIII, que pueden ser debidos a alteraciones en el ensamblaje de los complejos ferrosulfurados (FeS).

## 2. Estudio genético:

El establecimiento de un diagnóstico genético adecuado es muy importante para poder realizar un correcto consejo genético a los afectados. Para determinar que genes estudiar es necesario realizar una historia familiar correcta que nos oriente en el modo de herencia lo que indicara la necesidad de estudiar genes nucleares o bien el ADN mitocondrial.

Los estudios moleculares pueden realizarse en ADN genómico y mitocondrial extraído de sangre total o bien en ADN extraído de músculo y/o orina cuando sospechamos de alteraciones en el ADNmt. Para los síndromes clínicos clásicos se realizará directamente el estudio del gen o mutaciones frecuentes relacionadas con ellos.

Cuando la clínica no sea tan clara o no hayan encontrado las mutaciones más frecuentes, la herencia nos indicará si debemos estudiar el ADN mitocondrial o genes nucleares. En ambos casos hay dos aproximaciones: estudio de genes específicos /paneles de genes nucleares, o estudio completo del ADN mitocondrial /exoma clínico para alteraciones nucleares.

## BIBLIOGRAFÍA

**Vilain C et al.** A novel NDUFV1 gene mutation in complex I deficiency in consanguineous siblings with brainstem lesions and Leigh syndrome. *Clin Genet.* 2012 Sep;82(3):264-70).

**Chinnery PF.** Mitochondrial Disorders Overview. 2000 Jun 8 [Updated 2014 Aug 14]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/>

**Rahman S, Thorburn D.** Nuclear Gene-Encoded Leigh Syndrome Overview. 2015 Oct 1. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK320989/>

**Thorburn DR, Rahman S.** Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. 2003 Oct 30 [Updated 2014 Apr 17]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1173/>

**Ruhoy IS, Saneto RP.** The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet.* 2014 Nov 13;7:221-34

---

## EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (*Residente*), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, A. Peña (*Residente*), M. Rodríguez (*Presidente*), N. Rico, MC. Villà.

ISSN 1887-6463 – Marzo 2016 (recibido para publicación Febrero 2016).