



**Universidad**  
Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

# **COMPARACIÓN DE FENOTIPOS DE PACIENTES CON MUTACIONES EN FBXL4**

**Phenotypic comparison of patients presenting  
mutations in FBXL4**

Autor: *Guillermo Ríos Ballestín*

Directora: *María Pilar Bayona Bafaluy*

*Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias*

*Facultad de Medicina, curso 2016-2017*



# INDICE

<b>1- Resumen.....</b>	<b>pág. 3</b>
<b>2- Introducción.....</b>	<b>pág. 5</b>
2.1 Mitocondrias.....	pág. 5
2.2- Fosforilación oxidativa.....	pág.6
2.3- El DNA mitocondrial y las enfermedades mitocondriales.....	pág. 7
<b>3- Material y métodos.....</b>	<b>pág. 8</b>
<b>4- Resultados.....</b>	<b>pág. 9</b>
4.1- ¿Qué sabemos acerca de FBXL4?.....	pág. 9
4.2- Las mutaciones en FBXL4.....	pág. 11
4.3- ¿Cuáles son los síntomas y signos de pacientes con mutaciones en FBXL4?.....	pág.14
4.4- ¿Qué hallazgos analíticos existen en pacientes con mutaciones en FBXL4?.....	pág. 18
4.5- ¿Qué hallazgos radiológicos existen en estos pacientes?.....	pág. 23
4.6- ¿Qué cambios bioquímicos y moleculares encontramos en estos pacientes?.....	pág. 28
4.7- ¿Las mutaciones de FBXL4 provocan enfermedad?.....	pág. 34
4.8- ¿Qué tratamientos se han ensayado en estos pacientes?....	pág. 36
<b>5- Discusión.....</b>	<b>pág. 39</b>
<b>6-Conclusiones.....</b>	<b>pág. 43</b>
<b>7- Bibliografía.....</b>	<b>pág. 44</b>

## 1- Resumen

FBXL4 es un gen situado en el DNA nuclear, en el cromosoma 6q16.1. Este gen codifica un miembro de la familia de las proteínas F-box, la cual forma parte de un complejo con un importante papel en la ubiquitinación dependiente de fosforilación.

Hasta el momento se han descrito 31 mutaciones distintas en 36 familias diferentes, entre ellas 19 de cambio de sentido, 6 de pérdida de sentido, 3 deleciones y 3 mutaciones en los sitios de corte y empalme (*splicing*)

Las mutaciones patológicas encontradas hasta la fecha provocan un cuadro de encefalomiopatía de comienzo temprano, que se manifiesta con frecuencia desde el primer día de vida.

A pesar de ser una entidad relativamente heterogénea, podemos describir un cuadro clínico típico de un paciente con mutación de FBXL4 como un neonato de bajo peso al nacer que desde el comienzo presenta hipotonía, dificultad para la alimentación y rasgos dismórficos faciales, que analíticamente presenta una acidosis con un lactato muy elevado y en el que se realiza una RMN donde se detectan alteraciones de la señal en T2 junto a atrofia cerebral. No mejora a pesar de los tratamientos y con el paso del tiempo se constata un retraso del desarrollo

En el presente trabajo, a partir de los informes clínicos de dos pacientes no publicados todavía que están siendo estudiados en el Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial del Departamento de Bioquímica de la Facultad Ciencias de la Universidad de Zaragoza, se realiza una comparación entre estos pacientes y aquellos publicados en la literatura, al tiempo que se lleva a cabo una revisión bibliográfica acerca de todos los pacientes con mutaciones en FBXL4 publicados hasta la fecha.

En los pacientes estudiados se han encontrado 3 mutaciones: dos de ellas de pérdida de sentido y una de alteración de corte y empalme que lleva a un cambio en la pauta de lectura. Presentan características fenotípicas habituales, como son el retraso del desarrollo, la elevación de ácido láctico en la analítica, o la depleción del mtDNA en la biopsia muscular, lo cual permite orientar el diagnóstico previamente al análisis genético.

Palabras clave: FBXL4, enfermedad mitocondrial, encefalomiopatía, déficit del sistema OXPHOS, depleción de mtDNA.

FBXL4 is a nuclear DNA gene located on chromosome 6q16.1. This gene encodes a member of the F-box family of proteins, which is part of a complex with an important role in phosphorylation-dependent ubiquitination.

So far, 31 different mutations have been reported in 36 different families, including 19 missense mutations, 6 nonsense mutations, 3 splicing mutations and 3 deletions.

To date, the reported pathological mutations cause an early onset encephalomyopathy, starting frequently at birth.

Despite being a relatively heterogeneous entity, we can say that patients with a FBXL4 mutation are usually low-weight neonates presenting hypotonia, feeding difficulty, dysmorphic facies, high-lactate acidemia and T2-weighted image signal alterations along with cerebral atrophy. They don't get better in spite of treatments and as they grow up a developmental delay is verified.

In this work, using the clinical reports of two unpublished patients that are being studied in the Biogenesis and Mitochondrial Pathology's group, Biochemistry's department of Sciences school, University of Zaragoza, a comparison is made between these patients and those published, while carrying out a systematic review of every patient with FBXL4 mutations published to date.

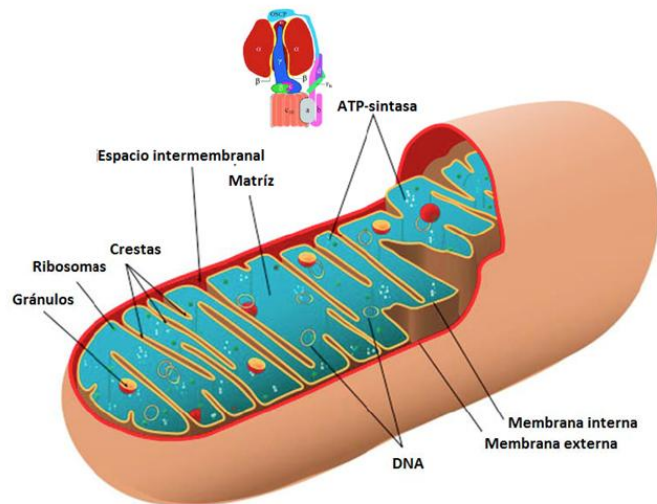
In our patients, we've discovered 3 novel mutations: two of them are missense mutations and the other one is a splicing/frameshift mutation. The patients present common phenotypic characteristics, such as developmental delay, lactic acidemia, or depletion of mtDNA in muscle biopsy, which makes possible guiding the diagnosis prior to genetic analysis.

Keywords: FBXL4, mitochondrial disease, encephalomyopathy, OXPHOS deficiency, mtDNA depletion.

## 2- Introducción

### 2.1- Mitocondrias

- Las mitocondrias son los orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la respiración celular. Estamos por lo tanto ante las centrales energéticas de la célula, que sintetizan ATP a expensas de diferentes elementos metabólicos<sup>1</sup>.



**Fig 1** Estructura interna mitocondrial

Estructuralmente, su característica más importante es la de presentar una membrana externa, lisa y algo elástica, y una membrana interna, con crestas en su interior (*Figura 1*). Esta última está conformada por multitud de proteínas diferentes con actividad biológica: entre ellas se encuentran los enzimas y proteínas de transferencia electrónica, los enzimas implicados en la síntesis del ATP o diversos componentes del sistema de transporte de diferentes metabolitos<sup>1</sup>.

Otra estructura de especial relevancia es la matriz, compuesta por cerca de un 50% de proteína, y la cual contiene también DNA y ribosomas (estos últimos localizados cerca de la porción de membrana interna en contacto íntimo con la externa). La matriz contiene además la mayor parte de los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como por ejemplo la malato y la glutamato-deshidrogenasa, las cuales son empleadas a menudo como marcadores de la matriz mitocondrial<sup>1</sup>.

El número de mitocondrias es relativamente constante y varía en función de cada tipo celular. Estos orgánulos se hallan localizados a menudo, como cabría esperar, en las proximidades de aquellas estructuras que precisan ATP, así como de las gotitas citoplasmáticas de grasa, las cuales hacen la función de suministro de combustible para la oxidación<sup>1</sup>.

En lo que a su forma respecta, esta es variable: desde esférica en las células grasas de color pardo, hasta elipsoidal en las células hepáticas, pasando por formas cilíndricas en las células renales, o filamentosas en los fibroblastos.

## 2.2- Fosforilación oxidativa:

- La molécula del ATP es un nucleótido libre formado por una base nitrogenada (adenina), un azúcar (ribosa) y tres grupos fosfato en unión éster, normalmente en forma de carga negativa (ionizados). La hidrólisis de esta molécula es una reacción exergónica en la cual se da lugar a ADP y Pi, con la consiguiente liberación de energía <sup>2</sup>.

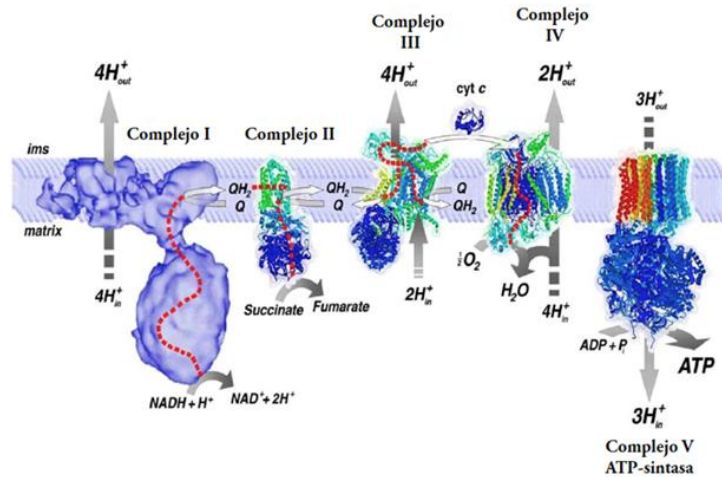


Fig 2 Estructura de la cadena respiratoria mitocondrial

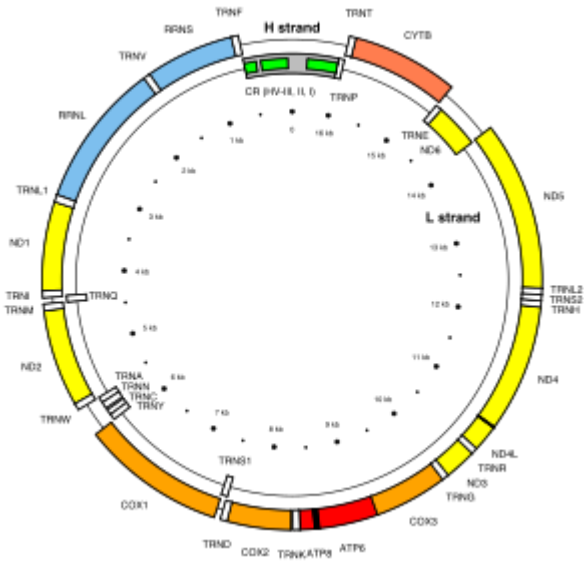
Las células sintetizan la mayoría de ATP, y para ser capaces de acumularlo en altas cantidades se produce el proceso conocido como fosforilación oxidativa, un proceso clave que se lleva a cabo en las crestas mitocondriales. En la fosforilación oxidativa, la energía generada a través de reacciones redox en los complejos que constituyen la cadena transportadora de electrones se emplea para crear un gradiente de protones a través de la membrana (quimiosmosis). Esta cadena respiratoria está formada por complejos principales de proteínas (I, III y IV), los cuales se asocian en complejos mayores (coenzima Q y citocromo C) y varios complejos auxiliares (*Figura 2*) <sup>1</sup>.

La energía de ese gradiente es lo que denominamos fuerza protón-motriz, la cual se libera al translocar los protones a través de la enzima ATP-sintasa, usando un grupo fosfato y una molécula de ADP para almacenar la energía generada en enlaces anhidro de alta energía (en la molécula de ATP en definitiva) <sup>2</sup>.

De todo ello se deduce la relevancia de la fosforilación oxidativa y las mitocondrias en la posibilidad de existencia de los seres vivos, así como la importancia de las enfermedades mitocondriales (si bien estas se caracterizan por su gran heterogeneidad y amplio abanico clínico).

### 2.3- El DNA mitocondrial y las enfermedades mitocondriales

- Se conoce con el nombre de DNA mitocondrial (mtDNA) a la pequeña proporción de DNA, de herencia materna en organismos pluricelulares, que en las células eucariotas se localiza en las mitocondrias (si bien la gran mayoría de las proteínas que encontramos en la mitocondrias están codificadas en el DNA nuclear). En los seres humanos, está compuesto por 16.569 pares de bases de DNA que forman un conjunto de 37 genes (*Figura 3*), (si bien más de 1000 genes nucleares están relacionados con la función mitocondrial<sup>3</sup>). Cada mitocondria contiene de 2 a 10 copias de mtDNA<sup>4</sup>.



**Fig 3** Estructura del genoma mitocondrial

Se cree que el DNA nuclear y mitocondrial tiene un origen evolutivo diferente, y que este último procede de genomas bacterianos circulares que fueron envueltos por los antepasados de las actuales células eucariotas (teoría endosimbiótica).

Las conocidas como enfermedades mitocondriales podrán producirse por tanto a través de mutaciones en el mtDNA, o por medio de mutaciones en genes del DNA nuclear que codifiquen proteínas necesarias para la mitocondria (como son por ejemplo los genes C10ORF2, MPV17, POLG, TK2...)<sup>5</sup>.

Las enfermedades de la cadena respiratoria mitocondrial constituyen un grupo grande y diverso de trastornos genéticos que se caracterizan por defectos en el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). La mayoría están relacionados con el genoma nuclear<sup>6</sup>, en concreto y como cabría esperar, con aquellos que codifican proteínas cuya diana es la mitocondria.

Estamos por lo tanto ante enfermedades con un genotipo y fenotipo extremadamente heterogéneo, de comienzo pediátrico con una incidencia aproximada de 1:5000<sup>7</sup>, en las que en ocasiones no se llega a un diagnóstico molecular etiológico.

Se ha demostrado que la mayor parte de los casos son causados, como hemos visto, por mutaciones alojadas en el DNA nuclear, en las que la transmisión más comúnmente observada es autosómica recesiva<sup>8</sup>.

Algunas de dichas mutaciones conducen a alteraciones del mtDNA en determinados tejidos que resultan clínicamente afectados. Estas alteraciones se manifiestan de dos formas distintas: a través de la acumulación de mtDNA delecionado amplificado clonalmente, y asociado con deficiencias de la respiración celular; o bien por medio de la pérdida de número de copias del mtDNA (como sucede por ejemplo en los síndromes de depleción del mtDNA) <sup>9</sup>.

La mayoría de los síndromes que pertenecen al primer grupo se suelen manifestar en la edad adulta, mientras que aquellos que cursan con caída de los niveles de mtDNA suelen ser enfermedades graves y de comienzo temprano propias de la infancia.

Los productos alterados que se derivan de estos genes están relacionados bien con la replicación o reparación del mtDNA o con el mantenimiento de los niveles de desoxirribonucleótidos necesarios para una síntesis adecuada de dicho material genético.

En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica acerca de una de estas enfermedades mitocondriales, que englobaríamos dentro del segundo grupo (disminución de los niveles del mtDNA): se trata de aquella patología mitocondrial en relación con las mutaciones que se han descrito en FBXL4, mutaciones desembocan en una proteína mitocondrial anómala y típicamente en un cuadro de encefalomiopatía de comienzo muy temprano, como a continuación se expone.

### **3- Material y métodos**

Por un lado, se dispone de dos informes de pacientes con mutaciones de FBXL4, los cuales consideraremos los principales del presente trabajo: un informe de un paciente del Hospital Sant Bernabe (Berga, Barcelona) y un informe de una paciente del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba).

Por otro lado, se realizó una búsqueda en Pubmed con la palabra clave ***FBXL4***, obteniéndose 18 resultados. Se seleccionaron todas aquellas publicaciones en las que se hacía referencia a FBXL4 de forma directa (series de casos, reportes de casos individuales), así como aquellos estudios con cohortes de pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial en los que se llegaba a un diagnóstico de mutación en FBXL4, seleccionando un total de 11 artículos (además de otros artículos para obtener cierta información de forma puntual, pero que no han sido aquellos sobre los que se ha realizado la revisión directamente).

El objetivo del presente trabajo es el de comparar los casos de nuestros pacientes con mutación en FBXL4 con aquellos casos publicados en la literatura, a través de una revisión sistemática de la bibliografía, buscando las similitudes y diferencias y repasando las características clínicas más significativas de estos pacientes.



## 4- Resultados

### 4.1- ¿Qué sabemos acerca de FBXL4?

- FBXL4 codifica una de las 69 proteínas F-box que se han descrito en el ser humano, la cual consta de 621 aminoácidos. Esta proteína se expresa en corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas y en placenta <sup>10</sup>.

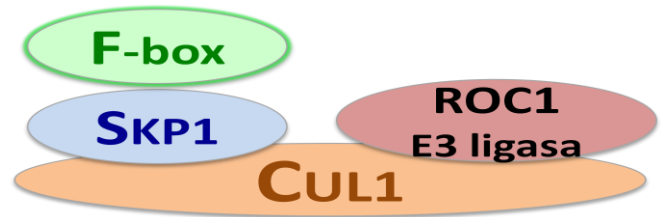


Fig 4 Complejo Skp1-Cullin-F-box

Forma parte de una familia de proteínas que constituyen el complejo ubiquitina-ligasa <sup>11</sup> Skp1-Cullin-F-box (*Figura 4*), el cual ha demostrado intervenir en la ubiquitinación dependiente de fosforilación <sup>12</sup>, jugando por tanto un papel fundamental tras la traducción en la regulación de la función proteica y en la estabilidad de todas las células eucariotas.

Además, se han realizado dos estudios que resultaron fundamentales para conocer más acerca de esta proteína: Bonnen et al (2013) y Gai et al (2013)

\*FBXL4 tiene un peso molecular de 70 kDa: Se han usado anticuerpos contra proteína FBXL4 de mamíferos junto a anticuerpos monoclonales anti-HA en células HEK293T inducidas con doxiciclina. Ambos anticuerpos detectaron una banda de material reactivo (CRM) que correspondía a una proteína de aproximadamente 68-70 kDa, compatible con el peso molecular de FBXL4 <sup>13</sup>.

\* FBXL4 es una proteína F-box con repeticiones ricas en leucina (LRR) que está dirigida a la mitocondria: El análisis de la estructura de la proteína reveló las características de una proteína LRR con dominios AMN1 en la porción carboxilo terminal, no siendo observados en la parte amino terminal (si bien el análisis reveló una señal de localización mitocondrial N terminal) (*Figura 5*) <sup>9,13</sup>.

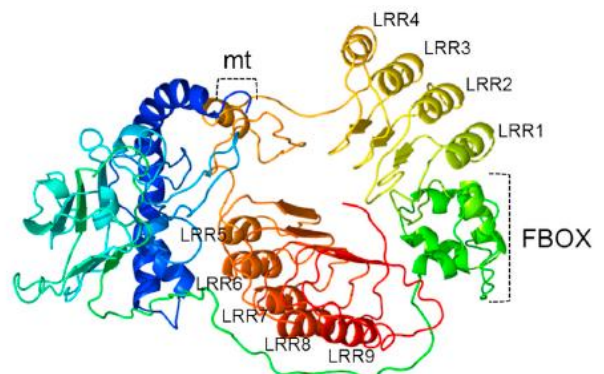
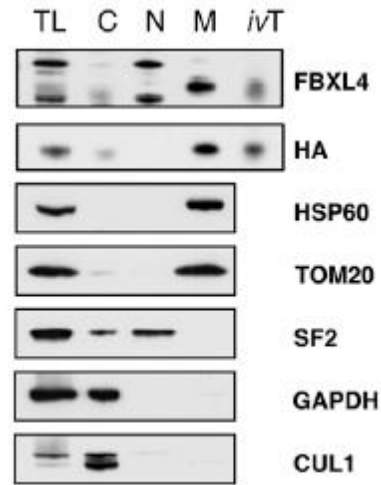


Fig 5 Modelo tridimensional de FBXL4, mostrando los pliegues de F-box y 9 repeticiones ricas en leucina (LRR)

Por medio de software capaz de predecir la localización mitocondrial o subcelular, la secuencia de la proteína FBXL4 obtuvo una alta puntuación mitocondrial (en concreto la secuencia que comprendía los aminoácidos 22-26 en el extremo amino terminal)<sup>9,13</sup>.

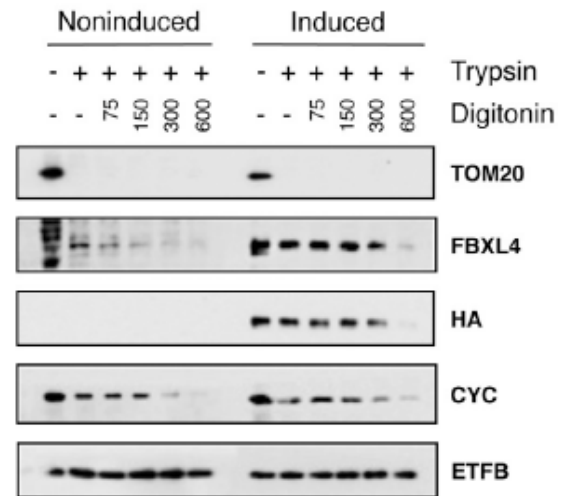
Los resultados mostraron mayor afinidad mitocondrial por parte de FBXL4<sup>HA-N</sup> en comparación con FBXL4<sup>HA-C</sup>, y en definitiva que el extremo amino terminal es esencial para dirigir a FBXL4 a la mitocondria<sup>9,13</sup>.



**Fig 6** Confirmación de la localización mitocondrial subcelular por *immunoblotting* basado en la señal de HSP60 y TOM20 (mitocondrial), SF2 (nuclear), GAPDH (citoplasmática) y CUL1 (citoplasmática). El lisado celular total (CL), y las fracciones de citosol (C), núcleo (N) y mitocondrial (M) se aislaron de células HEK293T transfectadas con FBXL4<sup>HA-C</sup>. Se incluyó proteína humana completa FBXL4<sup>HA-C</sup> como control (ivt).

\* FBXL4 reside en el interior de la mitocondria: En hígado de ratón aislado, FBXL4-CRM estaba solamente presente en la fracción soluble de la mitocondria<sup>13</sup>.

Con el fin de detectar en qué compartimento soluble en concreto se encontraba, se llevaron a cabo experimentos de degradación frente a tripsina en células inducibles HEK293T que expresaban FBXL4<sup>HA-C</sup>, confirmándose que FBXL4 era resistente a la digestión frente a tripsina, lo cual indicaba que se encontraba en el interior de la mitocondria (*Figura 7*)<sup>13</sup>.

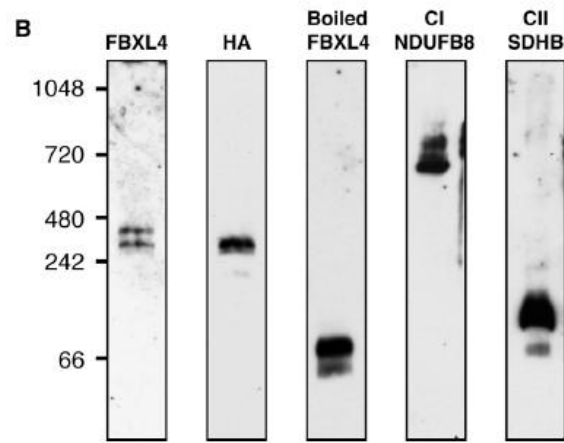


**Fig 7** Comparación de la señal de FBXL4 y Ha con TOM20 (membrana externa), citocromo c/CYC (espacio intermembrana) y transferente de electrones B/ETFB (matriz) con el fin de establecer la localización submitocondrial de FBXL4.

La intensidad de la banda que correspondía a FBXL4 se fue reduciendo progresivamente por el tratamiento con tripsina tras la exposición a digitonina (solubiliza la membrana externa pero no la interna), lo cual lleva a pensar que FBXL4 se localiza muy probablemente en el espacio intermembrana<sup>13</sup>.

\*FBXL4 forma parte de un complejo supramolecular:

Se llegó a esta conclusión por medio de electroforesis de la fracción mitocondrial a partir de células HEK293T transfectadas con FBXL4<sup>HA-C</sup> e inducidas con doxiciclina: la inmunovisualización reveló un doblete CRM formado por dos bandas en el rango de 400 kDa (*Figura 8*). Estos hallazgos indican que FBXL4 forma parte de un complejo proteico cuaternario <sup>13</sup>.



**Fig 8** Electroforesis con *blue native gel*. Para revelar la presencia de complejos de alto peso molecular, se separaron las muestras con geles al 5-13% no desnaturalizadores. La muestra de SDS hervida, NDUFB8 del complejo I y SDHB del complejo II se emplearon como control

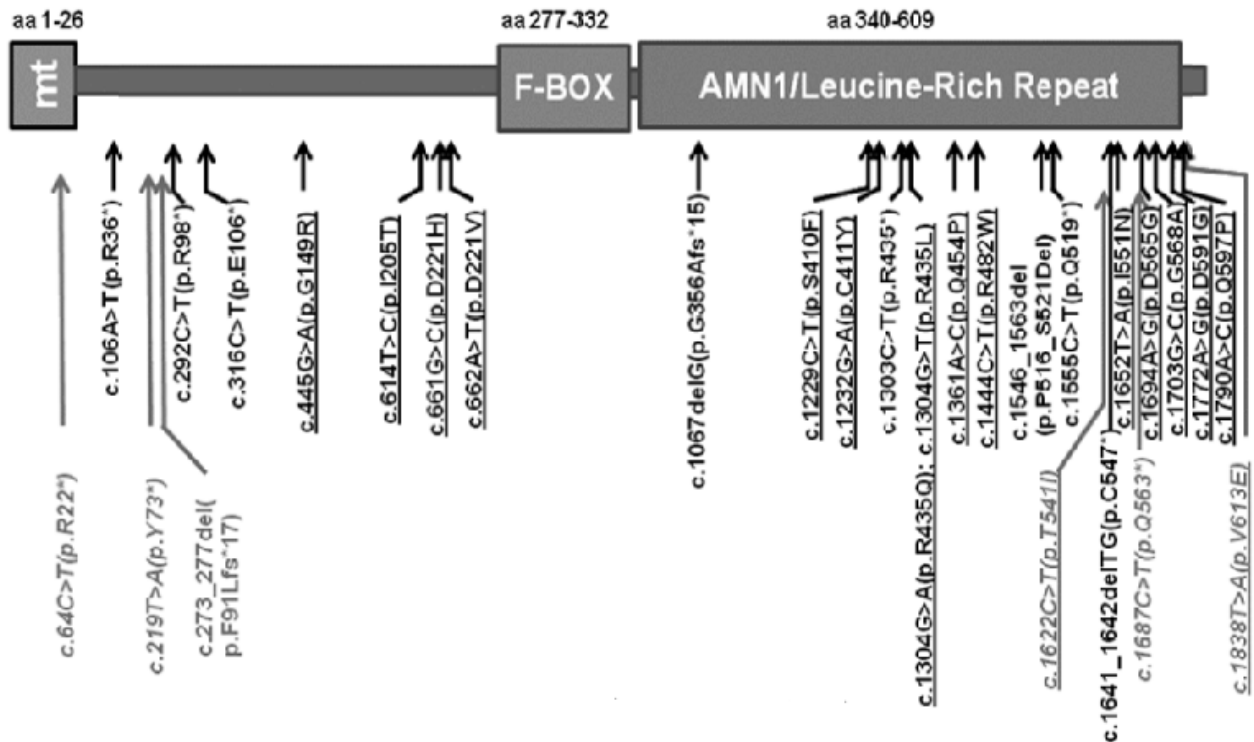
#### 4.2- Las mutaciones en FBXL4

El gen de FBXL4 está situado en el DNA nuclear en el cromosoma 6q16.1 <sup>14</sup>. Se han descrito 31 mutaciones distintas en 36 familias diferentes (*Figura 9*):

En nuestra paciente del Hospital Reina Sofía (al cual a partir de ahora nos referiremos como P1) se detectó la mutación **c. 1510T>C** en heterocigosis en el exón 8, lo cual provoca el cambio de aminoácido **p. Cys504Arg**, mutación no descrita anteriormente. Se detectó otra mutación **IVS4+5C>G** en heterocigosis en el intrón 4, lo cual lleva a una alteración de corte y empalme, la eliminación del exón 4 y cambio de pauta de lectura posterior, como han demostrado estudios moleculares llevados a cabo por nuestro grupo. Al igual que las anteriores, esta variante no se había reportado con anterioridad.

En el paciente del Hospital Sant Bernabe (al cual denominaremos a partir de ahora P2) se detectó una mutación **c.851delC** en homocigosis que causa una alteración a nivel proteico (**p. Pro284Leu\_fsX6**), la cual proviene de ambos progenitores, siendo ambos portadores del cambio en heterocigosis. Dicha mutación no había sido reportada anteriormente.

Hasta este momento, se han descrito las siguientes mutaciones en FBXL4:



**Fig 9** Las mutaciones en negrita fueron reportadas en Bonnen et al (2013), Gai et al (2013), Huemer et al (2015) y van Rij (2016). Las variantes en cursiva y color gris fueron descritas en Dai et al (2017). Las mutaciones subrayadas corresponden a aquellas de cambio de sentido. Las variantes que afectan al *splicing* se listan a continuación de la imagen.

Las tres mutaciones que afectan al *splicing* no incluidas en la imagen son las siguientes: **c.513-1G>A // c.1703G>C // c.1389+3\_+6delAAGT**.

Cabe destacar la ausencia de mutaciones reportadas en F-box y la mayor incidencia de mutaciones en las repeticiones ricas en leucina: un **64%** (18 en LRR frente a 10) <sup>7</sup>. Además, las mutaciones de cambio de sentido suponen el 58% (18/31), y las de pérdida de sentido suponen el 42% (13/31). Estos defectos de FBXL4 parecen ser panéuticos <sup>7</sup>.

En los pacientes descritos hasta el momento, existe un porcentaje de consanguinidad del 59% (20/34).

A continuación se muestra una tabla resumen (*Tabla 1*) con todos los pacientes en los cuales se han detectado mutaciones en FBXL4 hasta la fecha, así como el tipo de mutación, raza/procedencia, consanguinidad en los padres y estudio/publicación en las que han sido incluidos:

Sujeto	Mutación	Tipo mutación	Procedencia	Consanguinidad	Estudio
S1	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense	Árabe	Sí	Bonnen et al
S2	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense	Árabe	Sí	Bonnen et al
S3	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense	Árabe	Sí	Bonnen et al
S4	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense	Árabe	Sí	Bonnen et al
S5	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense	Árabe	Sí	Bonnen et al
S6	c.1303C>T (p.Arg435*)	Nonsense	Árabe	/	Bonnen et al
S7	c.1703G>C	Splicing	Árabe	Sí	Bonnen et al
S8	c.1444C>T (p.Arg482Trp)	Missense	Árabe	Sí	Gai et al
S9	c.1444C>T (p.Arg482Trp)	Missense	Árabe	Sí	Gai et al
S10	c.1444C>T (p.Arg482Trp)	Missense	Árabe	Sí	Gai et al
S11	c.1790A>C (p.Gln597Pro)	Missense	Caucásico	No	Gai et al
S12	c.1694A>G (p.Asp565Gly)	Missense	Albania	No	Gai et al
S13	c.1652T>A (p.Ile551Asn)	Missense	Árabe	Sí	Gai et al
S14	c.614T>C (p.Ile205Thr);c.106A>T (p.Arg36Stop)	Missense/Nonsense	Caucásico	No	Gai et al
S15	c.1229C>T (p.Ser410Phe)	Missense	Turquía	Sí	Gai et al
S16	c.1304G>T (p.Arg435Leu)	Missense			Huemer et al
S17	c.513-1G>A (p.172?)	Splicing			Huemer et al
S18	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense			Huemer et al
S19	c.1361A>C (p.Gln454Pro)	Missense			Huemer et al
S20	c.1232G>A (p.Cys411Tyr)	Missense			Huemer et al
S21	c.445G>A (p.Gly149Arg)	Missense			Huemer et al
S22	c.662A>T (p.Asp221Val)	Missense			Huemer et al
S23	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense			Huemer et al
S24	c.1555C>T (p.Gln519*)	Nonsense	6 Árabes, 3 Caucásicos, 8 NC	53% (9/17)	Huemer et al
S25	c.1303C>T (p.Arg435*)	Nonsense			Huemer et al
S26	c.1304G>A (p.Arg435Gln);c.1232G>A (p.Cys411Tyr)	Missense			Huemer et al
S27	c.1444C>T (p.Arg482Trp);1546_1563del (Pro516_Ser521del)	Missense/Nonsense			Huemer et al
S28	c.1304G>A (p.Arg435Gln)	Missense			Huemer et al
S29	c.661G>C(p.Asp221His);1641_1642del (Cys547*)	Missense/Nonsense			Huemer et al
S30	c.1067delG (p.Gly356Alafs*15)	Nonsense			Huemer et al
S31	c.1772A>G (p.Asp591Gly)	Missense			Huemer et al
S32	c.1703G>C (p.Gly568Ala);c. 316C>T(p.Gln106*)	Nonsense			Huemer et al
S33	c.1641_1642delTG	Nonsense	Caucásico	No	Antoun et al
S34	c.1442T>C (p.Leu481Pro)	Missense	Caucásico	No	Barøy et al
S35	c.292C>T (p.Arg98*);c.1303C>T (p.Arg435*)	Nonsense	/	/	Van Rij et al
S36	c.1411G>A (p.Ala471Thr);c.1586C>A (Ala529Glu);c.1790A>C (p.Gln597Pro)	Missense	/	/	Morton et al
S37	c.1411G>A (p.Ala471Thr);c.1586C>A (Ala529Glu);c.1790A>C (p.Gln597Pro)	Missense	/	/	Morton et al
S38	c.219T>A (p.Y73*)	Nonsense	Árabe	/	Dai et al
S39	c.1641_1642delTG(Cys547*)	Nonsense	Árabe	/	Dai et al
S40	c.1687C>T (p.Q563*);c.1622C>T (p.T541I)	Nonsense/Missense	/	/	Dai et al
S41	c.1389+3_+6delAAGT;c.1838T>A (p.V613E)	Splicing/Missense	Hispano	/	Dai et al
S42	c.64C>T (p.R22*);c.1444C>T (p.R482W)	Nonsense/Missense	Caucásico	/	Dai et al
S43	c.1703G>C (p.Gly568Ala)	Missense	Árabe	/	Dai et al
S44	c.273_277 del (p.F91Lfs*17)	Nonsense	Árabe	/	Dai et al
S45	c.1641_1642delTG(Cys547*);c.1232G>A (p.C411Y)	Nonsense/Missense	Hispano	/	Dai et al
S46	c.64C>T (p.R22*);c.1641_1642delTG(Cys547*)	Nonsense	Caucásico	/	Dai et al
P1	<b>c. 1510T&gt;C (p. Cys504Arg); IVS4+5C&gt;G</b>	<b>Missense/Splicing</b>	<b>Caucásico</b>	<b>/</b>	<b>Paciente propio</b>
P2	<b>c.851delC (p. Pro284Leu_fsX6)</b>	<b>Missense</b>	<b>Árabe</b>	<b>No</b>	<b>Paciente propio</b>

**Tabla 1**  
Pacientes en los que se ha detectado una o más mutaciones en FBXL4.  
NC = no conocido

### 4.3- ¿Cuáles son los síntomas y signos de pacientes con mutaciones en FBXL4?

Como se va a exponer a continuación, los cuadros clínicos de los sujetos con mutaciones en FBXL4 se caracterizan por su heterogeneidad, si bien ciertos hallazgos aparecen con una frecuencia superior al resto y nos pueden permitir al menos sospechar una patología mitocondrial y orientar el diagnóstico.

- Nuestra paciente del Hospital Reina Sofía, **P1**, es un recién nacido de 2090 g (<P3), con diagnósticos prenatales de crecimiento intrauterino restringido (CIR), arteria umbilical única, megacisterna magna, foco hiperintenso frontal (sangrado vs calcificación) y sospecha de comunicación interventricular (CIV).

16 meses después del nacimiento, los síntomas que en él se han objetivado son un ligero retraso psicomotor y escasa ganancia ponderal.

- Nuestro paciente del Hospital Sant Bernabe, **P2**, es un recién nacido en el que el único antecedente familiar de interés es consanguinidad en la rama paterna (abuelos). Nació con un peso de 2650g, longitud de 47 cm y perímetro craneal de 34 cm, en un parto por cesárea por distocia y falta de progresión a las 38+4 semanas.

Al 3<sup>er</sup> día de vida inició un cuadro de empeoramiento del estado general con cianosis e hipotonía y rechazo de tomas, motivo por el cual se decide el traslado a la unidad de neonatología.. A la exploración física sólo llama la atención el color pálido grisáceo de la piel y criptorquidia.

Tras siete días de vida y encontrándose en una situación de acidosis metabólica refractaria, con la sospecha de metabolopatía, se decide limitar el esfuerzo terapéutico, falleciendo el paciente.

A continuación se muestra una tabla (*Tabla 2*) de todos los pacientes junto a su tipo de mutación, edad de comienzo de la enfermedad, edad de la última evaluación/fallecimiento y las características clínicas más típicas de estos pacientes (peso al nacer, microcefalia, retraso global del desarrollo, hipotonía, escasa ganancia ponderal, dificultad para la alimentación, dismorfismos craneofaciales, miocardiopatía, y convulsiones).

Sujeto	Tipo mutación	Edad comienzo	Peso al nacer	Microcefalia	RGD	Hipotonía	EGP	DA	Dismorfía CF	Miocardopatía	Convulsiones	Edad última evaluación	Fallecimiento
S1	Nonsense	3 meses	<3rd	<3rd	+	-	+	-	-	/	-	/	3 años 9 meses
S2	Nonsense	/	<3rd	<3rd	+	+	-	-	-	+	-	/	1 año 8 meses
S3	Nonsense	/	<3rd	<3rd (adq)	+	+	-	-	+	/	-	/	2 años
S4	Nonsense	Nacimiento	<3rd	-	-	+	-	-	-	/	-	/	3 días
S5	Nonsense	/	/	/	+	/	-	-	/	/	-	/	4 años
S6	Nonsense	1 mes	<3rd	-	+	+	-	-	+	/	-	/	4 meses
S7	Splicing	4 meses	<10th	/	+	+	+	+	+	/	-	6 años	/
S8	Missense	Nacimiento	/	/	+	+	/	/	-	/	-	/	4 años
S9	Missense	4 meses	<10th	/	+	+	-	+	-	/	+	9 años	/
S10	Missense	NC	/	/	+	+	-	-	-	/	+	/	/
S11	Missense	1 mes	<10th	<10th	+	+	-	+	+	-	+	8 años	/
S12	Missense	Nacimiento	<3rd	/	+	+	+	+	+	+	+	/	16 meses
S13	Missense	9 meses	<3rd	/	+	+	+	+	+	-	+	3 años	/
S14	Missense/Nonsense	Nacimiento	<3rd	<3rd	+	+	+	+	+	+	+	3 años	/
S15	Missense	Nacimiento	<3rd	<3rd	+	+	+	+	-	-	+	/	2 años
S16	Missense	Nacimiento			+	+	/	/	+	+	/	/	24 meses
S17	Splicing	Nacimiento			+	+	/	/	+	-	/	37 meses	/
S18	Nonsense	3 meses			/	-	/	/	-	-	/	/	45 meses
S19	Missense	Nacimiento			+	+	/	/	+	-	/	55 meses	/
S20	Missense	6 meses			+	+	/	/	+	-	/	/	24 meses
S21	Missense	/			+	/	/	/	-	-	/	/	/
S22	Missense	Nacimiento			+	+	/	/	+	-	/	/	27 meses
S23	Nonsense	24 meses			/	+	/	/	+	-	/	/	24 meses
S24	Nonsense	3 días	<3rd 6/18	<3rd 2/5	/	+	/	/	+	-	/	24 meses	/
S25	Nonsense	Nacimiento			/	+	/	/	-	-	/	/	/
S26	Missense	5 meses			+	+	/	/	+	-	/	58 meses	/
S27	Missense/Nonsense	17 meses			+	+	/	/	-	+	/	55 meses	/
S28	Missense	Nacimiento			+	+	/	/	-	+	/	37 meses	/
S29	Missense/Nonsense	2 días			+	/	/	/	+	-	/	/	75 meses
S30	Nonsense	4.5 meses			+	+	/	/	+	-	/	45 meses	/
S31	Missense	2 días			/	+	/	/	-	+	/	2 meses	/
S32	Nonsense	Nacimiento			+	+	/	/	+	-	/	153 meses	/
S33	Nonsense	Nacimiento	<10th	/	+	+	+	+	+	+	/	14 meses	/
S34	Missense	Nacimiento	<3rd	Normal	+	+	-	+	+	+	+	42 meses	/
S35	Nonsense	Nacimiento	Normal	Normal	/	+	/	/	+	+	-	/	2 días
S36	Missense	Nacimiento	/	/	+	+	/	+	/	+	-	/	40 meses
S37	Missense	Nacimiento	/	/	+	-	/	+	/	-	-	/	26 meses
S38	Nonsense	2 meses	/	<3rd	+	+	+	/	+	+	-	19 meses	/
S39	Nonsense	Nacimiento	/	<3rd	+	+	+	/	+	+	-	14 meses	/
S40	Nonsense/Missense	2 días	/	/	/	/	/	/	-	+	/	/	5 días
S41	Splicing/Missense	Nacimiento	/	/	+	+	/	/	+	+	-	23 meses	/
S42	Nonsense/Missense	4 meses	/	-	+	+	-	/	+	-	+	22 meses	/
S43	Missense	/	/	/	+	/	/	/	/	/	+	/	5 años
S44	Nonsense	Nacimiento	/	-	/	+	+	/	+	+	/	/	3 días
S45	Nonsense/Missense	Nacimiento	/	-	+	-	-	/	-	+	-	7 meses	/
S46	Nonsense	2 años	/	-	+	+	-	/	+	-	-	12 años	/
P1	Missense/Splicing	Nacimiento	<3rd	Normal	+	/	+	/	-	-	-	16 meses	/
P2	Missense	3 días	<10th	Normal	/	NV	/	/	-	-	NV	/	2 días

**Tabla 2**  
 Sintomatología y características de pacientes con mutación en FBXL4. (RGD = retraso global del desarrollo) (EGP = escasa ganancia ponderal) (DA = dificultad para la alimentación) (CF = craneofacial) (<3rd = menor al percentil 3) (<10th = menor al percentil 10) (NV= no valorable)

Además de los síntomas más prevalentes, recogidos en la tabla, el abanico clínico es muy amplio:

**S1** fue empeorando progresivamente, falleciendo por encefalopatía. Dentro su misma familia se dieron 4 casos adicionales (**S2-S5**), con un desenlace similar <sup>9</sup>.

**S6** presentaba además encefalopatía <sup>9</sup>.

**S7** tiene una clínica similar a los casos anteriores, pero de menor gravedad <sup>9</sup>. En el momento de la publicación es un niño con distonía grave, que ha requerido de gastrostomía endoscópica percutánea (GEP) a causa de problemas importantes para la alimentación <sup>13</sup>.

**S9** es el hermano menor de S8, y presenta además intolerancia al ejercicio <sup>13</sup>.

**S10** es el hermano menor de S8 y S9. Ha presentado una convulsión por la que recibe tratamiento antiepiléptico <sup>13</sup>.

**S11** presenta también ataxia y movimientos coreoatetósicos, junto a infecciones de repetición y alteraciones de la motilidad gastrointestinal graves <sup>13</sup>.

**S12** dentro de su fenotipo presenta micrognatia, pezones supernumerarios bilaterales y leve hipospadias. A los 4 meses apareció reflujo gastroesofágico y dificultad para la deglución, por lo que requirió sonda nasogástrica. Falleció por encefalopatía en el contexto de una infección intercurrente <sup>13</sup>.

**S13**: el examen clínico reveló orejas de baja implantación, hipospadias y testículos sin descender. Presentaba además leve pectus excavatum. A los 3 años se encontraba encamado, con hipotonía troncular grave y grave pérdida de masa muscular <sup>13</sup>.

**S14**: los dismorfismos faciales consistían en orejas malformadas, nariz en silla de montar, hipoplasia facial con microftalmia surco subnasal alargado y párpados inclinados hacia abajo. A los 3 años desarrolló cataratas bilaterales y nistagmo horizontal <sup>13</sup>.

**S15** fue un hermano de un gemelo sano. Se constataron crisis de ausencia sin convulsiones. Falleció a causa de una infección intercurrente <sup>13</sup>.

**S16-S32**: En algunos sujetos aparecieron características de afectación de sistema nervioso central en enfermedades mitocondriales, como son discapacidad auditiva y trastornos del movimiento <sup>14</sup>.

Hubo 2 pacientes con cataratas congénitas, 1 paciente con atrofia del nervio óptico durante el curso clínico y 1 paciente de 11 años y 7 meses en el último seguimiento, que había desarrollado ptosis, pérdida neurosensorial de audición, atrofia del nervio óptico y accidente cerebrovascular que causó hemiparesia espástica izquierda <sup>14</sup>: se trata de **S32**, que sufrió un gran infarto de hemisferio derecho, al que siguió 2 años después un infarto de hemisferio izquierdo en la región parietal posterior y occipital <sup>15</sup>.



**S33:** el primer síntoma en aparecer fue inestabilidad de temperatura a las 12 horas del nacimiento. Tras diversos análisis y pruebas de imagen, se constata hipertensión pulmonar y una taquicardia ectópica auricular que requiere tratamiento con flecainida, permaneciendo en cuidados intensivos neonatales hasta los 2 meses <sup>16</sup>.

A los 7 meses de edad se descubrió una inmunodeficiencia a través de neutropenia, panlinfopenia e hipogammaglobulinemia, en el contexto de una candidiasis oral, y se inició tratamiento profiláctico de *Pneumocystis jirovecii* <sup>16</sup>.

**S34:** fue diagnosticado prenatalmente de quistes intracraneales. En el electrocardiograma se constató que existía un síndrome de Wolff-Parkinson-White. Desde el comienzo de su vida tuvo problemas para la alimentación y vómitos frecuentes. Aunque no presentaba oftalmoplejia, tenía un marcado nistagmo <sup>17</sup>.

Se llevaron a cabo una serie de tests para evaluar la capacidad auditiva, que sugirieron que existía una disminución de la audición <sup>17</sup>.

Las crisis convulsivas que presentaba eran parciales complejas: el electroencefalograma mostraba actividad de onda lenta, pero sin descargas epilépticas <sup>17</sup>.

Entre el resto de hallazgos estaban hepatomegalia, hernia umbilical, hipospadias y testículos sin descender. El examen neurológico reveló, además de hipotonía, presencia de signos del tracto piramidal (hiperextensión de las rodillas, reflejos tendinosos aumentados y un signo de Babinski + casi espontáneo) <sup>17</sup>.

**S35:** presentó prenatalmente polihidramnios y atrofia cerebelar. En la exploración física se constató que se trataba de un niño hipotónico con falta de tejido graso subcutáneo. Además de leves rasgos dismórficos faciales, presentaba brazos y piernas relativamente largos y delgados, manos grandes, dedos largos, uñas pequeñas y falanges distales algo anchas. Los testículos no estaban descendidos al escroto <sup>18</sup>.

**S36** presentó a las 18 horas inestabilidad de la temperatura y respiración profunda. Durante el curso clínico también aparecieron vómitos <sup>19</sup>.

El electroencefalograma a las 2 semanas no fue normal a causa de ondas en punta multifocales, ondas delta y discontinuidad excesiva durante el sueño, lo cual apuntaba hacia una encefalopatía inespecífica. No se halló actividad epiléptica alguna. Se descubrió asimismo una dilatación progresiva de la arteria pulmonar con *z-score* 5-6 <sup>19</sup>.

Por último, el paciente tuvo discapacidad visual de origen cerebral, atrofia del disco óptico, nistagmo y pérdida de audición neurosensorial leve-moderada <sup>19</sup>.

**S37:** hermano de **S36**, durante su ingreso se objetivaron importantes vómitos diarios. Tenía una agudeza visual de 20/190 a los 12 meses, y se constató nistagmo<sup>19</sup>.

**S38** presentaba nistagmo y defecto septo auricular junto a hipertrofia ventricular derecha.

**S39** presentaba nistagmo y tetralogía de Fallot

**S40** presentaba hipertensión pulmonar, foramen oval permanente y ductus arterioso persistente.

**S41** presentaba pérdida de audición, hipertrofia ventricular derecha, foramen oval permanente y ductus arterioso persistente.

**S44** presentaba hipertensión pulmonar, foramen oval permanente y ductus arterioso persistente.

**S45** presentaba una taquicardia supraventricular.

#### *4.4- ¿Qué hallazgos analíticos existen en pacientes con mutaciones en FBXL4?*

- En nuestra paciente **P1** se constató en sucesivas gasometrías de forma repetida ácidos lácticos elevados (cifra superior de 11,3), sin acidosis ni alteración de bicarbonato compensador, motivo por el que se amplió el estudio, siendo los siguientes resultados normales: coagulación y hemograma, ácido pirúvico, amonio, sulfiteo, cuerpos cetónicos en orina, transferrina con déficit de carbohidratos, prueba de talón, homocisteína, fondo de ojo.

Al alta continuaba con hiperlactacidemia (4,8) en todas las determinaciones, a pesar de tratamiento con bicarbonato y manteniendo un equilibrio ácido-base normal.

- En nuestro paciente **P2**, al 3<sup>er</sup> día de vida, coincidiendo con el comienzo del cuadro clínico, se realiza analítica que muestra hiperamoniemia e hiperlactacidemia con acidosis láctica grave, hiponatremia e hiperglucemia.

Al ingreso en neonatología se realizan hemograma, bioquímica e ionograma donde se objetivan: glucemia 414 mg/dL, creatinina 1.32 mg/dL, urato 636.3 umol/L (normal 100-330), amonio 224 umol/L y ácido láctico 25 mmol/L, sodio 142 mmol/L, potasio 3.30 mmol/L, calcio iónico 1.18 mmol/L, actividad de protrombina 50%.

En la gasometría: pH 7.13, pCO<sub>2</sub> 22.2 mmHg, pO<sub>2</sub> 99 mmHg, HCO<sub>3</sub>act 7 mmol/L, HCO<sub>3</sub>st 8.9 mmol/L, EB -20.6 mmol/L.

Se realizó también un estudio de metabolopatías, que consistió en un estudio de aminoácidos en plasma y un estudio de ácidos orgánicos en orina.

En plasma se encontró una elevación de alanina compatible con hiperlactacidemia, así como de glicina, glutamina y lisina, concordantes con la hiperamonemia, lo cual sugería una acidemia láctica primaria o secundaria a una acidemia orgánica.

En orina: acúmulo de los ácidos lácticos, 3-hidroxi-butírico, acetoacético y 2-hidroxi-butírico. Aunque en menor proporción, también están aumentados los ácidos atípico, subérico, subérico insaturado, 3-hidroxi-sebácico, p-hidroxi-fenil-láctico y p-hidroxi-fenil-pirúvico; acidosis láctica con cetosis y con afectación secundaria de la beta-oxidación mitocondrial.

Los hallazgos analíticos principales fueron por tanto hiperlactacidemia, hiperamonemia, hiperglucemia, hipocalcemia, hipopotasemia y coagulopatía (e hiponatremia en la primera evaluación).

A continuación se muestra una tabla (*Tabla 3*) de todos los pacientes junto a su tipo de mutación y las características analíticas más frecuentes: acidemia láctica, hiperamonemia, niveles de aminoácidos en plasma (alanina y lisina), junto a otros hallazgos menos frecuentes (glucemia, neutropenia). Se incluyen también aquellas anomalías detectadas en orina, si las hubiera:

Sujeto	Tipo mutación	Acidemia láctica	Hiperamonemia	Alanina ↑	Lisina ↑	Glucemia	Neutropenia	Orina
S1	Nonsense	+	-	/	/	/	/	/
S2	Nonsense	+	+	/	/	/	/	/
S3	Nonsense	+	-	/	/	/	/	/
S4	Nonsense	+	+	/	/	/	/	/
S5	Nonsense	+	/	/	/	/	/	/
S6	Nonsense	+	-	/	/	/	/	/
S7	Splicing	+	/	/	/	/	/	-
S8	Missense	+	-	+	/	N	-	Ácidos orgánicos ↑
S9	Missense	+	-	+	/	N	-	Ácidos orgánicos ↑
S10	Missense	+	/	+	/	N	-	Ácidos orgánicos ↑
S11	Missense	+	-	+	/	N	+	C3-carnitina ↑
S12	Missense	+	+	+	/	↓ (nacimiento)	+	Cetonuria
S13	Missense	+	+	+	/	N	+	Ácidos orgánicos ↑
S14	Missense/Nonsense	+	+	+	/	N	+	Ácidos orgánicos ↑
S15	Missense	+	+	+	/	N	+	Ácidos orgánicos ↑
S16	Missense	+				/	/	/
S17	Splicing	+				/	/	/
S18	Nonsense	+				/	/	/
S19	Missense	+				/	/	/
S20	Missense	+				/	/	/
S21	Missense	+				/	/	/
S22	Missense	+				/	/	/
S23	Nonsense	+				/	/	/
S24	Nonsense	+	54% (7/13)	62 % (8/13)	22% (2/9)	/	/	/
S25	Nonsense	+				/	/	/
S26	Missense	+				/	/	/
S27	Missense/Nonsense	+				/	/	/
S28	Missense	+				/	/	/
S29	Missense/Nonsense	+				/	/	/
S30	Nonsense	+				/	/	/
S31	Missense	+				/	/	/
S32	Nonsense	+				/	/	/
S33	Nonsense	+	-	+	-	N	+	Ácidos orgánicos ↑*
S34	Missense	+	-	+	+	N	-	Ácidos orgánicos ↑*
S35	Nonsense	+	-	-	+	N	-	Ácidos orgánicos ↑*
S36	Missense	+	+	+	+	↓	-	↓ intermediarios TCA
S37	Missense	+	+	+	+	N	-	↓ intermediarios TCA
S38	Nonsense	+	+	/	/	/	/	/
S39	Nonsense	+	-	/	/	/	/	/
S40	Nonsense/Missense	+	+	/	/	/	/	/
S41	Splicing/Missense	+	+	/	/	/	/	/
S42	Nonsense/Missense	+	+	/	/	/	/	/
S43	Missense	+	/	/	/	/	/	/
S44	Nonsense	+	+	/	/	/	/	/
S45	Nonsense/Missense	+	-	/	/	/	/	/
S46	Nonsense	+	/	/	/	/	/	/
P1	Missense/Splicing	+	-	/	/	/	-	-
P2	Missense	+	+	+	+	↑	-	Ácidos orgánicos ↑*

**Tabla 3**  
Alteraciones analíticas más características de pacientes con mutación en FBXL4. (N = normal)  
(TCA= ciclo de los ácidos tricarboxílicos)

\* Información suplementaria en páginas 17, 18 y 19

**S2** alcanzó niveles de lactato sérico de 18 mmol/l (rango normal 0.7-2.1 mmol/l) <sup>9</sup>.

**S7** fue diagnosticado de acidosis tubular renal a la edad de 4 meses <sup>9</sup>.

**S9** presentó intermitente niveles de lactato en plasma elevados <sup>13</sup>.

**S11** presentó acidosis tubular renal <sup>13</sup>.

**S12** los niveles de ácido láctico eran de 19 mM <sup>13</sup>.

**S13** presentó a los 9 meses un leve aumento de transaminasas y una anemia microcítica con niveles altos de ferritina <sup>13</sup>.

**S16-S32:** la glucemia fue normal en general, aunque se detectó hiperglucemia en un paciente e hipoglucemia en dos. La creatina quinasa estaba elevada en un 36% de pacientes (4/11) <sup>14</sup>.

La concentración plasmática de urea, creatinina, ácido úrico, amilasa y lipasa fueron normales en aquellos pacientes en los que se midió, y las transaminasas hepáticas fueron normales o se encontraron levemente elevadas <sup>14</sup>.

En líquido cefalorraquídeo (LCR) la glucosa fue normal (n=2) pero el lactato estaba elevado (n=4) <sup>14</sup>.

**S33:** el lactato en este paciente alcanzó niveles de 21.6 mmol/l inicialmente, que descendió hasta 4.3 mmol/l, y que permaneció elevado, no habiéndose registrado un lactato normal en ningún momento. Los aminoácidos en plasma también mostraron estar elevados, incluyendo serina (además de los reflejados en la tabla) <sup>16</sup>.

El perfil de acilcarnitinas reveló elevaciones difusas de acilcarnitinas de cadena corta, media y larga, así como de acetilcarnitinas y pequeñas cantidades de propionilcarnitina <sup>16</sup>.

Los ácidos orgánicos en orina demostraron resultados variables (se realizaron en más de una ocasión), encontrándose ácidos láctico, pirúvico y etilmalónico, cuerpos cetónicos, intermediarios del ciclo de Krebs y alfa-cetoácidos de cadena ramificada <sup>16</sup>.

**S34:** el nivel de lactato en plasma alcanzó los 20 mmol/L <sup>17</sup>.

A los 13 meses, tras iniciarse una dieta cetogénica, aparecieron niveles de transaminasas en sangre elevados (ALT 272 U/L, AST 197 U/L y GT 350 U/L) <sup>17</sup>.

En orina se encontraron niveles anormales de ácidos orgánicos, con niveles elevados de metabolitos del ciclo de Krebs, incluyendo ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido málico y ácido 2-cetoglutarico, además de niveles elevados de ácido 3-hidroxi-isovalérico, ácido 3-hidroxi-isobutírico, ácido glutárico y ácido etilmalónico <sup>17</sup>.

En plasma se encontraron niveles de prolina y tirosina ligeramente elevados. Se detectó además un patrón inespecífico de niveles elevados de varias acilcarnitinas <sup>17</sup>.

El nivel de lactato en LCR era también elevado, midiéndose a los 4 y 12 meses (7.0 y 7.5 mmol/L respectivamente) <sup>17</sup>.

**S35:** el piruvato estaba elevado (269  $\mu\text{mol/l}$ ), con un ratio lactato/piruvato (L/P) de 71 (normal <20) <sup>18</sup>.

El perfil de ácidos orgánicos en orina mostró un importante aumento de lactato (56540  $\mu\text{mol/mmol}$ ), y aumentos de 3-OH-butirato, piruvato, fumarato, malato y 4-OH-fenil lactato. Los aminoácidos prolina y lisina estaban elevados tanto en orina como en plasma <sup>18</sup>.

Los oligosacáridos en orina, acilcarnitinas y ácidos grasos de cadena muy larga en plasma fueron normales <sup>18</sup>.

**S36:** los niveles de lactato y amonio en plasma fueron de 27 mmol/L y 174  $\mu\text{mol/l}$  respectivamente. También se apreció una coagulación anormal con un INR de 2.63, tiempo de protrombina de 24.9, tiempo parcial de tromboplastina de 104.4 s y fibrinógeno de 114 mg/dL. La función hepática no estaba afectada, con una actividad de ALT de 14 unidades/L, una albúmina de 3.0 g/dL y bilirrubina total de 4.0 g/dL <sup>19</sup>.

Los análisis de aminoácidos en plasma demostraron además elevaciones de citrulina prolina, estando los niveles de glutamina y de aspartato dentro de valores normales (si bien los niveles de este último estaban en el límite inferior de normalidad) <sup>19</sup>.

**S37:** se descubrió un nivel de asparto en plasma disminuido con niveles aumentados de prolina <sup>19</sup>.

A los 24 meses de edad la punción lumbar reveló un nivel de ácido láctico en LCR de 10 mmol/L <sup>19</sup>.

#### 4.5- ¿Qué hallazgos radiológicos existen en estos pacientes?

Como se expondrá a continuación, la prueba de imagen fundamental en pacientes con mutaciones de FBXL4 es la resonancia magnética cerebral (RMN), si bien en ocasiones otras pruebas como el ecocardiograma o la ecografía prenatal pueden ser importantes para detectar comorbilidades.

- En nuestra paciente **P1** se empezó por realizar una ecografía abdominal y cardíaca, que resultaron ser normales.

En la ecografía cerebral sin embargo se apreciaron imágenes de calcificaciones periventriculares, un posible quiste subependimario en ventrículo izquierdo, megacisterna magna, ventrículo lateral izquierdo con paredes irregulares e hiperecogenicidad llamativa en lóbulo frontal izquierdo.

En la resonancia magnética se confirmó la megacisterna magna, y se observaron múltiples focos de alteración de intensidad de señal en hemisferios cerebelosos, cortical de lóbulo temporal izquierdo, en surcos caudotalámicos próximos al agujero de monro, parasagital posterior derecho y probablemente intraventriculares, así como discreta atrofia del lóbulo temporal izquierdo. Todo esto era compatible con focos de sangrado y/o calcificación (que sugirieron infección prenatal en un primer momento).

Por último, se realizó un TC craneal, en el que se informó de dos imágenes puntiformes hiperdensas intraventriculares en plexos coroideos de atrio izquierdo y asta frontal derecha en relación con pequeños focos hemorrágicos; así como dos focos puntiformes de sangrado extraaxiales en fosa posterior; y megacisterna magna, descartándose calcificaciones.

- En nuestro paciente **P2** se realizaron únicamente una radiografía de tórax, que mostró una silueta cardíaca y unos campos pulmonares de aspecto normal, y una ecografía transfontanelar, en la que se constató germinolisis bilateral triloculada en lado derecho y 2 a 3 quistes en el izquierdo; también se describió una hiperecogenicidad extensa que parecía corresponder a hemorragia retrocerebelosa, con cisterna magna agrandada. Dados estos hallazgos y teniendo en cuenta el pronóstico fatal, no se realizan ni RMN ni EEG.

A continuación se muestra una tabla (*Tabla 4*) de todos los pacientes junto a su tipo de mutación y las características radiológicas más frecuentes: atrofia cerebral, anomalías del tronconencéfalo, dilatación de ventrículos laterales, mielinización retrasada, megacisterna magna, quistes intraventriculares o periventriculares, anomalías de los ganglios basales e hipoplasia cerebelosa:

Sujeto	Tipo mutación	Atrofia cerebral	A. troncoencéfalo	Dilatación VL	Miel. Ret.	Mcis Magna	Quistes*	AGB	Hipo. CRBL
S1	Nonsense	+	-	-	-	-	-	-	-
S2	Nonsense	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	Nonsense	+	-	+	-	-	-	-	+
S4	Nonsense	/	/	/	/	/	/	/	/
S5	Nonsense	/	/	/	/	/	/	/	/
S6	Nonsense	-	+	-	-	+	-	-	-
S7	Splicing	+	+	-	+	-	-	+	-
S8	Missense	/	/	/	/	/	/	/	/
S9	Missense	+	-	-	-	+	+	-	-
S10	Missense	/	/	/	/	/	/	/	/
S11	Missense	+	-	-	+	-	-	+	-
S12	Missense	-	-	-	+	-	-	-	-
S13	Missense	+	-	-	+	-	-	-	-
S14	Missense/Nonsense	+	-	-	+	-	+	+	-
S15	Missense	+	-	-	+	-	-	+	-
S16	Missense			/		/			
S17	Splicing			/		/			
S18	Nonsense			/		/			
S19	Missense			/		/			
S20	Missense			/		/			
S21	Missense			/		/			
S22	Missense			/		/			
S23	Nonsense			/		/			
S24	Nonsense	66% (4/6)	50% (3/6)	/	83% (5/6)	/	80% (4/5)	40% (2/5)	40% (2/5)
S25	Nonsense			/		/			
S26	Missense			/		/			
S27	Missense/Nonsense			/		/			
S28	Missense			/		/			
S29	Missense/Nonsense			/		/			
S30	Nonsense			/		/			
S31	Missense			/		/			
S32	Nonsense			/		/			
S33	Nonsense	-	-	+	+	-	+	-	-
S34	Missense	+	-	+	+	-	+	-	-
S35	Nonsense	+	-	-	-	+	+	-	+
S36	Missense	+	+	-	-	-	-	+	+
S37	Missense	+	-	-	-	-	-	-	+
S38	Nonsense	+	/	/	/	/	/	/	/
S39	Nonsense	+	/	/	/	/	/	/	/
S40	Nonsense/Missense	/	/	/	/	/	/	/	/
S41	Splicing/Missense	-	/	/	/	/	/	/	/
S42	Nonsense/Missense	-	/	/	/	/	/	/	/
S43	Missense	/	/	/	/	/	/	/	/
S44	Nonsense	/	/	/	/	/	/	/	/
S45	Nonsense/Missense	/	/	/	/	/	/	/	/
S46	Nonsense	/	/	/	/	/	/	/	/
P1	Missense/Splicing	+	-	-	-	+	+	-	-
P2	Missense	/	/	-	/	+	+	/	/

**Tabla 4**  
Alteraciones radiológicas más características de pacientes con mutación en FBXL4. (A. troncoencéfalo = anomalías troncoencéfalo) (VL= ventrículos laterales) (Miel. Ret. = mielinización retrasada) (Mcis= megacisterna) (AGB= anomalías ganglios basales) (Hipo. CRBL= hipoplasia cerebelosa)

\* Quistes o pseudoquistes intraventriculares o periventriculares



**S2** fue el único sujeto con una resonancia magnética cerebral (RMN) normal <sup>9</sup>.

**S7:** se visualizó un cuerpo calloso delgado. En la espectroscopia cerebral se apreció un pico de lactato elevado <sup>9</sup>.

**S9:** se observó un cuerpo calloso delgado. El quiste era aracnoideo <sup>13</sup>.

**S11:** se visualizó un cuerpo calloso delgado y leucodistrofia <sup>13</sup>.

**S12:** se visualizó un cuerpo calloso delgado y leucodistrofia <sup>13</sup>.

**S13:** cabe destacar el valor de la ecografía prenatal, que reveló retraso en el crecimiento. Se constató leucodistrofia <sup>13</sup>.

**S14:** Existía un quiste aracnoideo, visualizándose además quistes múltiples que se localizaban en cápsula interna y putamen. Se constató leucodistrofia <sup>13</sup>.

**S15:** se observó un cuerpo calloso delgado y leucodistrofia <sup>13</sup>.

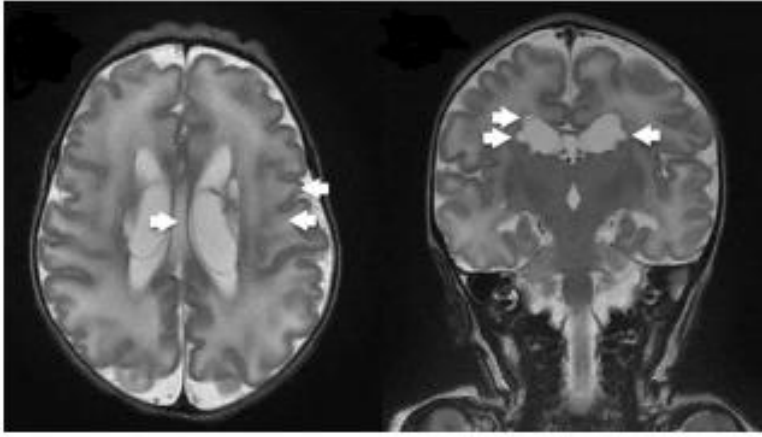
**S16-S32:** en un 100% de casos se apreció un aumento de la señal de sustancia blanca en secuencia potenciada en T2, con la correspondiente reducción de señal en la secuencia potenciada en T1. Además, la sustancia blanca parecía hinchada, indicando un incremento en el contenido de agua. En algunos pacientes se disponía de la secuencia de difusión, en la que se constató una difusión incrementada en la sustancia blanca supratentorial y una restricción de la difusión en los tractos del tegmento dorsal (n=4) y en el brazo posterior de la cápsula interna (n=1) <sup>14</sup>.

De 6 pacientes en los cuales se realizaron imágenes crónicamente, existían espacios pericerebelares prominentes en 5 de los pacientes <sup>14</sup>.

**S32:** presentó además un gran infarto de hemisferio derecho a los 10 años, e infarto de hemisferio izquierdo en la región parietal posterior y occipital 2 años después <sup>14,15</sup>.

**S33:** la RMN cerebral en el primer día de vida demostró hiperintensidad difusa en T2 de la sustancia blanca supratentorial, concordante con edema. Los quistes eran bilaterales, intraventriculares y periventriculares, y la falta de mielinización era más evidente en el brazo posterior de la cápsula interna <sup>16</sup>.

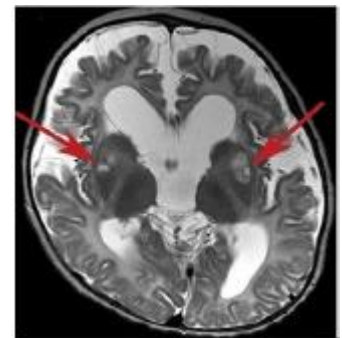
La espectroscopia cerebral identificó un doblete de lactato en los ganglios de la base. La ecocardiografía y el monitor Holter demostraron signos concordantes con hipertensión pulmonar y taquicardia auricular ectópica <sup>16</sup>.



**Fig 10** RMN de **S33** a los 5 días de vida, mostrando edema difuso de sustancia blanca (ver flechas) y quistes bilaterales intra- y periventriculares

**S34:** se realizó además una espectroscopia a los 12 meses en la que se aprecian picos grandes de lactato tanto en parénquima como en LCR <sup>17</sup>.

**Fig 11** RMN potenciada en T2 de **S34**, mostrando pérdida de volumen generalizada, principalmente en sustancia blanca, señal hiperintensa de sustancia blanca y agrandamiento secundario del sistema ventricular y espacios externos subaracnoideos (flechas rojas)

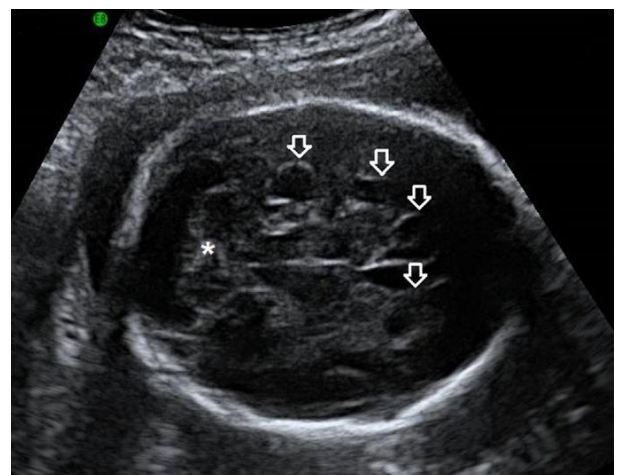


**S35:** A las 25+5 semanas la ecografía confirmó el polihidramnios y mostró un estómago lleno de líquido <sup>18</sup>.

El diámetro transcerebelar fue de 25.44 mm (<P3) <sup>18</sup>.

La ecografía cerebral en el primer día de vida mostró hemorragias bilaterales peri e intraventriculares <sup>18</sup>.

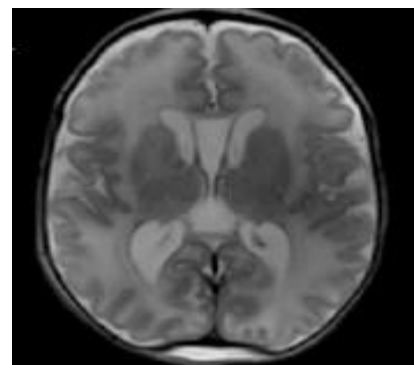
Tras el fallecimiento se confirmaron los hallazgos de la ecografía por medio de RMN, apreciándose hemorragias bilaterales extensas intra y periventriculares, con quiste adyacente, además de un pseudoquiste retrocerebeloso <sup>18</sup>.



**Fig 12** Ecografía cerebral de **S35** en la semana 25+5. Se aprecia hipoplasia cerebelar y dilatación límite de los ventrículos laterales. Los bordes de algunos quistes periventriculares también son visibles (ver flechas)

**S36:** la RMN en el sexto día de vida demostró hiperintensidad difusa en T2 en la sustancia blanca profunda y subcortical supratentorial: lóbulos frontal, parietal, occipital y temporal. Además del cerebelo, el troncoencéfalo era hipoplásico también <sup>19</sup>.

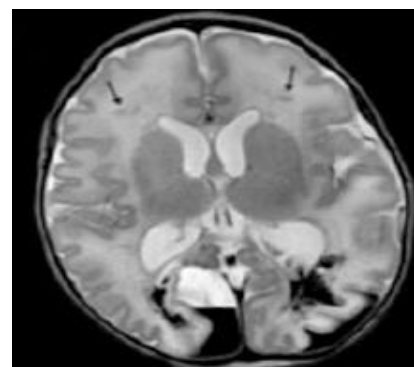
Las anomalías de los ganglios de la base consistieron en cavitación sin alteraciones en la difusión <sup>19</sup>.



**Fig 13** RMN axial potenciada en T2 de **S36** a los 6 días de vida. Se observa hiperintensidad difusa de de sustancia blanca periventricular y subcortical

**S37:** se constató prenatalmente un agrandamiento del espacio retrocerebelar. La RMN de la primera semana permitió observar hemorragias extensas en el parénquima, ventrículos y espacios extraaxiales <sup>19</sup>.

La espectroscopia cerebral descubrió un importante doblete invertido que indicaba lactato elevado en el cerebro <sup>19</sup>.



**Fig 14** RMN axial potenciada en T2 de **S37** a los 5 días de vida. Se objetivan áreas extensas de hemorragia intraparenquimatosa e intraventricular en ambos lóbulos parietal y occipital. Se observan áreas más pequeñas de hemorragia en el trayecto teórico de las venas medulares en la sustancia blanca frontal (ver flechas)

La RMN a los 24 meses de edad constató hiperintensidad persistente de sustancia blanca en T2, así como atrofia progresiva predominantemente frontotemporal, porencefalia y encefalomalacia en los lóbulos parietal y occipital (coincidiendo con los sitios de hemorragia previa) <sup>19</sup>.

**S38, S39, S41, S42 y S46:** se constató además leucodistrofia <sup>7</sup>.

#### 4.6- *¿Qué cambios bioquímicos y moleculares encontramos en estos pacientes?*

- En nuestra paciente **P1** se detectó una depleción del mtDNA al 85%. No se llevaron a cabo más análisis bioquímicos/moleculares.
- En nuestro paciente **P2** se encontraron unos niveles de mtDNA del 7% respecto a los valores normales. No se llevaron a cabo más análisis bioquímicos/moleculares

A continuación se muestra una tabla (*Tabla 5*) de todos los pacientes junto a su tipo de mutación y el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (citrito sintasa, complejos respiratorios I, II, III, IV y V y complejo piruvato deshidrogenasa) de dichos pacientes en biopsia muscular (si no se especifica lo contrario). Se incluyen además los niveles de mtDNA.

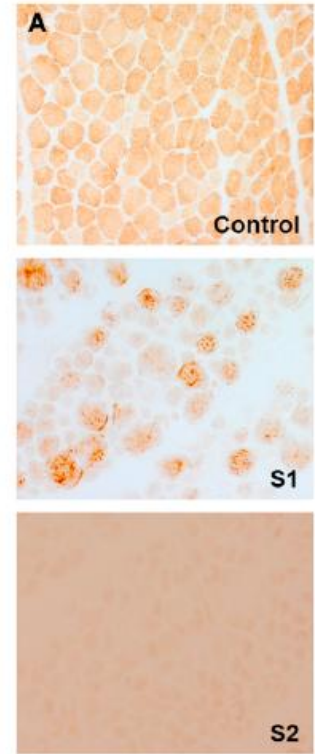
Sujeto		CS	CI	CII	CIII	CI-III	CII-III	CIV	CV	PDHC	mtDNA
S1	<i>Nonsense</i>	↓ (60%)	↓	↓	↓	/	/	↓	/	/	↓ (30%)
S2	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S3	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S4	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S5	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S6	<i>Nonsense</i>	↓	↓	↓	↓	/	/	↓	/	/	↓ (<10%)
S7*	<i>Splicing</i>	↓ (33%)	↓ (45%)	↓	/	/	↓ (66%)	↓ (42%)	/	N	↓ (30%)
S8*	<i>Missense</i>	N (114%)	N (111%)	/	/	/	N (108%)	N (103%)	/	/	↓
S9*	<i>Missense</i>	N	N	N	N	N	N	N	/	N	↓
S10	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S11	<i>Missense</i>	↓ (84%)	↓ (66%)	↓ (34%)	↓ (14%)	↓ (9%)	↓ (21%)	↓ (44%)	/	↓ (44%)	↓
S12	<i>Missense</i>	↓ (43%)	↓ (24%)	↓ (84%)	N (103%)	/	/	↓ (75%)	/	/	↓
S13	<i>Missense</i>	↓ (43%)	↓ (63%)	↓ (50%)	↓ (72%)	↓ (59%)	↓ (43%)	↓ (23%)	↓	↓ (31%)	↓
S14	<i>Missense/Nonsense</i>	↓ (18%)	↓ (34%)	↓ (65%)	↓ (59%)	↓ (27%)	↓ (57%)	↓ (25%)	↓	/	↓
S15	<i>Missense</i>	↓ (51%)	↓ (61%)	↓ (52%)	↓ (56%)	↓ (60%)	↓ (56%)	↓ (56%)	↓	↓ (64%)	↓
S16	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S17	<i>Splicing</i>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S18	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S19	<i>Missense</i>	↓	N	N	N	/	/	N	N	N	↓
S20	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S21	<i>Missense</i>	/	↓	/	/	/	/	/	/	/	↓
S22	<i>Missense</i>	↓	↓	↓	↓	/	/	↓	↓	↓	↓
S23	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	↓	/	/	↓
S24	<i>Nonsense</i>	/	N	N	N	/	/	N	N	↓	↓
S25	<i>Nonsense</i>	/	↓	/	↓	/	/	↓	/	/	↓
S26	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S27	<i>Missense/Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S28	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S29	<i>Missense/Nonsense</i>	↓	/	/	/	/	/	↓	/	↓	↓
S30*	<i>Nonsense</i>	N	N	N	N	/	/	N	N	N	↓
S31	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S32*	<i>Nonsense</i>	↓	/	↓	↓	/	/	↓	/	/	↓
S33	<i>Nonsense</i>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓ (37%)
S34	<i>Missense</i>	N	N	N	N	/	N	N	/	/	↓
S35	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	↓
S36	<i>Missense</i>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	/	N	/
S37	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S38	<i>Nonsense</i>	/	↓	/	/	/	/	↓	/	/	↓ (22%)
S39	<i>Nonsense</i>	/	↓	/	/	/	/	↓	/	/	/
S40	<i>Nonsense/Missense</i>	/	/	↓	/	/	↓	/	/	/	/
S41	<i>Splicing/Missense</i>	/	N (95%)	↓	/	N (131%)	↓	N (93%)	/	/	/
S42	<i>Nonsense/Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S43	<i>Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S44	<i>Nonsense</i>	/	/	/	/	↓	↓	/	/	/	/
S45	<i>Nonsense/Missense</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
S46	<i>Nonsense</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	/
P1	<b><i>Missense/Splicing</i></b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	↓ (85%)
P2	<b><i>Missense</i></b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	↓ (7%)

**Tabla 5** Análisis de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y niveles de mtDNA en biopsia muscular de pacientes con mutación en FBXL4 (excepto en aquellos pacientes con \*, en los cuales se han medido en biopsia de piel). (CS = citrato sintasa (CI, CII, CIII, CIV, CV = complejo de la cadena respiratoria I, II, III, IV Y V) (PDHC = complejo piruvato deshidrogenasa) (mtDNA = DNA mitocondrial) (N=normal)

\*biopsia de piel en vez de muscular

Además de los datos recogidos en la tabla 5, dos de los estudios reflejados en ella, Bonnen et al (2013) y Gai et al (2013) han resultado fundamentales para profundizar en la fisiopatología de estas mutaciones (se hace referencia a los sujetos según la nomenclatura de este trabajo, y no la de la publicación original):

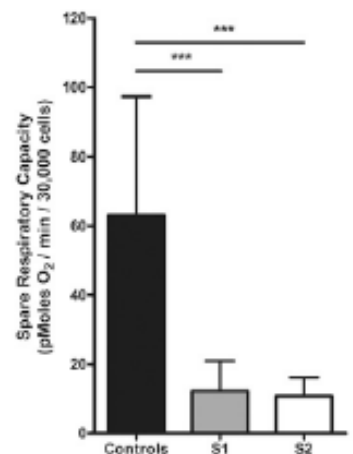
- En Bonnen et al (2013), el análisis histológico e histoquímico de S1 y S6 mostró una actividad de COX reducida (si bien se objetivó una actividad puntual de dichas fibras en el sarcoplasma en S1). Igualmente, la tinción con tricrómico de Gomori modificado permitió descubrir leves acúmulos subsarcolémicos en ambos casos, y en la biopsia de músculo esquelético de S7 se apreciaron cambios ligeros en el tamaño de las fibras, predominio de fibras tipo 2, unas pocas fibras con un leve aumento del contenido de glucógeno y en ocasiones mitocondrias aumentadas



**Fig 15** Actividad histoquímica de COX en biopsia muscular de S1 y S6, que se encuentra disminuida respecto al control. Existe una discreta actividad enzimática puntual en las fibras COX positivas de S1. (S2=S6)

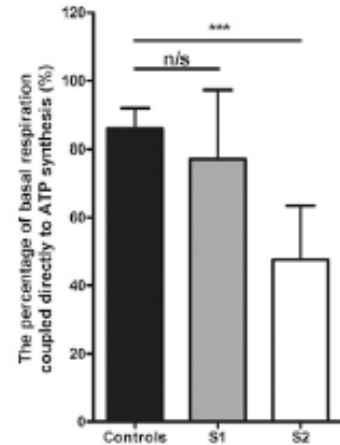
Por medio de micropolarografía se constató una reducción significativa tanto de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) basal como de la máxima en S1, lo cual derivaba en una síntesis disminuida de ATP por el sistema OXPHOS, razón por la cual se halló una glucólisis aumentada (compensatoria) en los fibroblastos de los sujetos afectados.

La capacidad respiratoria de reserva de los fibroblastos en S1 y S2 estaba significativamente disminuida respecto a los controles, lo cual sugería que las mitocondrias estaban trabajando a una capacidad cercana a la máxima, y que por lo tanto la capacidad para responder a situaciones de mayor demanda o de estrés estaba muy limitada.



**Fig 16** Habilidad de los fibroblastos de S1 y S6 para responder al estrés, medido según el OCR máximo - OCR basal. Esta respuesta al estrés se encuentra significativamente reducida en comparación a los controles. (S2=S6)

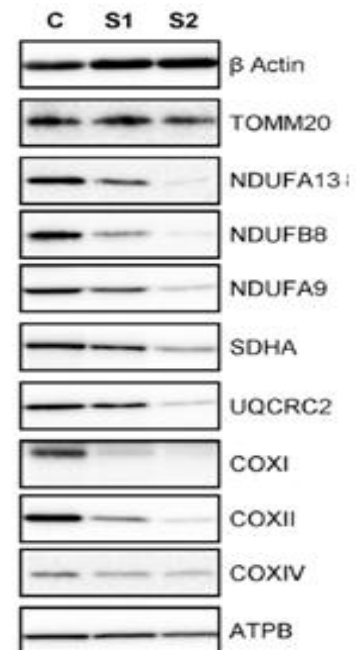
Además, la eficiencia del acoplamiento de la respiración y la síntesis de ATP estaban dañadas en los fibroblastos de S2, indicando un aumento de la fuga de protones a través de la membrana (los fibroblastos de S1 tenían un acoplamiento de ATP correcto). Por si esto fuera poco, los niveles de subunidades de complejos de la cadena respiratoria en estado estable, que contenían subunidades codificadas en el mtDNA, resultaron encontrarse significativamente reducidos tanto en S1 como en S6.



**Fig 17** OCR sensible a oligomicina expresado como porcentaje respecto al OCR basal. La eficiencia del acoplamiento de la respiración a la síntesis de ATP estaba disminuida en fibroblastos de S6 pero no de S1, en comparación a los controles. (S2=S6)

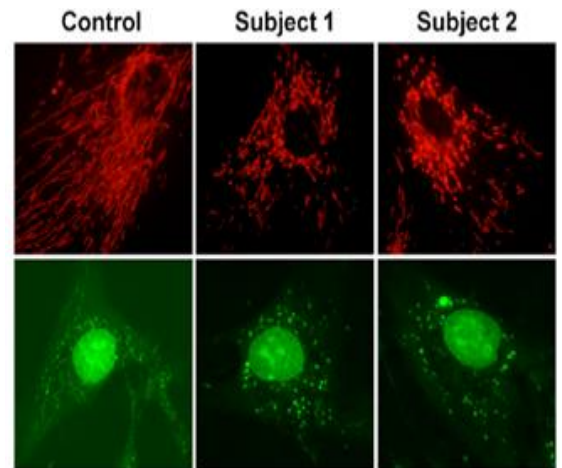
El marcador mitocondrial TOMM20 permaneció inalterado en los fibroblastos de los pacientes, lo cual confirmó un contenido mitocondrial de proteínas normal y subrayó que existía un problema específico de la biogénesis de las subunidades del sistema OXPHOS.

**Fig 18** Immunoblotting de los componentes proteicos de cada uno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Se comprobaron tres subunidades del complejo I (NDUFA13, NDUFB8 y NDUFA 9), una del complejo II (SDHA), una del complejo III (UQCRC2), tres del complejo IV (COXI, COXII y COXIV) y una del complejo V (ATPB), con TOMM20 como marcador mitocondrial y  $\beta$ -actina como control de carga. (S2=S6)



La evaluación de la morfología mitocondrial permitió constatar una importante fragmentación y acortamiento de las mitocondrias.

**Fig 19** Alteraciones morfológicas mitocondriales. Las imágenes de arriba se han realizado con Mitotracker tinción roja, tanto del control como de S1 y S6 (Subject 2). Se observa una fragmentación y acortamiento de la mitocondria en ambas líneas celulares en comparación al control. Las imágenes inferiores muestran la tinción de nucleoides con PicoGreen, tanto del control como de S1 y S6 (Subject 2), constatándose nucleoides más grandes de lo habitual con agrupación perinuclear.



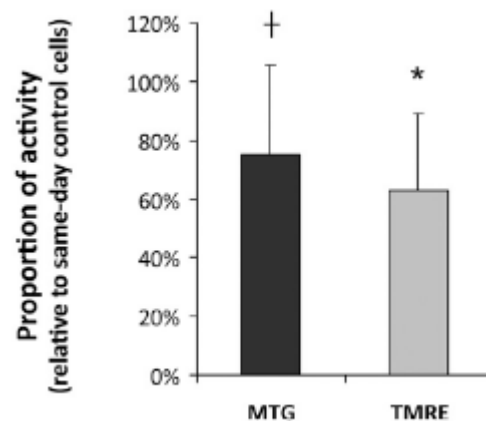
- En Gai et al (2013) también se llevaron a cabo evaluaciones bioquímicas tanto en músculo como en fibroblastos para observar el efecto que tenían las mutaciones de FBXL4 en la bioenergética mitocondrial.

Se constató una tasa máxima de consumo de oxígeno reducida en cultivos de fibroblastos de la piel de los pacientes.

La tinción con un marcador fluorescente específico de mitocondrias (MitoTracker Red) reveló una marcada fragmentación de la red mitocondrial de las líneas celulares de S11 y S12 [como ya se había constatado en Bonnen et al (2013)].

Por último, en la línea celular de S6 se encontró una reducción significativa y consistente del potencial de membrana mitocondrial, así como un descenso de la masa mitocondrial en S11 y S12.

**Fig 20** Reducciones en la masa mitocondrial y en el potencial de membrana en fibroblastos de S11, indicadas por medio de las reducciones de fluorescencia en MitoTrackerGreen y TMRE respectivamente. Las barras representan los valores de fluorescencia relativa comparados con las medidas obtenidas en fibroblastos control. El asterisco indica reducciones estadísticamente significativas, y la cruz indica una tendencia hacia una reducción significativa en la fluorescencia MTG.





En el resto de publicaciones no se describen con detalle los análisis histológicos, histoquímicos, moleculares... llevados a cabo a partir de las muestras obtenidas de los pacientes, pero en ocasiones se describen los hallazgos de dichas exploraciones:

- En Huemer et al (2015, **S16-S32**) los ligeros acúmulos subsarcolémicos ya observados en Bonnen et al (2013), en ausencia de fibras rojas rasgadas, volvían a estar presentes. Además, la inmunohistoquímica reveló una disminución del número de mitocondrias positivas a la tinción para todas las enzimas de la fosforilación oxidativa y la porina. Por último, existía un descenso de los gránulos positivos, pero la intensidad no estaba afectada, lo cual es comparable a la tinción de la actividad de COX.

- En **S33** la micropolarografía mostro OCR reducidos, tanto en reposo como tras estimulación. La tasa de acidificación extracelular estimulada con glucosa y oligomicina en las células se potenció, sugiriendo una dependencia excesiva de la glucólisis relativa a la fosforilación oxidativa. El ratio de lactato respecto a piruvato se encontraba ligeramente elevado (27.6) en fibroblastos, a pesar de la marcada hiperlactacidemia e hiperalaninemia del paciente.

La microscopía confirmó fragmentación de la red mitocondrial, y la valoración del contenido mitocondrial y de la carga de la membrana interna mostró una reducción del potencial de la membrana interna sin diferencia en el contenido mitocondrial.

Por último determinación de glutatión (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG) por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) evidenció una alteración del equilibrio redox, en concreto bajos niveles de glutatión reducida y un cociente GSH:GSSG significativamente bajo.

.

En **S36** se presentan los hallazgos de la biopsia muscular a los 8 meses de edad: con una leve variación en el tamaño del diámetro de las fibras tipo 1 principalmente; tejido conectivo normal y estructuras miofibrilares en ausencia de fibras rojas rasgadas mediante tricómico; contenido y apariencia normal de glucógeno mediante tinción PAS; contenido normal del lípidos con tinción ORO (Oil Red O); NADH, ATPasa, COX y succinato deshidrogenasa normales.

En la microscopía electrónica se constataron mitocondrias normales en número, morfología y distribución.

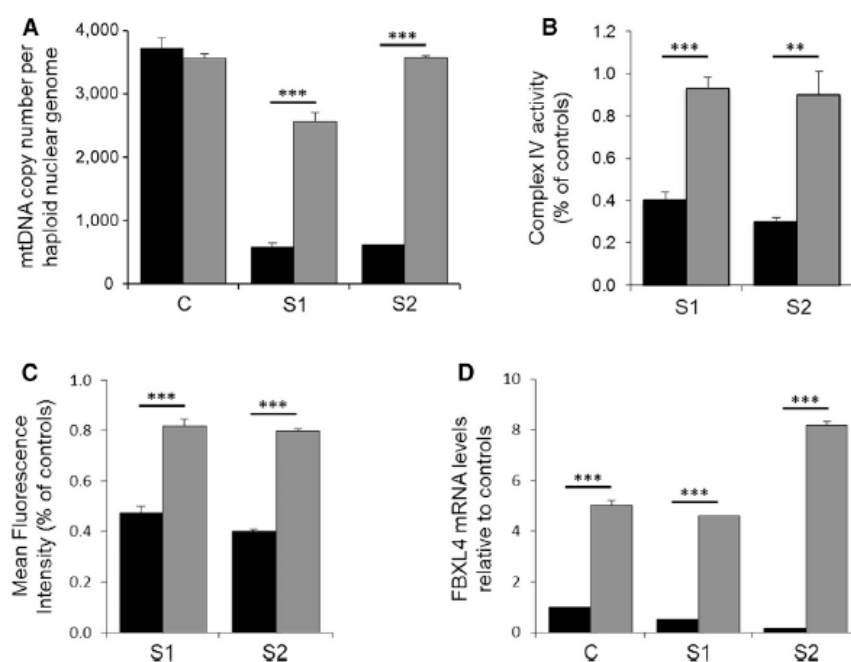
#### 4.7- ¿Las mutaciones de FBXL4 provocan enfermedad?

- En Bonnen et al (2013), para verificar que los cambios en la fisiología y estructura mitocondrial encontrados eran debidos a las mutaciones descubiertas en FBXL4, se realizaron experimentos similares a los ya descritos, en los que una copia *wild-type* de FBXL4 o un control negativo (EGFP) fue liberada viralmente en células de pacientes afectados (S1 y S6).

Las células de S1 y S6 que expresaban GFP no mostraron mejoría significativa en cuanto a deficiencia del complejo IV, potencial de membrana o depleción de mtDNA.

Sin embargo, las células de S1 y S6 que expresaban FBXL4<sup>wt</sup> demostraron un rescate completo de los niveles de mtDNA, de la actividad del complejo IV y del potencial de membrana. Además, los fibroblastos usados como control que expresaban FBXL4 no mostraron diferencia respecto a las células afectas en cuanto a número de copias de mtDNA o actividad bioquímica.

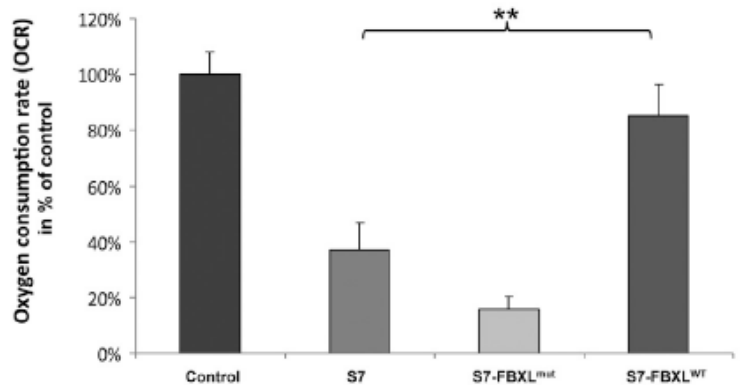
Todos estos datos nos dan una evidencia inequívoca de que las mutaciones autosómicas recesivas de FBXL4 causan una disminución del número de copias de mtDNA y que se asocian a defectos en el sistema OXPHOS en humanos.



**Fig 21** Los fibroblastos fueron transducidos bien con GFP (columnas negras) o FBXL4 *wild-type* (columnas grises, y comparados con fibroblastos control (C). A muestra el número de copias de mtDNA, B la actividad del complejo IV y C el potencial de membrana, los cuales se restauraron a valores normales en fibroblastos de S1 y S6 (S2 en las imágenes) que habían sido transfectados con FBXL4<sup>wt</sup>, pero no en aquellos con GFP. D muestra los niveles de mRNA de FBXL4, que aumentaron en los fibroblastos control, S1 y S2 transfectados con FBXL4<sup>wt</sup>, pero no en aquellos transfectados con GFP.

- En Gai et al (2013), con el fin de comprobar la patogenicidad de las mutaciones identificadas, se llevó a cabo un rescate bioquímico del sistema OXPHOS deficiente de fibroblastos de la piel de S13, por medio de la expresión de cDNA de FBXL4<sup>wt</sup> usando como vector p.Lenti6.3/V5-TOPO. Esto condujo a un aumento significativo de la tasa de oxígeno consumido.

Además, se puso a prueba la actividad de un alelo mutado de FBXL4. Tras la expresión de FBXL4<sup>mut</sup> la tasa de consumo de oxígeno, que había sido del 38% respecto a los controles en S13, se redujo incluso más, indicando una pérdida de función como consecuencia del cambio de aminoácido p.Arg206Leu.



**Fig 22** OCR de líneas celulares de fibroblastos transducidos y no transducidos. Los fibroblastos de S13 (S7 en la imagen) y los controles fueron transducidos con FBXL4 *wild-type* y FBXL4 mutada. El OCR se determinó como tasa de respiración sensible a rotenona de mitocondrias desacopladas (n>7) y aumentó significativamente después de la expresión de FBXL4<sup>wt</sup> sola. Los datos se representan como la media +/- una desviación estándar.

Al tener en cuenta todos estos resultados, se demostró la culpabilidad de estas mutaciones como causantes de la enfermedad, y confirmó que FBXL4 es un gen necesario para la homeostasis de la bioenergética mitocondrial.

#### 4.8- ¿Qué tratamientos se han ensayado en estos pacientes?

- Es importante destacar en primer lugar que no existe un tratamiento definitivo ni mucho menos curativo en estos pacientes, y que los tratamientos empleados, cuando se han utilizado, han sido de soporte/sintomáticos/de corrección de parámetros bioquímicos:

En nuestra paciente P1, sólo queda constancia de la prescripción al alta de un tratamiento continuado con bicarbonato, que no consigue disminuir los niveles de ácido láctico en sangre, permaneciendo estos elevados en todas las determinaciones.

En nuestro paciente P2, se procedió a la intubación endotraqueal y ventilación mecánica, administración de varias dosis de bicarbonato endovenoso, insulina endovenosa en bomba y tres dosis de adrenalina en el 3<sup>er</sup> día de vida.

En la unidad de neonatología se llevan a cabo una serie de tratamientos, entre los que se encuentran:

**Hemodinámico:** soporte inotrópico con dopamina en las primeras 24 horas. Posteriormente se retiran y mantiene TA y ritmo de diuresis adecuados de forma espontánea.

**Respiratorio:** presenta algún episodio de desaturación compatible con hipertensión pulmonar, que se controla aumentando la FiO2 transitoriamente.

**Infeccioso:** recibe antibioterapia por manipulación con ampicilina y gentamicina (el resultado de los cultivos es negativo)

**Metabólico:** a causa de la acidosis láctica grave con hiperamonemia secundaria, y con la sospecha de error congénito del metabolismo, se inicia tratamiento según pauta habitual con aporte energético elevado (100-120 cal/kg/día, glucolípido exclusivo), restricción proteica, L-carnitina, arginina y vitaminas (biotina, hidroxicoalamina, piridoxina, riboflavina y tiamina). A las doce horas, orientado el diagnóstico hacia academia láctica, se suspende arginina. En las analíticas en las siguientes 24 horas al ingreso muestra buena respuesta al tratamiento con normalización de la gasometría, resolución de la acidosis metabólica y corrección del bicarbonato, el déficit de bases y la hiperamonemia.

Se administra además insulina en bomba de infusión continua por hiperglucemia, corrección de la hipocalcemia con gluconato cálcico con aumento del aporte parenteral del mismo y corrección de la hipopotasemia con cloruro potásico con aumento del aporte parenteral.

**Neurológico:** pseudoanalgesia con fentanilo y midazolam a dosis habituales las primeras 24 horas. Se suspende posteriormente el midazolam, manteniendo el fentanilo.

**Digestivo:** dieta absoluta desde el ingreso, protección gástrica con ranitidina.

**Hematológico:** dos dosis de vitamina K (1 y 2 mg) por coagulopatía.

Respecto a los pacientes publicados en la literatura:

**S7** requirió de gastrostomía endoscópica percutánea, a causa de problemas importantes para la alimentación

**S10** recibe tratamiento antiepiléptico por presentar convulsiones.

**S11** requirió gastrostomía endoscópica percutánea (por alteraciones de la motilidad gastrointestinal graves y dificultad para la deglución).

**S12** a los 4 meses necesitó alimentación por sonda nasogástrica y máscara de ventilación con presión positiva espiratoria por insuficiencia ventilatoria.

**S13** comenzó a recibir alimentación por sonda nasogástrica en el período neonatal (a causa de escasa ganancia ponderal).

**S16-S32:** los enfoques de tratamiento incluyeron coenzima Q<sub>10</sub> en 6 pacientes, bicarbonato sódico a largo plazo en 4, carnitina en 4, riboflavina en 3 y tiamina, biotina, vitamina D, citrato de sodio y folato en 2 sujetos cada uno. Además se empleó bezafibrato, dieta rica en grasas y dieta baja en proteínas en un caso cada uno.

En **S32** tras el primer episodio cerebrovascular, se inició tratamiento con L-citrulina oral, que fracasó en su intento de prevenir un nuevo episodio. La L-arginina oral, que había demostrado tener un efecto beneficioso en esta clase de cuadros, no fue tolerada por la paciente a causa de discomfort abdominal y náuseas.

En conjunto, un 57% de los 21 pacientes recibió más de una medicación, y un 38% no recibieron un tratamiento específico 'mitocondrial'. Los sanitarios afirmaron que sus pacientes no mostraban respuesta bioquímica al tratamiento en un 61% de los casos y que no mostraban respuesta clínica al tratamiento en un 72%.

**S33:** tras la detección de una taquicardia ectópica auricular, se inicio tratamiento con flecainida.

Se inició en el sujeto terapia con cofactor que incluía carnitina, riboflavina, ubiquinona, biotina y tiamina, sin efecto beneficioso aparente. Por último, tras la aparición de una inmunodeficiencia, se inició profilaxis frente *Pneumocystis Jirovecii*.

**S34:** durante las primeras 24 horas de vida, se trató la acidosis metabólica grave (20 mmol/L) con bicarbonato sódico. Desde el período neonatal fue necesaria alimentación por sonda nasogástrica, que fue sustituida por gastrostomía endoscópica percutánea a los 7 meses.

Además, a causa de sospecha de defecto en el complejo piruvato deshidrogenasa, se inició a los 13 meses una dieta cetogénica, que provocó un aumento de las transaminasas, motivo por el cual se suspendió.

**S35:** al nacer el paciente requirió de CPAP y fue trasladado a la UVI. Unas pocas horas después del nacimiento necesitó ventilación mecánica y tratamiento con surfactante por síndrome de distress respiratorio. Apareció además hipotensión que fue tratada con bolos de fluido, junto a soporte inotrópico y antibiótico.

**S36:** se trató la hiperamonemia inicial con infusión continua con benzoato de sodio y fenilacetato sódico, corrigiéndose la acidosis por medio de bicarbonato sódico.

En la UVI neonatal se comenzó tratamiento con citrato, aspartato, biotina, carnitina y tiamina. Tanto los niveles de lactato en plasma como la hiperamonemia se resolvieron. Más tarde se administró trihexanoína como sustituto anaplerótico del ciclo de Krebs, pero se tuvo que interrumpir por la aparición de vómitos.

A causa de la hipertensión pulmonar se requirió óxido nítrico inhalado durante la primera semana de vida, hasta que se resolvió.

Tras el alta de la UVI neonatal se continuó el tratamiento con biotina, ácido L-aspártico, aspartato enteral, ácido cítrico-citrato potásico y bicarbonato sódico. Por último, cabe destacar la necesidad de diálisis durante los ingresos de repetición por hiperamonemia.

**S37:** requirió de alimentación por tubos de gastrostomía, así como de administración de biotina, ácido aspártico y ácido cítrico-citrato potásico. Al igual que su hermano, los niveles de aspartato en plasma permanecieron en el límite inferior de la normalidad a pesar de la administración de suplementos de aspartato.

Durante su último ingreso a los 24 meses de edad, se administró infusión continua de hasta 70 mEq/kg/día de bicarbonato sódico para tratar la acidosis láctica persistente.

## 5- Discusión

- Como ya se ha expuesto, FBXL4 es un gen situado en el DNA nuclear en el cromosoma 6q16.1<sup>14</sup>. Este gen codifica un miembro de la familia de las proteínas F-box, las cuales constituyen una de las 4 subunidades del complejo ubiquitina-ligasa Skp1-Cullin-F-box, complejo que ha demostrado tener un papel importante en la ubiquitinación dependiente de fosforilación<sup>10,12</sup>.

Se trata de una proteína de un peso molecular aproximado de 70 kDa, con repeticiones ricas en leucina (LRR), dirigida a la mitocondria y localizada en su interior<sup>9,13</sup>.

Se han descrito 31 mutaciones distintas en 36 familias diferentes (sin tener en cuenta las mutaciones que se han encontrado en nuestros pacientes, las cuales no habían sido descritas con anterioridad), entre ellas 19 de cambio de sentido, 6 de pérdida de sentido, 3 deleciones y 3 mutaciones en los sitios de corte y empalme (*splicing*). No existe ningún punto concreto o zona en la que tiendan a aparecer más estas mutaciones, aunque las mutaciones de cambio de sentido suelen ocurrir más frecuentemente (un 78% de ellas), en el dominio de repeticiones ricas en leucina en el extremo C<sup>13</sup>, mientras que el 54% de las mutaciones de pérdida de sentido se localizan en el extremo N, antes de F-box<sup>7</sup>. Todas estas mutaciones han sido consideradas patogénicas en las diferentes publicaciones, si bien sólo se ha comprobado a través de rescate por medio de fibroblastos que expresaban la proteína *wild-type* en ciertas ocasiones<sup>9,13</sup>.

Por si esto fuera poco, no se ha descrito ninguna mutación en F-box, y dado que los pacientes con mutaciones en FBXL4 suelen presentar un cuadro clínico grave de comienzo neonatal, este hallazgo podría sugerir que las mutaciones en F-box son incompatibles con la vida<sup>7</sup>.

Existen diferencias significativas en cuanto a la gravedad del cuadro clínico y el fenotipo molecular en función de la mutación encontrada en FBXL4: se ha descrito una supervivencia más larga (en líneas generales) y una evaluación histoquímica menos patológica (también una intensidad menor en la depleción de mtDNA) en aquellos pacientes con mutaciones de cambio de sentido respecto a aquellos con mutaciones de pérdida de sentido<sup>9</sup>.

La consanguineidad parece ser un factor a tener en cuenta, llegando hasta porcentajes del 58% en algunas series<sup>14</sup>. En nuestros pacientes sólo existía antecedente de consanguineidad en P2, en rama paterna (abuelos).

Respecto al cuadro clínico de estos pacientes, resulta imposible encontrar hallazgos que nos permitan sospechar una alteración concreta en FBXL4, si bien es verdad que la sospecha de enfermedad mitocondrial se puede establecer con relativa facilidad, y que existen una serie de elementos que están presentes en la gran mayoría de los casos.

Se han descrito varias anomalías prenatales (defectos cardíacos, polihidramnios<sup>18</sup>, crecimiento intrauterino restringido...), pero ninguna que se asocie con mayor frecuencia que el resto a mutaciones en este gen.

Al nacimiento, cabe destacar que un porcentaje importante de pacientes fueron pequeños para la edad gestacional/de bajo peso al nacer, alcanzando el 100% en algunas series<sup>9</sup>, mientras que la microcefalia es un signo que aparece con menor frecuencia, entre un 29-40%<sup>7,9</sup>. En nuestros pacientes cabe destacar el peso al nacer de P1, que fue de 2090 g (<P3).

Tras el nacimiento, el signo más frecuente, que se presenta en prácticamente el 100% (37/38) de los pacientes es el retraso global del desarrollo. Asimismo, en una inmensa mayoría de sujetos se constata hipotonía (90%, 37/41). Otros hallazgos relativamente frecuentes son los rasgos dismórficos faciales (64%, 27/42) y la dificultad para la alimentación (61%, 11/18). Entre los signos más frecuentes tenemos por último la enfermedad cardíaca (de cualquier tipo, 47%, 17/36) y la escasa ganancia ponderal (45%, 10/22). Otros hallazgos que se manifiestan con una frecuencia importante son convulsiones (39%, 10/26) y pérdida de audición (25-40% según la serie). Por último, signos poco frecuentes pero que se han descrito con cierta frecuencia son las alteraciones visuales (cataratas congénitas, atrofia del nervio óptico, nistagmo)<sup>7,9,13,14,16,18,19</sup>. En nuestra paciente P1 el síntoma más relevante fue el retraso psicomotor (cuando se le reevaluó a los 4 meses), y P2 presentó un cuadro clínico muy grave desde el nacimiento que causa su fallecimiento a los dos días de vida.

En cuanto a las alteraciones analíticas más prevalentes, en el 100% (46/46) de los pacientes se constata una acidosis láctica, que por lo general se manifiesta desde el nacimiento, aunque no siempre es así<sup>9</sup>. Además suele aparecer hiperamonemia en un porcentaje importante de pacientes (54%, 20/37), así como niveles elevados de aminoácidos en plasma, en especial de alanina (77%, 20/26)<sup>14</sup> y de lisina (43%, 6/14) en plasma (en general de todos los aminoácidos).

Fuera de estas anomalías analíticas que son relativamente frecuentes, se han descrito multitud de ellas pero con una incidencia significativamente menor: alteraciones glucémicas (tanto hipo como hiperglucemias), alteraciones iónicas (hiponatremia, hipopotasemia, hipocalcemia), neutropenia, alteraciones de la coagulación (INR y actividad de protrombina).



En orina se ha constatado cetonuria<sup>13</sup> y aumento de intermediarios del ciclo de Krebs<sup>16, 17</sup> (ácido fumárico, ácido succínico, ácido málico y ácido 2-cetoglutarico...) aunque también se ha descrito su ausencia casi completa<sup>19</sup>.

En nuestros pacientes, podemos destacar la presencia de hiperlactacidemia en todas las determinaciones al alta en P1, e hiperlactacidemia, hiperamonemia, hiperglucemia, hipocalcemia, hipopotasemia y coagulopatía en P2.

En cuanto a las pruebas de imagen, en un 100% de casos se pueden apreciar alteraciones de la señal en la RMN, y en un 69% atrofia cerebral (18/26). Tras estos hallazgos, los más prevalentes son mielinización retrasada en un 59% (13/22), quistes intraventriculares o periventriculares en un 43% (9/21), anomalías en ganglios de la base en un 33% (7/21), hipoplasia cerebelosa en un 29% (6/21), anomalías del troncoencéfalo en un 27% (6/22), dilatación de ventrículos laterales en un 27% (3/16) y megacisterna magna en un 27% (3/16). La RMN sólo fue normal en 1 paciente<sup>9</sup>.

Respecto a las demás pruebas de imagen, han demostrado ser útiles la ecografía como método de detección de malformaciones prenatales<sup>13, 17, 18</sup>, el ecocardiograma (como ya se ha dicho la prevalencia de anomalías cardíacas es >50%) y la espectroscopia cerebral<sup>9, 16, 17, 19</sup>.

En nuestra paciente P1 se realizaron ecografía cerebral, TC craneal y RMN, destacando atrofia cerebral, un quiste subependimario en ventrículo izquierdo y megacisterna magna. En P2 se realizó una ecografía transfontanelar y se detectó una cisterna magna agrandada.

Las dos muestras fundamentales a la hora de llevar a cabo estudios funcionales han sido en la práctica totalidad de casos la biopsia muscular y el cultivo de fibroblastos. El abanico de alteraciones descritas es muy amplio, aunque las más habituales han sido las deficiencias de los sistemas enzimáticos de la cadena respiratoria, ya sea de complejos aislados o, más frecuentemente, deficiencias combinadas.

Además de este hallazgo, que ha sido casi constante (salvo casos aislados como por ejemplo S46), otro hallazgo que ha aparecido con muy alta frecuencia, casi constante también, ha sido la depleción de mtDNA en la biopsia muscular. Otras anomalías que se dan con relativa frecuencia han sido la disminución del potencial de membrana mitocondrial, la síntesis disminuida de ATP por parte del sistema OXPHOS, el aumento de la glucólisis, OCR disminuida en micropolarografía o la fragmentación de la red mitocondrial<sup>9, 13, 14, 16</sup>. En nuestros pacientes sólo se ha medido la depleción del mtDNA en biopsia muscular, que fue del 85% y del 93% para P1 y P2 respectivamente.

Todos estos estudios funcionales demuestran que FBXL4 es una proteína mitocondrial, necesaria para el buen funcionamiento del sistema OXPHOS y posiblemente para el mantenimiento del DNA mitocondrial/biogénesis mitocondrial<sup>13</sup>.

No existe un tratamiento definitivo ni mucho menos curativo en estos pacientes: los tratamientos empleados, cuando se han utilizado, han sido de soporte/sintomáticos/de corrección de parámetros bioquímicos. Los procedimientos terapéuticos que han sido descritos más veces son la gastrostomía endoscópica percutánea/sonda nasogástrica <sup>13, 15, 18, 21</sup> debido a los problemas de alimentación de estos pacientes, y la administración de bicarbonato sódico en un intento de corregir la acidosis láctica <sup>14, 17, 19</sup>.

Han sido empleados igualmente biotina, ácido aspártico, ácido cítrico-citrato potásico, carnitina o tiamina en aquellos pacientes con depleción de intermediarios del ciclo de Krebs, con un control relativo temporal <sup>21</sup>. También se ha ensayado con dieta cetogénica, aunque se tuvo que abandonar por elevación de transaminasas <sup>17</sup>.

El resto de tratamientos que se han registrado han sido medidas personalizadas de soporte para cada paciente, como vitamina K en coagulopatías, flecainida en taquicardia auricular ectópica, óxido nítrico inhalado en hipertensión pulmonar, factor estimulante de la colonia de granulocitos en inmunodeficiencia, insulina en hiperglucemias...

En nuestra paciente P1 sólo queda constancia de la prescripción al alta de un tratamiento continuado con bicarbonato (que no consigue disminuir los niveles de ácido láctico). En nuestro paciente P2 se emplean una serie de tratamientos de soporte entre los que destacan la administración de varias dosis de bicarbonato endovenoso o insulina endovenosa en bomba. Se inicia además tratamiento con aporte energético elevado (restricción proteica, L-carnitina, arginina y vitaminas), y se emplea vitamina K a causa de la coagulopatía.

El diagnóstico genético se ha realizado hasta el momento por medio de secuenciación de última generación/secuenciación completa del exoma <sup>20, 21</sup>.

A pesar de ser una entidad enormemente heterogénea, podemos por tanto definir el cuadro clínico 'típico' de un paciente con mutación de FBXL4 como un neonato de bajo peso al nacer que desde el comienzo presenta hipotonía, dificultad para la alimentación y rasgos dismórficos faciales, que analíticamente presenta una acidosis con un lactato muy elevado y en el que se realiza una RMN donde se detectan alteraciones de la señal en T2 junto a atrofia cerebral. No mejora a pesar de los tratamientos y con el paso del tiempo se constata un retraso del desarrollo.

Como ya se ha comentado y como se puede deducir, son pacientes con un pronóstico muy pobre, en los que se ha descrito una media de edad de 37 meses <sup>14</sup>, teniendo el paciente más longevo 11 años en el momento de la publicación en la cual se hace referencia a él <sup>15</sup>.

Son necesarios más estudios acerca de FBXL4 con el fin de profundizar en su funcionamiento fisiológico y su fisiopatología cuando existen mutaciones, y de esta forma poder desarrollar una herramienta terapéutica eficaz que mejore el pronóstico de estos pacientes.

## **6-Conclusiones**

- 1.** FBXL4 es una proteína dirigida a la mitocondria y localizada en su interior.
- 2.** Las mutaciones de pérdida de sentido tienen peor pronóstico que las de cambio de sentido.
- 3.** No se ha descrito ninguna mutación en F-box. Es posible que sean incompatibles con la vida.
- 4.** El antecedente de consanguineidad alcanza porcentajes importantes en estos pacientes, de hasta el 58%.
- 5.** FBXL4 es necesaria para el buen funcionamiento del sistema OXPHOS y posiblemente para el mantenimiento del DNA mitocondrial/biogénesis mitocondrial
- 6.** El retraso del desarrollo es una manifestación clínica constante.
- 7.** Además del retraso en el desarrollo, son muy frecuentes la hipotonía, los rasgos dismórficos faciales y la dificultad para la alimentación.
- 8.** La acidosis láctica aparece en la totalidad de los pacientes.
- 9.** Los hallazgos más comunes de imagen son las alteraciones de la señal en la RMN y la atrofia cerebral.
- 10.** El tratamiento es de soporte/sintomático.
- 11.** Los pacientes estudiados comparten características fundamentales con aquellos publicados previamente, como retraso del desarrollo, acidosis láctica o depleción de DNA mitocondrial en biopsia muscular.
- 12.** Las deficiencias de los sistemas enzimáticos de la cadena respiratoria y la depleción de mtDNA son los hallazgos más frecuentes en la biopsia muscular/fibroblastos.
- 13.** El diagnóstico genético se ha realizado hasta el momento por medio de secuenciación de última generación/secuenciación completa del exoma.
- 14.** Son necesarios más estudios acerca de la fisiología y fisiopatología de FBXL4.

## 7- Bibliografía

- 1- Nelson, David L., et al. "Lehninger Principles of Biochemistry". 5th ed. New York : W. H. Freeman and Company, cop. 2008
- 2- Tuena de Gómez, Marietta, et al. "La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa." *Revista digital universitaria* 16.1 (2015): 1-15
- 3- Pagliarini, David J., et al. "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." *Cell* 134.1 (2008): 112-123
- 4- Wiesner, Rudolf J., et al. "Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues." *Biochemical and biophysical research communications* 183.2 (1992): 553-559
- 5- Angelini, Corrado, et al. "Mitochondrial disorders of the nuclear genome." *Acta Myologica* 28.1 (2009): 16
- 6- DiMauro, Salvatore, et al. "The clinical maze of mitochondrial neurology." *Nature Reviews Neurology* 9.8 (2013): 429-444
- 7- Dai, Hongzheng, et al. "FBXL4 defects are common in patients with congenital lactic acidemia and encephalomyopathic mitochondrial DNA depletion syndrome." *Clinical genetics* 91.4 (2017): 634-639
- 8- Debray, Francois-Guillaume, et al. "Disorders of mitochondrial function." *Current opinion in pediatrics* 20.4 (2008): 471-482
- 9- Bonnen, Penelope E., et al. "Mutations in FBXL4 cause mitochondrial encephalopathy and a disorder of mitochondrial DNA maintenance." *The American Journal of Human Genetics* 93.3 (2013): 471-481
- 10- Winston, Jeffrey T., et al. "A family of mammalian F-box proteins." *Current Biology* 9.20 (1999): 1180-S3
- 11- Bai, Chang, et al. "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box." *Cell* 86.2 (1996): 263-274
- 12- Cenciarelli, C., et al. "Identification of a family of human F-box proteins." *Current Biology* 9.20 (1999): 1177-S3
- 13- Gai, Xiaowu, et al. "Mutations in FBXL4, encoding a mitochondrial protein, cause early-onset mitochondrial encephalomyopathy." *The American Journal of Human Genetics* 93.3 (2013): 482-495.
- 14- Huemer, Martina, et al. "Clinical, morphological, biochemical, imaging and outcome parameters in 21 individuals with mitochondrial maintenance defect related to FBXL4 mutations." *Journal of inherited metabolic disease* 38.5 (2015): 905-914.

- 15-** Ebrahimi-Fakhari, Darius, et al. "Recurrent stroke-like episodes in FBXL4-associated early-onset mitochondrial encephalomyopathy." *Pediatr Neurol* 53 (2015): 549-550
- 16-** Antoun, Ghadi, et al. "Detailed biochemical and bioenergetic characterization of FBXL4-related encephalomyopathic mitochondrial DNA depletion." *JIMD Reports, Volume 27*. Springer Berlin Heidelberg, 2015. 1-9
- 17-** Barøy, Tuva, et al. "A novel mutation in FBXL4 in a Norwegian child with encephalomyopathic mitochondrial DNA depletion syndrome 13." *European journal of medical genetics* 59.6 (2016): 342-346
- 18-** Rij, Maartje C., et al. "Polyhydramnios and cerebellar atrophy: a prenatal presentation of mitochondrial encephalomyopathy caused by mutations in the FBXL4 gene." *Clinical case reports* 4.4 (2016): 425-428
- 19-** Morton, Sarah U., et al. "Hyperammonemia as a Presenting Feature in Two Siblings with FBXL4 Variants." (2016): 1-9
- 20-** Wortmann, Saskia B., et al. "Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice." *Journal of inherited metabolic disease* 38.3 (2015): 437-443
- 21-** Pronicka, Ewa, et al. "New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre." *Journal of translational medicine* 14.1 (2016): 174