



Trabajo Fin de Grado

Primer caso de enfermedad mitocondrial asociada a mutaciones puntuales en el gen *ATAD3C*

First case of mitochondrial disease associated with point mutations in the *ATAD3C* gene

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Autor

Marcos Blanco Santoro

Directora

Pilar Bayona Bafaluy

Facultad de Medicina

Año 2021

Índice

1 Resumen.....	1
2 Palabras clave.....	1
1 Abstract	2
2 Key words.	2
3 Abreviaturas.	3
4 Objetivos.	3
5 Introducción.	4
5.1 Marco teórico general: generalidades de la mitocondria y enfermedad mitocondrial.	4
5.1.1 Generalidades de la mitocondria.	4
5.1.2 Enfermedad mitocondrial.	6
5.2 Marco teórico específico: clúster genético <i>ATAD3</i>	11
5.2.1 Características de los genes pertenecientes al clúster <i>ATAD3</i>	12
5.2.2 Estructura de las proteínas <i>ATAD3</i>	14
5.2.3 Funciones de las proteínas <i>ATAD3</i>	15
6 Resultados.	18
6.1 Mutaciones en el clúster genético <i>ATAD3</i> asociadas a enfermedad mitocondrial en humanos.	18
6.2 Nuevo caso de un paciente con mutaciones puntuales en <i>ATAD3C</i> asociadas a enfermedad mitocondrial.	21
6.2.1 Antecedentes familiares	21
6.2.2 Antecedentes personales	21
6.2.3 Exploración física.....	22
6.2.4 Procedimiento diagnóstico	22
6.3 Manifestaciones clínicas y analíticas de pacientes con mutaciones puntuales en <i>ATAD3</i>	23
6.4 Manifestaciones clínicas y analíticas de pacientes con delecciones o duplicaciones en <i>ATAD3</i>	26
7 Discusión.....	28
8 Conclusiones.	30
9 Material y métodos.....	31
10 Bibliografía.	32

1 Resumen.

Las enfermedades mitocondriales suponen un conjunto de patologías caracterizadas por la alteración de los procesos de producción de energía. Estas pueden ser provocadas por mutaciones nucleares o por mutaciones en el propio material genético del orgánulo. Recientemente se ha descrito que la presencia de determinadas alteraciones en los genes del locus *ATAD3* del cromosoma 1 puede ser causa de este tipo de afectaciones. Un único gen *ATAD3* ha sido detectado en múltiples especies con un alto grado de conservación a lo largo de la evolución. En primates y humanos, este se ha duplicado dos veces en tandem dando lugar a un clúster formado por los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C*.

Las proteínas codificadas por los genes de este clúster pertenecen a la familia de las ATPasas asociadas a diversas actividades celulares o AAA-ATPasas. Al igual que ocurre en todas las proteínas de esta familia, se piensa que los monómeros de *ATAD3* se unen formando hexámeros que, en este caso, se encontrarían anclados a la membrana interna mitocondrial. A pesar de que su función todavía no se ha definido, se cree que son fundamentales en los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial, en el mantenimiento de estructuras específicas del orgánulo y en la organización del DNA mitocondrial en torno a unas estructuras denominadas nucleoides. Del mismo modo, parecen fundamentales en la regulación del metabolismo lipídico.

Desde el año 2016 se ha registrado un total de 50 pacientes que padecen enfermedades mitocondriales relacionadas con mutaciones en estos genes. El fenotipo de estos pacientes incluye alteraciones intrauterinas, retraso en el desarrollo psicomotor, sintomatología neurológica y afectación ocular y cardiaca. También es frecuente encontrar alteraciones del sistema nervioso central en pruebas de imagen así como niveles altos de lactato en la analítica sanguínea. En este trabajo presentamos al primer paciente diagnosticado de enfermedad mitocondrial relacionada con mutaciones puntuales en el gen *ATAD3C*. Al mismo tiempo realizamos una comparativa entre su fenotipo y el del resto de casos publicados teniendo en cuenta los distintos tipos de mutaciones encontradas.

2 Palabras clave.

Enfermedad mitocondrial; clúster genético *ATAD3*; *ATAD3C*; mutación puntual; heterocigosis compuesta; alteraciones del desarrollo psicomotor; síntomas neurológicos.

1 Abstract.

Mitochondrial diseases are a group of pathologies characterized by alterations in energy production processes. These can be caused by nuclear mutations or by mutations in the genetic material of the organelle itself. Recently it has been discovered that the presence of certain alterations in the genes of the *ATAD3* locus of chromosome 1 can be the cause of this type of affectations. A single *ATAD3* gene has been detected in multiple species with a high level of conservation throughout evolution. In primates and humans, it has been duplicated twice in tandem giving rise to a cluster formed by the *ATAD3A*, *ATAD3B* and *ATAD3C* genes.

The proteins encoded by the genes of this cluster belong to the family of ATPases associated with various cellular activities or AAA-ATPases. As it occurs in all the proteins of this family, it is thought that the *ATAD3* monomers bind to form hexamers that, in this case, would be anchored to the mitochondrial inner membrane. Although their function has not yet been defined, it is believed that they are essential in the processes of mitochondrial biogenesis and dynamics, in the maintenance of specific structures of the organelle and in the organization of mitochondrial DNA around structures called nucleoids. Similarly, they appear to be fundamental in the regulation of lipid metabolism.

Since 2016, a total of 50 patients with mitochondrial diseases related to mutations in these genes have been reported. The phenotype of these patients includes intrauterine alterations, delayed psychomotor development, neurological symptomatology and ocular and cardiac involvement. It is also common to find alterations of the central nervous system in image tests as well as high lactate levels in blood tests. In this work we present the first patient diagnosed with mitochondrial disease related to point mutations in the *ATAD3C* gene. At the same time, we make a comparison between his phenotype and that of the other published cases taking into consideration the different types of mutations found.

2 Key words.

Mitochondrial disease; *ATAD3* gene cluster; *ATAD3C*; point mutation; compound heterozygosity; psychomotor developmental disorders; neurological symptoms.

3 Abreviaturas.

<i>AAA-ATPasa:</i>	ATPasa asociada a diversas actividades celulares	<i>MMI:</i>	Membrana mitocondrial interna
<i>a-CGH:</i>	Hibridación genómica comparativa	<i>MMSS:</i>	Miembros superiores
<i>AMP:</i>	Adenosín monofosfato	<i>3MG</i>	Ácido 3-metilglutacónico
<i>ATP:</i>	Adenosín trifosfato	<i>NAD+/NADH:</i>	Dinucleótido de nicotinamida adenina
<i>COX:</i>	Citocromo C oxidasa	<i>NAHR:</i>	Recombinación homóloga no alélica
<i>cDNA:</i>	DNA complementario	<i>RNA:</i>	Ácido ribonucleico
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico	<i>SDH:</i>	Succinato deshidrogenasa
<i>LCR:</i>	Líquido cefalorraquídeo	<i>SNC:</i>	Sistema nervioso central
<i>MME:</i>	Membrana mitocondrial externa	<i>SNP:</i>	Sistema nervioso periférico

4 Objetivos.

Este trabajo tiene como objetivo general la comprensión de las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el clúster genético *ATAD3*. Para ello nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la etiología, sintomatología, diagnóstico y tratamiento de este tipo de patologías.
2. Obtener información acerca de los genes de este clúster así como de la estructura y función de sus proteínas.
3. Recoger datos acerca de todos los tipos de mutaciones en este locus que hayan sido causa de enfermedad mitocondrial en personas.
4. Realizar una comparativa entre la sintomatología de todos los casos publicados incluyendo uno recientemente diagnosticado en España. Para ello, se agruparán en función del tipo de mutación que asocian. Con estos datos se intentará concluir, si las mutaciones que presenta el nuevo paciente pueden ser causa de su cuadro clínico.

5 Introducción.

5.1 Marco teórico general: generalidades de la mitocondria y enfermedad mitocondrial.

5.1.1 Generalidades de la mitocondria.

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos pertenecientes a las células eucariotas formados por una membrana externa altamente permeable y una membrana interna con escasa permeabilidad al paso de iones y moléculas. Entre ambas membranas se forma un espacio intermembranoso en el que se concentran gran cantidad de cargas positivas provenientes del bombeo de protones desde los complejos de la cadena respiratoria localizados en las crestas mitocondriales. Estas crestas son el resultado de los procesos de invaginación de la membrana interna mitocondrial proyectados hacia el interior del orgánulo. Además de albergar los complejos de la cadena respiratoria poseen una gran cantidad de transportadores que contrarrestan la impermeabilidad de esta membrana. El espacio contenido por la membrana mitocondrial interna se denomina matriz mitocondrial o mitosol y en el abundan diferentes iones y componentes proteicos partícipes de múltiples vías metabólicas, moléculas de ácido ribonucleico (RNA) y un número variable de copias de ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial.

El DNA mitocondrial es una molécula bícatenaria y circular de 16.569 pares de bases que contiene la información de 37 genes, 13 de los cuales codifican péptidos pertenecientes a los complejos de la cadena respiratoria. Su código genético difiere en algunos codones y su secuencia no contiene intrones. Estas moléculas se encuentran expuestas al daño oxidativo procedente de los radicales libres y, al mismo tiempo, sus mecanismos de reparación son poco eficientes por lo que la tasa de mutaciones es alta en comparación con la del DNA nuclear. Cabe destacar que el proteoma mitocondrial está compuesto por aproximadamente 1500 proteínas dependiendo del tipo celular del que forme parte el orgánulo. De esto se puede deducir que la mayor parte de ellas están codificadas por genes nucleares, y una vez sintetizadas, son importadas al interior de la mitocondria mediante mecanismos activos donde se ensamblarán con otras subunidades formando macromoléculas.

Entre las funciones más conocidas de las mitocondrias se encuentra la producción de moléculas de ATP en el proceso conocido como la fosforilación oxidativa que se da en los complejos de la cadena respiratoria de las crestas mitocondriales mencionados anteriormente. Además en la matriz mitocondrial tienen lugar el ciclo de Krebs y la β -oxidación de ácidos grasos así como la participación de múltiples vías metabólicas como la del grupo hemo. La mitocondria también sirve de almacén de calcio y participa en la regulación de sus flujos celulares ⁽¹⁾.

“Un concepto emergente acerca de la biología mitocondrial es el que las define como orgánulos de señalización en constante comunicación con el núcleo y otros compartimentos

celulares, encargados de valorar la producción de la energía y de los metabolitos necesarios para la supervivencia y el correcto funcionamiento de la célula”⁽²⁾. Diferentes estudios han señalado a los radicales libres de oxígeno, el balance entre adenosín monofosfato y adenosín trifosfato (AMP/ATP) y entre la forma oxidada de dinucleótido de nicotinamida adenina y su forma reducida (NAD+/NADH), el potencial transmembrana o los flujos de calcio entre otros, como señales retrógradas desde la mitocondria hacia el citosol celular. Mediante estas señales la mitocondria se encarga de regular los niveles de aminoácidos, enzimas, cofactores, metabolitos y otras sustancias del interior celular. Del mismo modo distintos procesos celulares como la apoptosis, la autofagia, la respuesta a estímulos estresantes o los mecanismos de proliferación y diferenciación de las células madre parecen estar regulados en parte por estas vías. Además, el daño progresivo en el material genético de las mitocondrias a lo largo de los años parece estar en relación con el proceso de envejecimiento^(1,2).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes cuando existe patología mitocondrial son las neurológicas y las musculares. Esto parece deberse a que las neuronas y los miocitos son altamente dependientes del metabolismo oxidativo. De la misma manera, al ser células con escasa actividad mitótica, pueden acumular con mayor facilidad mitocondrias con material genético mutado en su interior. Además las mitocondrias desarrollan funciones de vital importancia en estos tipos celulares que de verse alteradas podrían explicar los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades.

En cuanto a las funciones de las mitocondrias en las neuronas, estas parecen intervenir en procesos tan importantes como la neuroplasticidad. Englobados en este término se encuentran procesos como la proliferación y diferenciación de las células madre precursoras de las neuronas, la polarización de estas en axón y dendritas o la creación de nuevas sinapsis mediante procesos como la regulación del consumo de oxígeno en determinadas partes de la neurona o la formación de microtúbulos que a su vez está regulada por los niveles de calcio en el citoplasma⁽³⁾. Las mitocondrias también están estrechamente relacionadas con la transmisión sináptica y con la unión neuromuscular controlando la exocitosis de las vesículas al espacio sináptico, regulando los potenciales de acción o aportando metabolitos para la síntesis de neurotransmisores como el GABA⁽⁴⁾. La gran cantidad de tareas desempeñadas por la mitocondria en estas células ha puesto en el punto de mira de las investigaciones la disfunción mitocondrial como una de las posibles etiologías responsables de algunas enfermedades neurodegenerativas. Se han descrito defectos en la función de determinados complejos de la cadena respiratoria como el fallo del complejo I en la enfermedad de Parkinson o del complejo IV en el Alzheimer. Asimismo, determinados genes relacionados con estas patologías como el *Parkin* o los genes de la *Prenililina 1* y *2* parecen estar relacionados con alteraciones de la biología mitocondrial⁽⁵⁾.

Al igual que en las neuronas, se han encontrado evidencias de que las alteraciones en la dinámica mitocondrial también son responsables del envejecimiento precoz de los miocitos causando atrofia muscular y sarcopenia. Algunas alteraciones que se han visto relacionadas con estas miopatías están en los genes encargados de procesos fusión y fisión mitocondrial como *Mfn1*, *Mfn2*, *OPA 1* y *Drp1*. Otro hallazgo frecuente en estas enfermedades es la disminución y/o remodelación de la cardiolipina de la membrana mitocondrial interna (MMI) de los miocitos cardiacos^(6,7).

5.1.2 Enfermedad mitocondrial.

“Entendemos por enfermedades mitocondriales al conjunto de patologías causadas por defectos en la morfología y en la función de estos orgánulos, y que tienen como consecuencia final la alteración de los procesos de producción de energía”⁽⁸⁾. Su prevalencia media en el mundo se estima en 1 caso por cada 5.000 nacimientos. Sin embargo, esta cifra es muy variable en función de la población estudiada, de los grupos de edad y del tipo de mutación responsable.

Las enfermedades mitocondriales deben su origen a defectos en los genes nucleares encargados de codificar las proteínas relacionadas con la estructura y con el funcionamiento del orgánulo (más frecuentes en niños) o a alteraciones en la propia molécula de DNA mitocondrial (más frecuentes en adolescentes y adultos). Estas alteraciones a su vez pueden deberse a mutaciones *de novo* o pueden ser heredadas. Las patologías debidas a fallos en el DNA nuclear siguen las leyes Mendelianas de la herencia pudiendo transmitirse de manera autosómica dominante, recesiva o ligada al cromosoma X. Al mismo tiempo, sus mutaciones pueden deberse a defectos puntuales, a pequeñas delecciones o a variaciones en el número de copias. Las patologías relacionadas con los genes de la propia mitocondria presentan una herencia exclusivamente materna y parecen estar influenciadas por el grado de heteroplasmia en la célula.

Si cada célula de nuestro organismo presenta un número variable de mitocondrias y cada mitocondria presenta un número variable de moléculas de DNA, entendemos por heteroplasmia a la existencia de dos o más copias diferentes de estas moléculas en el interior de una misma mitocondria, célula o individuo. El grado de heteroplasmia varía entre los descendientes de un mismo progenitor, entre los distintos órganos de un individuo o incluso entre las células de un mismo tejido. Esto podría explicarse por una distribución aleatoria de las copias durante el proceso de mitosis, a que los mecanismos de replicación del DNA mitocondrial no regulan la producción del mismo número de copias de cada una de las moléculas (pudiendo producirse un mayor número de las copias mutadas que de las copias originales en algunas células) o a mecanismos todavía no bien conocidos en el reparto del material genético mitocondrial en las células germinales (como el denominado efecto de cuello de botella genético mitocondrial).

Recientemente se han descrito umbrales en relación con la heteroplasmia. Cuando el número de copias de DNA alterado en una célula supera dichos valores, se produce la expresión de la enfermedad. La existencia de estos umbrales junto a la variabilidad en la heteroplasmia entre individuos o dentro de un mismo organismo podrían explicar la diversidad fenotípica y los diferentes periodos de latencia que se observan en las enfermedades mitocondriales ante una misma mutación ⁽⁹⁾.

Por otro lado, se ha observado que las mutaciones del DNA mitocondrial que han sido registradas como causantes de patología también pueden deberse a alteraciones puntuales, a delecciones o a la disminución del número total de moléculas o depleción mitocondrial (proceso poco frecuente y asociado a mutaciones en el DNA nuclear). Las delecciones suelen deberse a mutaciones *de novo* durante el periodo embrionario y rara vez son heredadas por lo que el individuo suele ser el único afectado de la unidad familiar. Los individuos con este tipo de defectos siempre presentan heteroplasmia. Por el contrario, las mutaciones puntuales del DNA mitocondrial suelen ser heredadas y puede haber o no más afectados en la unidad familiar. Además pueden presentarse en homoplasmia o en heteroplasmia y sus fenotipos suelen variar desde leves a muy graves. Las mutaciones puntuales en homoplasmia parecen estar relacionadas más frecuentemente con fenotipos en los que se afecta solamente un órgano (habiéndose excepciones donde se producen enfermedades extensas) mientras que las que se producen en heteroplasmia suelen asociar cuadros sistémicos graves ^(9,10). Algunos estudios llegan a afirmar que “el nivel de heteroplasmia está relacionado con la cantidad de tejidos y órganos afectados asociándose un mayor nivel a mayor extensión de la enfermedad y, por lo tanto, mayor gravedad del cuadro” ⁽⁹⁾.

Las enfermedades mitocondriales abarcan un amplio grupo de cuadros clínicos muy heterogéneos entre sí y que muchas veces son muy difíciles de identificar. En algunas ocasiones el conjunto de síntomas conforma un cuadro específico para una mutación pero en muchas otras los síntomas son inespecíficos y variables entre individuos con afectación de un mismo gen. Del mismo modo la mutación de diferentes genes puede provocar cuadros clínicos muy similares entre sí. Como ya se ha mencionado anteriormente, los síntomas más prevalentes en este grupo de patologías provienen de la afectación del sistema nervioso central (SNC) (temblores, ataxia, espasticidad, alteraciones del desarrollo...), del sistema nervioso periférico (SNP) (oftalmoplejia, sordera neurosensorial, neuropatías...) y de la afectación muscular (intolerancia al ejercicio, sarcopenia, patología cardiaca...). Otros hallazgos frecuentes son las alteraciones renales (tubulopatías) y endocrinológicas (sobre todo la diabetes mellitus) ⁽⁸⁾.

A pesar de no existir un consenso generalizado, los procedimientos diagnósticos a seguir para la identificación de estas patologías abarcan generalmente un análisis bioquímico sobre

muestras de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR), un estudio genético, y un estudio anatomopatológico (*Fig 1*). A estos estudios se añaden otras pruebas complementarias en función de la clínica del paciente (generalmente pruebas de neuroimagen, pruebas neurofisiológicas, estudios cardiológicos etc.).

Los estudios bioquímicos requieren un análisis de aminoácidos en plasma, LCR y orina, un análisis de lactato y piruvato en plasma y LCR, así como la medición de los niveles de acilcarnitina en plasma y los niveles de ácidos orgánicos en orina. Los niveles de lactato por encima de 3 mmol/L o del ratio lactato/piruvato por encima de 20 cuando el lactato está elevado tienen una especificidad muy alta aunque otros errores del metabolismo, la isquemia tisular o determinados tóxicos también se ven implicados en el aumento de estos niveles. Asimismo, los valores pueden verse alterados por un error en la toma de muestras sanguíneas por lo que es preferible realizar las mediciones de lactato y piruvato en LCR. La elevación de aminoácidos como la alanina o la glicina pueden indicar la disfunción de la cadena respiratoria con una sensibilidad y especificidad todavía no estudiadas y la elevación de las carnitinas parecen indicar alteraciones en la oxidación de los ácidos grasos aunque tampoco se conoce la correlación exacta entre su elevación y la patología mitocondrial. Por el contrario, la elevación de distintos ácidos orgánicos en orina como el malato, el fumarato o el ácido 3-metilglutacónico (3MG) parecen tener una mayor asociación con estas enfermedades. De igual manera, se encuentran en estudio diferentes biomarcadores de enfermedad mitocondrial a la espera de ser aprobados como la proteína FGF-21 o el glutatión reducido⁽¹¹⁻¹³⁾.

Dada la ausencia de tratamientos efectivos, es fundamental realizar un estudio genético completo. De esta manera podemos ofrecer consejo a los progenitores sobre el riesgo que tienen de transmitir de nuevo una mutación a sus descendientes, podemos realizar un diagnóstico prenatal y abre la puerta a nuevas terapias en investigación como el reemplazo mitocondrial. Las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) se han convertido en el *gold standard* a la hora de diagnosticar posibles mutaciones de las enfermedades mitocondriales. Estas técnicas permiten la secuenciación de un solo gen, de paneles de genes seleccionados o la secuenciación completa del genoma mitocondrial o del exoma nuclear. El primer paso a seguir suele ser la secuenciación del genoma mitocondrial ya que las secuenciaciones de nueva generación permiten la detección de mutaciones puntuales, de delecciones y de bajos niveles de heteroplasmia. Por el contrario, no existe consenso a la hora de decidir si es más apropiado realizar un panel o la secuenciación completa del exoma cuando sospechamos una mutación nuclear. Generalmente se realiza en primer lugar un panel de genes nucleares ya identificados como causantes de enfermedad mitocondrial y, si no se encuentra ninguna alteración, se continúa con la secuenciación completa del exoma nuclear del paciente y si es posible también de los progenitores (lo que se conoce como exoma en trío). A pesar de que los estudios genéticos se pueden realizar

sobre muestras sanguíneas es preferible estudiar una muestra de tejido preferentemente muscular o hepático debido a que pueden presentar mutaciones específicas únicamente localizadas en esas células y a su alto contenido en mitocondrias. Para determinados síndromes también pueden ser de utilidad las muestras de orina ^(10,12).

Además de los tejidos mencionados, también se pueden obtener muestras de otros órganos afectados en el paciente para poder llevar a cabo los estudios anatomo-patológicos y bioquímicos. A la hora de obtener las biopsias es preferible realizarlas abiertas y mediante técnicas especiales para no lesionar las mitocondrias y no generar artefactos ⁽¹²⁾. Las tinciones más utilizadas para la valoración histológica del músculo son la hematoxilina-eosina, el tricrómico de Gomori modificado, las tinciones para la actividad succinato deshidrogenasa (SDH) y citocromo c oxidasa (COX). La hematoxilina y el tricrómico permiten valorar el tamaño de las fibras, la presencia de inclusiones o la posición de los núcleos. Además el tricrómico permite valorar la existencia de fibras rojas rasgadas que pueden presentarse como una respuesta compensatoria a defectos en la cadena de transporte de electrones. Por otro lado el COX permite valorar la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria y el SDH permite valorar la actividad del complejo II. Se están desarrollando nuevas técnicas de inmunofluorescencia para poder valorar el resto de complejos (especialmente el complejo I). El sistema nervioso de los pacientes también muestra diferentes alteraciones histológicas como pérdida de densidad de sinapsis, zonas isquémicas, perdida de celularidad/atrofia o defectos en la mielina entre otras. Existen diferentes métodos de estudio en desarrollo para poder analizar con mayor facilidad el tejido neuronal y los mecanismos por los cuales se produce la neurodegeneración ya que estos hallazgos suelen encontrarse en valoraciones post mortem. En los pacientes pediátricos es frecuente no encontrar alteraciones en microscopía óptica. Por esta razón es recomendable hacer un estudio de microscopía electrónica para valorar la ultraestructura de las mitocondrias aunque esta no se encuentre siempre alterada ⁽¹⁰⁾.

A pesar de que las técnicas de secuenciación genética de nueva generación se han posicionado como la prueba diagnóstica de mayor relevancia, los estudios bioquímicos sobre los tejidos siguen siendo de gran utilidad a día de hoy y pueden aportar información adicional que puede ser de ayuda para establecer el diagnóstico de enfermedad mitocondrial. Estos estudios incluyen un análisis de la actividad enzimática de cada uno de los complejos de la cadena respiratoria mediante espectrofotometría. En los casos en los que no se aprecie disminución en la actividad de ningún complejo se puede medir la ratio de consumo de oxígeno de las mitocondrias del tejido ya que suele aparecer disminuido en estas patologías. También existe la posibilidad de cuantificar los niveles de coenzima Q10 que actúa como transportador de electrones desde los complejos I y II hacia el complejo III y puede verse igualmente alterado ⁽¹¹⁻¹³⁾.

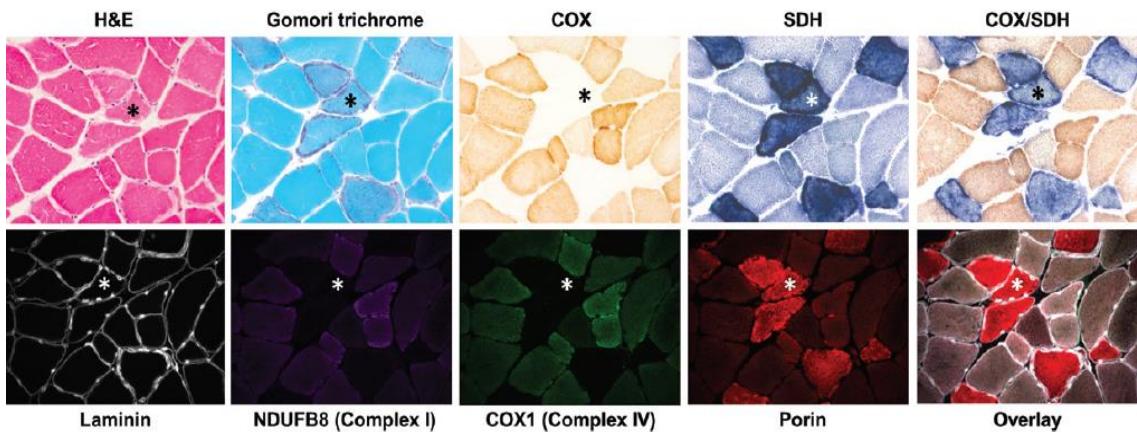


Figura 1. Cortes histológicos obtenidos de una muestra del músculo vasto lateral de un paciente que presenta un defecto detectado en el DNA mitocondrial sobre los que se han aplicado diferentes técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas. Podemos observar la presencia de fibras rojas rasgadas en la tinción con tricrómico de Gomori. En muestras estudiadas con COX, SDH y COX/SDH podemos observar defectos en la tinción con COX (fibras anaranjadas) lo que indica un fallo del complejo IV (codificado parcialmente por el DNA mitocondria) de la cadena respiratoria. Como no existen un defecto en la tinción con SDH que nos indique un fallo en el complejo II (codificado completamente por el DNA nuclear) podemos confirmar la presencia de un defecto en el DNA mitocondrial. (Imagen modificada obtenida de Alston CL et al., 2017 (10).).

En lo que se refiere al tratamiento de la enfermedad mitocondrial, es recomendable que se adopten una serie de medidas generales entre las que se incluye la práctica de ejercicio aeróbico de intensidad moderada, el cual favorece la biogénesis de nuevas mitocondrias, aumenta su actividad enzimática y su ratio de consumo de oxígeno a la vez que disminuye los niveles de lactato plasmáticos y la sintomatología de los pacientes sin producir efectos deletéreos sobre el organismo. Por otro lado no existe evidencia científica sobre las recomendaciones nutricionales que se deben seguir en estas patologías aunque parece que la dieta que mejor se adapta a los defectos metabólicos de los pacientes debe ser rica en grasas y pobre en hidratos de carbono. Además se debe evitar el estrés térmico así como la toma de fármacos que interfieran en las diferentes vías metabólicas de la mitocondria como el ácido valproico, la fenitoína, la metformina o algunos antibióticos como los aminoglucósidos o las tetraciclinas^(12,13).

El tratamiento de estos pacientes se ha basado tradicionalmente en el aporte de diferentes vitaminas y cofactores a pesar de la falta de evidencia científica que pruebe su efectividad. Esto parece deberse a la baja incidencia de efectos secundarios de estas terapias. Como la patología mitocondrial se caracteriza por el deterioro de los procesos de síntesis de ATP, los primeros tratamientos que surgieron fueron encaminados a mejorar la actividad de la cadena de transporte de electrones. En este grupo se encuentran los tratamientos con aportes de vitaminas B1-3, el coenzima Q₁₀, la carnitina o agentes sintéticos como el dicloroacetato o la idebenona (análogo del coenzima Q₁₀). También se han elegido otras sustancias que actúan como bypass entre complejos

de la cadena respiratoria defectuosos (vitaminas C y K), que neutralizan los metabolitos tóxicos mediante su actividad antioxidante (ácido alfa lipoico y vitaminas C y E) o que ayudan al proceso de almacenamiento de moléculas de ATP (creatina) ^(12,14).

Al margen de las medidas mencionadas y aplicables a todos los pacientes, existen guías con recomendaciones específicas sobre el cribado y cuidado de las posibles alteraciones que puedan aparecer sobre cada uno de los aparatos y sistemas del organismo así como recomendaciones sobre el manejo de la descompensación o agudización de los síntomas ⁽¹⁵⁾.

5.2 Marco teórico específico: clúster genético ATAD3.

Se ha descrito una cantidad aproximada de 300 genes asociados a enfermedades mitocondriales (Fig 2.). Las mutaciones en estos genes y, en consecuencia, la alteración de las funciones de las proteínas que codifican explicarían la afectación mitocondrial mediante mecanismos patogénicos tales como defectos en el metabolismo del DNA y RNA mitocondrial, alteraciones de las subunidades que conforman los complejos de la cadena respiratoria así como alteraciones de su ensamblaje o trastornos en los procesos de biogénesis, en la dinámica y en la homeostasis de las mitocondrias entre otros.

Primary role specific to OXPHOS biogenesis										Secondary impact on OXPHOS								
OXPHOS Subunits					Electron Carriers		mtDNA Homeostasis		mt-tRNA Biogenesis/Aminoacylation		Fe-S clusters		Co-Factors		Protein Quality Control		Protein Import/Processing	
Cl	CII	CIII	ClIV	CV	CoQ	Cyt. c	DNA2	MT-TA	GTPBP3	AARS2	ABC7	COASY	AFG3L2	AGK	CHCHD10			
MT-ND1	NDUFB3	SDHA	MT-CYB	MT-CO1	MT-ATP6	COQ2	CYCS	MGME1	MT-TC	MTFMT	CARS2	BOLA3	FLAD1	CLPB	AIFM1	C19orf70		
MT-ND2	NDUFB9	SDHB	CYC1	MT-CO2	MT-ATP8	COQ4	HCCS	POLG	MT-TD	MTO1	DARS2	FDX1L	LIAS	CLPP	DNAJC19	DNM1L		
MT-ND3	NDUFB10	SDHD	UQCRB	COX4I1	ATP5A1	COQ5	POLG2	MT-TE	NSUN3	EARS2	FDXR	LIPT1	HSPD1	GFER	GDAP1			
MT-ND4	NDUFB11		UQCRC2	COX4I2	ATP5E	COQ6	RNASEH1	MT-TF	PUS1	FARS2	FXN	LIPT2	LONP1	MIPEP	MFF			
MT-ND4L	NDUFS1		UQCRCQ	COX5A		COQ7	TFAM	MT-TG	QRSL1	GARS	GLRX5	PANK2	SPG7	PMPCA	MFN2			
MT-ND5	NDUFS2			COX6A1		COQ8A	TWNK	MT-TH	TRIT1	HARS2	IBA57	TPK1	YME1L1	TIMM8A	MSTO1			
MT-ND6	NDUFS3			COX6B2		COQ8B	TOP3A	MT-TI	TRMT5	IARS2	ISCA2				TIMM50	OPA1		
NDUFA1	NDUFS4			COX7B		COQ9		MT-TK	TRMU	KARS	ISCU				SACS			
NDUFA2	NDUFS6			COX8A	PDSS1	Nucleotide Pools		MT-TL1	TRNT1	LARS2	LYRM4				ATAD3A	PNPLA8	SLC25A46	
NDUFA9	NDUFS7			NDUFA4	PDSS2	ABAT	SUCL2	MT-TL2	MARS2	NFS1	CHKB	SERAC1			STAT2			
NDUFA10	NDUFS8					DGUOK	SUCLG1	MT-TM	NARS2	NFU1	PLA2G6	TAZ			TRAK1			
NDUFA11	NDUFS11					MPV17	TK2	MT-TN		PAR2								
NDUFA12	NDUFS2					RRM2B	TYMP	MT-TP	RARS2									
NDUFA13						SAMHD1		MT-TQ	SARS2									
Blue fonts indicate genes which we reported																		
OXPHOS Assembly Factors																		
Cl	CII	CIII	ClIV	CV						Metabolite Transport	TCA cycle							
ACAD9	SDHAF1	BCS1L	COA3	COX20	ATPAF2	mtRNA Expression/Processing	Mitochondrion Biogenesis	MT-TRN1	MT-TV	SLC19A3	ALDH1A1	MECR	ECHS1					
FOXRED1		LYRM7	COA5	PET100	TMEM70	ELAC2		MT-TT		VAR2	SLC25A1	DLAT	NADK2	ETHE1				
NDUFAF1	TTC19	COA6	PET117			FASTKD2	ERAL1	MT-TW	WARS2	SLC25A3	DLD	PDHA1	HIBCH					
NDUFAF2	UQCC2	COA7	SCO1			HSD17B10	MRPL3	MT-TY	YARS2	SLC25A4	FH	PDHB	L2HGDH					
NDUFAF3	UQCC3	COX10	SCO2			LRPPRC	MRPL42			SLC25A12	HAAO	PDHX	NAXE					
NDUFAF4		COX14	SURF1			MRM2	MRPL44			SLC25A19	IDH3A	PDK3	TXN2					
NDUFAF5			COX15			MTPAP	MRPS7			SLC25A24	IDH3B	PDP1						
NDUFAF6						PNPT1	MRPS16			C12orf65	SLC25A26	KYNU	PPA2					
NUBPL		256	nuclear encoded			TRMT10C	MRPS22			GFM1	SLC25A32			Apoptosis/Autophagy	OPA3			
TIMMDC1		35	mtDNA encoded				MRPS23			GFM2	SLC25A42			HTRA2	APOPT1			
TMEM126B							MRPS34			RMND1	SLC39A8			VPS13C	CEP89	RTN4IP1		
										TACO1	MICU1			C19orf12	SFXN4			
										TSFM	MICU2			1QBP	TMEM65			
										TUFM	MPC1			FBXL4	IARS			

Figura 2. Clasificación de los genes nucleares (en negro) y mitocondriales (en rojo) en relación a las funciones que desempeñan en las mitocondrias. El gen ATAD3A (perteneciente al clúster de genes ATAD3) aparece clasificado dentro del grupo de genes encargados del metabolismo lipídico. Distintos estudios asocian otras funciones a este clúster que serán comentadas más adelante en el texto (Imagen modificada obtenida de Murayama K et al., 2019 ⁽¹³⁾).

5.2.1 Características de los genes pertenecientes al clúster *ATAD3*.

Se han descrito recientemente en la literatura distintos tipos de mutaciones en el clúster de genes nucleares *ATAD3* responsables de patología mitocondrial en humanos. El gen *ATAD3* está presente en organismos eucariotas habiéndose encontrado ortólogos lejanos en protistas y levaduras. Sin embargo, los dominios específicos de las proteínas codificadas por estos ortólogos difieren con los de la ATPasa codificada por *ATAD3*, que es sintetizada en organismos eucariotas más avanzados evolutivamente como las plantas, los nematodos, los insectos, las aves o los mamíferos. En primates y en humanos, este gen se ha duplicado dos veces en tandem dando lugar a un clúster genético compuesto por los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C*. En humanos, este clúster se localiza en el brazo corto del cromosoma 1, más concretamente en el locus 1p36.33⁽¹⁶⁾.

El gen *ATAD3B* es muy similar a *ATAD3A* en cuanto al número de exones y a la longitud de sus intrones se refiere. En cambio, su principal diferencia viene dada por una mutación en el codón de finalización original, resultando en la codificación de una región no traducible en *ATAD3A* que tiene como consecuencia final la síntesis de una proteína de 62 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal. El gen *ATAD3C* difiere en mayor medida con *ATAD3A* ya que se trata de un gen truncado que ha perdido los 4 primeros exones de los 16 que codificaban los otros dos genes del clúster. Es por esto que la proteína sintetizada carece de los 70 aminoácidos iniciales del extremo N-terminal presentes en la proteína *ATAD3A*⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Publicaciones recientes alegan que *ATAD3A* se trata de un gen constitutivo cuya expresión es particularmente abundante en el SNC. Del mismo modo, afirman que *ATAD3B* se expresa especialmente en tejidos embrionarios y en zonas germinales del SNC (células con alta capacidad proliferativa)^(17,18). Sin embargo, la información recogida sobre estos genes en bases de datos en constante actualización que cuantifican el nivel de expresión de RNA mensajero y de proteínas, señala que ambos genes se expresan en todos los tipos celulares y tejidos con poca especificidad; es decir, con niveles de expresión similares (Fig 3.)^(19,20).

Si hablamos en concreto del gen *ATAD3C*, estas publicaciones refieren que no existen datos experimentales publicados acerca de su expresión y su localización. El artículo publicado por Harel T et al., 2016⁽²¹⁾ incluso plantea la hipótesis de que se trate de un pseudogén. Sin embargo, las bases de datos referidas anteriormente, recogen información sobre la expresión de su RNA mensajero y, del mismo modo, confirman la existencia de la proteína *ATAD3C*. Su nivel de expresión es inferior que el de los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* (en estos, el nivel es medio-bajo) y, al igual que estos, se ha detectado en varios tipos de tejidos y células con escasa especificidad.

El hecho de que los niveles de expresión de los genes de este clúster sean medio-bajos indica que sus proteínas se recambian con poca frecuencia y, del mismo modo, indica que pueden cumplir funciones estructurales o que solamente son requeridas en momentos puntuales.

Al mismo tiempo, varios estudios de proteómica han detectado la presencia de ATAD3C en el organismo^(22,23). El grupo de investigación “Biogénesis y patología mitocondrial” de la Universidad de Zaragoza ha conseguido obtener copias de DNA complementario (cDNA) del ARN mensajero de *ATAD3C* a partir de células de la línea RPMI (línea celular que registra una mayor expresión de este gen en “The Human Protein Atlas”⁽²⁰⁾). A la par, han conseguido detectar la proteína mediante espectrometría de masas en la línea celular HEK293T (utilizada habitualmente en estudios de biología molecular y celular). De esta manera, la información recogida en las bases de datos y en los estudios mencionados contradicen la hipótesis planteada por Harel T et al., 2016⁽²¹⁾.

El estudio publicado por Baudier J et al., 2018⁽¹⁸⁾ plantea una hipótesis diferente, proponiendo que *ATAD3C* se pueda comportar como un gen regulador complementando la actividad de *ATAD3A*. El grupo de investigación mitocondrial de la Universidad de Zaragoza ha observado que al sobre-expresar *ATAD3C* en fibroblastos humanos se altera el complejo que la proteína *ATAD3A* forma en la membrana mitocondrial lo que parece reforzar esta teoría.

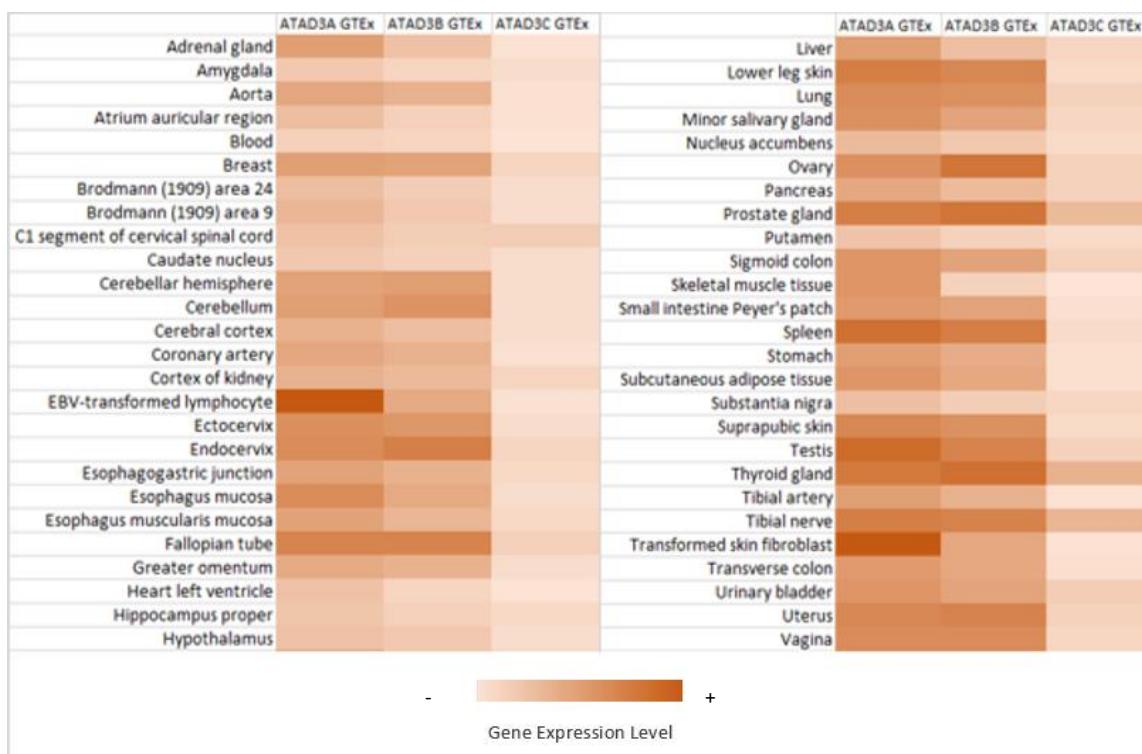


Figura 3. Comparación de los niveles de expresión de *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* entre sí en 52 tejidos del cuerpo humano. Se puede observar que la expresión de *ATAD3C* es inferior a la de los otros genes del clúster (representada por colores claros en las casillas de cada tejido). A pesar de esto, *ATAD3A* y *ATAD3B* presentan un nivel de expresión medio-bajo en comparación con otros genes del organismo. También se puede comprobar que, a pesar de la variabilidad observada entre los tejidos, esta no es suficiente para afirmar que ninguno de los tres genes presenta especificidad por ninguno de ellos. La información ha sido recogida de la base de datos “Expression Atlas (release 37 – March 2021)”, Papatheodorou et al., 2020⁽¹⁹⁾.

5.2.2 Estructura de las proteínas ATAD3.

Múltiples análisis basados en el alineamiento de secuencias determinan que las proteínas codificadas por los genes de este clúster pertenecen a la familia de las ATPasas asociadas a diversas actividades celulares (AAA-ATPasas). A pesar de que no han sido cristalizadas y, por lo tanto, desconocemos su configuración exacta, se piensa que sus monómeros se agrupan formando hexámeros ordenados en anillo. Esto se debe a que todas las proteínas pertenecientes a esta familia estudiadas hasta el momento mantienen esta estructura ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

El extremo C-terminal de estas proteínas tiene actividad ATPasa ya que contiene los dominios encargados de la unión e hidrólisis de las moléculas de ATP (los dominios Walker A y B, los sensores 1 y 2 y el dedo de arginina). Este extremo permanece invariable en cada una de las tres proteínas del clúster ^(16,18). El extremo N-terminal engloba los dominios específicos de ATAD3. En concreto, en su secuencia de aminoácidos podemos encontrar dominios transmembrana, una secuencia auxiliar de importe a la mitocondria y hélices superenrolladas. Estas últimas parecen intervenir en el proceso de oligomerización de los monómeros para formar el anillo hexamérico. La secuencia también puede contener un dominio rico en prolina cuya función se desconoce pero que podría ser partícipe de interacciones con otras proteínas o permitir el anclaje de ATAD3 a membranas ⁽¹⁸⁾. Al contrario que en el extremo C-terminal, los dominios de este extremo varían entre las tres proteínas. De hecho, debido a los procesos de empalme alternativo (o “*alternative splicing*”) existen diferentes isoformas de ATAD3A y ATAD3B que, de igual manera, también presentan variabilidad entre sus dominios (*Fig 4A.*) ⁽¹⁶⁾. Diferentes estudios han utilizado *softwares* de predicción para poder analizar detalladamente las diferencias estructurales entre las proteínas de este clúster ^(18,24).

En relación a su localización, estas se encuentran ancladas a la MMI al mismo tiempo que pueden establecer puntos de contacto con la membrana mitocondrial externa (MME). A pesar de que se ha confirmado que el extremo C-terminal se localiza en la matriz mitocondrial ⁽²⁴⁾, todavía existen dudas sobre la ubicación exacta del extremo N-terminal. Este podría localizarse en el citosol de la célula, en el espesor de la MME, en el espacio contenido entre ambas membranas o incluso, si tenemos en cuenta la variación entre los dominios de las isoformas de ATAD3A y de ATAD3B, podría atravesar nuevamente la MMI localizándose en el mitosol (*Fig 4B*) ⁽¹⁶⁾. Los experimentos basados en técnicas de inmunomarcaje de estas proteínas en mitocondrias expuestas a distintos medios y a enzimas digestivas que degradan sus diferentes dominios realizados por Baudier J et al., 2018 ⁽¹⁸⁾ parecen confirmar que el extremo N-terminal de ATAD3A atraviesa la MME y se localiza en el citosol celular. Estudios similares realizados por el grupo de investigación de la Universidad de Zaragoza determinan que el extremo N-terminal en el caso de ATAD3C se localiza en el espacio intermembrana sin contactar con la MME.

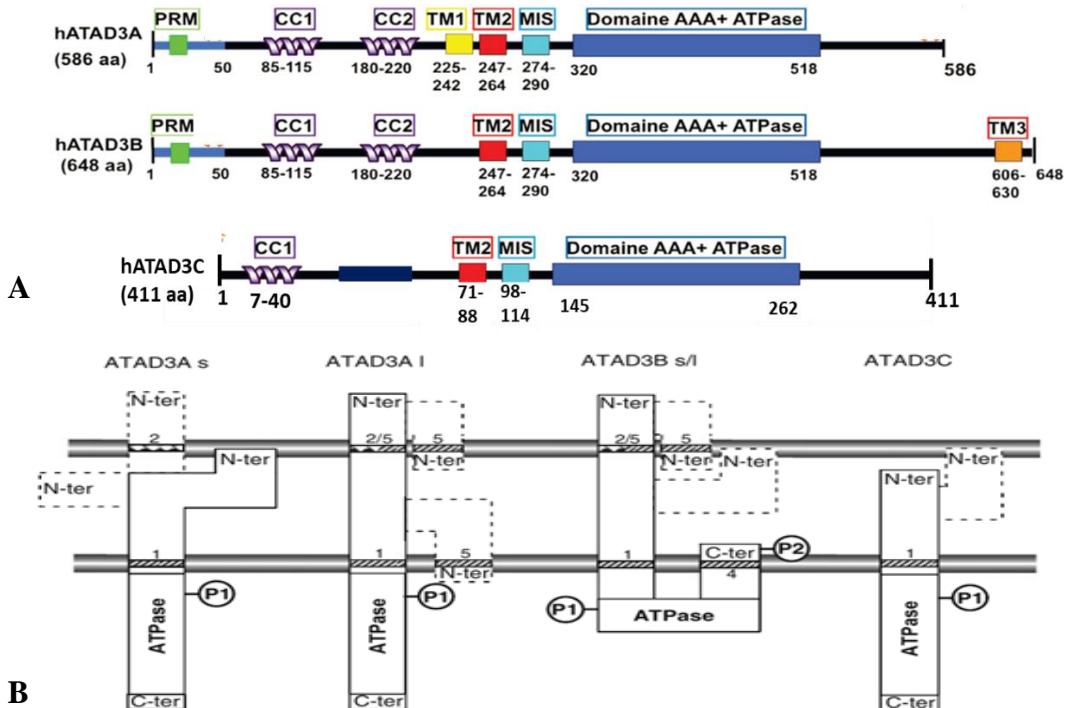


Figura 4. Proteínas ATAD3. (A) Representación de los dominios correspondientes a cada una de las proteínas codificadas por el clúster. El dominio ATPasa localizado en el extremo C-terminal es común a las tres proteínas mientras que los dominios del extremo N-terminal presentan variabilidad. Las tres contienen un dominio transmembrana 2 (TM2) seguido de una secuencia auxiliar de importe a la mitocondria aunque ATAD3A y ATAD3B contienen un dominio transmembrana adicional (TM1 y TM3 respectivamente). ATAD3C carece de una región rica en prolinas (PMR) y solo contiene una hélice superenrollada (CC1). (Imagen modificada obtenida de Baudier J et al., 2018⁽¹⁸⁾). (B) Representación de las posibles configuraciones de cada una de las proteínas (incluidas las isoformas) en las membranas de la mitocondria. El grupo de investigación “Biogénesis y patología mitocondrial” de la Universidad de Zaragoza ha confirmado que el extremo N-terminal en el caso de ATAD3C se localiza en el espacio intermembrana (Imagen modificada obtenida de Li S et al., 2012⁽¹⁶⁾).

5.2.3 Funciones de las proteínas ATAD3.

La principal función de las proteínas ATAD3 todavía no ha sido esclarecida. La similitud entre los genes de este clúster en humanos y sus respectivos ortólogos en otras especies demuestra que presentan un alto grado de conservación a lo largo de la evolución y que, por lo tanto, desempeñan con gran probabilidad funciones de vital importancia en la célula. Distintos experimentos realizados sobre nematodos⁽²⁵⁾, moscas^(21,24) y ratones⁽²⁶⁾ han demostrado que los defectos en el gen *ATAD3* alteran el desarrollo de las larvas y embriones de estas especies desembocando la mayoría de las veces en su muerte por inviabilidad del proceso. Se ha observado que las células de estos organismos detienen su diferenciación y crecimiento al mismo tiempo que presentan alteraciones en el metabolismo (sobretodo defectos en el funcionamiento de algunos complejos de la cadena respiratoria) y en la estructura de sus mitocondrias.

Esto nos lleva a pensar que ATAD3 es fundamental en el proceso de biogénesis de estos orgánulos ya que, en el caso del experimento en ratones, el desarrollo embrionario se detiene cuando las células (cuya principal fuente de energía provenía de los procesos de glicólisis), cambian sus requerimientos energéticos siendo necesario para su diferenciación el metabolismo oxidativo ⁽²⁶⁾. Al existir anomalías en la formación de nuevas mitocondrias, se dificulta el cumplimiento de estos requerimientos, explicando la paralización del proceso.

Además de intervenir en el proceso de biogénesis mitocondrial, se cree que estas proteínas influyen en el mantenimiento de la estructura de estos orgánulos una vez formados y, en concreto, parecen ejercer su función en zonas especializadas de la membrana mitocondrial. Por una parte, se ha encontrado que estas proteínas se expresa en abundancia en unas zonas conocidas como “MAMs” (*Mitocondrial Associated Membranes*) que consisten en puntos de unión entre la MME y la membrana del retículo endoplásmico que parecen constituir canales que permiten el paso de moléculas e iones entre ambos orgánulos, regulando de esta manera algunos procesos celulares ^(24,27). Por otra parte parecen ser fundamentales en la formación y el mantenimiento de las crestas mediante su interacción con el complejo proteico “MICOS” (*Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*). Las alteraciones en la expresión de ATAD3 podrían impedir el ensamblaje del complejo dando lugar a la desorganización de estas estructuras ⁽¹⁷⁾. Distintas imágenes de microscopía electrónica obtenidas de fibroblastos de pacientes con enfermedad mitocondrial asociada a mutaciones en el clúster ATAD3 han observado una importante desestructuración de sus crestas mitocondriales apoyando esta hipótesis ⁽²⁸⁾. Simultáneamente, varios artículos señalan alteraciones en el funcionamiento de varios complejos de la cadena respiratoria en pacientes con estas patologías ^(21,28–30). Esto podría explicarse por la destrucción de las crestas (las cuales albergan los complejos de la cadena respiratoria) o por alteraciones observadas en la estructura del DNA mitocondrial (que codifica varias subunidades de los complejos de la cadena respiratoria) las cuales se comentarán más adelante.

Se piensa que las proteínas ATAD3 también intervienen en diferentes procesos dinámicos de la mitocondria debido a su participación en las interacciones entre la MMI y la MME ⁽²⁴⁾. Algunas publicaciones refieren interrelaciones entre ATAD3 y otras proteínas encargadas de procesos de fisión mitocondrial como Drp1 ⁽³¹⁾ y fusión como Mfn2 y OPA1 ^(17,32). Diferentes estudios experimentales han comprobado que la ausencia de expresión o, por el contrario, la sobreexpresión bajo condiciones de estrés celular de la proteína ATAD3 en animales conducen a la fragmentación de las mitocondrias ⁽³¹⁾. Este hallazgo también se ha reportado en imágenes de microscopía electrónica de células de pacientes afectados por estas mutaciones, las cuales demuestran un aumento del nivel de autofagia de sus mitocondrias relacionado con el aumento del número de lisosomas primarios y vacuolas autofágicas en su interior.

Recordando que gran parte de las reacciones del metabolismo lipídico ocurren en la matriz mitocondrial, distintos experimentos realizados sobre células productoras de hormonas esteroideas han planteado la posibilidad de que este grupo de proteínas desempeñe un papel fundamental en el mismo. El paso de colesterol desde el citosol hacia la matriz mitocondrial ocurre a través de un complejo denominado transduceosoma formado por proteínas citosólicas y proteínas ancladas en las membranas mitocondriales entre las se encuentra ATAD3A (*Fig 5*)⁽³³⁾. Otro motivo por el que se piensa que interviene en el metabolismo es por su contribución en las zonas de asociación con el retículo o “MAMs” mencionadas anteriormente. Por estas uniones podrían pasar libremente moléculas de colesterol o fosfolípidos hacia la matriz mitocondrial^(27,33). Asimismo, se han encontrado alteraciones del metabolismo lipídico en pacientes con mutaciones en este clúster^(28,29).

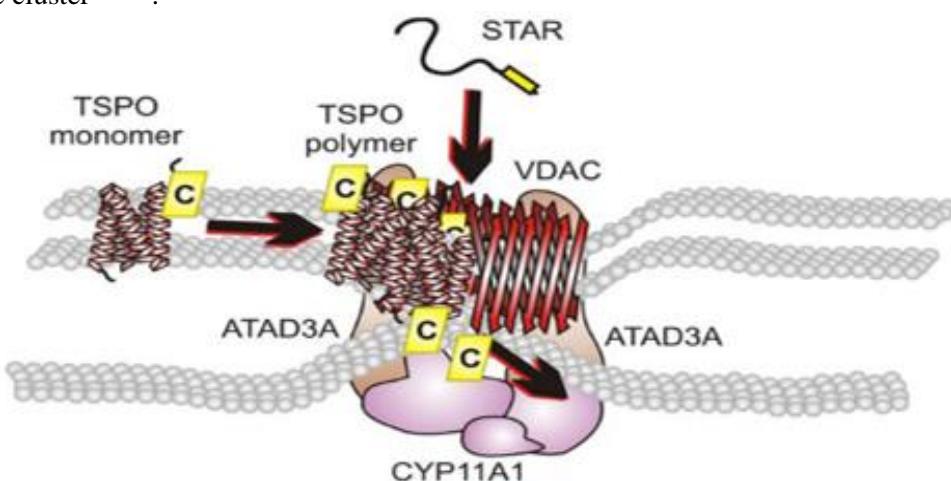


Figura 5. Representación esquemática de un transduceosoma. La proteína TSPO es necesaria para la unión del colesterol a la MME mientras que la proteína citosólica STAR inicia el transporte a través de esta membrana. La proteína VDAC interviene en la unión entre las dos anteriores. La función de ATAD3A es facilitar el paso a través de la MME y de la MMI. En esta última se localiza el citocromo P450 11A1 que se encargará de transformar el colesterol en pregnenolona (molécula precursora de todas las hormonas esteroideas). (Imagen modificada obtenida de Rone MB et al., 2012⁽³³⁾).

Por último, es necesario señalar que el DNA mitocondrial se ordena en torno a unos complejos proteicos denominados nucleoides⁽³⁴⁻³⁶⁾. Se cree que ATAD3 también interviene en la síntesis de proteínas y en la segregación y mantenimiento de la estructura del DNA mitocondrial al interaccionar con estos complejos y con los ribosomas mitocondriales^(35,36). Por el contrario, no parecen influir en la replicación del mismo, ya que no se observa depleción del material genético mitocondrial al alterarse la expresión de estas proteínas^(29,35). Sin embargo, no se conoce hasta qué punto ATAD3 interviene directamente sobre el DNA o su relación se debe a que estas proteínas participan en el metabolismo del colesterol, ya que se piensa que esta molécula es la encargada de unir los nucleoides a la MMI⁽³⁴⁾. Estudios realizados sobre células humanas demuestran que la alteración del metabolismo lipídico induce la formación de agregados de DNA mitocondrial en la matriz por lo que sí que parece existir una estrecha relación con el colesterol⁽²⁹⁾.

6 Resultados.

6.1 Mutaciones en el clúster genético *ATAD3* asociadas a enfermedad mitocondrial en humanos.

Hasta el día de hoy, se ha encontrado un total de 50 pacientes (incluyendo el caso clínico presentado en este trabajo) con mutaciones en el clúster genético *ATAD3* asociadas a patología mitocondrial. Las mutaciones encontradas son de diversa índole y se encuentran resumidas en la *Tabla 1* que se presenta a continuación.

	Pacientes	Puntual	Deleción B-A	Deleción C-B	Reagrupamiento B-A	Duplicación	Herencia
(Harel T et al., 2016⁽²¹⁾)	5 Pacientes Familias 1-5	+- R528W	-	-	-	-	DN/AD
	2 Pacientes Familia 6	++ T531I	-	-	-	-	AR
	1 Pacientes Familia 7	- (HC)	++	-	-	-	AR
Cooper HM et al., 2017⁽³⁷⁾)	2 Pacientes Familia 1	+- G355D	-	-	-	-	AD
(Desai R et al., 2017⁽²⁹⁾)	5 Pacientes Familia 1-4	- (4-HC)	++	-	-	-	AR (2-NR)
	1 Paciente Familia 5	-	-	+-	+-	-	AR
(Peeters-Scholte CMPCD et al., 2017⁽³⁸⁾)	2 Pacientes Familia 2	++ Q164*	-	-	-	-	NR
(Peralta S et al., 2019⁽²⁸⁾)	4 Pacientes Familia 1	++ L406R	-	-	-	-	AR
(Gunning AC et al., 2020⁽³⁹⁾)	5 Pacientes Familias 1-5	-	-	-	-	+-	DN/AD
(Frazier AE et al., 2021⁽³⁰⁾)	17 Pacientes Familias 1-16	-	-	-	-	+-	DN/AD
(Azova S et al., 2021⁽⁴⁰⁾)	1 Paciente Familia 1	-	-	-	-	+-	DN/AD
Estudio actual	1 Paciente Familia 1	++ L231P/IVS	-	-	-	-	AR

Tabla 1. Agrupamiento de los pacientes de cada estudio en función del tipo de mutación que presentan. El desglose de la clínica de cada uno de los miembros de las familias se realizará en los próximos apartados. DN: mutación *de novo*, AD: herencia autosómica dominante, AR herencia autosómica recesiva; ++: bialélico (homocigoto o heterocigoto compuesto), +-: heterocigoto, HC: heterocigosis compuesta; IVS: intervening sequence/ mutación localizada en intrón; NR: no existe registro/ los artículos no proporcionan los datos suficientes para completar la tabla.

Del total de 16 pacientes cuya enfermedad mitocondrial se asocia a mutaciones puntuales en el clúster *ATAD3* (es decir, con alteración de un único par de bases nitrogenadas de la secuencia), 15 de ellos las presentan en el gen *ATAD3A* y, solo en el caso del paciente de este trabajo, estas se localizan en el gen *ATAD3C* (este caso se presentará en el siguiente apartado).

Dentro del grupo de los 15 pacientes cuyos defectos puntuales se localizan en *ATAD3A*, 8 de ellos los presentan en homocigosis. En los casos publicados por Peralta S et al., 2019⁽²⁸⁾ y Harel T et al., 2016⁽²¹⁾ la herencia de estos defectos es recesiva ya que la secuenciación del exoma de los progenitores así como la de los hermanos de los pacientes, todos ellos libres de enfermedad, presenta estas alteraciones en heterocigosis. Por el contrario no es posible determinar la herencia en los casos publicados por Peeters-Scholte CMPCD et al., 2017⁽³⁸⁾ ya que el artículo no aporta los datos suficientes. Los alelos mutados de los pacientes registrados por Peeters-Scholte CMPCD et al., 2017⁽³⁸⁾ y Peralta et al., 2019⁽²⁸⁾ han sido clasificados como nulos, lo que quiere decir que no llegan a expresar ningún tipo de proteína o en el caso de que lo hagan, esta es inactiva. En los casos registrados por Harel T et al., 2016⁽²¹⁾ estos se han clasificado como hipomorfos, lo que quiere decir que la actividad de la proteína que codifican esta disminuida.

Los 7 pacientes restantes presentan mutaciones puntuales en heterocigosis. Las mutaciones de los 5 casos publicados por Harel T et al., 2016⁽²¹⁾ ocurren *de novo* pero, al estar en heterocigosis y tener clínica asociada, podemos afirmar que su herencia será autosómica dominante. En los dos casos publicados por Cooper HM et al., 2017⁽³⁷⁾ la mutación se transmite de manera autosómica dominante de una madre a su hijo, ambos con patología igualmente asociada. Estos dos estudios concluyen que las proteínas *ATAD3A* codificadas por el alelo mutado actúan de manera dominante negativa con respecto al otro alelo. Esto quiere decir que inhiben o interfieren en la función de la proteína codificada por el alelo original.

La alta homología existente entre los tres genes de este locus, confiere inestabilidad a la zona y facilita el fenómeno de recombinación homóloga no alélica (NAHR)⁽²¹⁾. Debido a esto, se ha registrado un gran número de personas con delecciones en el locus *ATAD3* de un único alelo que no mostraba patología asociada. En la actualidad, hay publicados 10 pacientes con delecciones en ambos alelos que sí presentan fenotipos patológicos. Todas ellas parecen producirse entre los últimos exones de *ATAD3B* y los primeros de *ATAD3A* resultando en la formación de un nuevo gen de fusión *ATAD3B/ATAD3A* a partir de los exones que no se hayan perdido durante la delección. Las delecciones de estos casos se pueden presentar tanto en homocigosis como en heterocigosis compuesta y son heredadas de los progenitores de manera autosómica recesiva (aunque carecemos de los datos suficientes del paciente 2 de Desai R et al., 2017⁽²⁹⁾ y de los pacientes 3 y 4 de Peeters-Scholte CMPCD et al., 2017⁽³⁸⁾ para poder determinarlo). Los experimentos de Desai R et al., 2017⁽²⁹⁾ demostraron la existencia de una proteína codificada por

el gen de fusión *ATAD3B/ATAD3A* la cual es idéntica a una de las isoformas de *ATAD3A* a excepción de dos cambios puntuales en su secuencia de aminoácidos. Este gen de fusión contiene la región promotora de *ATAD3B* por lo que se expresa en un nivel inferior a las proteínas *ATAD3A*. Los tres estudios clasifican los alelos de sus pacientes como nulos lo que quiere decir que esta proteína sería inactiva. Es importante señalar, que en todos estos pacientes, la expresión de *ATAD3A* nativa es nula o se encuentra drásticamente disminuida al haber perdido parte de los exones de este gen en ambos alelos.

El paciente número 5 de Desai R et al., 2017 ⁽²⁹⁾ muestra diferencias con respecto al resto. Aparentemente presentaba una delección *ATAD3C/ATAD3B* en uno de los alelos y una delección *ATAD3B/A* en el contrario tratándose, por lo tanto, de un caso de heterocigosis compuesta. Cada delección había sido heredada de un progenitor de manera autosómica recesiva ya que ninguno de ellos asociaba ningún tipo de afectación. Los estudios experimentales realizados por los autores de este artículo no consiguieron amplificar el cDNA del RNA producido por la proteína de fusión observada en el resto de casos. Sin embargo, sí que pudieron amplificar secuencias de cDNA correspondientes a los transcritos de ARN de los genes *ATAD3B* y *ATAD3A* por separado. Al estudiar las secuencias de estos cDNA lo que se pudo encontrar es que ambos contenían intrones correspondientes al otro gen por lo que se piensa que se produjo una conversión génica no alélica/ectópica interlocus (es decir, que zonas de las secuencias de un gen han sido sustituidas por partes homólogas de otro gen localizado en su mismo locus). Los alelos de este caso han sido clasificados como hipomorfos ya que los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* sí que se expresan en el alelo reagrupado pero en menor cantidad y, al contener exones intercambiados entre ellos, su función podría verse disminuida. Además, el alelo con delección en *ATAD3C/ATAD3B* mantiene la expresión de *ATAD3A* por lo que la función también podría estar conservada por esta parte.

En último lugar, los artículos de Gunning AC et al., 2020 ⁽³⁹⁾, Frazier AE et al., 2021 ⁽³⁰⁾ y Azova S et al., 2021 ⁽⁴⁰⁾ han registrado un total de 23 pacientes con duplicaciones en el locus *ATAD3*. De entre todos ellas, únicamente no se han detallado las características de la presentada por el paciente de Azova S et al., 2021 ⁽⁴⁰⁾. Los otros 22 casos presentan duplicaciones muy similares (a pesar de que varían ligeramente en sus puntos de corte) que han conducido a la formación de un gen de fusión *ATAD3A/ATAD3C* por NAHR y a la síntesis de una copia extra de *ATAD3B* en este locus (*Fig 6*). En los 23 casos, las duplicaciones afectan a un único alelo, todas han ocurrido *de novo* y su herencia es autosómica dominante. Los estudios experimentales de estos autores demostraron una aumento de los transcritos de ARN de los genes *ATAD3B* en un 40-50% (ya que este se encuentra duplicado) y de *ATAD3C* (en realidad se estaba detectando el transcríto del gen de fusión). Asimismo, se detectó la proteína codificada por *ATAD3A/ATAD3C*. Esta parecía interferir en la oligomerización de los hexámeros de proteínas *ATAD3* codificados por el alelo sano por lo que podemos afirmar que se comporta de manera dominante negativa.

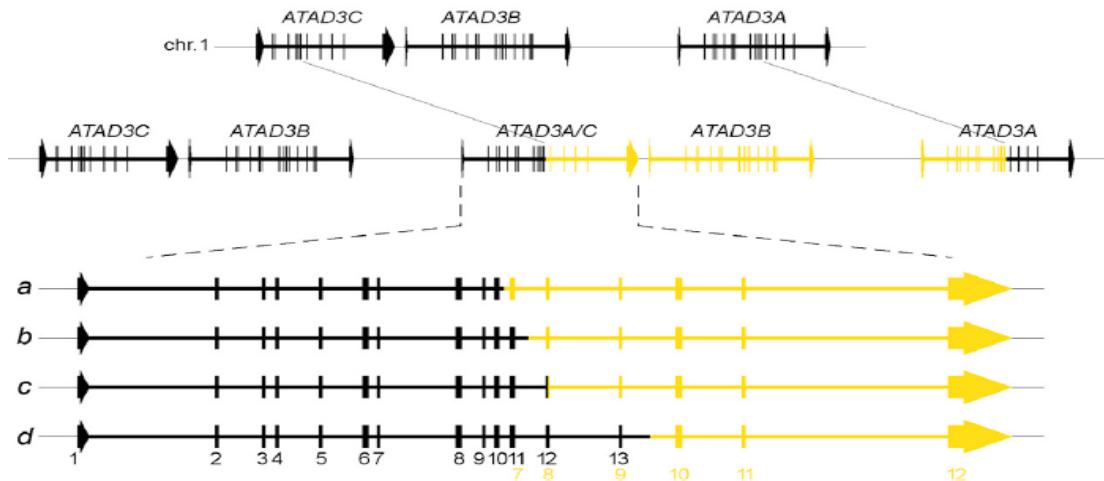


Figura 6. Representación esquemática de las duplicaciones observadas en el artículo publicado por Frazier AE et al., 2021⁽³⁰⁾ (Las presentadas por los casos de Gunning AC et al., 2020⁽³⁹⁾ son muy parecidas). Podemos observar que se ha duplicado parte de *ATAD3C*, el gen *ATAD3B* al completo y parte de *ATAD3A*. Mediante un proceso de recombinación homóloga no alélica (NAHR) se ha configurado un gen de fusión *ATAD3A/ATAD3C* que abarca los primeros exones de *ATAD3A* (en concreto del 1 al 10-13) y los últimos de *ATAD3C* (en concreto del 7-10 al 12). A pesar de que la parte del gen *ATAD3A* duplicada también sufre un proceso de recombinación con el gen original, el resultado final es la presencia de un gen de fusión *ATAD3A/ATAD3A* que no se diferencia del nativo. Este proceso de formación de genes de fusión también ocurre en los casos que presentan delecciones. Estos se forman al unir los primeros exones de *ATAD3B* con los últimos de *ATAD3A* ya que el resto de exones de estos genes se han eliminado en el transcurso de la delección. (Imagen modificada obtenida de Frazier AE et al., 2021⁽³⁰⁾).

6.2 Nuevo caso de un paciente con mutaciones puntuales en *ATAD3C* asociadas a enfermedad mitocondrial.

En este trabajo presentamos a un paciente de 8 años de edad en seguimiento por foniatria, fisioterapia, rehabilitación y neurología desde temprana edad por padecer un cuadro de hipotonía asociado a retraso en la adquisición de pautas psicomotoras.

6.2.1 Antecedentes familiares

La madre es asmática y presentó una crisis durante el transcurso de la gestación que precisó oxígeno y broncodilatadores de urgencia. El hermano mayor está en seguimiento por dermatología debido a un cuadro de mastocitos cutánea. Las abuelas materna y paterna padecían crisis de migraña. El resto de antecedentes familiares carecen de interés.

6.2.2 Antecedentes personales

Parto distóxico a las 40 semanas de gestación. Estuvo ingresado en neonatología por un cuadro de corioamnionitis (fiebre puerperal) y fue dado de alta a los dos días tras la obtención de los resultados de los hemocultivos realizados de urgencia. Posteriormente ha padecido un episodio de otitis media y varios episodios de reflujo gastroesofágico.

El paciente presenta importante retraso en el desarrollo psicomotor. No era capaz de sostener la cabeza a los 4 meses de edad, la sedestación era inestable y con apoyo a los 7 meses y actualmente no ha desarrollado la marcha independiente. Comenzó a señalar con el dedo y a realizar el gesto de despedida con la mano a los 3 años.

6.2.3 Exploración física

El fenotipo del paciente asocia algunos signos dismórficos menores (leve hipertelorismo, epicantus y oblicuidad ocular descendente). En consulta se muestra sonriente y atento y es capaz de fijar y seguir con la mirada. No mantiene postura de gateo por lo que se arrastra por el suelo para poder desplazarse. La sedestación con apoyo es inestable y dura solo unos instantes. Se mantiene de pie agarrado aunque no es capaz de deambular. El lenguaje es muy pobre y solo se compone de algunos bisílabos y vocalizaciones.

A la exploración neurológica se objetiva hipotonía y ataxia axial, asociada a hipertonía de las extremidades, las cuales presentan reflejos exaltados. Se observan polimioclonías bilaterales y temblor que resulta más acusado en miembros superiores (MMSS) y que se exacerba durante el movimiento o cuando el paciente se excita. La exploración de los pares craneales es normal.

6.2.4 Procedimiento diagnóstico

Durante el año 2014 se le realizaron multitud de pruebas complementarias en el Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de las islas Canarias. El paciente también fue valorado por el Hospital San Juan de Dios de Barcelona en el año 2015 donde se repitieron parte de estos exámenes. Recordemos que para el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales es fundamental asociar a estos estudios complementarios una serie de pruebas analíticas concretas, distintos tipos de análisis genéticos y es recomendable la toma de una biopsia (preferentemente del músculo vasto lateral del cuádriceps) para realizar estudios bioquímicos y de microscopía sobre sus células.

Los resultados de las analíticas llevadas a cabo en estos hospitales, las cuales incluían hemograma, bioquímica general, perfil hepático, perfil tiroideo y niveles de vitamina D, vitamina B12 y ácido fólico, fueron normales a excepción de un aumento del nivel de lactato en plasma de 3,5 mmol/L. El análisis del LCR del paciente también resultó normal. Asimismo, ninguna de las dos resonancias magnéticas craneales que se le realizaron detectó ningún hallazgo relevante. Los estudios realizados por los servicios de neurofisiología no mostraron alteraciones a excepción de una ligera hipoacusia neurosensorial en el oído izquierdo y una hipoacusia de transmisión también leve en el oído derecho, ambas detectadas mediante potenciales evocados auditivo de tronco cerebral. El fondo de ojo del paciente no era patológico y las pruebas realizadas por el servicio de cardiología, incluyendo una ecocardiografía, tampoco señalaron ningún tipo de patología.

Un estudio metabólico más detallado fue llevado a cabo en la Universidad Autónoma de Madrid en el año 2014. Este incluía la detección de niveles de aminoácidos en plasma, LCR y orina, la detección de ácidos orgánicos en orina y otras pruebas altamente específicas como la cuantificación de niveles de neurotransmisores en LCR. Los resultados de este estudio también resultaron completamente normales.

En el año 2015 se obtuvo una muestra de tejido del músculo vasto lateral del paciente. El informe de anatomía patológica únicamente mencionaba leves cambios histológicos inespecíficos como atrofia ocasional de alguna de las fibras de la muestra o algún defecto puntual en su tinción. Parte de la muestra se remitió a un centro de investigación del Hospital 12 de Octubre de Madrid para el análisis del funcionamiento de la cadena respiratoria y para el estudio de posibles mutaciones y/o depleción del DNA mitocondrial. Las pruebas realizadas tampoco detectaron ningún hallazgo clínicamente significativo.

Al no demostrarse defectos en el DNA mitocondrial, se realizó una hibridación genómica comparativa (a-CGH) para analizar el cariotipo así como un estudio exómico dirigido a múltiples enfermedades genéticas que, al igual que el resto de pruebas, tampoco llegaron a ninguna conclusión. Finalmente, ante la ausencia de ningún resultado aclaratorio que pudieran explicar las causas etiológicas de la enfermedad del paciente se propuso en 2016 la realización de una secuenciación exómica en trio con la máxima cobertura posible (más de 19.000 genes y 198.000 exones que cubrían el 85% de las alteraciones de origen genético). Los resultados obtenidos se compararon con bases de datos para detectar y descartar posibles variantes polimórficas de genes previamente descritas y no asociadas a ningún fenotipo clínico. En el exoma materno, se logró detectar una mutación puntual en el gen *ATAD3C* que provocaba un cambio de aminoácido. En el paterno se detectó igualmente una alteración puntual en una zona que podría alterar el proceso de *splicing* del transcripto de RNA del gen *ATAD3C*. El paciente había heredado ambas mutaciones de manera autosómica recesiva y, al ser diferentes entre ellas, podemos afirmar que se encuentran en heterocigosis compuesta. Seguidamente, se utilizaron varios programas informáticos de predicción que coincidieron en que existía una alta probabilidad de que estos defectos se trataran de variantes patogénicas del gen que podrían explicar finalmente el cuadro clínico del paciente.

6.3 Manifestaciones clínicas y analíticas de pacientes con mutaciones puntuales en *ATAD3*

Los 15 casos de pacientes que presentan mutaciones puntuales en el gen *ATAD3A* registrados en la literatura asocian fenotipos muy similares entre ellos y, en más de la mitad de los casos, su tiempo de supervivencia es mucho mayor que en los que presentan otros tipos de defectos en este clúster. A continuación se realizará una comparativa (*Tabla 2*) de la clínica y de las analíticas de todos ellos incluyendo a nuestro paciente por presentar igualmente mutaciones de tipo puntual en este locus, a pesar de que estas se localicen en el gen *ATAD3C*.

(Harel T. et al., 2016 ⁽²¹⁾)									(Cooper H.M. et al., 2017 ⁽³⁷⁾)	
Pacientes	Familia 1 II-1	Familia 2 II-4	Familia 3 II-1	Familia 4 II-1	Familia 5 II-1	Familia 6 II-1	Familia 6 II-2	Paciente II-1	Paciente III-1	
Origen	NR	NR	Italia	NR	NR	Italia	Italia	Finlandia	Finlandia	
Sexo	F	F	M	F	M	F	M	F	M	
Edad en el año de publicación del artículo	9 años	5 años	3 años	5 años	23 meses	26 años	24 años	35 años	3,5 años	
Alteraciones durante el embarazo	NR	NR	NR	NR	+	NR	NR	-	-	
Retraso en el desarrollo	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Patología neurológica	Hipotonía Espasticidad Neuropatía periférica	Hipotonía, Espasticidad Neuropatía periférica	Hipotonía Distornia Espasticidad neuropatía Periférica	Hipotonía, Espasticidad Neuropatía Periférica	Hipotonía Neuropatía periférica leve	Hipotonía Temblor Ataxia	Hipotonía Temblor Ataxia	Hipotonía Espasticidad en MMII Neuropatía periférica	Hipotonía Espasticidad severa generalizada, Neuropatía periférica	
Patología oftalmológica	Atrofia del nervio óptico	-	Atrofia del nervio óptico	Atrofia del nervio óptico	-	Catarata congénita	Catarata congénita	Miopía magna Fotofobia Ausencia de pestañas	Fotofobia Ausencia de pestañas Ptosis	
Miocardiopatía hipertrófica	-	-	+	+	-	-	-	NR	NR	
Alteraciones del SNC en diagnóstico por imagen	-	-	-	-	-	-	-	+	(Atrofia médula espinal)	
Alteraciones en la analítica sanguínea	-	↑ Niveles de lactato	↑ Niveles de lactato ↓ Niveles de GH	↑ Niveles de lactato	NR	NR	↑ Niveles de lactato	-	↑ Niveles de lactato ↑ Niveles de amonio	
Otros hallazgos	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad	Deficiencia de los complejos I y III	Aciduria 3-metilglutacónica	Deficiencia de los complejos II + CS y II +III. Aciduria 3-metilglutacónica	Síndrome de Klinefelter	Alteraciones del desarrollo sexual Hiposmia	Alteraciones del desarrollo sexual Hiposmia	-	-	

Figura 2. Principales hallazgos clínicos y analíticos de pacientes con mutaciones puntuales en el clúster genético ATAD3.

	(Peeters-Scholte C. et al., 2017 (38))	(Peralta S. et al., 2019 (28))	Estudio actual				
Pacientes	S2a	S2b	SII-3	SII-4	SII-6	SII-8	Paciente II-2
Origen	Holanda	Holanda	Marruecos	Marruecos	Marruecos	Marruecos	España
Sexo	M	M	F	M	F	F	M
Edad en el año de publicación del artículo	† 6º día	† 3º día	† 3º día	† 7º día	† 19º día	† 30º día	8 años
Alteraciones durante el embarazo	Polihidramnios Cesárea a las 32 + 6 semanas por pérdida de bienestar fetal	Polihidramnios Microcefalia en ecografía de 30 semanas	-	-	-	<i>Hydrops fetalis</i>	Parto distóxico Fiebre puerperal
Retraso en el desarrollo	+	+	NR	+	+	+	+
Patología neurológica	NR	NR	Hipotonía Tremor	Hipotonía Tremor	Hipotonía Tremor	Hipotonía axial y movimientos clónicos de extremidades Tremor	Hipotonía axial e hipertonia de extremidades Movimientos clónicos Tremor en MMSS
Patología oftalmológica	Neuropatía óptica Catarata congénita, Opacidad corneal	Opacidad corneal	Blefarofimosis Ausencia de pestañas	Catarata congénita Ausencia de pestañas	Catarata congénita	Catarata congénita Opacidad corneal	Epicantus
Miocardiopatía hipertrófica	NR	NR	+	+	+	+	-
Alteración del SNC en diagnóstico por imagen	+	+	+	+	+	+	-
Alteraciones en la analítica sanguínea	↑ Niveles de lactato ↑ Ácido 3-metilglutacónico	↑ Niveles de lactato ↑ Ácido 3-metilglutacónico	↑ Niveles de lactato ↓ Niveles de colesterol	↑ Niveles de lactato ↓ Niveles de colesterol	↑ Niveles de lactato	+	↑ Niveles de lactato
Otros hallazgos	Rasgos dismórficos faciales Disgenesia gonadal	Malformaciones congénitas en las manos Disgenesia gonadal	Rasgos dismórficos faciales	Rasgos dismórficos faciales Disgenesia gonadal Depleción mtDNA	Disfunción del complejo I	Rasgos dismórficos faciales	Rasgos dismórficos faciales Hipoacusia en OD y OI

Tabla 2 (continuación). NR: datos no registrados; F: femenino, M: masculino; MMII: miembros inferiores, MMSS miembros superiores; OI oído izquierdo, OD oído derecho.

6.4 Manifestaciones clínicas y analíticas de pacientes con delecciones o duplicaciones en ATAD3.

A continuación se expone una tabla comparativa en la que se representan las distintas frecuencias de aparición de determinadas patologías en un total de 32 pacientes que presentan delecciones o duplicaciones en los genes del clúster *ATAD3* (*Tabla 3*). En ella no se han incluido ni al paciente número 5 del artículo publicado por Desai R. et al., 2017⁽²⁹⁾ ni al único paciente registrado en el artículo de Azova S et al., 2021⁽⁴⁰⁾ por motivos que se expondrán más adelante. A pesar de que los aparatos y sistemas que se ven afectados con más frecuencia son los mismos, los pacientes con estos tipos de mutaciones asocian fenotipos más graves en comparación a los de los pacientes con mutaciones puntuales en este locus y, en consecuencia, la mortalidad entre los primeros es mayor (95% del total de pacientes y 100% de los expuestos en la tabla). Los motivos por los cuales la severidad del fenotipo o el porcentaje de mortalidad varían entre pacientes con distintas mutaciones o entre pacientes con un mismo tipo de mutación todavía no han sido del todo esclarecidos. Las diferentes hipótesis serán planteadas en el apartado de discusión.

Hallazgos clínicos y analíticos	Delecciones		Duplicaciones		Total de pacientes	
	Número de pacientes afectados	%	Número de pacientes afectados	%	Número de pacientes afectados	%
Alteraciones durante el embarazo (<i>Polihidramnios, hydrops fetalis, restricción del crecimiento intrauterino, pérdida de bienestar fetal...</i>)	9/10	90%	11/22	50%	20/32	63%
Patología neurológica (<i>Hipotonía, espasticidad, polimioclonías, temblor, neuropatía periférica...</i>)	5/10	50%	17/22	77%	22/32	69%
Patología oftalmológica (<i>Neuropatía óptica, catarata congénita, opacidad corneal...</i>)	5/10	50%	16/22	73%	21/32	66%
Patología cardíaca (<i>Miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, fibroelastosis endocárdica...</i>)	2/10	20%	21/22	95%	23/32	72%
Alteraciones del SNC en diagnóstico por imagen (<i>Hipoplasia pontocerebelosa, alteraciones de la sustancia blanca, hemorragias...</i>)	9/10	90%	20/22	91%	29/32	91%
Acidosis láctica	6/10	60%	19/22	86%	25/32	78%

Tabla 3. Resumen de las distintas frecuencias de aparición de determinadas patologías en pacientes con delecciones o duplicaciones en los genes del clúster *ATAD3*. Estas aparecen representadas en porcentaje y en relación al número total de pacientes que presentan cada tipo de mutación. También han sido representadas con respecto al número total de pacientes. Los pacientes en los cuales no se ha realizado algún tipo de estudio para determinar alguna patología se han clasificado junto a los pacientes que si han sido estudiados y no presentan ese tipo de afectación.

A pesar de que tanto las delecciones como las duplicaciones en este clúster asocien patologías similares, se pueden encontrar diferencias entre los fenotipos de ambos grupos de pacientes. Al comparar los porcentajes, la diferencia más clara que se puede observar es que la patología cardiaca se ha presentado con más frecuencia en los casos con duplicaciones. Dentro de cada grupo de alteraciones también existen diferencias como, por ejemplo, en las afectaciones que se producen durante el desarrollo embrionario. La presencia de polihidramnios o de hidropesía fetal solamente se ha detectado en los casos que presentan delecciones mientras que solo se ha producido restricción del crecimiento intrauterino en casos con duplicaciones. De la misma manera, la hipoplasia severa del cerebelo observada en pruebas de neuroimagen es un hallazgo mucho más frecuente cuando existen delecciones⁽³⁰⁾.

El paciente número 5 del artículo de Desai R et al., 2017⁽²⁹⁾ supone un caso especial entre los pacientes con delecciones ya que presenta un fenotipo mucho menos severo que el resto con leve retraso en la adquisición de pautas psicomotoras y problemas psiquiátricos. Comenzó a presentar ataxia cerebelosa y distonía a partir de los 25 años y supone el único caso dentro de este grupo que no ha fallecido. Aunque al principio se pensaba que presentaba dos delecciones en heterocigosis compuesta (es decir, una diferente en cada alelo), posteriormente se vio que en uno de los alelos lo que había sucedido es que los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* habían intercambiado exones entre ellos. Esto hace que sea el único paciente que presenta una única delección asociada a enfermedad mitocondrial. El hecho de que el otro alelo también presente alteraciones parece propiciar la aparición de patología aunque, del mismo modo, puede explicar que la clínica del paciente sea mucho menos severa al no presentarse una doble delección como en el resto de casos.

El paciente del caso publicado por Azova S et al., 2021⁽⁴⁰⁾ también supone un caso especial esta vez dentro del conjunto de pacientes con duplicaciones. No se ha incluido junto al resto de pacientes debido a que aunque los autores comenten que presenta una duplicación heterocigótica *de novo* en el clúster de genes *ATAD3*, no especifican exactamente las características de esta. Además, este paciente ha sobrevivido durante mucho más tiempo que el resto de casos de este grupo (19 meses). Aunque ha presentado varias alteraciones típicamente observadas en los pacientes con mutaciones en este locus (restricción del crecimiento intrauterino, opacidad corneal, hipotonía axial e hipertonia de extremidades, miocardiopatía hipertrófica...), es el único paciente en el que se ha descrito enfermedad de Graves. Esta se diagnosticó a los 5 meses de edad suponiendo el caso más joven con esta patología publicado hasta la fecha (es muy infrecuente que esta enfermedad aparezca por debajo de los 5 años). Ante la persistencia de clínica hipertiroides y resistencia al tratamiento antitiroides se le tuvo que practicar una tiroidectomía total a los 9 meses de edad. Al desconocer las características de la mutación resulta difícil entender las diferencias entre el fenotipo de este paciente y el resto de casos que presentan duplicaciones.

7 Discusión.

En este trabajo se ha presentado un nuevo caso clínico de un niño que asocia mutaciones en el clúster genético *ATAD3*. Del mismo modo, se ha realizado una comparativa entre sus manifestaciones clínicas más relevantes con las del resto de casos publicados así como un resumen de todos los tipos de mutaciones registradas en este locus hasta la fecha.

El principal fenotipo de las enfermedades mitocondriales asociadas a mutaciones en *ATAD3* se compone de alteraciones del desarrollo embrionario y de afectación muy marcada del sistema nervioso con retraso en la adquisición de pautas psicomotoras, hipotonía, espasticidad, ataxia, temblor y alteraciones del SNC en pruebas de diagnóstico por imagen (siendo el cerebelo la parte más afectada). Además, también es frecuente la patología ocular y la afectación cardiaca. Resulta difícil determinar los mecanismos patogénicos por los cuales la afectación de estos aparatos y sistemas es más severa que en el resto de órganos. Como hemos comentado al inicio del texto, las mitocondrias desempeñan un rol fundamental en la fisiología de las neuronas y de los miocitos. La alteración de las funciones que estos genes parecen tener en el mantenimiento de la estructura y en los procesos dinámicos de estos orgánulos podría explicar la afectación de estas células ante el deterioro de sus mitocondrias. Además Desai R et al., 2017⁽²⁹⁾ afirma que las alteraciones del metabolismo del colesterol también pueden suponer un factor clave en la patogenia de estos cuadros ya que este establece interacciones con el DNA mitocondrial. Aunque los genes del clúster no presentan especificidad por ningún tipo de tejido, todos los datos acerca de su expresión han sido recogidos sobre muestras obtenidas post mortem. Esto quiere decir que es posible que durante el desarrollo embrionario, estos se expresen en mayor cantidad en el SNC y sean fundamentales en su maduración. Los hallazgos observados por varios estudios sobre larvas y embriones de distintos animales parecen apoyar esta teoría^(21, 24-26).

En el caso de nuestro paciente, nos resulta difícil concluir que la disfunción de *ATA3C* suponga la principal causa etiológica de su cuadro clínico ya que los conocimientos que existen actualmente sobre este gen son escasos. Sin embargo, algunos hallazgos como la elevación del nivel de lactato por encima de 3 mmol/L sugieren que el paciente padece una enfermedad mitocondrial con alta probabilidad. Además, el retraso en el desarrollo psicomotor y la clínica neurológica que presenta coinciden con los fenotipos observados en el resto de casos. Aunque las resonancias magnéticas nucleares no determinan ninguna afectación específica, el temblor que se exacerba durante el movimiento y la ataxia apuntan claramente a alteraciones en el funcionamiento del cerebelo, el cual, es un órgano que se ha visto afectado en la mayoría de los pacientes. Además si tenemos en cuenta que las dos variantes encontradas durante el estudio genético han sido consideradas como patogénicas, la probabilidad de que estas sean la principal causa etiológica es bastante elevada.

Para finalizar, ante el creciente número de genotipos patológicos en este clúster, nos resulta importante determinar los motivos por los cuales algunos asocian fenotipos más graves que otros de cara al manejo pre- y postnatal⁽³⁸⁾.

El nivel de expresión del gen *ATA3A* parece correlacionarse con la severidad de la clínica de los pacientes con mutaciones puntuales en el mismo. Aquellos que las presentan en heterocigosis mantienen la expresión de este gen por parte del alelo no mutado y en consecuencia, su fenotipo es más leve. La patogenia en estos casos viene dada porque la proteína codificada por el alelo afectado interactúa con las proteínas *ATAD3A* nativas reduciendo su función. Esta hipótesis también parece adecuarse a los casos que se encuentran en homocigosis. Aquellos cuyos alelos fueron clasificados como nulos (que no expresaban el gen mutado o si lo expresaban, la proteína era inactiva) fallecieron a las pocas semanas de vida. Sin embargo, aquellos pacientes que si conservaban algo de expresión (alelos hipomorfos) no presentaron un cuadro tan severo. La variabilidad de expresión de los alelos en los casos en homocigosis así como la variabilidad en los fenotipos de los pacientes en heterocigosis podrían venir definidas por la localización de las mutaciones dentro de la secuencia del gen. En los casos en los que estas se encuentren en regiones que codifican dominios fundamentales para las proteínas puede perderse por completo la función de las mismas (en el caso de estas proteínas los fenotipos más graves suelen asociarse a cambios de aminoácidos en los dominios del extremo C-terminal, que es el que presenta actividad ATPasa⁽²⁸⁾). Sin embargo, mutaciones en otros puntos de menor relevancia pueden tener repercusiones más leves en su funcionamiento. También puede ocurrir que la mutación genere un codón de finalización dando lugar a la pérdida de parte de la cadena de aminoácidos. La diversidad de fenotipos también podría deberse a la presencia de mutaciones en secuencias intrónicas que resultan muy difíciles de detectar y pueden aportar un mayor grado de dificultad a la hora de entender los mecanismos patogénicos de estas enfermedades.

El nivel de expresión de *ATAD3A* también parece ser decisivo en los pacientes con delecciones en este locus. Los casos que han presentado este tipo de mutaciones en *ATAD3B/ATAD3A* de manera homocigótica han fallecido al poco tiempo de nacer. Esto puede explicarse porque ambos locus han perdido parte de la secuencia de *ATAD3A* transformándose en alelos nulos para este gen. Por el contrario, el artículo de Harel T et al., 2016⁽²¹⁾ consigue detectar en bases de datos una gran cantidad de personas con esta misma mutación en heterocigosis, todas ellas libres de enfermedad. Además registró un paciente con delecciones en *ATAD3C/ATAD3B* en homocigosis que sí que presentaba patología, pero esta se explicaba por una mutación concomitante. Esto nos lleva a pensar que la ausencia de expresión de los otros dos genes del clúster no es tal relevante a la hora de determinar la aparición de enfermedad mitocondrial.

Resulta más difícil explicar la patogenia de los casos en los que se produjeron duplicaciones homocigóticas en el clúster. En estos pacientes parece que la proteína de fusión ATAD3A/ATAD3C que se generaba actuaba de manera dominante negativa interfiriendo en la oligomerización de los complejos de proteínas ATAD3A expresadas por el alelo sano al igual que lo que sucedía en los pacientes con mutaciones puntuales en heterocigosis. Sin embargo, el fenotipo de estos casos era mucho más severo y todos fallecieron a las pocas semanas de nacer. En el estudio publicado por Gunning AC et al., 2020⁽³⁹⁾ se consiguieron detectar varios pacientes con duplicaciones monoalélicas del gen *ATAD3B* en distintas bases de datos para ver si estas podrían contribuir a la severidad del fenotipo de estos pacientes. Sin embargo los resultados que obtuvieron es que todos los sujetos que presentaban este hallazgo se encontraban completamente sanos. Por lo tanto el aumento del número de copias del gen *ATAD3B* tampoco parece contribuir a la patogenia de enfermedades mitocondriales.

Como ya se ha comentado anteriormente, se han registrado un par de pacientes que suponen casos especiales y difíciles de comprender. Según lo explicado, el paciente número 5 de Desai R et al., 2017⁽²⁹⁾ no debería haber asociado clínica por presentar una delección en *ATAD3B/ATAD3A* de manera homocigótica. Sin embargo esta parece explicarse al verse disminuidos los niveles de expresión de *ATAD3B* y *ATAD3A* debido a un proceso de conversión génica ectópica en el segundo alelo. La caída en los niveles de proteína *ATAD3B* no explicaría el cuadro clínico según los hallazgos observados por Harel T et al., 2016⁽²¹⁾ por lo que la etiología parece recaer de nuevo en la baja expresión de *ATAD3A*. Además, esta proteína podría ser menos activa al contener exones de *ATAD3B* en su secuencia. El motivo por el que el paciente con una duplicación heterocigótica presentado por Azova S et al., 2021⁽⁴⁰⁾ presentó un fenotipo tan característico y sobrevivió durante mucho más tiempo que el resto de pacientes de su grupo resulta imposible de explicar al no conocer los detalles exactos de la mutación.

El caso de nuestro paciente supone el único caso con mutaciones puntuales en ambos alelos que conserva completamente la expresión de *ATAD3A*. Los resultados de los experimentos realizados por el grupo de investigación “Biogénesis y patología mitocondrial” de la Universidad de Zaragoza parecen determinar que las proteínas ATAD3C codificadas por ambos alelos mutados interferirían en la oligomerización de los complejos de proteínas ATAD3A de manera dominante negativa explicando el posible mecanismo patogénico de su enfermedad.

8 Conclusiones.

1. A pesar de que se ha hecho un gran avance en la comprensión de la fisiopatología y en el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales todavía queda un largo camino por recorrer en el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas. Estas suelen basarse en contrarrestar los

defectos metabólicos de los pacientes así como en el tratamiento sintomático. Resulta de vital importancia proponer un adecuado consejo genético así como realizar un diagnóstico preimplantacional ante el deseo de un nuevo embarazo.

2. Los genes de este clúster tienen un nivel de expresión medio-bajo y no presentan especificidad por ningún tipo de tejido. La alta homología entre ellos confiere inestabilidad a la zona facilitando la aparición de distintos tipos de mutaciones. Todavía falta por definir la localización exacta de los dominios de las proteínas que codifican, así como las funciones que desempeñan en las mitocondrias.
3. La severidad del fenotipo de los pacientes parece venir determinada por los niveles de expresión de *ATAD3A* que a su vez vienen condicionados por el tipo de mutación presente en el clúster. La alteración en los niveles de *ATAD3B* y *ATAD3C* no parece determinar la aparición de enfermedad aunque no lo podemos afirmar debido a la escasez de información.
4. Aunque no lo podemos afirmar, las mutaciones en los genes *ATAD3C* de nuestro paciente parecen ser las responsables de su enfermedad.

9 Material y métodos.

Este trabajo se incluye dentro del proyecto de investigación denominado “Mutaciones en el DNA mitocondrial y nuclear asociadas a enfermedades mitocondriales: Confirmación de patogenicidad y posibilidades terapéuticas” del Instituto de Salud Carlos III. FIS - PI17/00021, aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (CEICA).

Para la obtención de información se ha recurrido a la base de datos de PubMed de la que se han recogido revisiones sistemáticas y artículos originales. Se han excluido todas las publicaciones anteriores al año 2000 a excepción del primer artículo citado en la bibliografía por la relevancia de su información y por su elevado factor de impacto. Para la búsqueda se han utilizado los siguientes términos: “Mitochondrial disease”, “Mitochondrial DNA”, “Neurological disorder”, “myopathies”, “ATAD3” y “gene cluster”. A su vez, los datos referentes a la expresión de estos genes y proteínas han sido recogidos de las bases de datos “Expression Atlas” y “The Human Protein Atlas”. Por último, los informes con los datos clínicos del paciente han sido facilitados por el grupo de investigación “Biogénesis y patología mitocondrial” de la Universidad de Zaragoza. Estos recogían un estudio de anatomía patológica realizado en 2015 en el Hospital 12 de Octubre de Madrid así como un estudio genético del año 2016 y un informe del servicio de neurología del año 2018 ambos realizados en el Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de las islas Canarias. Todos ellos se han obtenido con el consentimiento de los progenitores.

10 Bibliografía.

1. Hoogenraad N. Mitochondria: In sickness and in health. *Today's Life Sci.* 1990;2(2):37–9.
2. Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet.* 2018;391(10139):2560–74.
3. Cheng A, Hou Y, Mattson MP. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro.* 2010;2(5):243–56.
4. Devine MJ, Kittler JT. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(2):63–80.
5. Macdonald R, Barnes K, Hastings C, Mortiboys H. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: Can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochem Soc Trans.* 2018;46(4):891–909.
6. Picca A, Calvani R, Bossola M, Allocca E, Menghi A, Pesce V, et al. Update on mitochondria and muscle aging: All wrong roads lead to sarcopenia. *Biol Chem.* 2018;399(5):421–36.
7. Boengler K, Kosiol M, Mayr M, Schulz R, Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2017;8(3):349–69.
8. Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview Summary Genetic counseling. *Gene Rev.* 2014;1–21.
9. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. *Nat Rev Genet.* 2015;16(9):530–42.
10. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol.* 2017;241(2):236–50.
11. Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, et al. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. Vol. 94, *Molecular Genetics and Metabolism.* 2008. 16–37 p.
12. Parikh S, Goldstein A, Koenig MK, Scaglia F, Enns GM, Saneto R, et al. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *2016;17(9):689–701.*
13. Murayama K, Shimura M, Liu Z, Okazaki Y, Ohtake A. Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *J Hum Genet.* 2019;64(2):113–25.
14. Pfeffer G, Horvath R, Klopstock T, Mootha VK, Suomalainen A, Koene S, et al. New treatments for mitochondrial disease - No time to drop our standards. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(8):474–81.
15. Parikh S, Goldstein A, Karaa A, Koenig MK, Anselm I, Brunel-Guitton C, et al. Patient care standards for primary mitochondrial disease: a consensus statement from Mitochondrial Medicine Society. *2017. 19(12):1380-1417.*
16. Li S, Rousseau D. ATAD3, a vital membrane bound mitochondrial ATPase involved in tumor progression. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(1):189–97.

17. Peralta S, Goffart S, Williams SL, Diaz F, Garcia S, Nissanka N, et al. ATAD3 controls mitochondrial cristae structure in mouse muscle, influencing mtDNA replication and cholesterol levels. *J Cell Sci.* 2018;131(13).
18. Baudier J. ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria–endoplasmic reticulum connection in mammalian cells. *Biol Rev.* 2018;93(2):827–44.
19. Papatheodorou I, Moreno P, Manning J, Fuentes AMP, George N, Fexova S, et al. Expression Atlas update: From tissues to single cells. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(1): 77–83.
20. Uhlen M, Karlsson MJ, Zhong W, Tebani A, Pou C, Mikes J, et al. A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science.* 2019;366(6472).
21. Harel T, Yoon WH, Garone C, Gu S, Coban-Akdemir Z, Eldomery MK, et al. Recurrent De Novo and Biallelic Variation of ATAD3A, Encoding a Mitochondrial Membrane Protein, Results in Distinct Neurological Syndromes. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):831–45.
22. Garin-Muga A, Odriozola L, Martínez-Val A, Del Toro N, et al. Detection of Missing Proteins Using the PRIDE Database as a Source of Mass Spectrometry Evidence. *J Proteome.* 2016;15(11):4101–15.
23. Wang D, Eraslan B, Wieland T, Hallström B, Hopf T, Zolg DP, et al. A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Mol Syst Biol.* 2019;15(2):1–16.
24. Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, Hubstenberger A, Gay O, Merle N, et al. The AAA+ ATPase ATAD3A Controls Mitochondrial Dynamics at the Interface of the Inner and Outer Membranes. *Mol Cell Biol.* 2010;30(8):1984–96.
25. Hoffmann M., Bellance N, Rossignol R, Koopman WJH, Willems PHGM, et al. *C. elegans* ATAD-3 Is Essential for Mitochondrial Activity and Development. 2009;4(10):1–8.
26. Goller T, Seibold UK, Kremmer E, Voos W, Kolanus W. Atad3 Function Is Essential for Early Post-Implantation Development in the Atad3 Function Is Essential for Early Post-Implantation Development in the Mouse. 2013;(January).
27. Issop L, Fan J, Lee S, Rone MB, Basu K, Mui J, et al. Mitochondria-Associated membrane formation in hormone-stimulated leydig cell steroidogenesis: Role of ATAD3. *Endocrinology.* 2015;156(1):334–45.
28. Peralta S, González-Quintana A, Ybarra M, Delmiro A, Pérez-Pérez R, Docampo J, et al. Novel ATAD3A recessive mutation associated to fatal cerebellar hypoplasia with multiorgan involvement and mitochondrial structural abnormalities. *Mol Genet Metab.* 2019;128(4):452–62.
29. Desai R, Frazier AE, Durigon R, Patel H, Jones AW, Rosa ID, et al. ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. *Brain.* 2017;140(6):1595–610.
30. Frazier AE, Compton AG, Kishita Y, Hock DH, Welch AE, Amarasekera SSC, et al. Fatal Perinatal Mitochondrial Cardiac Failure Caused by Recurrent De Novo Duplications in the ATAD3 Locus. *Med.* 2021;2(1):49-73.e10.
31. Zhao Y, Sun X, Hu D, Prosdocimo DA, Hoppel C, Jain MK, et al. ATAD3A oligomerization causes neurodegeneration by coupling mitochondrial fragmentation and bioenergetics defects. *Nat Commun.* 2019;10(1).

32. Fang HY, Chang CL, Hsu SH, Huang CY, Chiang SF, Chiou SH, et al. ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *J Cell Sci.* 2010;123(7):1171–80.
33. Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, et al. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 2012;26(11):1868–82.
34. Gerhold JM, Cansiz-Arda S, Lohmus M, Engberg O, Reyes A, Van Rennes H, et al. Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure. *Sci Rep.* 2015;5:1–15.
35. He J, Mao CC, Reyes A, Sembongi H, Di Re M, Granycome C, et al. The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol.* 2007;176(2):141–6.
36. He J, Cooper HM, Reyes A, Di Re M, Sembongi H, Gao J, et al. Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(13):6109–21.
37. Cooper HM, Yang Y, Ylikallio E, Khairullin R, Woldegebriel R, Lin KL, et al. ATPase-deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3a disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraparesis. *Hum Mol Genet.* 2017;26(8):1432–43.
38. Peeters-Scholte CMPCD, Adama Van Scheltema PN, Klumper FJCM, Everwijn SMP, Koopmans M, Hoffer MJV, et al. Genotype-phenotype correlation in ATAD3A deletions: Not just of scientific relevance. *Brain.* 2017;140(11):e66.
39. Gunning AC, Strucinska K, Muñoz Oreja M, Parrish A, Caswell R, Stals KL, et al. Recurrent De Novo NAHR Reciprocal Duplications in the ATAD3 Gene Cluster Cause a Neurogenetic Trait with Perturbed Cholesterol and Mitochondrial Metabolism. *Am J Hum Genet.* 2020;106(2):272–9.
40. Azova S, Rajabi F, Modi BP, Mansfield L, Jonas MM, Drobysheva A, et al. Graves' disease in a five-month-old boy with an unusual treatment course. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2021;34(3):401–6.