



Universidad
Zaragoza

PATOLOGÍA MITOCONDRIAL DEBIDA A MUTACIONES DEL GEN FARS2

PATOGENICIDAD DE UNA NUEVA MUTACIÓN

MITOCHONDRIAL PATHOLOGY DUE TO FARS2 GENE MUTATIONS
PATHOGENICITY OF A NEW MUTATION

AUTORA: ALARCIA FERNÁNDEZ, Bárbara

DIRECTORA: BAYONA BAFALUY, Pilar

DEPARTAMENTO: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	Pág. 3
1. INTRODUCCIÓN	Pág. 5
1.1 MITOCONDRIA	Pág. 5
1.2 PATOLOGÍA MITOCONDRIAL	Pág. 6
1.3 AMINOACIL-ARNt SINTETASAS Y PATOLOGÍA MITOCONDRIAL	Pág. 9
1.4 GEN FARS2 Y FENILALANIL-ARNt SINTETASA	Pág. 10
1.5 ENFERMEDAD DE ALPERS	Pág. 11
1.6 PARAPLEJÍA ESPÁSTICA HEREDITARIA	Pág. 12
2. MATERIAL Y MÉTODOS	Pág. 13
3. RESULTADOS	Pág. 14
3.1 PACIENTES	Pág. 14
3.2 REVISIÓN DE PACIENTES PUBLICADOS	Pág. 15
3.2.1 CLÍNICA	Pág. 15
3.2.2 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS	Pág. 16
3.2.3 ESTUDIOS GENÉTICOS ENZIMÁTICOS Y MOLECULARES	Pág. 20
3.3 PACIENTE DIAGNOSTICADO EN ESPAÑA	Pág. 25
3.3.1 EVOLUCIÓN CLÍNICA Y EXPLORACIÓN FÍSICA	Pág. 25
3.3.2 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS	Pág. 26
3.3.3 DIAGNÓSTICO	Pág. 29
3.3.4 TRATAMIENTO ACTUAL	Pág. 29
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	Pág. 30
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 35

Resumen.

La secuenciación del exoma ha resultado ser una herramienta muy importante para el diagnóstico de enfermedades de base genética en la infancia. El objetivo de este trabajo es analizar los pacientes descritos en la literatura con mutaciones patológicas en FARS2 (que codifica la Fenilalanil-ARNt sintetasa mitocondrial) y compararlos con un nuevo paciente diagnosticado recientemente en España con una mutación en este gen. Este paciente presenta una mutación puntual c.1256G>A (p.Arg419His) y una delección del exón 3 en FARS2. Cinco de los siete pacientes conocidos diagnosticados de esta mutación tienen unas características clínicas compatibles con el Síndrome de Alpers, otro de ellos tiene una Paraplejía espástica hereditaria, mientras que la clínica de nuestro paciente es compatible con el Síndrome de Leigh. Las diferencias clínicas entre pacientes con una mutación en el mismo gen pueden deberse entre otras causas a la diferente localización de la mutación dentro de ese gen, afectando en cada caso a aminoácidos diferentes. Esto va a influir también en la edad de supervivencia de cada paciente. En tres de los trabajos que se han revisado se demostraba mediante estudios funcionales la relación entre la mutación que describen en FARS2 y la alteración de la función de la Fenilalanil-ARNt sintetasa lo que lleva a una disminución en general de la capacidad de carga del ARNt. Este estudio informa de una nueva mutación patológica en FARS2 a la vez que establece una nueva causa genética nuclear del Síndrome de Leigh.

Abstract.

Exome sequencing has proved to be a very important tool to uncover genetic basis of childhood diseases. The aim of this work is to report the patients described in literature with pathological mutations in FARS2 (encoding mitochondrial Phenylalanyl-tRNAsynthetase) and to compare it with a new patient recently diagnosed in Spain with a mutation in this gene. This patient has a point mutation c.1256G>A (p.Arg419His) and a deletion of exon 3 in FARS2. Five of the seven known patients diagnosed with this mutation have a compatible clinical features with Alpers syndrome, one of them has a Hereditary spastic paraplegia, while our patient has a clinic compatible with Leigh syndrome. The clinical differences between patients with a mutation in the same gene may be due, among other reasons, to the different location of the mutation into the gene, affecting in each case to different aminoacids. This will also influence the survival age of each patient. In three of the papers that it has been reviewed was demonstrated by functional studies the relationship between the mutation described in FARS2 and impaired Phenylalanyl-tRNAsynthetasefunction leading to a decrease in the tRNA

overall capacity. This study reports a new pathological mutation in FARS2 while establishing a new nuclear genetic cause of Leigh syndrome.

Palabras clave: Fenilalanil-ARNt sintetasa, FARS2, cadena respiratoria mitocondrial, enfermedad mitocondrial, mutación mitocondrial, Síndrome de Alpers, Paraplejía espástica hereditaria, Síndrome de Leigh, secuenciación del exoma.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 MITOCONDRIA.

Las mitocondrias son organelos intracitoplasmáticos del tamaño de las bacterias que se encuentran en todas las células eucariotas aerobias. Pueden cambiar de aspecto, fusionarse, dividirse, etc. según el estado funcional de la célula. Poseen su propio ADN, distinto del ADN nuclear (ADNn). La estructura del ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular de 16.569 pares de bases que se replica de forma independiente del ADN nuclear.

Las mitocondrias son las “centrales energéticas”. Su principal función es la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) [Fig. 1].¹ El sistema OXPHOS está localizado en la membrana interna de las mitocondrias y está formado por cinco complejos multienzimáticos.² Los complejos (C) I, III, IV y V están codificados por el ADNmt y el ADNn, y el complejo II por el ADNn.¹ Las subunidades nucleares de los complejos del sistema OXPHOS así como las proteínas necesarias para la síntesis de proteínas mitocondriales son codificadas en el genoma nuclear y sintetizadas en el citosol antes de ser transportadas al interior del organelo. El ADNmt contiene los genes que codifican 13 polipéptidos de los complejos de la cadena respiratoria (CI 7 polipéptidos, CIII 1 polipéptido, CIV 3 polipéptidos y CV 2 polipéptidos), el ARNr de las dos subunidades ribosomales mitocondriales y los 22 ARNt mitocondriales. Todas las proteínas codificadas por el ADNmt se localizan en la membrana mitocondrial interna formando parte del sistema OXPHOS. El resto de componentes mitocondriales que incluyen la mayoría de los péptidos del sistema OXPHOS y otras proteínas implicadas en la transcripción, traducción, replicación y mantenimiento del ADNmt está codificado en el ADNn. Por lo tanto, es necesaria una expresión coordinada entre los dos genomas para el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS.²

Las mitocondrias tienen su propio mecanismo para la síntesis de proteínas que difiere tanto del citosólico como del mecanismo de traducción de proteínas en procariotas. Sin embargo, en todos ellos la traducción sigue los mismos pasos: iniciación, elongación y terminación, en las que participan diferentes factores, como los ARNt y ARNr ambos codificados en el ADNmt, las proteínas ribosomales, proteínas de ensamblaje ribosomal, aminoacil-ARNt sintetasas, enzimas modificadoras de ARNt y factores de iniciación, elongación y terminación codificados en el ADNn.² Es muy importante que se tenga en cuenta la participación de ambos genomas ya que ello implicará por ejemplo, una gran variabilidad en los fenotipos clínicos de las enfermedades mitocondriales y diferencias en el modelo de herencia debido a que el

ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna mientras que el ADNn sigue un patrón de herencia mendeliana.¹

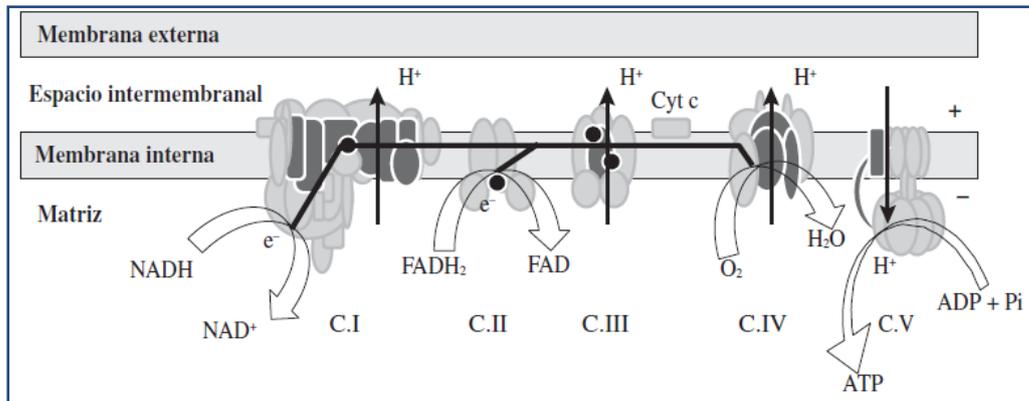


Fig. 1. Esquema del sistema de fosforilación oxidativa. En gris oscuro se representan las subunidades codificadas por el ADNmt y en gris claro las codificadas por el ADNn. Puntos negros: coenzima Q. C.I a C.V: Complejos I al V.¹

1.2 PATOLOGÍA MITOCONDRIAL.

En la práctica clínica se define como patología mitocondrial a un conjunto de entidades muy heterogéneas producidas por disfunción de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) de origen nuclear o mitocondrial.

Las patologías mitocondriales tienen en común que están producidas por una deficiencia en la biosíntesis de ATP. De esta manera, como el sistema OXPHOS está controlado tanto por el sistema genético mitocondrial como por el nuclear estas enfermedades podrán estar causadas por ambos ADNn y podrán mostrar una herencia materna o mendeliana. La complejidad de este sistema hace que los mecanismos fisiopatogénicos sean prácticamente desconocidos, lo que hace muy difícil hallar un tratamiento adecuado. Aunque estas enfermedades son individualmente raras, en su conjunto agrupan muchos trastornos genéticos llegando a ser las más comunes de los errores congénitos del metabolismo con clínica y fenotipos muy variados.

Clasificamos la etiología de las enfermedades mitocondriales dependiendo de si son por mutaciones del ADNmt o del ADNn [Tabla 2]:

MUTACIONES DEL ADNmt	
-	En genes que codifican proteínas de las subunidades OXPHOS
-	En genes que regulan la síntesis de las proteínas OXPHOS (ARNt y ARNr)
-	Deleciones/duplicaciones del ADNmt

MUTACIONES DEL ADNn
<ul style="list-style-type: none"> - En genes que codifican proteínas del complejo OXPHOS - En genes que afectan al ensamblaje de proteínas del complejo OXPHOS - En genes que afectan al mantenimiento o estabilidad del ADNmt (déficits combinados de la cadena respiratoria) - En genes que afectan a la síntesis de proteínas mitocondriales (déficits combinados de la CR o de COXPD) (Ejemplo FARS2) - En genes de componentes no proteicos - En genes que afectan a la fusión, fisión o motilidad mitocondrial - En genes que afectan al transporte o importación mitocondrial - Mutaciones que afectan a la homeostasis del Fe o del ensamblaje de proteínas hierro-azufre (Fe-S) - En proteínas con función de chaperona - Otros defectos genéticos de la función mitocondrial

Tabla 1: Etiología de las enfermedades mitocondriales por mutaciones del ADNmt y por mutaciones del ADNn.³

El diagnóstico de estas enfermedades es complejo [Fig. 2]. Las manifestaciones clínicas son muy variadas y pueden afectar a muchos órganos y tejidos y a cualquier edad. Muchas veces, sobretudo en la infancia, los síntomas son muy poco informativos y sólo la presencia de alguna anomalía neurológica proporciona una orientación sobre el origen mitocondrial. La presencia de algún síntoma característico de estas enfermedades obliga a hacer un estudio bioquímico, estructural, enzimático y molecular. Hoy en día es imprescindible hacer un estudio genético de los pacientes y de sus familiares.⁴

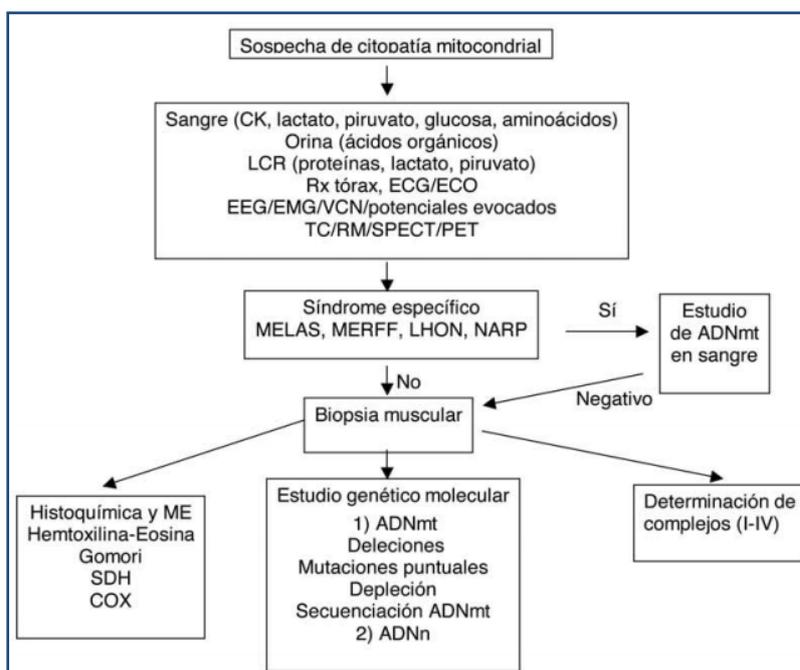


Fig. 2. Algoritmo diagnóstico de enfermedades mitocondriales.⁵

- *Manifestaciones clínicas:* lo más común es que se traten de trastornos multisistémicos y que afecten a casi cualquier órgano o tejido, pero sobre todo al sistema nervioso y muscular, ya que dependen en gran medida de la energía mitocondrial. Cuando tenemos una asociación de síntomas inexplicable con un curso rápido y progresivo de la enfermedad se debe sospechar una enfermedad mitocondrial. Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran: encefalopatía, alteraciones motoras, accidentes cerebro-vasculares, convulsiones, retraso mental...¹

- *Examen bioquímico en sangre periférica:* se deben estudiar los niveles de lactato (que suele estar elevado), piruvato, coencima Q, folato, cuerpos cetónicos, glucosa, aminoácidos, carnitina, creatinina, urea, ácidos grasos no esterificados y niveles de hormonas cuando esté clínicamente indicado.¹

- *Estudios anatomopatológicos:* el tejido más afectado por la enfermedad es la muestra de elección, en concreto el músculo suele ser uno de los más afectados en la patología mitocondrial.¹

- *Estudios de actividad enzimática:* una de las pruebas más determinantes de un defecto a nivel del sistema OXPHOS es el cálculo de la actividad enzimática de los complejos respiratorios mitocondriales. Los pacientes con mutaciones del ADNmt pueden tener un rango de actividades enzimáticas normales, defectos aislados en un complejo, o defectos múltiples. Cuando son normales y no se puede excluir una enfermedad mitocondrial hay que recurrir a estudios moleculares.^{1,5}

- *Estudios de ensamblaje de complejos OXPHOS:* lo podemos estudiar mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida con lo que podremos cuantificar los niveles de los complejos OXPHOS perfectamente ensamblados.¹

- *Análisis del árbol genealógico:* es muy importante preguntar por algún síntoma en los familiares. Si la mutación es mitocondrial puede estar en algún familiar pero con un porcentaje muy bajo y que no haya expresado toda la sintomatología. Además, las deleciones y depleciones del ADNmt pueden ser debidas a proteínas codificadas en el ADNn e implicadas en el mantenimiento del sistema genético mitocondrial; y en estos casos junto con las deficiencias de proteínas del sistema OXPHOS codificadas por el ADNn los patrones de herencia de la enfermedad son mendelianos.¹

- *Estudios genético-moleculares:* el análisis genético-molecular del ADNn y del ADNmt es necesario para confirmar y clasificar adecuadamente los síndromes debido a la gran heterogeneidad de las manifestaciones clínicas, morfológicas y bioquímicas.¹

El único tratamiento actual para estas enfermedades se basa en el tratamiento sintomático—con fármacos que modifican la función de la cadena respiratoria como la Coenzima Q o la Vitamina C— o fármacos que reducen el acúmulo de metabolitos tóxicos como la Carnitina y antioxidantes como la Vitamina E o C aunque sin evidencia clínica de mejoría. Por último la terapia génica que en este momento está en fase experimental todavía no puede ser ofrecida a los pacientes.⁴

El diagnóstico prenatal de los defectos OXPHOS resulta muy difícil por las características biológicas de las mitocondrias. Habitualmente se practica a través de la determinación de la actividad enzimática en los tejidos fetales. El estudio del ADNmt resulta prácticamente imposible debido a que la heteroplasmia mitocondrial, su segregación mitótica y el efecto umbral hacen que no pueda predecirse el fenotipo futuro de un embrión en el que se detectan estas mutaciones. Por el contrario, la identificación de una mutación nuclear sí que permite establecer un diagnóstico prenatal.⁴

1.3. AMINOACIL-ARNt SINTETASAS Y PATOLOGÍA MITOCONDRIAL.

Las aminoacil-ARNt sintetetasas (aaRSs) son enzimas que juegan un papel clave en la traducción del código genético. Cada ARNt, y el aminoácido que lleva (ej. Fenilalanina) serán reconocidos por una aminoacil-ARNt sintetasa individual (ej. Fenilalanil-ARNt sintetasa). La activación de los aminoácidos se lleva a cabo en dos pasos. Primero la aminoacil-ARNt sintetasa une el aminoácido al ATP. En el segundo paso la enzima cataliza la transferencia del aminoácido a su ARNt específico generando un aminoacil-ARNt activado (ej. Fenilalanil-ARNt^{Phe}) [Fig. 3]. Este se unirá a su codón del ARNm correspondiente y se irá formando una cadena polipeptídica que finalmente se liberará e irá a la cadena respiratoria para producir energía.

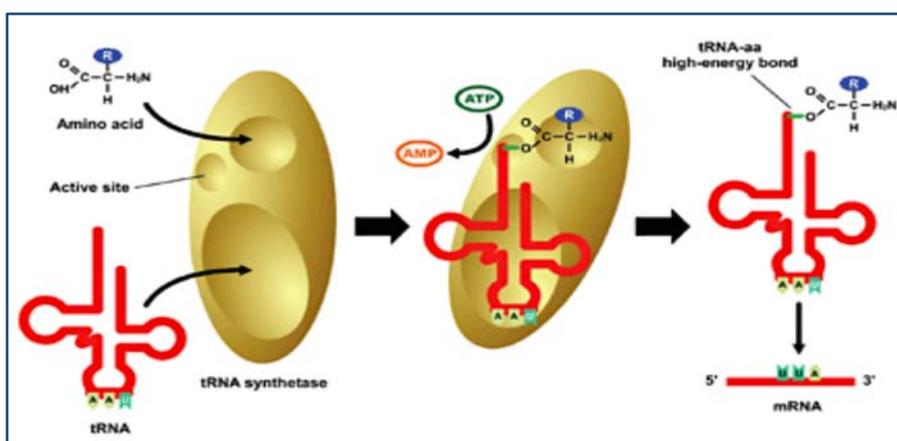


Fig. 3: Actividad catalítica de la aminoacil-ARNt sintetasa. $\text{ATP} + \text{L-phenylalanine} + \text{tRNA(Phe)} = \text{AMP} + \text{diphosphate} + \text{L-phenylalanyl-tRNA(Phe)}$.

El proteoma humano incluye dos conjuntos de aaRSs que están codificados por genes nucleares y están involucrados ya sea en la síntesis de proteínas citosólicas o mitocondriales, con la excepción de GARS y KARS que funcionan en ambos dominios.² Basándonos en el modo de reconocimiento del ARNt y la organización del dominio, las aaRSs se dividen en dos clases: Clase I (principalmente activas como monómeros) y Clase II (principalmente activas como dímeros o tetrámeros).⁶ En los últimos años se han asociado mutaciones hereditarias recesivas en un número cada vez mayor de genes codificadores de las aminoacil-ARNt sintetasas mitocondriales de ambas clases, con un amplio espectro de presentaciones clínicas mitocondriales de inicio temprano. Estos incluyen las mutaciones en el gen DARS2 causando leucoencefalopatía con elevación del lactato; RARS2 que causa hipoplasia pontocerebelar; YARS2 que causa miopatía, acidosis láctica y síndrome de anemia sideroblástica; SARS2 que causa hiperuricemia, hipertensión pulmonar, insuficiencia renal en la infancia y alcalosis; HARS2 asociado a disgenesia ovárica y pérdida neurosensorial de la audición; AARS2 causando miocardiopatía infantil; EARS2 que produce leucoencefalopatía; MARS2 ataxia espástica autosómica recesiva frecuentemente asociada con leucoencefalopatía; LARS2 asociada con la insuficiencia ovárica prematura y la pérdida de audición en el síndrome de Perrault; y KARS, que se asocia con discapacidad auditiva. Recientemente, se ha informado de mutaciones en el gen FARS2 (fenilalanil-ARNt sintetasa mitocondrial) con manifestaciones clínicas características que expondremos en este trabajo.⁷

1.4. GEN FARS2 Y FENILALANIL-ARNt SINTETASA.

El gen FARS2 (OMIM 611592) situado en 6p25.1 codifica la enzima mitocondrial humana Fenilalanil-ARNt sintetasa (mt-Phe-ARNt). Incluye siete exones, seis de los cuales son codificantes [Fig. 4].

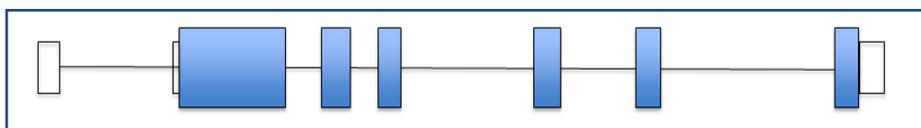


Fig4. Estructura genómica de FARS2 con 6 intrones (línea continua) y 7 exones (rectángulos). En azul exones codificantes y en blanco exones no codificantes. Los rectángulos de los extremos corresponden a 5' y 3' (UTR).

La enzima mitocondrial humana mt-Phe-ARNt estructuralmente la clasificaríamos en la Clase II de las aminoacil-ARNt sintetasas, pero funcionalmente se asemeja a la Clase I lo que significa que funciona como un monómero en oposición a la clase II aaRSs que suelen actuar como tetrámeros. La proteína consta

de cuatro dominios principales [Fig. 5]: la región N-terminal (residuos 0-83) donde se encuentra la secuencia de envío a la mitocondria (residuos 0-37), el dominio de aminoacilación (residuos 84-325) donde se produce la unión del ATP y es el que lleva a cabo la reacción enzimática, la región “linker” (residuos 326-358) que es la zona de unión entre el dominio de aminoacilación y el dominio C-terminal y por último el dominio C-terminal (residuos 359-451) que es la zona de unión al anticodón, capaz de reconocer el anticodón específico Fenilalanina.⁸



Fig. 5: Proteína FARS2 con sus dominios funcionales.

La función de la Fenilalanil-ARNt sintetasa mitocondrial es reconocer específicamente y unirse al tRNA^{Phe} en la mitocondria y catalizar así la transferencia a éste del aminoácido fenilalanina, siendo por lo tanto esencial para la traducción mitocondrial.

Las mutaciones de herencia autosómica recesiva del gen FARS2 identificadas hasta ahora y que afectan a la síntesis o función de la Fenilalanil-ARNt sintetasa son responsables de producir una clínica compatible con la enfermedad de Alpers, excepto en el estudio de Yang et al. que la mutación produce una Paraplejía espástica hereditaria.⁹

1.5. ENFERMEDAD DE ALPERS.

La enfermedad de Alpers (OMIM 203700) es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por la triada clínica de retraso psicomotor, epilepsia refractaria al tratamiento e insuficiencia hepática en los lactantes y niños pequeños. El trastorno es progresivo y a menudo conduce a la muerte por insuficiencia hepática o “status” epiléptico antes de los 3 años. Algunas personas afectadas pueden mostrar leve aciduria intermitente y defectos en la fosforilación oxidativa mitocondrial. El comienzo de esta enfermedad ocurre generalmente antes de los dos años de edad con convulsiones y retraso en el desarrollo de forma insidiosa.

Clínicamente se caracteriza por mioclonías, microcefalia, atrofia cerebral, hipotonía progresiva con espasticidad, ataxia, alteraciones de la visión y retraso en el desarrollo. En algunos niños las convulsiones inicialmente se controlan con dosis habituales de anticonvulsivos; en otros son refractarias desde el inicio. Con el tiempo

las convulsiones se vuelven cada vez más resistentes a la terapia anticonvulsiva. La pérdida de la función cognitiva se produce durante todo el curso de la enfermedad pero la edad de inicio y la velocidad de progresión son variables. Puede haber una regresión repentina o una aceleración coincidiendo por ejemplo, con una enfermedad infecciosa. Debido a la pérdida del tejido cerebral, a las convulsiones refractarias y a las altas dosis de medicamentos utilizados para tratar los ataques epilépticos puede aparecer una demencia y conducir a un deterioro cognitivo significativo. La pérdida visual cortical puede producir ceguera que aparecerá meses o años después de la aparición de otras manifestaciones neurológicas. La retinopatía también puede desempeñar un papel aunque menos importante en la pérdida de la visión. La pérdida de audición es variable. La afectación hepática en fase terminal está acompañada de hipoalbuminemia y tiempo de coagulación prolongado, seguida poco después, a causa del ayuno, de hipoglucemia e hiperamonemia. El inicio rápido de insuficiencia hepática se suele producir al utilizar ácido valproico para tratar las convulsiones, aunque la introducción de otros anticonvulsivantes como la fenitoína también pueden desempeñar un papel en la aparición del fallo hepático.

Los hallazgos del electroencefalograma (EEG) incluyen actividad lenta de gran amplitud con polipuntas o polipuntas-onda intermitentes. La resonancia magnética (RMN) o la tomografía computarizada (TC) del cerebro pueden ser normales al inicio del curso de la enfermedad. A medida que la enfermedad evoluciona la neuroimagen muestra gliosis (inicialmente más pronunciada en las regiones del lóbulo occipital) y atrofia cerebral generalizada.

La histología hepática puede mostrar, entre otras, esteatosis macro y microvesicular, necrosis centrolobulillar, pérdida de hepatocitos con o sin fibrosis, proliferación de las vías biliares y proliferación mitocondrial con un citoplasma eosinófilo. La cirrosis se produce en la enfermedad avanzada.

La primera mutación a la que se asoció fue a una mutación en el gen nuclear que codifica la subunidad gamma de la ADN Polimerasa mitocondrial, POLG. Recientemente se ha descubierto que puede estar causada por variaciones en otros genes como son la mutación en el gen NARS2 y la mutación en el gen FARS2 en pacientes con deficiencia de la fosforilación oxidativa.^{7,10}

1.6 PARAPLEGÍA ESPÁSTICA HEREDITARIA.

La paraplejía espástica hereditaria es un grupo de enfermedades degenerativas genéticas de la médula espinal, caracterizado por debilidad progresiva (paraplejía) y rigidez (espasticidad) con un excesivo tono muscular o hipertonía, o con sobreactividad muscular con aumento de la resistencia al estiramiento de los músculos

de las piernas. Se han encontrado varias mutaciones en distintos genes relacionadas con esta enfermedad, entre ellas mutaciones en FARS2.

Se clasifica según si la espasticidad progresiva ocurre como un hallazgo aislado (paraplejía “pura” o no complicada) o asociada a otras alteraciones neurológicas (paraplejía complicada). El inicio suele ser gradual, lento e insidioso, con síntomas que típicamente empeoran progresivamente a lo largo del tiempo. La edad de inicio de los síntomas puede ser extremadamente variable entre las diferentes familias así como entre los miembros afectados de la misma familia.

Actualmente no existe ningún tratamiento capaz de enlentecer o modificar la evolución de la enfermedad.⁹

El objetivo de este trabajo es determinar si las mutaciones de nuestro paciente son las causantes de su patología. Para ello lo compararemos con los pacientes descritos en la literatura que muestran mutaciones en el mismo gen, resumiendo los conocimientos más actuales sobre enfermedades debidas a la mutación del gen FARS2 y su diagnóstico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Este trabajo está realizado mediante la revisión de artículos de PubMed, Libros de Bioquímica, Pediatría y Guías de práctica clínica de Pediatría.

Utilizando la base de datos PubMed e introduciendo las palabras clave “FARS2”, “mutation” y “human disease” para comparar los casos descritos hasta ahora con mutación en el gen FARS2 con un nuevo caso recientemente diagnosticado en España aparecen cinco resultados, el más antiguo de 2012 y el más reciente de 2015. Tras revisarlos hemos incluido los cinco, aunque en este trabajo sólo hemos comparado cuatro de ellos, que eran los que describían pacientes. De estos cuatro artículos se han sacado seis pacientes que se nombrarán como **P1** y **P2** del artículo de Elo et al. **P3** del artículo de Almalki et al. **P4** y **P5** del artículo de Vernon et al. y **P6** del artículo de Yang et al. ordenados según la fecha de publicación. El quinto artículo (Shamseldin et al.) se ha utilizado con fin informativo sobre este gen. Además se han revisado los antecedentes familiares, características clínicas, exploraciones complementarias más significativas, resultados de los estudios de ADNn y ADNmt, supervivencia y respuesta al tratamiento de un nuevo paciente diagnosticado recientemente en España (**P7**) con mutación en el mismo gen que el resto. Para encontrar información acerca de mutaciones mitocondriales, patología mitocondrial y otros temas relacionados con la mitocondria se han revisado seis artículos de la base

de datos PubMed (desde 2012 hasta 2016), una monografía de la AEPED (del año 2008), una publicación de los Anales del Sistema Sanitario de Navarra (del año 2008), un libro de bioquímica sobre patologías mitocondriales de la base de datos PubMed y un libro sobre el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias (del año 2014). Además, para localizar y describir las distintas mutaciones se ha investigado en páginas de bioquímica online como OMIM.

3. RESULTADOS.

3.1. PACIENTES.

En nuestro trabajo hemos comparado los casos descritos hasta ahora en la literatura con una mutación en el gen FARS2 [Tabla 2] y un nuevo caso en España con esta misma mutación cuyos estudios genético nuclear y genético mitocondrial, se han llevado a cabo en el Hospital San Juan de Dios de Barcelona y en el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) de Zaragoza, respectivamente.

Hemos localizado cuatro artículos que describen a seis pacientes con mutación en FARS2. Por orden de publicación son los siguientes:

El Paciente 1 (**P1**) es una niña de origen finlandés y padres no consanguíneos que presenta una mutación heterocigota en FARS2 en el exón 5 c.986T>C (p.I329T) y en el exón 6 c.1172A>T (p.D391V) [Fig. 6A].⁷

El Paciente 2 (**P2**) es un niña de origen saudí y padres consanguíneos con una mutación homocigota en el exón 2 c.431A>G (p.Y144C) [Fig. 6B].⁷

El Paciente 3 (**P3**) es un niño de origen británico y padres no consanguíneos con una mutación heterocigota que afecta al exón 5 c.973G>T (p.D325Y) y una mutación de 88kb que afecta desde 5193613-5281294 incluyendo al promotor y al exón 1[Fig. 6C].⁸

El Paciente 4 (**P4**) es una niña de origen europeo y padres no consanguíneos con una mutación heterocigota que afecta al exón 7 c.1255C>T (p.Arg419Cys) y al exón 6 desde 5610223 hasta -5726369. Esta paciente es hermana del Paciente 5 (**P5**) que presenta la misma mutación [Fig. 6D].¹¹

El Paciente 6 (**P6**) es un niño de origen chino y padres consanguíneos con una mutación homocigota que afecta al exón 2 c.424G>T (p.D142Y) [Fig. 6E].⁹

Finalmente, el Paciente 7 (**P7**) es un niño de origen español y padres no consanguíneos con una mutación heterocigota. Presenta una mutación puntual

c.1256G>A (p.Arg419His) y una deleción del exón 3. Este es el paciente sobre el que versa nuestro trabajo y con el que compararemos al resto [Fig. 6F].

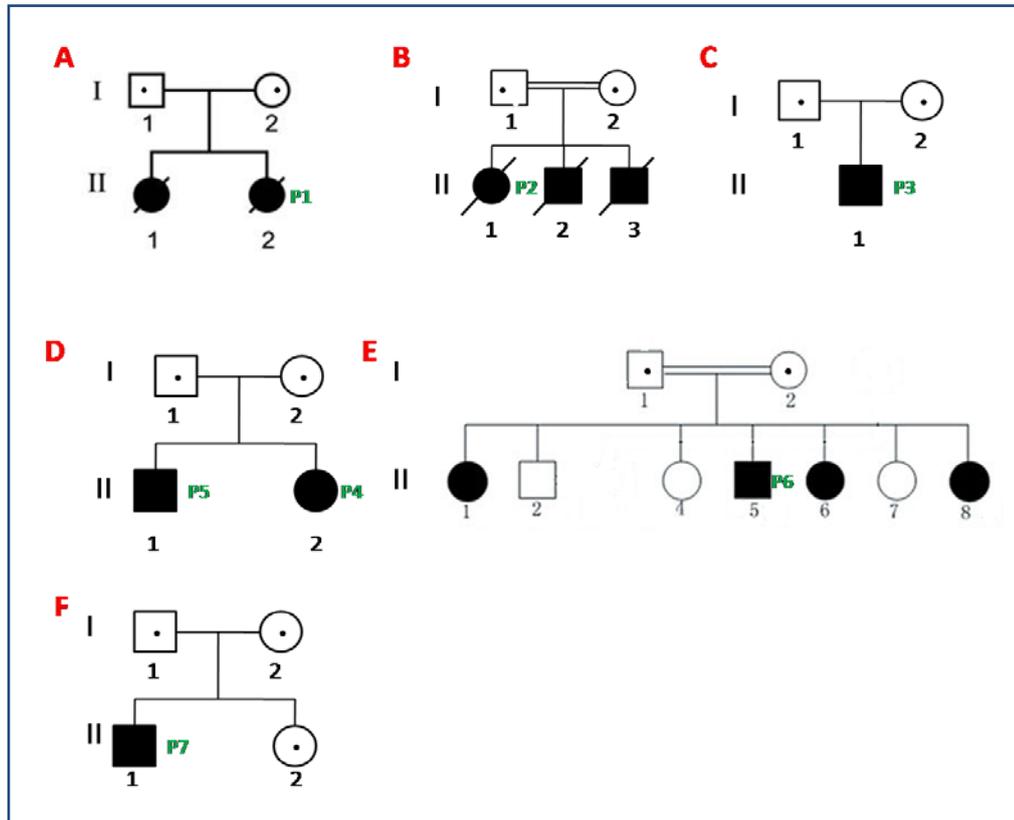


Fig.6. A: Árbol genealógico P1. B: Árbol genealógico P2. C: Árbol genealógico P3. D: Árbol genealógico P4 y P5. E: Árbol genealógico P6. F: Árbol genealógico P7.

3.2. REVISIÓN DE PACIENTES PUBLICADOS.

3.2.1 CLÍNICA.

Hasta ahora había descritos seis pacientes de diferente sexo y nacionalidad [Tabla 2]. P1 y P2 fallecieron a los 8 y 22 meses de edad⁷ mientras que P3, P4, P5 y P6, estaban vivos en el momento del estudio.^{8,9,11} P4 y P5 tienen por ahora mayor supervivencia que el resto (5 y 14 años en el momento del estudio). Esta mayor supervivencia se cree que es debido a la localización de su mutación, más cerca del extremo C-terminal, lo que podría permitir alguna actividad residual de la enzima.¹¹

Todos los pacientes estudiados tuvieron un embarazo y un parto normal a excepción de P5 que sufrió hipoxia en el momento del parto, lo que propició que al principio se creyera que ésta era la etiología de la clínica que presentaba.¹¹

Los únicos síntomas compartidos por casi la totalidad de los pacientes (a excepción de P6) son las convulsiones refractarias al tratamiento y el retraso en el

desarrollo. Éstos comenzaron con convulsiones a los pocos meses de vida. Además, P3 tuvo una regresión en el desarrollo asociada a estatus epiléptico.⁸

P3, P4 y P5 presentaban cara dismórfica aunque a excepción de los dos últimos que tienen la misma mutación de FARS2 la cara no se asemeja en unos y otros pacientes,^{8,11} por lo que no se puede asociar una fascies característica para esta enfermedad. Lo mismo ocurre con las alteraciones oftalmológicas. Como vemos en la Tabla 2 todos los pacientes tienen alguna oftalmopatología pero diferente entre ellos. Otros signos característicos de esta enfermedad pero que no están presentes en todos los pacientes son hipotonía, ataxia, disartria y patología hepática.

3.2.2. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.

a) RMN cerebral.

Los pacientes que fallecieron a los pocos meses de vida (P1 y P2) presentaban alteraciones en la resonancia magnética cerebral de atrofia cortical y cambios de señal en el putamen [Fig 7].⁷ P3 tenía lesiones en la sustancia blanca subcortical además de adelgazamiento de la porción anterior y media del cuerpo calloso [Fig. 8].⁸ En P5 se pueden observar dos focos hiperintensos periventriculares en la sustancia blanca del lóbulo frontal [Fig. 9].¹¹ P6 mostraba una degeneración axonal difusa y pérdida de células de Purkinje del cerebelo. Este paciente es clínicamente un poco diferente al resto, ya que no debutó con una clínica compatible con el Síndrome de Alpers, si no con una Paraplejía espástica hereditaria consistente en espasticidad progresiva e hiperreflexia de las extremidades inferiores.⁹

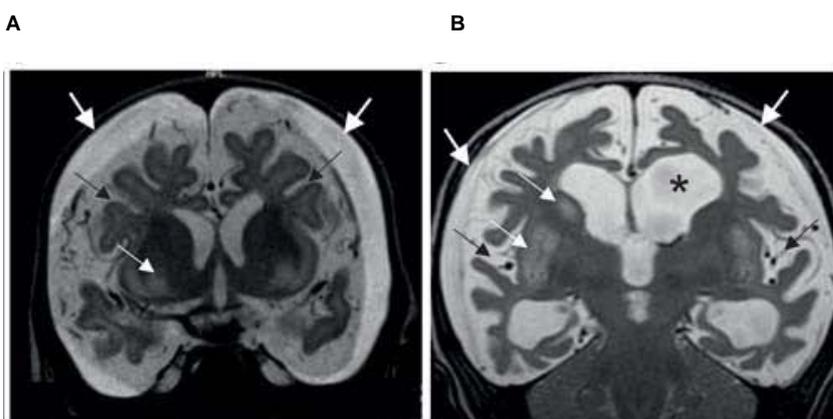
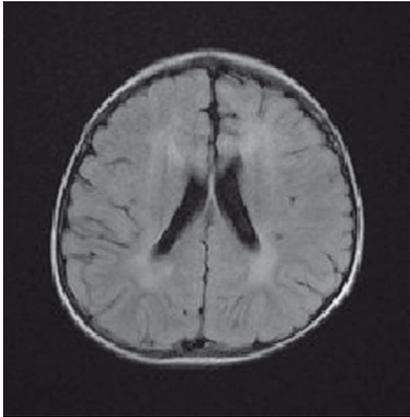


Fig. 7. A:RMN cerebral T2 de P1. Atrofia cerebral extensa, surcos ensanchados (flechas negras), acumulación de líquido (flechas blancas gruesas), cambio de señal patológica en putamen (flecha blanca delgada). **B:** RMN cerebral de P2. Atrofia cortical, surcos ensanchados (flechas negras) acumulación de líquido (flechas blancas gruesas), aumento de líquido cefalorraquídeo en ventrículos laterales (asterisco), cambios de señal patológicos en putamen (flechas blancas finas inferiores) y en el caudado (flechas blancas finas superiores).⁷

A



B

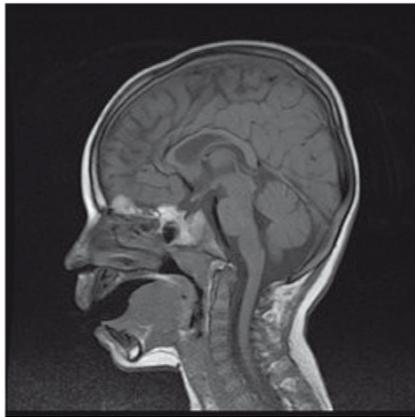


Fig. 8. A: Corte transversal RMN cerebral T1 FLAIR de P3. Cambios en la sustancia blanca. **B:** Corte sagital RMN cerebral T1 de P3. Adelgazamiento parte anterior y media del cuerpo calloso.⁸

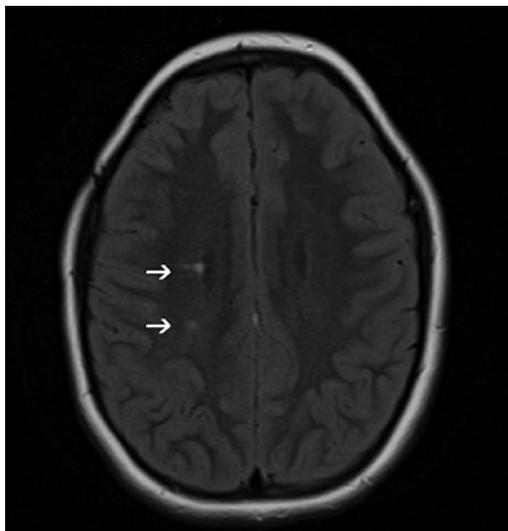


Fig. 9. RMN cerebral T2/FLAIR de P5. Las flechas indican dos focos de hiperintensidad en la sustancia blanca del lóbulo frontal posterior derecho. Se cree que son secuelas de la hipoxia que tuvo en el parto.¹¹

b) EEG.

No se evidenciaron alteraciones características que compartan todos los pacientes. P1 presentaba picos multifocales.⁷ En P3 se puede observar trazados de hipsarritmia.⁸ P4 mostraba un EEG de características normales. P5 tenía una alteración cerebral difusa.¹¹

c) Análisis en sangre periférica.

En cuanto al análisis en sangre periférica todos ellos, a excepción de P3 en el que carecemos de esta información, tenían una elevación del lactato y acidemia láctica. Los pacientes P4 y P5 además tenían acidosis metabólica y en el análisis de aminoácidos plasmáticos en sangre periférica se constató una alanina elevada.¹¹ P1 también tenía una elevación de alanina, además de leucina e isoleucina.⁷

Estos datos tanto clínicos como de pruebas complementarias hicieron pensar en una mutación mitocondrial, por lo que se procedió a realizar técnicas más específicas.

PACIENTE	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7
ESTUDIO	Elo et al. ⁷	Elo et al. ⁷	Almalki et al. ⁸	Vernon et al. ¹¹	Vernon et al. ¹¹	Yang et al. ⁹	
MUTACIÓN 1 FARS2	Exón 5, c.986T>C, p.I329T	Exón 2, c.431A>G, p.Y144C	Exón 5, c.973GT, p.D325Y	Exón 7 de FARS2, c.1255C>T p.R419C (del padre)	Exón 7 de FARS2, c.1255C>T p.R419C (del padre)	Exón 2, c.424G>T, p.D142Y	Mutación puntual c.1256G>A, p.R419H (del padre)
MUTACIÓN 2 FARS2	Exón 6, c.1172A>T, p.D391V	Exón 2, c.431A>G, p.Y144C	Comosoma 6p25.1 del 5193613-5281294, incluye promotor y exón 1	Cromosoma 6p25.1 del 5610223-5726369, Exón 6 (de la madre)	Cromosoma 6p25.1 del 5610223-5726369, Exón 6 (de la madre)	Exón 2, c.424G>T, p.D142Y	Delección del exón 3 (de la madre)
TIPO DE MUTACIÓN	Heterocigota	Homocigota	Heterocigota	Heterocigota	Heterocigota	Homocigota	Heterocigota
SEXO	Mujer	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Hombre	Hombre
ORIGEN	Finlandés	Saudí	Británico	Europeo	Europeo	Chino	Español
CONSANGUINIDAD	No	Sí	No	No	No	Sí	No
PESO AL NACIMIENTO	3740g	-	3132g	3257g	2725g	-	2730g
ESTADO	Fallecida (8meses)	Fallecida (22 meses)	Vivo (en el estudio)	Viva (5 años y medio en el estudio)	Vivo (14 años en el estudio)	Vivo (en el estudio)	Vivo (7 años)
FASCIES DISMÓRFICA	-	-	Orejas rotadas anteriormente, amplia raíz nasal	Retrognatia, incisivos prominentes	Retrognatia, incisivos prominentes. Ptosis.	-	Asimétrica, ptosis izquierda
OFTALMOPATOLOGÍA	Pigmentación de la retina	Ceguera cortical	Discapacidad visual cortical	Estrabismo	Estrabismo	-	Ambliopía (corregida), endotropía
HIPOTONÍA	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
CONVULSIONES	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	-	No
ATAXIA	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
DISARTRIA	-	-	-	Sí	Sí	-	Sí
RETRASO DEL DESARROLLO	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
REGRESIÓN DEL DESARROLLO	-	-	Sí	No	No	-	No
ALTERACIÓN HEPÁTICA	Sí	-	-	-	-	-	No

PACIENTE	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
RMN CEREBRAL	Severa atrofia cortical y central con aumento de la señal en el putamen	Atrofia cortical, acumulación líquido subdural, cambios de señal en caudado y putamen	Lesiones en sustancia blanca subcortica simétricas, adelgazamiento de porción anterior y media del cuerpo caloso	N	2 focos hiperintensos en T2/FLAIR periventriculares en la sustancia blanca del lóbulo frontal posterior (13 años)	Pérdida de células de Purkinje, degeneración axonal difusa	lesión troncoencefálica en la sustancia negra del mesencéfalo
EEG	Picos multifocales	-	Hipsarritmia	N	Alteración difusa	-	Alteraciones inespecíficas
LACTATO	↑	↑	-	↑	↑	-	↑
ACIDEMIA LÁCTICA	Sí	Sí	-	Sí	Sí	-	Sí
AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS	Isoleucina, leucina y alanina	N	-	Alanina	Alanina	-	Alanina
ÁCIDO ORGÁNICO EN ORINA	-	-	-	Sí	Sí	-	-
SECUENCIACIÓN ADNmt	No mutaciones	-	No mutaciones	-	No mutaciones	-	No mutaciones patológicas
BIOPSIA MUSCULAR	↓ Complejo IV y I, ↓ actividad de COX, gotitas de lípidos, no fibras rojo rasgadas	Fibras dispersas con ↑ NADH, mitocondria anormal, no fibras rojo rasgadas	↓ reactividad de COX, ↓ Complejo IV y mt-aaRSs	-	-	-	↑ Complejo I+III, ↑ Complejo IV, ↑C I+III/CS, ↑ CIV/CS
OTROS	Su hermana murió a los 21 meses con un cuadro similar	Dos hermanos varones muertos a los 3 meses con clínica similar		Hermana paciente 2	Hermano paciente 1	Fenotipo encontrado en varios miembros de la familia	Paciente que está siendo estudiado actualmente en España.

Tabla 2. Resumen clínico de pacientes. N: normal. ^{7, 8, 9, 11}

3.2.3. ESTUDIOS GENÉTICOS ENZIMÁTICOS Y MOLECULARES.

A los pacientes que hemos revisado se les encontraron mutaciones en distintas regiones del gen FARS2 [Fig. 10] [Fig. 11].

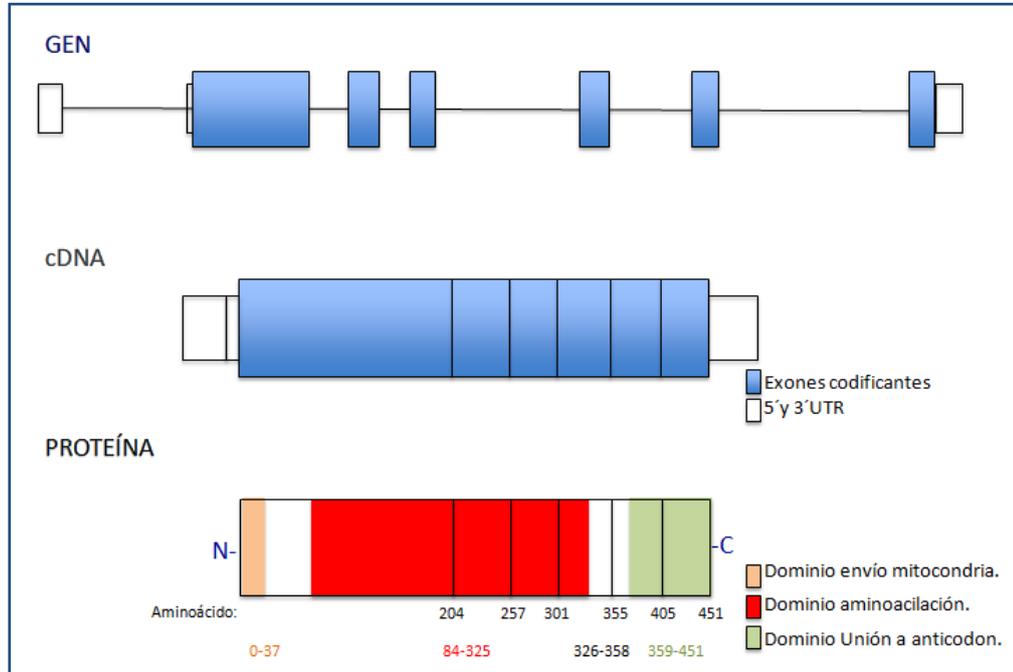


Fig. 10: GEN: Estructura genómica de FARS2 con 6 intrones (línea continua) y 7 exones (rectángulos). Exones codificantes en azul y exones no codificantes en blanco. DNA: FARS2 cDNA, (NM_006567.4). PROTEÍNA: Proteína FARS2. Se muestran los dominios funcionales.

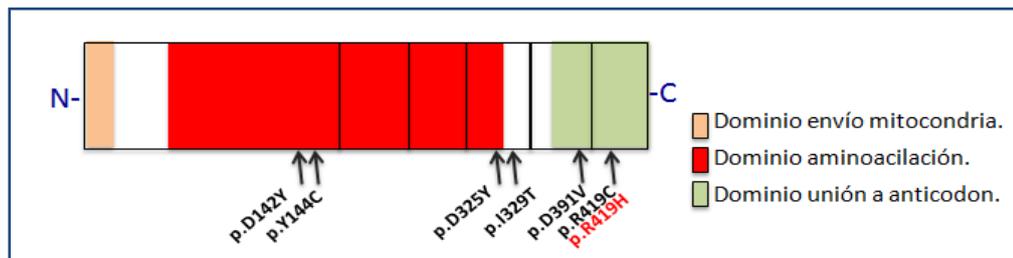


Fig. 11: Proteína FARS2 con los cambios de aminoácidos descritos en los casos clínicos. Se muestran los dominios funcionales. En letra de color rojo el cambio descrito en nuestro paciente.

En P1 tras la secuenciación del exoma se encontró una variante en el exón 5 de FARS2 c.986T>C (p.I329T) y en el exón 6 c.1172A>T (p.D391V) que afecta a la zona de unión del anticodón. En P2 que pertenece al mismo estudio que P1 se halló una mutación homocigota de FARS2 c.431A>G (p.Y144C) en el exón 2 perteneciente al dominio de aminoacilación. Mediante técnicas de electroforesis se demostró una disminución del Complejo IV en la biopsia de músculo esquelético y cerebro y una disminución del Complejo I en el cerebro. También se llevaron a cabo análisis

funcionales de la proteína recombinante mutante tanto *in vitro* expresando las proteínas recombinantes mutantes en *E.coli*, como *in vivo*. Estos estudios concluyeron que las dos mutaciones de P1 dañan la función de aminoacilación y además afectan a la estabilidad de la proteína disminuyendo la capacidad global de carga. Por el contrario p.Y144C (P2) se cree que interfiere con el mecanismo de rotación de la sintetasa afectando así a la unión del ARNt [Tabla 3].⁷

En P3 se hicieron análisis citogenéticos y genéticos moleculares para identificar las mutaciones responsables de la patogénesis. De esta forma se encontró la delección en el cromosoma 6p25.1 que incluía al promotor y al exón 1 y una mutación en FARS2 c.973G>T (p.D325Y) en el dominio de aminoacilación. A continuación, se desarrollaron líneas celulares del paciente y se valoró la actividad de los complejos de la cadena respiratoria en biopsia de músculo, fibroblastos y mioblastos del paciente y controles. De esta forma mediante técnicas de electroforesis se demostró una disminución del C.IV en músculo esquelético y en mioblastos [Fig 12].⁸

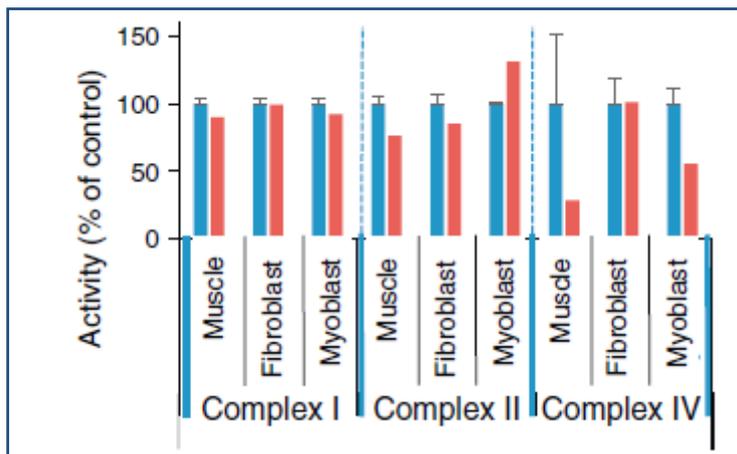


Fig 12. Actividad de la cadena respiratoria en biopsia de músculo esquelético de P3, fibroblastos y mioblastos. La actividad del Complejo I, Complejo II y Complejo IV se determinó: en el control (azul) y en el paciente (rojo). Hay una disminución del Complejo IV en el músculo y en los mioblastos del paciente con respecto al control.⁸

También se buscaron cambios en los niveles de proteínas en pacientes y controles mediante Western blot (WB). El resultado de este análisis mostró una disminución de COX 1, COX 2 y FARS2 en mioblastos[Fig 13].⁸

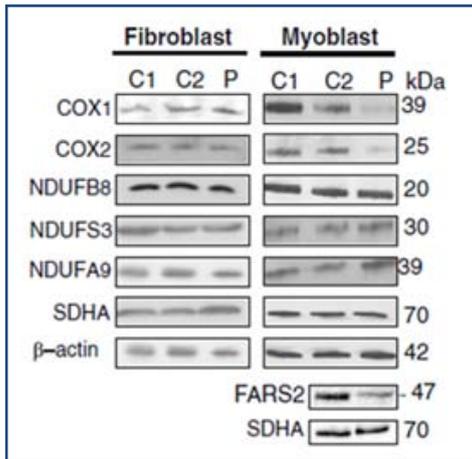


Fig 13. Niveles de proteínas de la cadena respiratoria en fibroblastos (a la izquierda) y en mioblastos (a la derecha) de P3 y control determinados por la técnica Western blot. Se puede observar una disminución de los niveles de COX1 COX2 y FARS2 en los mioblastos del paciente (P) comparados con los controles (C1 y C2).⁸

Además, usando la técnica de Northern blot se analizaron los niveles de mt-ARN^{t-Phe} que también aparecieron disminuidos en los mioblastos del paciente. Se estudió la síntesis de proteínas mitocondriales mediante marcaje metabólico para establecer si la mutación provocaba una síntesis defectuosa de la proteína resultando este análisis negativo. Mediante microscopía de fluorescencia se estudió la morfología de las mitocondrias, esto permitió identificar únicamente un defecto en la distribución de las estructuras nucleoides. Para poder realizar un estudio funcional de la enzima se expresó y purificó tanto la proteína mutante como la proteína wild-type. La proteína mutante no mostró actividad de aminoacilación ni tampoco capacidad para unir el ATP necesario para su actividad enzimática. Se transdujeron los mioblastos del paciente con una construcción lentiviral que permitía la expresión de la proteína wild-type. Los análisis demostraron que se recuperaban los niveles proteicos de COX1, COX2 y FARS2 y los niveles de ARN^{mt} [Fig 14] [Tabla 4].⁸

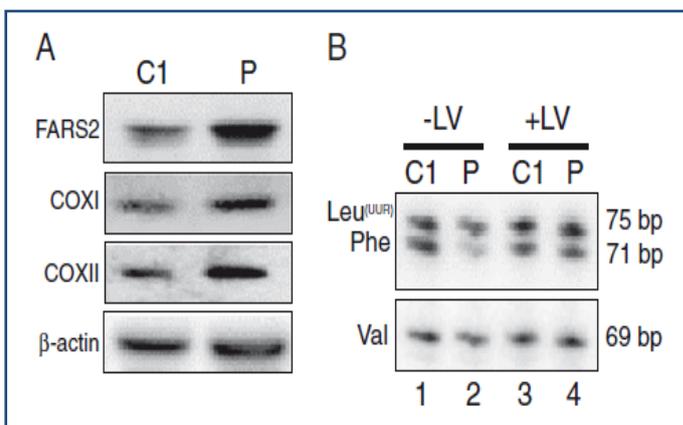


Fig 14. Transducción lentiviral de mioblastos en la proteína wild-type de FARS2. Ambos mioblastos, los del control (C1) y los del paciente (P) se transdujeron con lentivirus que expresaban la proteína wild-type de FARS2. **A:** Mediante Western blot se determinaron los niveles de FARS2 y las proteínas mitocondriales del complejo IV (COXI Y COXII). Los niveles de FARS2, COXI y COXII transducidos se han restaurado e incluso superan al control. **B:** Análisis del mt-RNA^{Phe} indican un aumento con respecto al control al transducirse con un lentivirus. mt-ARN^{Leu} y mt-ARN^{Val} no se modifican.⁸

Los niveles de FARS2, COXI y COXII transducidos se han restaurado e incluso superan al control. **B:** Análisis del mt-RNA^{Phe} indican un aumento con respecto al control al transducirse con un lentivirus. mt-ARN^{Leu} y mt-ARN^{Val} no se modifican.⁸

En P4 y P5 la secuenciación del exoma identificó una mutación heterocigota en el exón 7 de FARS2 c.1255C>T (p.R419C) en el dominio de unión al anticodón que cuadraba con los datos que teníamos hasta ahora de estos pacientes. No consta estudio enzimático. Tras estos hallazgos se hizo un reanálisis del estudio genético buscando polimorfismos de nucleótido sencillo SNP (Single Nucleotide Polimorfism) donde se encontró una delección intersticial en el cromosoma 6p25.1 que incluía al exón 6.¹¹

En P6, tras la secuenciación del exoma se diagnosticó como causante de la clínica que presentaba tanto el paciente como otros miembros de su familia, una mutación en FARS2 que producía la sustitución p.Asp142Tyr en el dominio de aminoacilación. Para determinar si la sustitución p.D142Y afectaba a la actividad de la mtPheRS, se expresaron y purificaron proteínas wild-type y mutantes de mtPheRS en *E. coli*, y se estudió su actividad enzimática que resultó dañada [Tabla 5].⁹

P1, P2			
		Cerebro	Músculo esquelético
NIVELES DE PROTEÍNAS	BN-PAGE	↓Complejo IV, ↓Complejo I	↓Complejo IV
ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS	Predicción en proteínas mutantes	Ile329 ↓ afinidad por ATP, Asp391 alteración de la unión al ARNt, Tyr144 alteración de la estructura cerrada.	
ACTIVIDAD mt-ARNt-Phe			
ACTIVIDAD DE AMINOACILACIÓN	↓ de la actividad en p.Y144C y cambios modestos en p.I329T y p.D391V		
ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA MEDIANTE REPLEGAMIENTO	Deteriorada en p.I329T y p.D391V		
UNIÓN ATP	↓ unión de ATP en p.I329T		

Tabla 3. Estudio genético de Elo et al.⁷

P3					
LÍNEAS CELULARES		MÚSCULO ESQUELÉTICO	FIBROBLASTOS	MIOBLASTOS	MIOBLASTOS TRANSDUCIDOS
ACTIVIDAD COMPLEJOS OXPHOS	Espectrofotometría	↓ Complejo IV	N	↓ Complejo IV	-
NIVELES PROTEÍNAS	COX1, COX 2, NDUFB8, NDUFS3, NDUFA9, FARS2 (Por WB)	-	N	↓COX1, ↓COX2, ↓FARS2	Niveles restaurados
NIVELES ARN	Mt-ARNt-Phe (por Northern blot)	-	-	↓	Niveles restaurados
SÍNTESIS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	Incorporación 35S-metionina/cisteína en la síntesis mitocondrial	-	-	N	-
ESTRUCTURA MITOCONDRIAL	Fluorescencia: TMRM (mitocondria), PicoGreen (nucleoides)	-	-	Morfología N, Número N, Distribución retículo N, nucleoides a largados y ↓	-
NIVEL ADNmt	qPCR	-	-	N	-
ACTIVIDAD mt-ARNtPhe					
AMINOACILACIÓN mt-ARNt	In vitro: expresión y purificación de la proteína mutante y en la proteína WT	La mutante tiene actividad dañada comparada con la WT			
ESTRUCTURA PROTEÍNA	Predicción de la estructura mutante	La mutación parece que modifica el sitio de unión a ATP			
UNIÓN ATP		La mutante no se une a ATP			

Tabla 4. Estudio genético de Almalki et al. N: normal; NA: no aplicable; WB: western blot; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. WT: wild type; TMRM: tetrametilrodamina metil ester.⁸

P6	
ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA	Asp 142 está implicado en la estabilización de la estructura cerrada; los cambios pueden afectar a la flexibilidad conformacional de la enzima.
ACTIVIDAD mt-ARNt-Phe	
SÍNTESIS DE ARNt	Dañada
UNIÓN DEL ATP	Dañado

Tabla 5. Estudio genético de Yang et al.⁹

3.3. PACIENTE DIAGNOSTICADO EN ESPAÑA (PACIENTE 7) [Tabla 2].

3.3.1 EVOLUCIÓN CLÍNICA Y EXPLORACIÓN FÍSICA.

El paciente identificado como P7 es el primer hijo de un embarazo controlado de padres no consanguíneos que tiene actualmente siete años de edad. Nació en un parto por cesárea a las 38 por presentación podálica. Pesó 2730g y su perímetro cefálico fue de 35cm. Tuvo que ser alimentado con lactancia artificial ya que tenía dificultad para la succión e hipotonía.

Como antecedentes personales aunque al principio tuvo dificultades con la alimentación su ganancia ponderal ha sido adecuada. A nivel oculomotor tenía ambliopía que se corrigió con un parche y endotropía. La fascies era asimétrica con ptosis palpebral izquierda. En el desarrollo psicomotor: reacciona a la voz y sonríe a los 2 meses, control cefálico a los 3-4 meses, ríe a carcajadas a los 3 meses, gira sobre sí mismo a los 5 meses y medio, a los 10 meses reconoce su nombre, sedestación autónoma a los 12 meses, dice papá-mamá a los 19 meses y gatea a los 21[Tabla 6].

	PACIENTE (meses)	DESARROLLO NORMAL (meses)
Reacciona a la voz	2	1-2
Sonríe	2	1-2
Control cefálico	3-4	3-6
Carcajadas	3	3-5
Gira sobre sí mismo	5.5	2-4.5
Reconoce su nombre	10	9-12
Sedestación	12	7-9
Papá, mamá	19	11-16
Gatea	21	10

Tabla 6. Comparación entre el desarrollo psicomotor de P7 y el desarrollo normal.

Como antecedentes familiares, la tía paterna tuvo epilepsia en su juventud y la abuela y el tío maternos son portadores de X frágil.

A los 2 años de edad presentaba un fenotipo metabólico energético con afectación mixta del sistema nervioso central y periférico y afectación muscular (hipotonía, ataxia y signos de afectación piramidal en las extremidades inferiores). El electromiograma fue normal. En los primeros años parecía que estaba estabilizado o que la progresión era muy lenta. Sin embargo entre los 3 y los 5 años sufrió una

progresión notoria de la hipotonía muscular y de la ataxia. Esto se vio agravado cuando a los 5 años tuvo una encefalopatía aguda con un ictus troncoencefálico coincidiendo con un proceso infeccioso.

En la exploración física a los 6 años pesaba 31,7 Kg (>P97). El control cefálico estaba estable girando cabeza y cuello a ambos lados. Apertura palpebral simétrica sin nistagmus. Leves dificultades para el seguimiento lateral de la mirada. No presentaba mímica facial espontánea excepto al llorar. Sonrisa espontánea. El movimiento involuntario era más eficaz que en exploraciones anteriores (cuadro parkinsoniano con hipomímica facial voluntaria sin paresia de pares craneales). Flexión de la cabeza hacia adelante en decúbito supino. Había iniciado el volteo hacia ambos lados. No presentaba temblor en extremidades superiores. Hacía flexión del brazo y los levantaba del plano en decúbito prono. Manos con tendencia a la flexión más que a la extensión. La prensión era eficaz pero le costaba liberar el objeto. Levanta las piernas contra la gravedad con respuesta más flexora que extensora. Clonus aquileo que ya estaba presente anteriormente pero que había disminuido a 5-6 batidas simétricas. Los ROTs (reflejos osteotendinosos) estaban presentes. Tenía hipotonía marcada y signos de espasticidad por afectación de las vías largas piramidales.

3.3.2 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.

a) RMN cerebral.

La primera RMN cerebral fue al año y medio de vida debido al retraso en el desarrollo y a la hipotonía. No se encontró ninguna alteración patológica.

A los 3 años se le vuelve a repetir la RMN cerebral. En este caso se informa de un discreto aumento de la intensidad de señal en T2 en la sustancia blanca profunda del cerebelo/núcleo dentado y prominencia de los atrios ventriculares.

Un año más tarde, en una nueva resonancia se observan los espacios de Virchow-Robin ectásicos en el cuerpo caloso. Esto puede ser una variante de la normalidad aunque también puede estar asociado con mucopolisacaridosis.

En la última que se le ha practicado, a la edad de 5 años, el paciente tiene una RMN cerebral compatible con lesión troncoencefálica en la sustancia negra del mesencéfalo.

b) EEG.

A los 4 años se le realizaron varios electroencefalogramas tanto en vigilia como en privación del sueño.

1º) En vigilia. Breves polipunta-onda frontal de predominio derecho y puntas bitemporales ocasionales.

2º) En vigilia. Ondas lentas hipervoltadas temporales superiores. Polipunta-onda frontotemporal izquierda única. Al hacerle estimulación luminosa intermitente: puntas lentas hipervoltadas frontotemporales superiores/vertex.

3º) Con privación del sueño. Ondas agudas frontotemporales bilaterales. Puntas lentas posteriores derechas, de presentación aislada. Ondas lentas temporales izquierdas.

En resumen: alteraciones inespecíficas.

c) Estudio genético que descarta la X frágil.

d) Analítica en sangre periférica.

En un análisis que se le hizo a los 4 años apareció acidemia láctica por elevación de lactato y alanina muy elevada (aunque no se hizo estudio en LCR).

e) Cariotipo molecular mediante CGH array.

Se practicó para detectar alteraciones en el número de copias de fragmentos del tamaño de decenas de kilobases (kb) a lo largo del genoma, con especial énfasis en las regiones subteloméricas, pericentroméricas y otras asociadas a trastornos genómicos.

- Conclusión:

a) No revela alteraciones en el número de copias de acuerdo con el conocimiento actual.

b) Monosomía segmentaria de aproximadamente 140kb en banda 18p11.32 que solapa en un 40% el número de bases conocidas descritas en la población normal. Así mismo, el hecho de que no altere la dosis ni la estructura de ningún gen conocido, hace poco probable su implicación en el fenotipo del paciente. Por lo tanto, esta alteración se podría clasificar como una variante de significado incierto probablemente benigna.

La resolución del array utilizado permitió descartar con una elevada probabilidad la ganancia o pérdida de material genético de pequeño tamaño en regiones de reordenamiento recurrente, regiones subteloméricas y pericentroméricas y de tamaño considerable en el resto de regiones del genoma estudiado por el array que se conoce asociado a patologías. No obstante, cabe destacar que este resultado no permite descartar la existencia de reordenamientos equilibrados, alteraciones de la metilación, disomías monoparentales, mutaciones puntuales ni alteraciones del número de copias de menor tamaño o regiones no estudiadas por el array, así como la presencia de alteraciones del número de copias que se encuentren en un grado de mosaicismo menor del 35-40%.

Se han clasificado las variantes encontradas en este informe como patogénicas de significado clínico incierto y/o benignas. Se tiene que tener en cuenta que el estudio de variantes del número de copias polimórficas y/o causantes de patología es un campo activo de la investigación en genética médica por lo que es posible que estas variaciones sí que signifiquen algo en un futuro. Un resultado normal de esta prueba no excluye la posibilidad de que el fenotipo clínico se pueda deber a causas genéticas no testadas por el array.

f) Perfil de ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML) y de ácidos ramificados.

AGCML: normalidad de todos los valores. Con este resultado se descartaron:

- a. Trastornos generalizados de la biogénesis del peroxisoma (Enfermedad de Zellweger, adrenoleucodistrofia neonatal, Refsum infantil)
- b. Deficiencias de la beta oxidación peroxisomal
- c. Adrenoleucodistrofia ligada a X

Excepciones: Algunas alteraciones de la beta oxidación peroxisomal (Acetil CoAoxidasa y enzima bifuncional), mosaicismos de los trastornos generalizados de la biogénesis del peroxisoma y trastornos de la división de los peroxisomas. En estos tres casos se requiere un estudio de fibroblastos cultivados para su diagnóstico.

Ácidos ramificados estudiados mediante espectrofotometría.

Resultado: Los niveles de ácidos ramificados, fitánico y pristánico, están dentro del rango de los valores de referencia. Se descartan:

- d. Enfermedad de Refsum del adulto.
- e. Condrodisplasia punctata rizomélica.

g) Biopsia de piel: fibroblastos.

Actividad de Piruvato-deshidrogenasa normal.

h) Biopsia de músculo esquelético.

El resultado de la biopsia muestra un leve aumento del Complejo I+III y un aumento más acusado del Complejo IV.

i) Análisis ADN mitocondrial.

A los 5 años de edad la principal impresión diagnóstica era que el fenotipo del paciente se debía a un defecto en la cadena respiratoria mitocondrial. Primeramente se realizó a raíz de una biopsia muscular un estudio genético del ADN mitocondrial. Los resultados concluyeron que no se había encontrado ninguna delección ni depleción del genoma mitocondrial. Todas las mutaciones encontradas eran polimorfismos descritos anteriormente y aparentemente ninguna era patológica.

j) Análisis ADN nuclear.

Medio año más tarde se realizó un estudio genético del ADN nuclear del paciente y de los familiares. Se descubrió la presencia en el paciente de una doble mutación en heterocigosidad del gen FARS2. La mutación c.1256G>A (p.Arg419His) de herencia paterna (padre y hermana también portadores) y una delección del exón 3 de herencia materna (madre portadora). Por lo tanto concluimos que la causa de la patología del paciente P7, es una mutación patógena del gen FARS2, con una herencia mendeliana autosómica recesiva.

A raíz de los resultados de las diferentes pruebas complementarias podemos resumir que P7 presenta una mitocondriopatía por una doble mutación heterocigota del gen nuclear FARS2 que ocasiona un trastorno en el proceso de transcripción y síntesis de determinadas proteínas mitocondriales afectando al correcto funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (OXPHOS).

3.3.3 DIAGNÓSTICO.

Diagnóstico principal:

» Mitocondriopatía por una doble mutación en heterocigosidad del gen nuclear FARS2.

Diagnósticos secundarios:

» Trastorno en el proceso de transcripción mitocondrial que afecta al sistema OXPHOS.

» Miopatía de origen mitocondrial.

» Síndrome de Leigh

» Lesiones troncoencefálicas con ictus a los 6 años en el contexto de una infección aguda y de los ganglios basales: subtalámico y sustancia negra.

3.3.4 TRATAMIENTO ACTUAL.

- Ubidecorenona 30 mg/kg/d (Coenzima Q10)
- Idebenona 20 mgr/kg/d (Análogo sintético de la Coenzima Q10)
- Bicarbonato 16 cc/6 horas
- Levodopa 1'5 cc/6 horas
- Vitamina E 200 mg/12 horas
- Riboflavina 100 mg/12 horas (Vitamina B2)
- Biotina 10 mgr/12 horas
- Tiamina 300 mg/8 horas (Vitamina B1)
- Levocarnitina 1g/8 horas
- Vitamina C 1gr/dia

- Vitamina D 0,2cc/día
- Keppra 300-400 mgr (Levetiracetam, antiepiléptico)
- Dieta limita en hidratos carbono hasta 3-4 gr / kg/ día
- Grasas 2,5 g/k/d
- Proteínas 2,5-3 gr / kg/d

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En este trabajo describimos un paciente con retraso del desarrollo, hipotonía y alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial. El estudio genético ha encontrado una mutación heterocigota compuesta en el gen FARS2 formada por una parte por una mutación puntual c.1256G>A (p.R419H) de herencia paterna y por otra de una delección del exón 3 de herencia materna. Mutaciones en FARS2 ya se habían asociado en otros casos a deficiencias en el sistema OXPHOS y retraso del desarrollo. En la mayoría de los casos los pacientes presentaban una disminución de la actividad del complejo IV y epilepsia refractaria al tratamiento desde los pocos meses de edad compatible con el síndrome de Alpers y en otro caso la mutación se relacionó con Paraplejía espástica hereditaria. Esta presentación difiere de nuestro paciente donde no han aparecido, hasta la fecha, convulsiones ni paraplejía y paradójicamente nuestro paciente no presentaba un descenso de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria (C IV) como cabría esperar en una mutación que afecta a una proteína que interviene en la formación del sistema OXPHOS. Esta diferencia en la actividad del complejo IV puede deberse a que quizá el músculo no esté afectado y por ello el resultado de la biopsia muscular no nos salga como cabría esperar. Otra característica de nuestro paciente es su edad de supervivencia. Junto con P4 y P5 (hermanos) son los pacientes que más años han vivido. Esto podría ser debido a que presentan la misma localización de la mutación (p.R419C para P4 y P5 y p.R419H para P7). Afectan al mismo aminoácido (Arginina, R) aunque cada uno hace un cambio a un aminoácido distinto (cambio a Cisteína (C) en P4 y P5; y cambio a Histidina (H) en P7). Se localiza en el dominio de unión al anticodon de la mt-PheRS cercano al extremo C-terminal lo que podría permitir alguna actividad residual de la enzima.

Un número cada vez mayor de genes nucleares codificadores de ARNt sintetetas mitocondriales están siendo identificados en asociación con fenotipos clínicos y síndromes muy diversos. Por ejemplo, mutaciones en DARS2 están asociadas con leucoencefalopatía y elevación del lactato (LBSL), mutaciones en YARS2 con miopatía, acidosis láctica y síndrome de anemia sideroblástica (MLASA) y las mutaciones en RARS2 con hipoplasia pontocerebelar (PCH6).

Los fenotipos clínicos causados por mutaciones en aminoacil-ARNt sintetetasas se asocian con gran diversidad en especificidad tisular y en la presentación clínica. La variabilidad en la presentación clínica sugiere la participación de estas enzimas en otras funciones secundarias, además de su papel principal en la síntesis de proteínas mitocondriales; sin embargo, estas otras aún no han sido identificadas. La especificidad tisular puede ser debida a la variación en el nivel de expresión de genes entre tejidos, la cual dará lugar a que la actividad de la enzima estará por encima o por debajo del umbral crítico en un tejido particular. Además, diferencias en los requerimientos de los complejos de la cadena respiratoria y del ATP producido por la fosforilación oxidativa también pueden conducir a la presencia o ausencia del fenotipo en un tejido particular.

Hasta el momento, entre los seis pacientes que había descritos se habían diagnosticado dos patologías relacionadas con la mutación en FARS2 (Síndrome de Alpers y Paraplejía espástica hereditaria). El paciente español, P7, que difiere de los otros tanto en la clínica como en el resultado de las pruebas complementarias, creemos que presenta un cuadro clínico compatible con el Síndrome de Leigh, síndrome por otra parte frecuente en las alteraciones mitocondriales. Los datos que apoyan esta relación son los siguientes: P7 se caracteriza por presentar lesiones en el troncoencéfalo (ictus troncoencefálico a los 6 años) y en los ganglios basales (en la RMN se veía afectada la sustancia negra). Los síntomas ya se evidenciaron en el nacimiento donde presentaba dificultades para la succión e hipotonía. Más adelante el paciente presentaba retraso en la adquisición de las etapas del desarrollo, hipotonía con pérdida de control cefálico y trastornos del movimiento. Además P7 tiene signos piramidales, extrapiramidales y neuropatía periférica que también es característico de este síndrome. A diferencia de los que tienen el síndrome de Alpers, nuestro paciente no tiene clínica convulsiva un dato que apoya más nuestro diagnóstico. La resonancia magnética muestra las lesiones en el troncoencéfalo y en los ganglios basales. En el análisis de sangre periférica el lactato está aumentado, y aunque el diagnóstico se haría con la elevación de lactato en LCR a nuestro paciente no se le había realizado, pero lo más probable es que también lo tenga aumentado. La piruvato-deshidrogenasa analizada en el cultivo de fibroblastos de piel fue normal con lo que en principio descartaríamos la alteración de genes implicados en el complejo piruvato-deshidrogenasa. Sin embargo, en el análisis de la cadena respiratoria mitocondrial a partir de una biopsia de músculo esquelético los complejos I+III y IV no aparecieron disminuidos como cabría esperar en un síndrome de estas características. Más tarde con el análisis genético del ADN nuclear se encontró la doble mutación en heterocigosidad en FARS2, que efectivamente tiene repercusión en los complejos de

la cadena respiratoria desencadenando un trastorno en la producción de ATP a este nivel. El síndrome de Leigh todavía no tiene tratamiento y la única forma que tenemos de intentar paliar o retrasar el avance de los síntomas sería con el tratamiento que lleva nuestro paciente.

La secuenciación del exoma para la búsqueda de mutaciones patológicas causantes de una determinada clínica es un campo que está desarrollándose cada vez más. Sin embargo, también ha aumentado notablemente la posibilidad de obtener falsos diagnósticos, es decir, considerar que una variante es causante de la enfermedad sin que lo sea. Este tipo de errores hacen difícil la identificación de la etiología de las enfermedades y tiene consecuencias tanto en el paciente como en otros miembros de la familia a los que se les diagnosticará un resultado negativo o positivo para el falso positivo, lo que influirá sobre la futura planificación de la familia. Una mutación es descrita como patógena si: 1) ha sido reconocida previamente como causante de una enfermedad; o 2) es del tipo del cual se espera que cause la enfermedad que tiene el paciente. En el primer caso, se supone que la relación causal entre la mutación y la enfermedad es la correcta. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que una proporción inesperadamente alta de mutaciones descritas en la literatura como causa de enfermedad son incorrectas. En el segundo caso, se supone que la patogenicidad de una mutación se puede predecir fácilmente pero las herramientas informáticas de predicción actuales todavía no resultan fiables para su uso en la interpretación clínica. Por lo tanto, sería deseable realizar el análisis de las células relevantes y analizar el efecto de la mutación en la actividad de la proteína afectada, como en P1, P2 y P6 ó validar el efecto de las variantes mediante el rescate del fenotipo, como hicieron en P3.

En P7 se han identificado las mutaciones que pueden ser responsables de la patogénesis del paciente. Una delección patológica del exón 3 de FARS2 y una mutación puntual c.1256G>A (p.R419H) que es más difícil de determinar que sea patológica. Mediante el estudio de la estructura de la proteína se ha determinado que la delección eliminaría una buena parte del dominio de aminoacilación, indicando que es patológica, mientras que la mutación puntual afecta al dominio de unión al anticodon. La mutación p.R419H cambia el aminoácido Arginina (R) por el aminoácido Histidina (H). Ambos aminoácidos pertenecen al grupo de los aminoácidos básicos, por lo que no es fácil predecir el efecto que puede tener en la función de la enzima. Sería conveniente generar líneas celulares del paciente y controles (fibroblastos y mioblastos) para un estudio molecular más detallado y ver así el efecto que puede tener la mutación puntual y determinar si es causa patológica del fenotipo del paciente. Al igual que se ha hecho en P3 mediante la técnica Western blot (WB) se podrían

valorar los posibles cambios en los niveles de proteína en el paciente y en los controles o usando la técnica de Northern blot podríamos analizar los niveles de mt-ARNt-Phe. También tendríamos que estudiar la síntesis de proteína mitocondrial mediante marcaje metabólico para establecer si la mutación provoca una síntesis defectuosa de la proteína. Para poder realizar un estudio funcional de la enzima sería conveniente expresar y purificar tanto la proteína mutante como la proteína wild-type. Para confirmar que la mutación en el gen FARS2 es la responsable del fenotipo bioquímico del paciente podríamos transducir los mioblastos del paciente con una construcción lentiviral que permitiera la expresión de la proteína wild-type y ver así si el reemplazo de la enzima es suficiente para recuperar las deficiencias causadas por la mutación y se rescata el fenotipo.

En conclusión, nuestro paciente está afecto de una mutación heterocigota compuesta en el gen FARS2 que parece ser patógena aunque necesitaríamos más pruebas genéticas y moleculares para confirmarlo. La mutación está en la misma posición que los pacientes hermanos P4 y P5, los cuales presentan un fenotipo menos severo que las mutaciones del resto de los pacientes con síndrome de Alpers. Sin embargo, al igual que en nuestro paciente, en P4 y P5 no se analizó el efecto de la mutación en la actividad de la enzima por lo que deberíamos hacer estudios funcionales como los que hemos mencionado para confirmar que la mutación en esa posición es patológica. Asumiendo que la mutación heterocigota compuesta en FARS2 sea la responsable, ésta da una clínica compatible con el Síndrome de Leigh, de tal forma, que mutaciones en FARS2 se han relacionado, hasta el momento, con tres tipos de clínica diferentes: el Síndrome de Leigh, el Síndrome de Alpers y la Paraplejía espástica hereditaria. Se descartó que el paciente fuese portador de mutaciones en el ADNmt. Estas mutaciones –aunque deben ser investigadas en todo caso sospechoso– no son las principales responsables de las enfermedades mitocondriales que se manifiestan en la infancia. Las mayores responsables de la patología mitocondrial son las mutaciones del ADNn, por lo que su estudio es fundamental para el diagnóstico de los pacientes sospechosos.

En el momento actual cada familia debe ser considerada individualmente y es muy arriesgado el uso de cálculos empíricos de riesgo. Unos exámenes complementarios normales no excluyen definitivamente una patología mitocondrial. Este estudio debe realizarse en centros con la debida experiencia. El resultado del estudio de la actividad enzimática del complejo OXPHOS en los pacientes sospechosos debe ser valorado cuidadosamente por lo compleja que es su

interpretación. La heterogeneidad clínica es habitual en las enfermedades mitocondriales, pueden afectar a cualquier órgano, hacerlo de un modo aislado o en combinación y tener una evolución diferente en cada caso. Los tejidos más afectados son los que tienen una mayor dependencia energética: sistema nervioso central y músculo estriado. Lo habitual es que no exista una buena correlación genotipo/fenotipo de tal modo que cualquier asociación ilícita de síntomas debe hacer pensar en una enfermedad mitocondrial. Por el momento no existe una terapia efectiva para los defectos OXPHOS.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Montoya Villarroya J, Emperador Ortiz S, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E. Diagnóstico genético de enfermedades metabólicas producidas por alteración del ADN mitocondrial. En Sanjurjo P y Baldellou A, editores. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4ª ed. Ergon. Madrid; 2014. p.773-790.
2. Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *Int J BiochemCell Biol.* 2014; 48:77-84.
3. García Silva MT, Pineda Marfá M, Martín Hernández E, Quijada Fraile P, Artuch Iriberrí R, Martín Casanueva MA. Las enfermedades de la fosforilación oxidativa (oxphos): sintomatología y diagnóstico clínico. En Sanjurjo P y Baldellou A, editores. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4ª ed. Ergon. Madrid; 2014. p. 803-836
4. Sanjurjo P, Baldellou A, Aldámiz-Echevarría K, Montejo M, García Jiménez MC. Los errores congénitos del metabolismo como enfermedades raras con un planteamiento global específico. *Anales Sis San Navarra [Internet].* 2008 [citado 2016 Abr 25]; 31(Suppl 2): 55-73. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000400005&lng=es.
5. Eiris Puñal J, Gómez Lado C, Blanco Barca MO, Castro-Gago M. Enfermedades Mitocondriales.[monografía en internet]*. Santiago de Compostela: Asociación Española de Pediatría; 2008 [acceso 12 de abril de 2016]. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/15-enfmitocon.pdf>
6. Shamseldin HE, Alshammari M, Al-Sheddi T, Salih MA, Alkhalidi H, Kentab A, et al. Genomic analysis of mitochondrial diseases in a consanguineous population reveals novel candidate disease genes. *J Med Genet.* 2012;49(4):234-41.
7. Elo JM, Yadavalli SS, Euro L, Isohanni P, Gotz A, Carroll CJ, et al. Mitochondrial phenylalanyl-tRNAsynthetase mutations underlie fatal infantile Alpers encephalopathy. *Hum Mol Genet.* 2012;21(20):4521-4529.
8. Almalki A, Alston CL, Parker A, Simonic I, Mehta SG, He L, et al. Mutation of the human mitochondrial phenylalanine-tRNAsynthetase causes infantile-onset epilepsy and cytochrome c oxidase deficiency. *BiochimBiophysActa.* 2014;1842(1):56-64.
9. Yang Y, Liu W, Fang Z, Shi J, Che F, He C, et al. A Newly Identified Missense Mutation in FARS2 Causes Autosomal-Recessive Spastic Paraplegia. *Hum Mutat.* 2016;37(2):165-169.
10. Cohen BH, Chinnery PF, Copeland WC. *POLG-Related Disorders.* En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. *GeneReviews® [Internet].* Seattle (WA): Universidad de Washington, Seattle; 1993-2016.Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26471>
11. Vernon HJ, McClellan R, Batista DA, Naidu S. Mutations in FARS2 and non-fatal mitochondrial dysfunction in two sibs. *Am J Med Genet A.* 2015;167A(5):1147-1151.
12. DiMauro S, Hirano M. Mitochondrial DNA deletion Syndromes.En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. *GeneReviews® [Internet].* Seattle (WA): Universidad de Washington, Seattle; 1993-2016.Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1203>