



Universidad de Sevilla

TESIS DOCTORAL

**Miopatías oculares mitocondriales:
descripción epidemiológica, clínica,
morfopatológica y
análisis mutacional del ADN mitocondrial
de esta patología en Andalucía.
Correlación genotipo-fenotipo**

María Ronquillo Japón
Sevilla, 2009



Universidad de Sevilla

**Miopatías oculares mitocondriales:
descripción epidemiológica, clínica, morfológica y
análisis mutacional del ADN mitocondrial
de esta patología en Andalucía
Correlación genotipo-fenotipo**

Tesis Doctoral presentada por **María Ronquillo Japón**,
Licenciada en Medicina por la Universidad de Sevilla,
para optar a **GRADO DE DOCTOR**

Director

Dr. Juan Bautista Lorite

*Médico Adjunto del Servicio de Neurología
del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla
Jefe de Sección de Patología Neuromuscular*

Tutor

Prof. Dr. José Villar Ortiz

*Médico Adjunto de Medicina Interna
del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla
Profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla*

Dr. D. Juan Bautista Lorite

Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla

CERTIFICO

Que Dña. María Ronquillo Japón, Licenciada en Medicina por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo mi dirección y tutela el trabajo titulado **Miopatías oculares mitocondriales: descripción epidemiológica, clínica, morfológica y análisis mutacional del ADN mitocondrial de esta patología en Andalucía. Correlación genotipo-fenotipo**, y que a mi juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de doctor.

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla, a Junio de 2009

Dr. D. José Villar Ortiz

Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla y profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICO

Que Dña. María Ronquillo Japón, Licenciada en Medicina por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo mi dirección y tutela el trabajo titulado **Miopatías oculares mitocondriales: descripción epidemiológica, clínica, morfopatológica y análisis mutacional del ADN mitocondrial de esta patología en Andalucía. Correlación genotipo-fenotipo**, y que a mi juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de doctor.

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla, a Junio de 2009

A mi familia

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES	10
1.1.1. Definición	10
1.1.2. Epidemiología	13
1.1.3. Genética	15
1.1.3.1. Cadena respiratoria mitoconrial	17
1.1.3.2. Características de la genética mitocondrial	20
1.1.4. Biopsia muscular	23
1.1.5. Expresión clínica	27
1.1.5.1. Clasificación clínica	29
1.1.5.2. Clasificación genética	30
1.1.5.3. Miopatías mitocondriales precoces y tardías	30
1.2. MIOPATÍAS OCULARES MITOCONDRIALES	32
1.2.1. Definición y clasificación de las miopatías oculares	32
1.2.2. Clínica de las miopatías oculares mitocondriales	33
1.2.2.1. Síndrome de Kearns-Sayre	33
1.2.2.2. Oftalmoplejía externa progresiva	35
1.2.4. Correlaciones entre genotipo y fenotipo	39
2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS E INTERÉS DEL TEMA	43

ÍNDICE	Página
3. MIOPATÍAS OCULARES MITOCONDRIALES EN ANDALUCÍA	50
3.1. Objetivos del estudio	51
3.2. Metodología	51
3.2.1. Diseño del estudio	51
3.2.2. Ámbito de estudio	52
3.2.3. Sujetos de estudio	52
3.2.4. Criterios de inclusión y exclusión	53
3.2.5. Recogida de datos	53
3.2.6. Seguimiento clínico	66
3.2.7. Método estadístico	67
3.3. Resultados	71
3.3.1. Datos epidemiológicos	71
3.3.2. Antecedentes familiares y forma de herencia	74
3.3.3. Características clínicas	75
3.3.4. Determinaciones bioquímicas	103
3.3.5. Biopsia muscular: estudio morfológico	105
3.3.6. Estudio de la cadena respiratoria mitocondrial	107
3.3.7. Estudio genético del mtDNA	110
3.4. Correlación entre genotipo y fenotipo	112
3.6. Discusión	119
3.5. Conclusiones	125

ÍNDICE	Página
4. ANEXOS	127
4.1. Anexo 1: Criterios diagnósticos enfermedad mitocondrial	128
4.2. Anexo 2: Mutaciones en el DNA mitocondrial	132
4.3. Anexo 3: Mutaciones en el DNA nuclear	134
4.4. Anexo 4: Casos clínicos	136
5. ABREVIATURAS	152
6. BIBLIOGRAFÍA	155
7. AGRADECIMIENTOS	178

Parte 1:

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES.

1.1.1. Definición.

Clásicamente, las enfermedades mitocondriales constituyen un grupo heterogéneo de trastornos en los que una disfunción mitocondrial, primaria y significativa, produce un cuadro clínico característico. En la actualidad, el término ***enfermedad mitocondrial*** se reserva para aquellas enfermedades en las que existe un defecto o alteración a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial (DiMauro et al, 2003).

El término mitocondria fue acuñado originalmente en alemán por el microbiólogo Carl Benda en el año 1898. Proviene del griego antiguo, de los términos “*mitos*” o “*μίτος*” que significa hilo o hebra, y “*chondros*” o “*χονδρίον*”, diminutivo de “*χόνδρος*”, cuyo significado es grano, terrón o cartílago. Dicha etimología viene dada por las estructuras alargadas que la mitocondria contiene en su interior y por el pequeño tamaño que representa en el interior de la célula.

Las mitocondrias son organelas que se encuentran en el citoplasma de la célula eucariota, están rodeadas de dos membranas, la membrana externa y la membrana interna (figura 1), claramente diferentes en sus propiedades y en sus funciones enzimáticas (Pagliarini et al, 2006). Son autorreplicantes, se reproducen por fisión binaria como las bacterias y presentan un sistema genético propio, con toda la maquinaria necesaria para replicar, transcribir y

traducir la información genética que contienen (DiMauro et al, 2005; Wallace, 2005). Son los orgánulos productores de energía, por lo que se las considera la “fábrica o central energética” de la célula. Se encargan de completar el proceso de consumo de la glucosa y ácidos grasos generando la mayor parte del trifosfato de adenosina (ATP) que necesita la célula para sus funciones, de manera que realizan las últimas etapas de la descomposición de las moléculas de los alimentos. Estas etapas finales consisten en el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, proceso llamado respiración celular. El número de mitocondrias de una célula depende de la función de ésta. Las células con demandas de energía particularmente elevadas, como son las células musculares, tienen mayor número de mitocondrias que otras células con menor demanda energética (Peterson et al, 1988; Molnar et al, 1998).

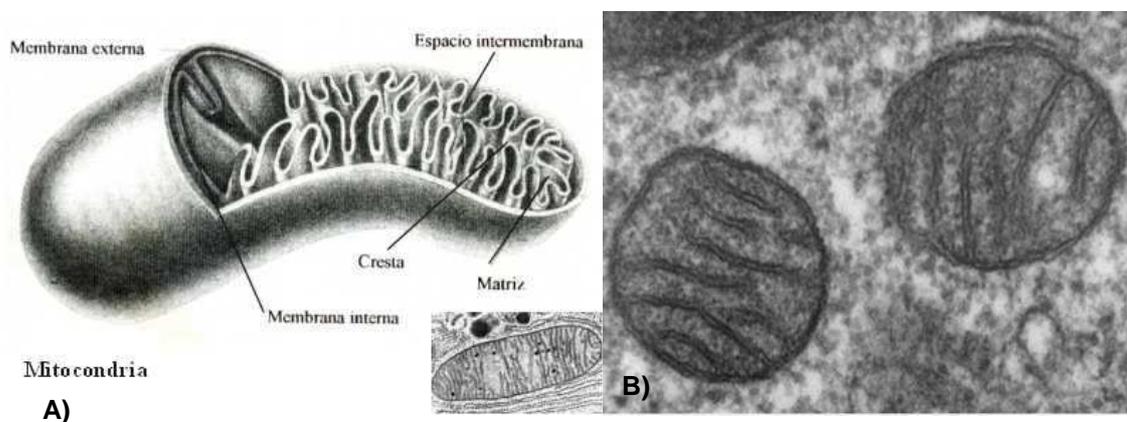


Figura 1. A) La mitocondria se compone de una membrana externa y otra interna. La membrana interna se repliega formando las crestas mitocondriales. El espacio que queda entre ambas membranas se denomina espacio intermembrana. Bañando las crestas se encuentra la matriz mitocondrial. B) Dos mitocondrias vistas en el microscopio electrónico de transmisión.

La función primaria de las mitocondrias es la producción de ATP del metabolismo oxidativo. Varias vías metabólicas intermediarias de los hidratos de carbono, ácidos grasos y aminoácidos convergen en las mitocondrias a nivel

de la acetil-Coenzima A (acetil-CoA) para la conversión final del combustible en energía química (ATP). El piruvato, el producto final de la glicolisis anaeróbica, se transporta a través de la membrana interna mitocondrial, estando el transporte acoplado al flujo hacia dentro de los iones de hidrógeno, rebajando su gradiente electro-químico a través de la membrana mitocondrial interna. El transporte de ácidos grasos libres a través de la membrana mitocondrial requiere dos enzimas (carnitina palmitoil transferasas, CPT I y II), una molécula transportadora (L-carnitina) y una translocasa (translocasa carnitina acil-carnitina). La acetil-CoA entra en el ciclo de Krebs. Las moléculas producidas son transportadas en la cadena de transporte electrónico de la membrana mitocondrial interna (figura 2) (Verma y Moraes, 2006). La disfunción de la **cadena respiratoria** (CR) mitocondrial lleva consigo una alteración en el mecanismo de producción de energía en forma de ATP necesaria para el mantenimiento de las estructuras y funciones de la célula, de tal forma que las células más sensibles a esta falta de energía serán las más afectadas en las enfermedades mitocondriales. Este hecho hace que el músculo esquelético y el cerebro sean los tejidos más frecuentemente implicados en estas enfermedades, y de ahí el término de "encefalomiopatía mitocondrial" (DiMauro, 2005).

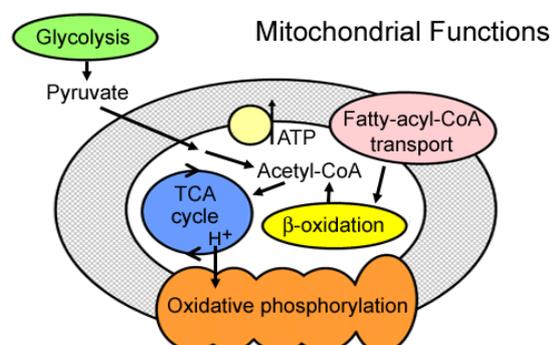


Figura 2. Funciones de la mitocondria (Neuromuscular Disease Center)

En las enfermedades mitocondriales el defecto mitocondrial debe ser primario y significativo (Peterson et al, 1988). No obstante, se conoce que existen anomalías mitocondriales en otras patologías como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, enfermedades neurodegenerativas en las que se han detectado deleciones en el ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) (Schapira et al, 1998; Schapira, 2006; Bender et al, 2006; Kraysberg et al, 2006). También se han descrito anomalías mitocondriales en la miositis por cuerpos de inclusión (Molnar et al, 1998), en la hipercolesterolemia (Dahmani, 2008) y asociadas a alteraciones provocadas por fármacos, como ocurre con las estatinas (Martínez García et al, 1997). En estos casos el defecto mitocondrial tiene un significado dudoso, desconociéndose su importancia biológica real en estas entidades.

1.1.2. Epidemiología.

La epidemiología de las enfermedades mitocondriales no es del todo bien conocida. El primer caso descrito de enfermedad mitocondrial se remonta a 1962, fecha en la que Luft y colaboradores relacionan un cuadro de hipermetabolismo eutiroides con un defecto en el acoplamiento de la fosforilación y oxidación mitocondrial, encontrando mitocondrias anormales en la biopsia muscular (Luft et al, 1962).

Los estudios iniciales estimaban una prevalencia aproximada para las enfermedades mitocondriales de 1 caso por cada 50.000 habitantes (Chinnery et al, 1997). Estudios más recientes nos hacen ver que las enfermedades mitocondriales no son raras en su conjunto, estimándose que afecta, al menos,

a 1 de cada 8500 individuos (Chinneri et al, 2001). Esta incidencia es superior para el caso de algunas mutaciones del mtDNA, como la transición A3243G, de la que son portadores 1/6134 personas en el norte de Finlandia (Majamaa et al, 1998). Respecto a la población pediátrica, en Finlandia se estudiaron 116 niños con retraso psicomotor inexplicable sobre una población de 97.000 niños, de los cuáles 17 mostraron alteraciones bioquímicas de la cadena respiratoria y sólo 1 niño tenía una mutación en el mtDNA (Uusimaa et al, 2000). En Inglaterra, se estima que 6,57 por 100.000 adultos y 12,48 por 100.000 individuos (adultos y niños) desarrollan o tiene riesgo de desarrollar enfermedades mitocondriales (Chinnery et al, 2000).

La aportación de nuevos casos clínicos de origen mitocondrial nos ayuda a ampliar el conocimiento sobre estas enfermedades y hace suponer que su incidencia sea cada vez mayor. El importante avance en la investigación de estas enfermedades por parte de determinados grupos (Galán-Ortega et al, 1999; Artuch et al, 1998), mediante la aplicación sistemática de las técnicas de biología molecular encaminadas a la búsqueda de mutaciones en el mtDNA, ha puesto de manifiesto que las alteraciones a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial no representan un trastorno tan raro como comúnmente se piensa (Bonilla et al, 1992). Se ha estimado que la prevalencia de las enfermedades mitocondriales es similar a la prevalencia de otras enfermedades neurológicas como las distrofias musculares o la esclerosis lateral amiotrófica (DiMauro e Hirano, 2005; Bernier et al, 2002).

1.1.3. Genética.

La formación de las mitocondrias, en particular de los complejos enzimáticos que conducen a la síntesis de energía en forma de ATP, es el resultado de la acción coordinada de dos genomas diferentes, el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. El mtDNA es un material genómico circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares (figura 3). Está formado por 16.569 pares de bases, aproximadamente 16.6 Kilobites (Kb), y aunque sólo codifica una fracción pequeña de las proteínas mitocondriales de la cadena respiratoria, es responsable de un elevado número de deficiencias de la actividad de la misma (Moraes et al, 2003). Las proteínas restantes del mtDNA son codificadas por el DNA nuclear (nDNA), genoma común al resto de la economía celular (Castro-Gago et al, 1998).

La doble biogénesis mitocondrial da lugar a que los déficits de la fosforilación oxidativa puedan ser debidos a diferentes mecanismos genéticos (Montoya et al, 2002) que se enumeran a continuación:

- a) Mutaciones del mtDNA, transmitidas por herencia materna o vertical (mutaciones puntuales) o bien mutaciones de aparición espontánea (deleciones y duplicaciones) (Van Goethem et al, 2002; Poulton et al, 1989);
- b) Defectos de interacción entre el mtDNA y el nDNA (comunicación intergenómica), transmitidos por herencia mendeliana (depleción o deleciones múltiples) (Suomalainen y Kaukonen, 2001; Spinazzola y

Zeviani, 2005);

c) Mutaciones del nDNA, transmitidas por herencia mendeliana (Zeviani et al, 1990), y por tanto, sin defectos en el mtDNA (Spelbrink et al, 2001; Nishino et al, 1999; Kaukonen et el, 2000; Van Goethem et al, 2001).

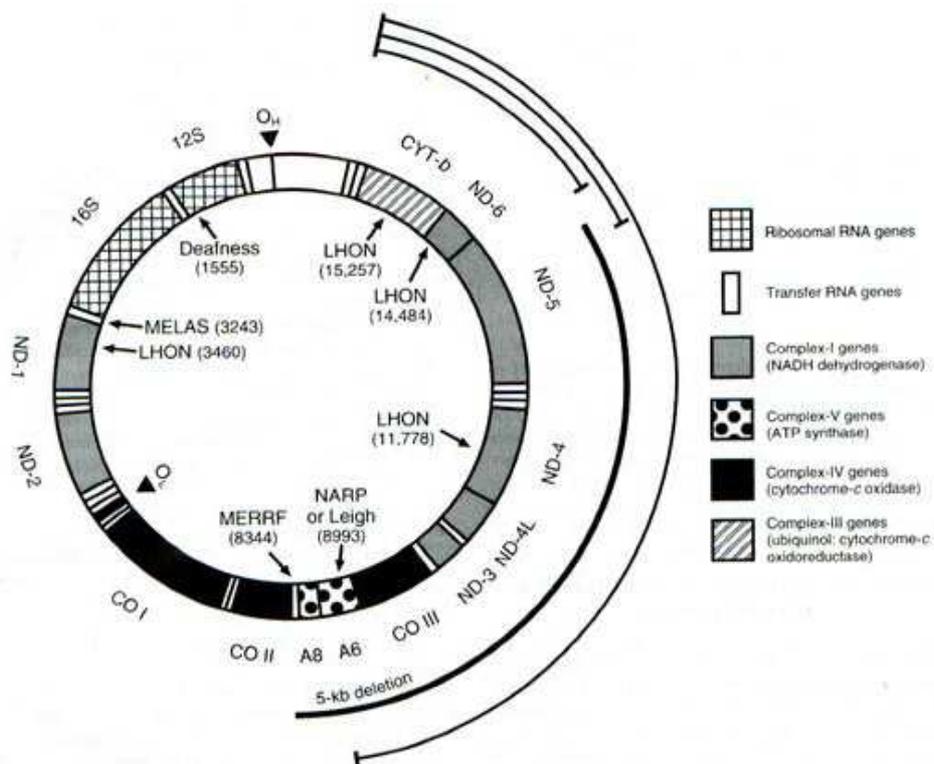


Figura 3. Diagrama del mtDNA humano y las mutaciones patológicas más comunes. En el círculo interior se muestran los puntos de mutación y genes codificadores de proteínas, con el fenotipo clínico indicado y la posición del nucleótido se muestra entre paréntesis.

Las alteraciones más frecuentes que se encuentran en el mtDNA son de dos tipos: deleciones únicas, con o sin duplicaciones de la molécula, y mutaciones puntuales. Las deleciones únicas se suelen detectar en pacientes esporádicos, por lo que se piensa que el evento mutacional puede tener lugar en el oocito materno o durante la embriogénesis temprana. No parece que

exista riesgo de recurrencia cuando la madre no presenta el cuadro clínico, pero si ésta sufre la enfermedad ese riesgo puede elevarse al 4,11% (Chinnery et al, 2004). Las mutaciones puntuales (Zeviani et al, 2004) pueden tener lugar tanto en genes que codifican los ácido ribonucleicos mitocondriales (mtRNA) como proteínas (Kogelnik et al, 1998; MITOMAP). En las tablas de los anexos 2 y 3 se muestran las mutaciones descritas en el mtDNA y en genes nucleares, causantes de diferentes síndromes mitocondriales.

1.1.3.1. Cadena respiratoria mitocondria

El mtDNA contiene información de 37 genes: 2 ácido ribonucleico (RNA) ribosómico (rRNA) (12S y 16S), 22 RNA de transferencia (tRNA) y 13 genes estructurales, los cuales codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa (Anderson et al, 1981; Ricoy-Campo et al, 2003). Los 13 polipéptidos son componentes de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial (figura 4) (Solano et al, 2001). En la tabla 1 se resumen y esquematizan los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

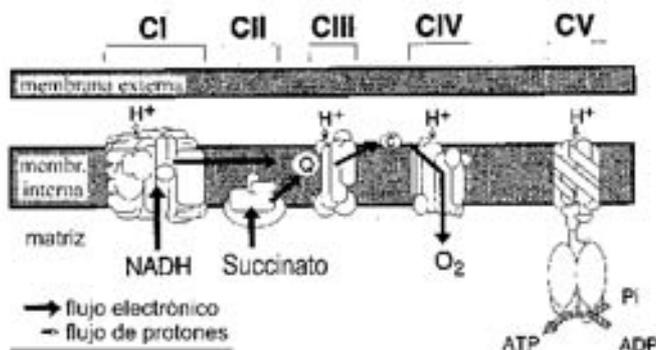


Figura 4. Representación de la cadena respiratoria mitocondrial mostrando los complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna mitocondrial y el flujo de electrones y protones.

Complejo	Nombre	Constituyentes	Acción
I	NADH-CoQ oxidorreductasa	25 polipéptidos (7)	Oxidación NADH
II	Succinato CoQ oxidorreductasa	5 polipéptidos (0)	Oxidación sustratos FADH2 dependientes
III	QH2 citocromo C oxidorreductasa	11 subunidades (1)	Oxidación sustratos NADH y FADH2 dependientes
IV	Citocromo C oxidasa (COX)	13 subunidades (3)	Transfiere equivalentes reductores del Cit C al oxígeno molecular
V	ATP sintasa	2 subunidades 12-14 polipéptidos (2)	Convierte el gradiente transmembrana en energía (ADP pasa a ATP)

Tabla 1. Sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial. Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Acción y constituyentes principales. Entre paréntesis se recoge el número de péptidos codificados por el mtDNA.

Como puede observarse, la cadena respiratoria está formada por cuatro complejos enzimáticos (I, II, III y IV) acoplados al complejo V, donde tiene lugar la fosforilación oxidativa. Todos los complejos, excepto el complejo II, poseen subunidades codificadas por el mtDNA y el nDNA. Por tanto, una miopatía mitocondrial puede ser debida a la alteración de genes que vienen codificados por cualquiera de estos dos genomas.

Los déficits aislados de los complejos I, III y IV pueden ser debidos a mutaciones en genes nucleares, especialmente si la historia familiar es compatible con un patrón de herencia autosómico recesivo. Sin embargo, también pueden ser debidos a mutaciones en genes del mtDNA codificantes de proteínas, tanto en pacientes sin historia familiar como en pacientes con evidencias de herencia materna. El déficit de complejo II es bastante

infrecuente, y el patrón de herencia es siempre mendeliano. Los déficits combinados de los complejos I, III y IV (todos ellos con alguna subunidad codificada por el mtDNA) se asocian, frecuentemente, a alteraciones de la síntesis proteica mitocondrial y se relacionan, en la mayoría de los casos, con alteraciones del mtDNA. Puede tener un origen primario (mutaciones en los tRNA, rRNA y deleciones únicas del mtDNA) o secundario, por alteraciones en genes nucleares que regulan la comunicación intergenómica (deleciones múltiples y depleción del mtDNA). Las alteraciones en genes nucleares que intervienen en el sistema de translocación de proteínas sintetizadas en el citoplasma e importadas a la mitocondria constituyen un caso especial en su expresión bioquímica. Las consecuencias, en este caso, podrían ser un único déficit enzimático o una multienzimopatía, según si la proteína alterada interviene en la translocación de una sola subunidad o de varias.

El déficit primario de CoQ10 fue descrito por primera vez en dos hermanas con un cuadro progresivo de fatigabilidad y debilidad proximal, crisis convulsivas y mioglobinuria (Ogasahara et al, 1989). La biopsia muscular presentaba fibras rojo-rasgadas (RRF) y un exceso de lípidos. El estudio bioquímico mostró una actividad enzimática normal de los complejos I, II, III y IV, mientras que estaba reducida la actividad combinada de los complejos I+III y II+III. Posteriormente se ha descrito en otros cuadros clínicos de encefalomiopatía sin mioglobinuria (Musumeci et al, 2001) y en un fenotipo con características de síndrome de Leigh de inicio en la etapa adulta (Van der Maldergem et al, 2002). Independientemente de la causa genética de este déficit primario es importante su identificación rápida, tanto a través de dichas

actividades enzimáticas como valorando los niveles de CoQ10, pues el tratamiento con dicho fármaco puede mejorar sustancialmente el cuadro clínico.

1.1.3.2. Características de la genética mitocondrial

La genética mitocondrial tiene una serie de características propias que difieren significativamente del nDNA y le dan un carácter peculiar a la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales. Estas características son: poliplasmia, heteroplasmia, efecto umbral, segregación mitótica y herencia predominantemente materna (DiMauro et al, 1993; DiMauro y Moraes, 1993; Zeviani et al, 1989), y tienen una consecuencia inmediata sobre las enfermedades mitocondriales, la gran heterogeneidad tanto clínica como bioquímica que presentan estos pacientes (DiMauro y Schon, 2001). A continuación desarrollamos la explicación de estos conceptos:

- *Poliplasmia*. Cada célula, dependiendo de sus requerimientos de energía, contiene un elevado número de mitocondrias, y cada organelo tiene un término medio de 5 genomas, de forma que cada célula puede llegar a tener cientos o miles de copias de mtDNA.
- *Heteroplasmia*. Se refiere a la presencia de diferentes tipos de mtDNA en la misma mitocondria, célula o individuo. En contraposición, se denomina *homoplasmia* a la presencia de un único tipo de mtDNA. En tejidos normales, todas las moléculas de mtDNA son idénticas, es decir, su mtDNA es homoplásmico. Si existe una mutación en el mtDNA, ésta

puede afectar a todos los genomas, constituyendo una homoplasmia mutante (Monnat y Reay, 1986), o a parte de ellos, coexistiendo en la misma célula o en el mismo tejido mtDNA normal y mutado, denominándose esta situación heteroplasmia (Zhang et al, 2009).

- *Efecto umbral.* La expresión fenotípica de una mutación patogénica del mtDNA no sigue las reglas de la herencia mendeliana y depende en gran medida de las proporciones de mtDNA normal y mutado que existen en un tejido en particular. El efecto umbral representa la proporción mínima de mtDNA mutado necesaria para alterar el metabolismo oxidativo al nivel suficiente que produzca la disfunción de un determinado órgano o tejido, lo cual está condicionado por los requerimientos energéticos del mismo.

El umbral de expresión fenotípica es diferente para cada tejido, siendo menor para aquellos con mayor requerimiento energético (cerebro, músculo esquelético y cardíaco). Además, el porcentaje de mutación puede ir cambiando a lo largo de la vida del paciente, haciendo que la expresión de la enfermedad se produzca en cualquier momento de la misma y afectando sucesivamente a distintos órganos y tejidos. Ello también, en parte, es responsable de la distinta expresión clínica que presentan distintos pacientes con la misma alteración genética. Incluso, en el caso de tejidos con alto índice de recambio, como el hemático, una mutación puede llegar a desaparecer debido a un fenómeno de selección clonal negativa.

- *Segregación mitótica, o distribución de la mutación en diferentes tejidos.*
La división de las mitocondrias y la replicación del mtDNA son procesos aleatorios independientes del ciclo celular, lo que causa la denominada segregación mitótica del mtDNA. Debido a este hecho, si un paciente es heteroplásmico, la proporción de moléculas de mtDNA mutadas puede variar de tejido a tejido (Jenuth et al, 1996).
- *Herencia materna.* El mtDNA se hereda por vía materna, y parece que, salvo excepciones, el de origen paterno no contribuye significativamente en la herencia. Las mujeres pasan este DNA a todos sus hijos, pero sólo las hijas lo volverán a pasar a la siguiente generación. Es decir, presenta un modo de herencia vertical no mendeliana. El DNA paterno se pierde en los primeros estadios celulares después de la fecundación (Schawartz et al, 2002).

Por otra parte, el mtDNA posee una elevada tasa de mutación espontánea, diez veces superior a la del nDNA (Rubio González et al, 2004). Un factor determinante en la aparición de mutaciones en el mtDNA es la exposición continuada de estas moléculas a las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas por la fosforilación oxidativa (Bogénhagen et al, 2007). El mtDNA es especialmente susceptible a este estrés oxidativo ya que se encuentra muy próximo a la cadena respiratoria mitocondrial y no se encuentra protegido por histonas (Greaves et al, 2006). En la mitocondria el mtDNA es reparado cuando existe algún daño, sin embargo, esta reparación es menos eficiente que la del nDNA (Bohr y Anson, 1999; Sawyer y Van Houten, 1999).

Es por ello que, a pesar de los pocos genes codificados por el mtDNA, éste puede ser responsable de numerosos cuadros clínicos asociados a mutaciones en el mismo.

1.1.4. Biopsia muscular

El músculo esquelético es el tejido de elección para el estudio de las mitocondrias, tanto por su fácil accesibilidad como por su dependencia del metabolismo oxidativo (Barrientos, 2002; Tanji y Bonilla, 2001). Además, frecuentemente, las deficiencias de la cadena respiratoria no se expresan en los fibroblastos cultivados (biopsia de piel). Por ello, el método habitual de estudio es la biopsia muscular (Ricoy-Campo, 2003). En las enfermedades mitocondriales son características las alteraciones histopatológicas en el músculo. No obstante, una biopsia muscular normal no excluye el diagnóstico (Bernier et al, 2002; Dubowitz y Broke, 1985).

Con la microscopía óptica la alteración morfológica más característica es la presencia de fibras "rojo-rotas" o "rojo-rasgadas" (RRF, del inglés "ragged-red fibers") en el músculo esquelético, si bien éstas no se encuentran siempre. Las RRF se ponen de manifiesto con la tinción de tricrómico de Gomori modificado (figura 5) (Engel y Cunningham, 1963).

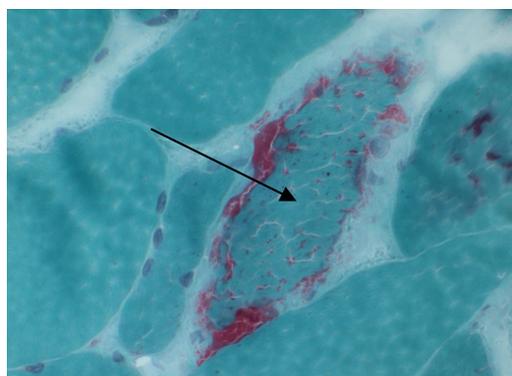


Figura 5. Biopsia muscular. La flecha señala una RRF puesta de manifiesto con la tinción tricrómico.

Con la técnica de tricrómico de Gomori, las fibras musculares muestran grandes acúmulos de organelas, en las que se forman hendiduras artefactuales al cortar el tejido en el criostato y se tiñen íntensamente de rojo, de ahí que se las denomine fibras RRF (figura 5 y 6B). Las RRF también pueden observarse con marcadores de la actividad oxidativa mitocondrial como la succinodeshidrogenasa (SDH), que pone de manifiesto el aumento de actividad oxidativa, también en disposición subsarcolémica, y cambios variables en el patrón miofibrilar (Morgan-Hughes, 1994). Con la tinción de nicotinamida adeninucleótido glucohidrolasa (NADH), y con la citocromo oxidasa (COX) pueden observarse estos cambios (figura 6), permitiendo además éste último marcador poner de manifiesto, en algunos casos, defectos en este complejo de la cadena respiratoria mitocondrial (Hasegawa et al, 1991; Clark et al, 1999).

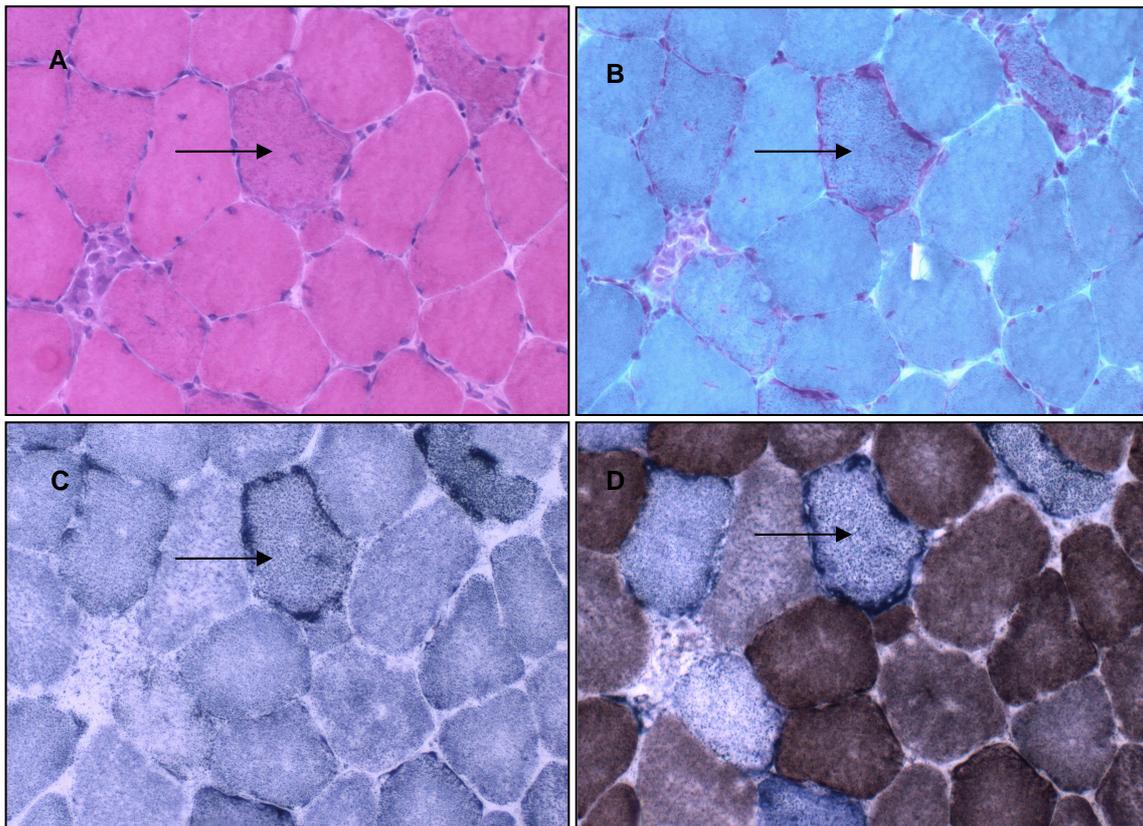


Figura 6. Diferente comportamiento de las RRF (flecha) en cada tipo de tinción. A) Tinción H-E. B) Tinción Tricrómico de Gomori. C) Tinción SDH. D) Tinción COX-SDH.

Ultraestructuralmente, las RRF corresponden a fibras musculares con alteraciones notables en el número, disposición, forma y estructura interna de las mitocondrias. La distribución de las RRF es anárquica (Chinchón, 1992) y la proporción varía de un espécimen de la biopsia a otro, e incluso en un mismo paciente al repetir la biopsia un tiempo después (Reichman et al, 1993; Tritschler et al, 1992). En general, las RRF son COX negativas, pero no todas las fibras con tinción negativa para la COX son RRF. La coexistencia de RRF / COX negativas es característica de pacientes con oftalmoplegia externa progresiva o el síndrome de Kearns-Sayre, con deleciones en el mtDNA (Moraes and Schon, 1996).

Aunque durante mucho tiempo la presencia de RRF se ha considerado un marcador inequívoco de una encefalomiopatía mitocondrial, hoy en día este concepto es inapropiado, al menos, por dos razones. En primer lugar, la presencia de fibras rojo rotas, y más frecuentemente la presencia de cambios ultraestructurales en las mitocondrias, se puede observar en otras patologías no mitocondriales, como las distrofias musculares, polimiositis (Campos, 1995), dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión (Hu et al, 2007) e incluso en biopsias de pacientes ancianos (González-Crespo et al, 1999; Cormio et al, 2005). Y en segundo lugar, existen enfermedades mitocondriales en las que no se detecta la presencia de RRF en ningún caso, tal como ocurre en la atrofia óptica de Leber (LHON) y en los pacientes con síndrome de Leigh con mutaciones puntuales en el gen de la ATPasa-6 (Holt et al, 1990).

Además de la fibras RRF, en el músculo esquelético podemos encontrar

otras alteraciones morfológicas relacionadas con defectos mitocondriales:

- Variabilidad en el tamaño de las fibras, presencia de atrofia, centralización de los núcleos o necrosis con fagocitosis con la hematoxilina-eosina (Scelsi, 1992; Nonaka et al, 1988).
- Defecto de una determinada actividad enzimática, preferentemente de la COX. Puede afectar a todas las fibras o sólo a algunas, dando un aspecto “salpicado”. En el interior de una fibra puede existir zonas combinadas con y sin defecto que le da un aspecto “apolillado” (“moth-eaten”) a la fibra muscular (Vogel, 2001).
- Acúmulo anormal de gotas lipídicas, a veces intenso enmascarando cambios mitocondriales, y glucógeno. Reflejan una afectación general del metabolismo intermediario, como consecuencia de disfunción a nivel de la cadena respiratoria (Peterson et al, 1988). EL depósito de lípidos en muchos casos es secundario a la alteración en el metabolismo de la carnitina, afectado secundariamente por el bloqueo en el transporte electrónico (Campos et al, 1993).

El microscopio electrónico es menos utilizado que el microscopio óptico para realizar el diagnóstico. Los hallazgos que se han descrito con la microscopía electrónica son agregados subsarcolemales de mitocondrias con anomalías en las crestas (Combes et al, 1989), incremento del número de mitocondrias o del tamaño de las mismas y presencia de inclusiones

paracristalinas, identificadas como depósitos de creatín-kinasa (Stadhouders et al, 1994; Bonilla et al, 1980).

1.1.5. Expresión clínica

Las enfermedades mitocondriales pueden expresarse de formas muy diversas, afectando a cualquier tejido (Schwartz et al, 2002) y en cualquier momento de la vida, si bien es cierto que la sintomatología más frecuentemente encontrada es neuromuscular (Leonard et al 2000; Zeviani et al, 1996).

Las mitocondrias se encuentran presentes en todas las células del organismo y el tejido afectado va a depender por un lado, de la demanda energética del tejido implicado (ésta demanda energética es elevada en músculo, cerebro y corazón), y por otro lado, de la distribución tisular del defecto del mtDNA (Egger et al, 1981). Los principales síndromes clínicos descritos asociados a alteraciones del metabolismo energético son los siguientes (Verma y Moraes, 2006):

1. Síndrome de Alpers: regresión psicomotora, crisis mioclónicas, microcefalia adquirida, insuficiencia hepatocelular
2. Síndrome de Pearson: anemia, disfunción pancreática exocrina
3. Síndrome de Barth: cardiomiopatía congénita, neutropenia
4. Oftalmoplejía externa crónica progresiva (CPEO)
5. Síndrome de Kearns-Sayre (SKS)

6. Forma miopática aislada: debilidad muscular, mialgias, intolerancia al ejercicio, miopatía progresiva, mioglobulinuria
7. Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ictus “stroke-like” (MELAS)
8. Epilepsia mioclónica con miopatía de fibras rojo rasgadas (MERRF)
9. Síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP)
10. Encefalomielopatía necrotizante subaguda (ENS, Síndrome de Leigh)
11. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)
12. Encefalopatía mioneurogastrointestinal, Síndrome de MNGIE: polineuropatía, oftalmoplejía, leucoencefalopatía, pseudoobstrucción intestinal
13. Síndrome DIDMOAD, y si es de inicio precoz, Síndrome de Wolfram: diabetes mellitus, diabetes insípida, atrofia óptica, sordera neurosensorial.

Clásicamente las enfermedades mitocondriales se han clasificado en base a la clínica o en base a la genética. La clasificación clínica de las enfermedades mitocondriales engloba dos grandes cuadros, las encefalomiopatías y las miopatías que cursan sin encefalopatía. A continuación se expone la clasificación clínica de las enfermedades mitocondriales y la clasificación genética de los defectos de la cadena respiratoria mitocondrial.

1.1.5.1. Clasificación clínica de las enfermedades mitocondriales:

1. Encefalomiopatías mitocondriales

1.1. Precoces

- a) Enfermedad de Leigh
- b) Enfermedad de Alpers
- c) Otros cuadros

1.2. Tardías

- a) Enfermedad de Kearn-Sayre
- b) MELAS
- c) MERFF
- d) Síndrome MNGIE
- e) Síndrome NARP

1.3. Miscelánea

- a) Neuropatía óptica hereditaria de Leber
- b) Síndromes no especificados

2. Miopatías mitocondriales

2.1. Precoces

- a) Miopatía infantil fatal
- b) Miopatía infantil benigna

2.2. Tardías

- a) Oftalmoplejía externa progresiva
- b) Miopatías proximales
- c) Intolerancia al ejercicio, mialgias, mioglobinuria
- d) Miocardiopatías

1.1.5.2. Clasificación genética de las enfermedades mitocondriales:

1. Alteraciones del DNA mitocondrial

1.1. Deleciones únicas (habitualmente esporádicas)

1.2. Duplicaciones o duplicaciones/deleciones (herencia materna)

1.3. Mutaciones puntuales (herencia materna)

2. Alteraciones del DNA nuclear (herencia mendeliana)

2.1. Mutaciones en los genes que codifican enzimas

2.2. Alteraciones en la importación de proteínas mitocondriales

3. Alteraciones en la comunicación intergenómica

3.1. Deleciones múltiples del DNA mitocondrial

3.2. Depleción del DNA mitocondrial

1.1.5.3. Miopatías mitocondriales precoces y tardías

Según la edad de presentación pueden distinguirse: **cuadros precoces**, en los que el paciente está gravemente enfermo desde el nacimiento o se deteriora rápidamente en los primeros años de vida, y **cuadros tardíos**, en los que el paciente permanece asintomático durante los primeros años de vida y los síntomas aparecen en la adolescencia o edad adulta. Las miopatías mitocondriales precoces suelen manifestarse como severa hipotonía del recién nacido. Los pacientes con miopatías mitocondriales de aparición tardía pueden presentar una variada expresión fenotípica, con diversas combinaciones de los siguientes síntomas: oftalmoplejía externa, debilidad muscular, miopatía proximal, intolerancia al ejercicio, mialgias,

mioglobinuria y miocardiopatía (Barohn, 2004). La debilidad muscular suele afectar a la musculatura proximal adoptando la forma de una miopatía de cinturas (“limb-girdle”) (figura 7). La presentación de intolerancia al ejercicio con mialgias como sintomatología exclusiva es poco conocida e infrecuente en las series desritas. Estos pacientes presentan una limitación patológica al ejercicio que desencadena mialgias y/o una respuesta ventilatoria y circulatoria excesiva (Haller et al, 1989), con acidosis metabólica severa en ocasiones (Schapira et al, 1998; Bet et al, 1990). La base bioquímica de la fatiga muscular excesiva se relaciona con el defecto metabólico que produce una deficiente utilización de oxígeno a nivel mitocondrial con una rápida entrada en metabolismo anaerobio (Elliot et al, 1989).



Figura 7. Miopatía mitocondrial tardía. Distribución proximal de las paresias (“limb-girdle”). Escápula alada bilateral.

1.2. MIOPATÍAS OCULARES MITOCONDRIALES.

1.2.1. Definición y clasificación de las miopatías oculares.

Las **miopatías oculares** son enfermedades de la musculatura ocular que causan limitación de los movimientos oculares dando lugar a oftalmoparesia u oftalmoplejía consecuencia de la paresia o parálisis, respectivamente, de los músculos extraoculares, y de debilidad del músculo elevador del párpado con una consecuente ptosis palpebral.

Bajo el concepto de miopatías oculares se incluyen entidades muy diferentes. En el año 1997 se realizó un intento de clasificación utilizando como criterio la edad de comienzo de los síntomas (Rowland et al, 1997). Según este criterio podemos diferenciar dos grupos: por un lado, las formas infantiles y, por otro lado, las formas juveniles o de inicio en el adulto. Las miopatías oculares infantiles corresponden a algunas miopatías congénitas (central core, multicore, centronuclear, miotubular, nemalínica, agregados tubulares), la distrofia muscular oculofaríngea infantil y la miastenia gravis congénita, mientras que las formas juveniles y del adulto comprenden la distrofia muscular oculofaríngea y las miopatías oculares mitocondriales. Otra forma de clasificar las miopatías oculares es en función de su etiología u origen. Según la etiología encontramos miopatía congénita, distrofia muscular, miopatía inflamatoria, miopatía tóxica, miopatía por trastornos infiltrativos, miopatía por deficiencia de vitaminas (vitamina E) y citopatías o miopatías mitocondriales (Verma y Moraes, 2006).

Los síndromes mitocondriales que clásicamente se han descrito con

afectación ocular son el SKS, la CPEO, el Síndrome de Pearson y el Síndrome MNGIE (Verma y Moraes, 2006). La sintomatología de ptosis palpebral y alteración de la motilidad ocular extrínseca en las miopatías oculares ocurre cuando el lugar afectado es el músculo. Otras patologías que presentan clínica ocular similar obligan a establecer el diagnóstico diferencial con la CPEO, sin embargo, la fisiopatología afecta a otros lugares diferentes del músculo. El ejemplo más significativo es la miastenia gravis, cuya fisiopatología se encuentra en relación con la unión o placa neuromuscular y no con el músculo en sí. También en la afectación de los nervios motores oculares por diferentes patologías y las lesiones nucleares o paranucleares de los mismos dan sintomatología ocular sin que exista un daño muscular (Behbehani et al, 2007).

1.2.2. Clínica de las miopatías oculares mitocondriales.

Existen dos síndromes mitocondriales bien descritos que implican a la musculatura extraocular: el Síndrome de Kearns-Sayre y la Oftalmoplejía externa progresiva.

1.2.2.1. Síndrome de Kearns-Sayre.

Para el diagnóstico de Síndrome de Kearns-Sayre deben cumplirse los tres criterios clínicos mayores que lo definen:

- 1) Comienzo antes de los 20 años de edad,
- 2) Ptosis palpebral y oftalmoplejía externa progresiva, y,
- 3) Retinitis pigmentaria (figura 8)

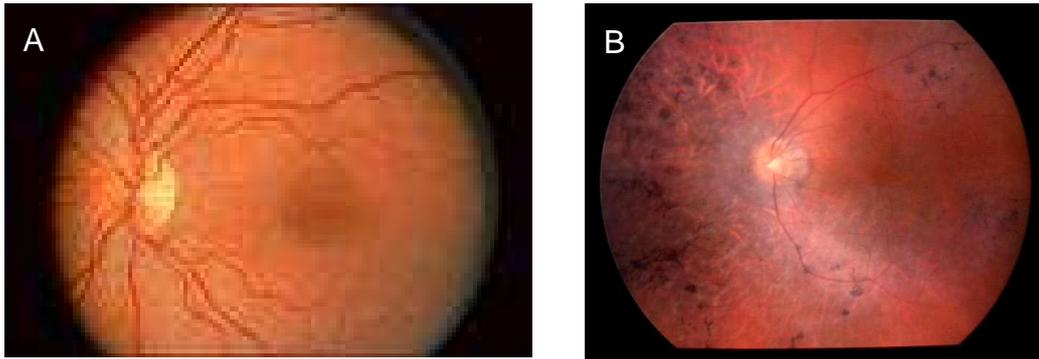


Figura 8. A) Fondo de ojo normal. B) Fondo de ojo de paciente con SKS que muestra una retinitis pigmentaria atípica.

Además, el paciente debe presentar al menos uno de los siguientes hallazgos o criterios menores: evidencia electrocardiográfica de bloqueo cardíaco (Chawla et al, 2008), hiperproteíorraquia (proteínas superiores a 100 mg/dL) en el líquido cefalorraquídeo, y/o síndrome cerebeloso (Kearns et al, 1958).

Esta entidad afecta por igual a hombres y mujeres. Otras posibles manifestaciones clínicas, además de las referidas en los criterios mayores y menores, son sordera neurosensorial, baja estatura, retraso mental o demencia (DiMauro y Bonilla, 1997), y endocrinopatías tales como la diabetes mellitus o el hipoparatiroidismo entre otras. Casi siempre existirán fibras RRF en la biopsia muscular. La mayoría de los casos de SKS son esporádicos y se asocian a grandes deleciones del mtDNA (Zeviani et al, 1988; Mita et al, 1989; Carod-Artal et al, 2006b). Hay autores que han encontrado deleción en el mtDNA hasta en el 70-80% de los pacientes con SKS estudiados (Soga F et al, 1993).

1.2.2.2. Oftalmoplejía externa progresiva.

Se trata de una miopatía mitocondrial por lo general de aparición tardía. Se caracteriza por la aparición progresiva de una ptosis palpebral, generalmente bilateral y asimétrica, y una afectación de los músculos oculomotores, dando lugar a oftalmoparesia u oftalmoplejía (figura 9) (Castro-Gago y Novo, 1998) que puede cursar sin diplopia (Garcidueñas et al, 2000).

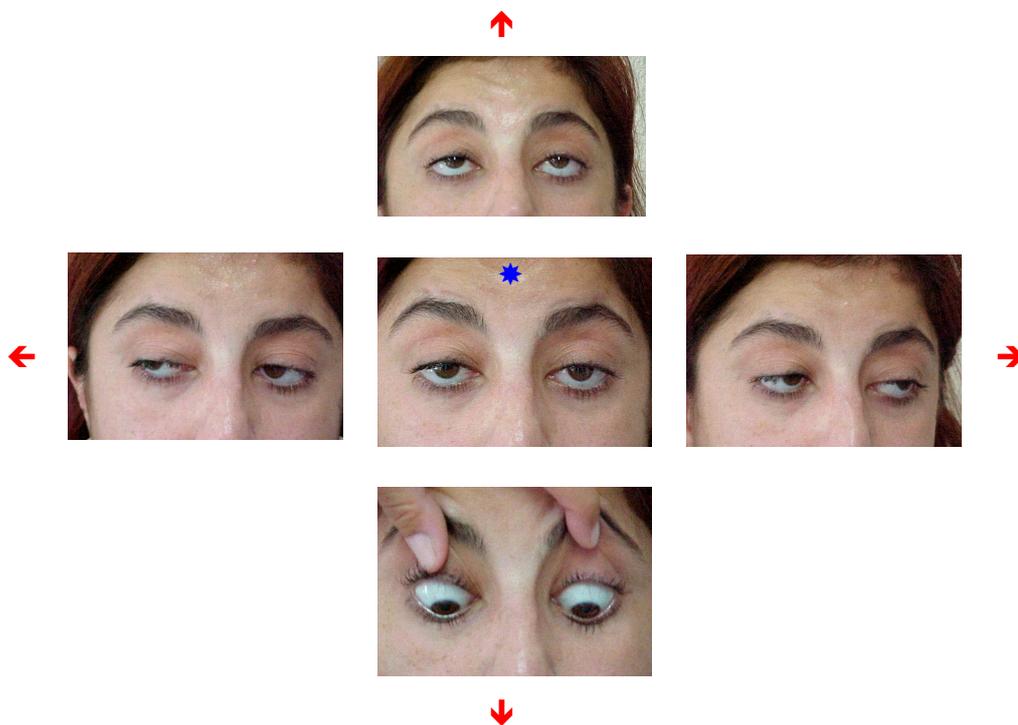


Figura 9. Paciente con oftalmoplejía de origen mitocondrial, con ptosis bilateral en la posición primaria de la mirada (*) y limitación de los movimientos oculares (las flechas indican la dirección de la mirada), más evidente en la mirada hacia arriba (cuadro superior).

La forma de expresión clínica varía de un paciente a otro (Laforet et al 1994) de manera que en ocasiones la única afectación es una ptosis palpebral, unilateral (figura 10) o bilateral. Otros pacientes combinan la ptosis con oftalmoparesia leve o severa (figura 11). En algunos casos existe también afectación de la musculatura esquelética (figura 12), genralmente de carácter leve y distribución proximal.



Figura 10. Paciente con ptosis unilateral como única manifestación de clínica de enfermedad mitocondrial.

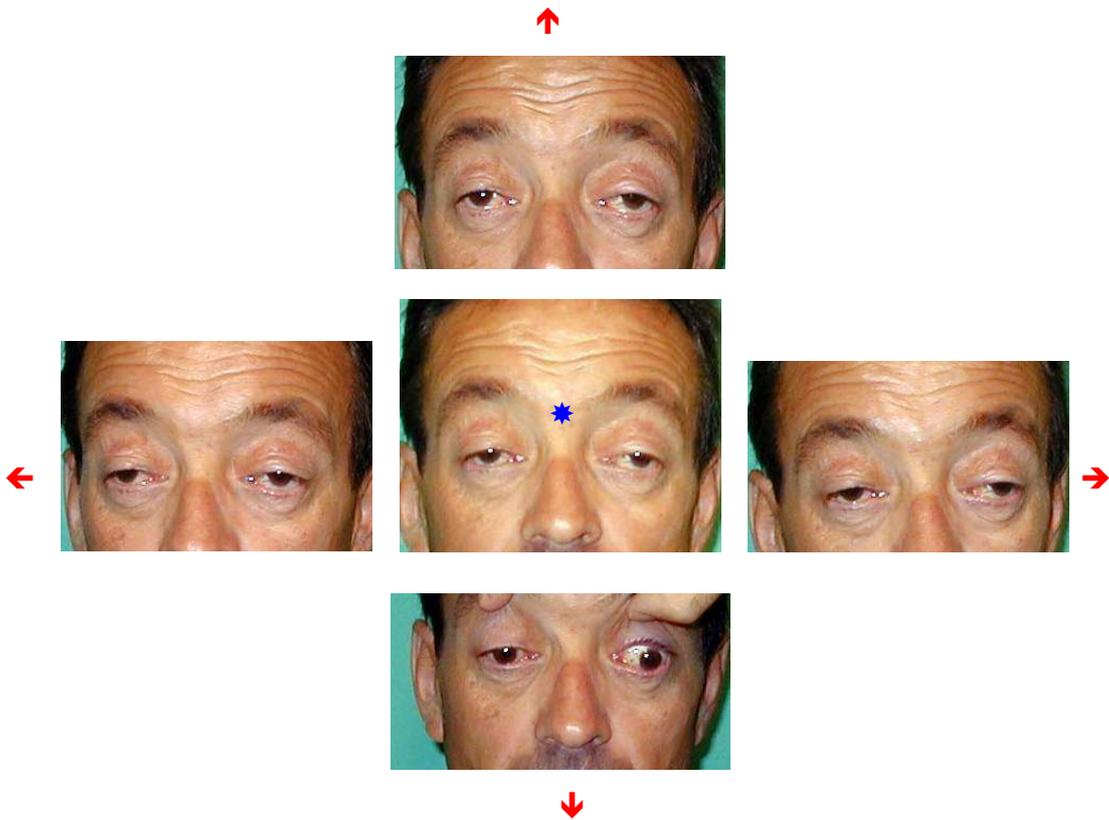


Figura 11. Paciente con oftalmoplejía severa de origen mitocondrial, con ptosis bilateral en la posición primaria (*) de la mirada y marcada limitación de los movimientos oculares (las flechas indican la dirección de la mirada). Mantiene una típica contracción permanente de la musculatura frontal para intentar compensar la ptosis palpebral.



Figura 12. Miopatía ocular de origen mitocondrial con afectación de musculatura proximal. En la figura A) puede observarse la afectación proximal de cintura escapular. En la figura B) observamos una ptosis palpebral bilateral en el mismo paciente.

La existencia de otras de otras alteraciones asociadas, depende en gran medida de la base genética del trastorno (Moslemi et al, 1996). La afectación cardíaca, cuando existe, se limita generalmente a trastornos de conducción, sin embargo hay estudios que demuestran que puede existir también una disfunción del ventrículo izquierdo (Akaike et al, 1997). Desde un punto de vista neuropsicológico, no se han encontrado trastornos de memoria o demencia significativos, pero sí se ha observado una afectación en la esfera ejecutiva, visuoespacial y atencional en estos pacientes (Bosbach et al, 2003).

Más de la mitad de los casos aparecen de forma esporádica, al igual que los casos de SKS (Larsson et al, 1992). Han sido descritas varias alteraciones genéticas asociadas a CPEO (ver anexo 2 y 3). Las deleciones únicas del mtDNA se detectan fundamentalmente en los fenotipos tipo síndrome de Kearns-Sayre, el síndrome de Pearson (Rotig et al, 1989) y las miopatías oculares (ptosis palpebral y/o CPEO). En los dos primeros cuadros es el hallazgo común en cerca del 90% de los casos (Moraes et al, 1989), y asociado a la presencia de RRF en casi el mismo porcentaje. En el caso de las miopatías

oculares se asocia a más del 50% de los casos, cuando presentan RRF en su biopsia muscular (Chinnery et al, 2004). Hay mutaciones puntuales en los tRNA que también se asocian a CPEO. En pacientes con CPEO y patrón de herencia autosómico dominante (Zeviani et al, 1989; Suomalainen y Kaukonen, 2001) se han descrito mutaciones causantes de deleciones múltiples del mtDNA, en tres genes implicados en la comunicación intergenómica:

- ANT1, que codifica la isoforma muscular del traslocador de nucleótidos de adenina (Kaukonen et al, 2000);
- C10orf2 (Twinkle), que codifica una helicasa mitocondrial (Spelbrink et al, 2001; Agostino et al, 2003);
- POLG, codificante de la subunidad γ de la polimerasa mitocondrial (Van Goethem G et al, 2001; Longley et al, 2006).

Las mutaciones en pol γ A son responsables de amplio espectro de cuadros clínicos (Horvath et al, 2006; Filosto et al, 2003). Las mutaciones en el gen POLG se han asociado a deleciones múltiples en pacientes con CPEO y herencia autosómico recesiva, y por tanto no sólo a la forma dominante de esta enfermedad (Lamantea et al, 2002). Otras entidades asociadas a mutaciones en este gen son el síndrome SANDO (CPEO, neuropatía sensorial con ataxia y disartria), la encefalopatía y dismotilidad intestinal (Van Goethem et al, 2003), cuadros complejos con parkinsonismo (Luoma P et al, 2004), la ataxia espinocerebelosa de inicio juvenil con epilepsia (Tzoulis et al, 2006) y la

poliodistrofia hepatopática infantil o síndrome de Alpers-Huttenlocher (Nguyen et al, 2005).

El diagnóstico CPEO se basa en los resultados de la biopsia muscular incluyendo fibras rojo-rasgadas (Johns DR, 1995; Schoser BG y Pongratz D, 2006) o verificando alteraciones del mtDNA mediante Southern blotting en el músculo esquelético. Hwang y colaboradores han encontrado deleciones en el mtDNA de células epiteliales en dos pacientes con ptosis palpebral y oftalmoparesia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de manera que postulan que la PCR de células bucales o epitelio urinario podría ser un método menos invasivo para el diagnóstico de CPEO (Hwang JM et al, 2009; Coulter-Mackie MB et al, 1998).

1.2.3. Correlaciones entre genotipo y fenotipo.

La complejidad de las características bioquímicas y genéticas de las proteínas que forman parte de la cadena respiratoria mitocondrial justifica la gran variedad de presentaciones clínicas en las enfermedades mitocondriales. Normalmente, los tejidos con más alta demanda energética, como el músculo, el cerebro y el corazón son los que principalmente se afectan. No obstante, debido a que la mayoría de los tejidos dependen para su correcta fisiología en mayor o menor medida del metabolismo mitocondrial, un fallo a este nivel podría producir entidades clínicas con afectación de órganos tan dispares como la médula ósea, el oído interno, el sistema endocrino, el hígado, el riñón, el páncreas o el tracto gastrointestinal (figura 13).

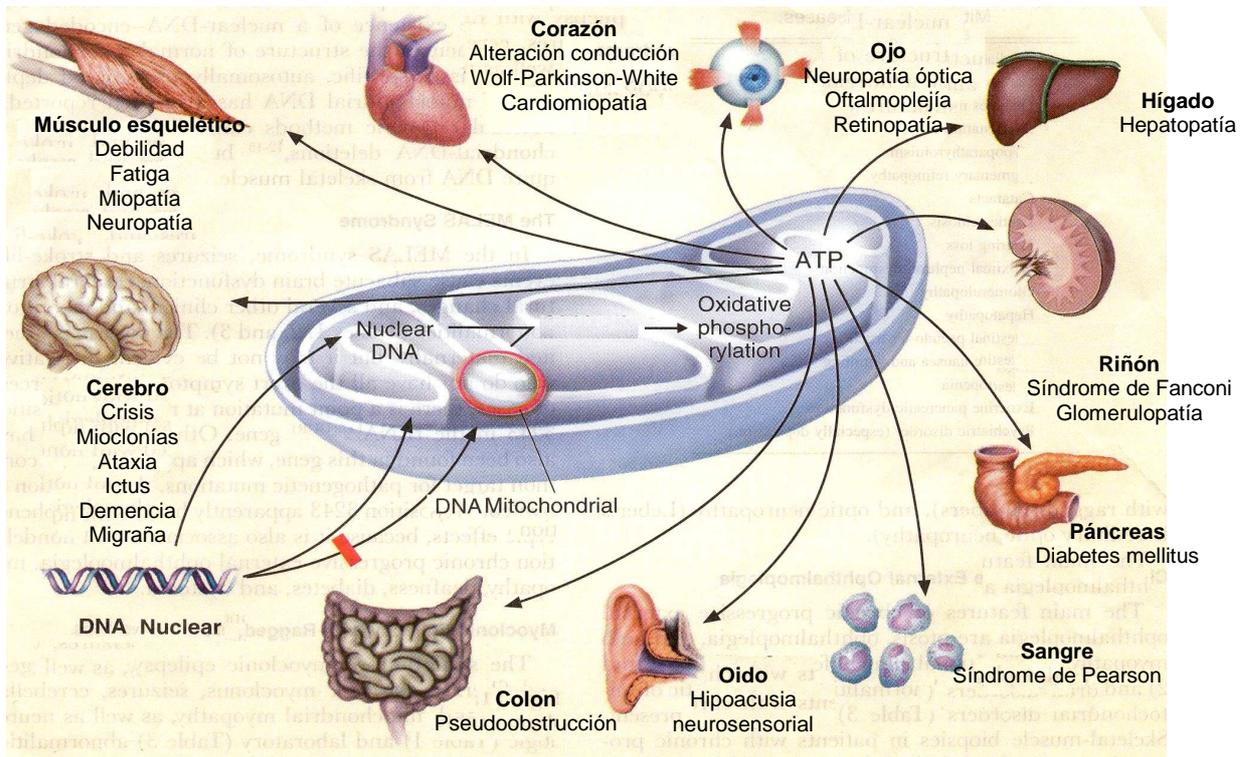


Figura 13. Afectación de los diferentes órganos de la economía secundaria a patología mitocondrial.

La heterogeneidad clínica y la afectación de órganos aparentemente tan diferentes como los descritos anteriormente, son criterios de sospecha diagnóstica de enfermedad mitocondrial, especialmente en casos pediátricos (DiMauro et al, 1993; Schon et al, 1997). La presentación de un síndrome rígido-acinético de debut en la infancia debe incluir en su diagnóstico diferencial a los trastornos mitocondriales, ya que éstos pueden simular cuadros secundarios a defectos de neurotransmisores (García-Cazorla 2008).

Las mutaciones patogénicas del mtDNA incluyen mutaciones puntuales (sustituciones) y mutaciones por reordenamientos simples o complejos de nucleótidos (deleciones, duplicaciones, inserciones), y pueden afectar a

cualquiera de los 2 rRNA, 22 tRNA y 13 polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial (McKenzie et al, 2004). Las mutaciones descritas en el grupo de enfermedades mitocondriales se asocian principalmente a enfermedades como el SKS (Zeviani et al, 1988), el Síndrome de Pearson (Akman et al, 2004) y la CPEO (Holt et al, 1988). En casos de heteroplasmia se necesita que la mutación afecte a un número mínimo de copias para que la célula desarrolle el correspondiente defecto bioquímico (Zeviani et al, 2007; Holt et al, 1990), por lo que el fenotipo clínico de una mutación puntual particular vendrá determinado por la proporción relativa de genomas sanos y mutados en los diferentes tejidos (Andreu et al, 2004). Por tanto, el hecho de que una misma mutación produzca diferentes fenotipos puede explicarse en función de la heteroplasmia, la segregación mitótica y el efecto umbral. No obstante, aunque mutaciones en diferentes genes o distintas mutaciones en el mismo gen pueden acarrear fenotipos similares, diferentes mutaciones en el mismo gen y en el mismo lugar nucleotídico pueden dar lugar a diferencias fenotípicas (Schon et al, 1997; Shoubridge et al, 1998; Zeviani et al, 2007; Zhang et al, 2008).

Algunos de los pacientes con CPEO esporádica presentan grandes deleciones del mtDNA indistinguibles de las del SKS en extensión y posición dentro del genoma mitocondrial. Por lo tanto, la CPEO podría constituir una forma frustrada de SKS, constituyendo una variante más leve (Zeviani, 2008; Shoffner et al, 1989). Otros casos de CPEO son familiares, con una herencia materna, y se asocian a mutaciones puntuales en el mtDNA, especialmente en genes que codifican el tRNA de varios nucleótidos (Maeso et al, 2007; Mariotti et al, 1995). Éste es el caso de la mutación del A3243G del ARN^tLeu, que

también puede causar un síndrome de MELAS. Existen casos descritos de CPEO con herencia autosómica dominante asociados a mutaciones puntuales en genes relacionados con la replicación del mtDNA como el de la *twinkle* *helicasa* (Rivera et al, 2007; Van Hove et al, 2009). Otro grupo de pacientes heredan la enfermedad de forma autosómica y presentan deleciones múltiples del mtDNA (Suomalainen et al, 1997). También se ha descrito la transmisión de forma recesiva (Bohlega et al, 1996).

Hay autores que han postulado en sus estudios que el tamaño de la deleción del mtDNA podría estar en relación con la evolución clínica de los síntomas. En los estudios más antiguos la evidencia para soportar esta hipótesis era escasa debido al número pequeño de pacientes incluidos en la muestra (Goto et al, 1990a). Aure y colaboradores dividieron 69 pacientes con deleción en el mtDNA en dos grupos en función de la presencia o ausencia de manifestaciones cerebrales tales como ataxia cerebelosa, trastorno del movimiento, síndrome piramidal o demencia. No encontraron diferencias en el tamaño y la localización de la deleción entre estos dos grupos (Aure et al, 2007). Yamashita y colaboradores examinaron un total de 136 pacientes con deleción en su mtDNA. Entre los diagnósticos clínicos se incluyeron 94 pacientes con CPEO, 33 pacientes con SKS, 6 pacientes con síndrome de Pearson, y 3 pacientes con otras entidades (1 paciente con síndrome de Leigh, 1 paciente con síndrome de Reye-“like” y 1 paciente con MELAS). Encontraron que los pacientes que portaban deleciones de mayor tamaño tenían un debut de la enfermedad más temprano. Además los pacientes con SKS presentaron deleciones más largas que los pacientes con CPEO (Yamashita et al, 2008).

Parte 2:

ANTECEDENTES HISTÓRICOS E INTERÉS DEL TEMA

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS E INTERÉS DEL TEMA.

Las enfermedades mitocondriales representan una patología relativamente reciente y el avance en su conocimiento ha sido paralelo al desarrollo de las nuevas técnicas de estudio en patología muscular.

El sistema genético mitocondrial se descubrió a finales de los años 60 y a principios de los 80 se dieron a conocer sus caracteres moleculares en unas investigaciones desarrolladas en el *California Institute of Technology* de Estados Unidos. En ellas participaron investigadores que ahora se encuentran en las Universidades españolas, y fueron consideradas en su momento como un hito en la Bioquímica al ser el primer genoma humano que se describía en su integridad (Zeviani, 2008; Montoya et al, 2002).

En la década de los ochenta los progresos de la exploración bioquímica multiplicaron las descripciones de anomalías de la función mitocondrial, describiéndose una amplia variedad de defectos metabólicos relacionados con diversos cuadros clínicos (Holt et al, 1988; Wallace et al, 1988). En los noventa el desarrollo de las técnicas genéticas de biología molecular permitió identificar numerosas mutaciones del mtDNA (Serratrice et al, 1991; Mita et al, 1990). Durante la pasada década se ha asociado de forma clara la presencia de mutaciones en el mtDNA al desarrollo de algunos cuadros clínicos establecidos. También se han ido demostrando mutaciones del nDNA responsables de enfermedad mitocondrial.

El ARNt^{Leu(UUR)} constituye el gen mitocondrial donde se han descrito más mutaciones puntuales causantes de patología en humanos. La primera mutación encontrada en el mismo fue una transición A-G en la posición 3243 del mtDNA (Goto et al, 1990). Estudios posteriores con grandes series han confirmado que esta mutación es la más frecuentemente asociada al síndrome MELAS, siendo responsable de más del 80% de pacientes con este fenotipo y RRF. Esta mutación se asocia también a otros fenotipos clínicos como es la CPEO. Se siguen describiendo nuevas mutaciones del mtDNA en este gen. Recientemente se ha identificado una nueva transición G3283A asociada con miopatía ocular de aparición tardía (Maeso et al, 2007).

Hoy por hoy se continúa con el estudio molecular tanto del mtDNA como el nDNA (Servidei, 2002; Spinazzola et al, 2005; Aure et al, 2006; Amanti-Bonneau et al, 2008; Hudson et al, 2008). Se sabe que el mtDNA es especialmente susceptible a la acumulación de puntos de mutación por lo que no es fácil determinar cuando una nueva mutación es patogénica, a pesar de los diferentes criterios que se han ido proponiendo y estableciendo a lo largo de los tiempos (Montoya J, 2009).

En la siguiente tabla (tabla 2) se resumen los principales hechos en la historia de las enfermedades mitocondriales.

HISTORIA DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES	
1868-1879	Von Graëfe y Hutchinson describen casos de parálisis ocular con ptosis.
1890-1892	Beaumont y Möbius (1892) introducen el término de oftalmoplejia nuclear progresiva.
1959	Ernster, Ikkos y Luft desarrollan técnicas para el estudio bioquímico de mitocondrias aisladas a partir de músculo esquelético obtenido por biopsia.
1962	Luft y colaboradores describen la primera enfermedad mitocondrial al demostrar un acoplamiento defectuoso de la fosforilización y oxidación mitocondrial en una paciente con hipermetabolismo eutiroides (enfermedad de Luft).
1963	Engel y Cunningham introducen una modificación en la tinción del tricrómico de Gomori que es capaz de mostrar acúmulos de mitocondrias anormales, apareciendo éstos como una banda morada en la periferia de la fibra muscular.
1972	Olson describe las fibras rojo-rasgadas ("ragged-red fibres" o RRF)
1977	Shapira utiliza por primera vez el término de encefalomiopatía mitocondrial, al demostrarse la existencia de mitocondrias anómalas en diversos cuadros en los que la participación cerebral era importante.
Años 80	Se describen numerosas anomalías bioquímicas de la función mitocondrial.
1988	Se describen las primeras mutaciones del DNA mitocondrial
Años 90	Se describen numerosas mutaciones del DNA mitocondrial y se relacionan con diversos fenotipos característicos
Siglo XXI	Se continua estudiando el genoma mitocondrial y nuclear en relación con los defectos de la fosforilación oxidativa

Tabla 2. Principales hechos de la historia de las enfermedades mitocondriales.

Cuando se revisa la literatura observamos que no son muchos los estudios que se pueden encontrar en relación a la patología ocular mitocondrial. Vilarinho y colaboradores publicaron en el año 1998 una serie de casos constituida por 29 pacientes portugueses con CPEO seleccionados de entre noventa pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial. La secuenciación del mtDNA puso de manifiesto que un 38% de los sujetos presentaban deleciones del mtDNA y que no existía en esta serie correlación entre el tamaño, lugar y número de deleciones, los hallazgos en la biopsia muscular (presencia de RRF y fibras COX negativas) y el déficit en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria afectados (Vilarinho et al, 1998). Esta ausencia de correlación entre los hallazgos clínicos, el estudio anatomopatológico, molecular y genético en las miopatías oculares, puede ser debida, entre otros factores, a la falta de unificación de criterios que existe entre los distintos grupos de trabajo a la hora de realizar las exploraciones. El abordaje diagnóstico unificado de los pacientes que padecen una miopatía ocular nos permitiría acercarnos con mayor precisión al establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo en esta entidad. Para ello es necesario seguir analizando sistemáticamente los casos.

Previamente, en el año 1995, Laforet y colaboradores realizaron una investigación sobre 43 pacientes procedentes de Francia que padecían CPEO con RRF, serie en la que se incluyen 6 pacientes con SKS y también pacientes con afectación multisistémica. En este artículo se realiza un análisis comparativo de los hallazgos clínicos, morfológicos y genéticos en la CPEO, confirmando una elevada frecuencia de deleciones en el mtDNA (58%). No encuentran en su investigación ningún dato clínico, morfológico o molecular al

inicio del trastorno que les permita predecir si la oftalmoplejía permanecerá como un cuadro clínico aislado o bien si llegará con el tiempo a formar parte de un trastorno multisistémico severo. No obstante, sí observaron que los pacientes con deleciones del mtDNA se caracterizaban por una oftalmoplejía más severa y de inicio más precoz que aquellos que no la presentaban. Además, los pacientes con afección multisistémica y deleción en el mtDNA representan casos esporádicos con una presentación clínica en su mayoría en relación con el SKS (Laforet et al, 1995).

Con fecha más reciente no encontramos en la literatura publicaciones de series de casos con un número amplio de pacientes con CPEO, sino sólo casos aislados o pequeñas series de casos. En este sentido, en el año 2006, Carod-Artal y colaboradores publican dos casos de CPEO en pacientes de origen brasileño y observan que las deleciones del mtDNA son más frecuentes con expresión esporádica, y no encuentran relación entre el tamaño, la localización y el porcentaje de heteroplasmia de las mismas, y el fenotipo de los pacientes (Carod-Artal, 2006a). Son Houshmand y colaboradores quien en este mismo año 2006 publican una serie de 23 pacientes iraníes con CPEO en el que realizan una investigación genética, tanto de las deleciones del mtDNA como de la mutación G1423C del nDNA, haciendo referencia a la necesidad de estudiar los pacientes con deleciones en el mtDNA desde el punto de vista de su nDNA, puesto que es posible identificar mutaciones en ambos genomas en un mismo paciente (Houshmand et al, 2006).

En cuanto a pacientes españoles existen también algunas publicaciones,

aunque son escasas. Hay descrita una serie de 24 pacientes, con diferentes fenotipos, seleccionados por la presencia de deleciones multiples en el mtDNA en quienes se describe una nueva mutación en el gen POLG (González-Vioque et al, 2006). En el año 2007 Rivera y colaboradores describen una familia española con CPEO con herencia autosómica dominante, identificando una nueva mutación en el nDNA, c.1071G>C (p.R357P) en la proteína *twinkle* (Rivera et al, 2007).

La diferente forma de expresión clínica de este tipo de miopatías que oscila desde pacientes con ptosis palpebral aislada hasta oftalmoplejía completa y otros que padecen una afectación multisistémica, y la diferente expresión morfológica y genética, nos ha llevado a plantear el presente trabajo. Nuestra investigación quiere contribuir al conocimiento del mecanismo molecular que produce la enfermedad para así en un futuro poder ofrecer soluciones de tratamiento e información a estos pacientes, ya que uno de los mayores problemas para definir estrategias en este campo es la dificultad de encontrar series largas de pacientes con el mismo defecto molecular, con la misma edad y el mismo grado de afectación clínica.

Parte 3:

MIOPATÍAS OCULARES MITOCONDRIALES EN ANDALUCÍA

3. MIOPATÍAS OCULARES MITOCONDRIALES EN ANDALUCÍA

3.1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

- Objetivo principal:

Definir la expresión fenotípica de la miopatía ocular de origen mitocondrial en nuestro medio y proponer una clasificación clínica.

- Objetivos secundarios:

1. Correlacionar las diferentes formas clínicas con las alteraciones morfológicas, histoquímicas y bioquímicas de la biopsia muscular.
2. Establecer la relación entre las deleciones del DNA mitocondrial y el cuadro clínico (correlación genotipo-fenotipo).
3. Establecer criterios pronósticos desde el punto de vista clínico.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Diseño del estudio

Estudio descriptivo y comparativo de una serie de casos constituida por pacientes seleccionados sobre una muestra hospitalaria, que padecen una miopatía ocular de origen mitocondrial según los criterios diagnósticos establecidos (Bernier et al, 2002).

3.2.2. Ámbito de estudio

- Unidad de Patología Neuromuscular del Servicio de Neurología y Neurofisiología Clínica de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla.
- Cobertura poblacional: Andalucía.
- El complejo hospitalario Virgen del Rocío tiene una población asignada como hospital de referencia de 875.331 habitantes en la provincia de Sevilla y es hospital de referencia, para algunas de sus especialidades más complejas, de toda la Comunidad Autónoma Andaluza, Ceuta, Melilla y Extremadura.
- La Unidad de Patología Neuromuscular del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla constituye el centro de referencia de la patología del sistema nervioso periférico para el resto de los centros de Andalucía.

3.2.3. Sujetos de estudio

Pacientes con miopatía ocular en los que se ha establecido un diagnóstico de enfermedad mitocondrial según los criterios clínicos, bioquímicos, histológicos y genéticos de Bernier (ver los criterios en el anexo 1), que han sido valorados en la consulta de Patología Neuromuscular desde el 1 de enero de 1992 al 31 de diciembre de 2007.

3.2.4. Criterios de inclusión y exclusión

A) Criterios de inclusión:

- Pacientes con miopatía ocular en los que se ha demostrado una etiología mitocondrial y cumplen los criterios diagnósticos definidos (ver anexo 1).

B) Criterios de exclusión:

- Pacientes con miopatía ocular en los que no se haya demostrado un origen mitocondrial.
- Pacientes con afectación de la musculatura extraocular que se encuentre en el contexto de un cuadro clínico miopático de un origen diferente al mitocondrial.
- Pacientes con encefalopatía asociada al síndrome clínico que presentan.
- Pacientes que cumplan los criterios de Síndrome de Kearns-Sayre.
- La edad no se considera un criterio de exclusión.

3.2.5. Recogida de datos

Se recogen los datos referentes a la historia clínica, la exploración, las determinaciones en sangre periférica y el estudio de la biopsia muscular desde el punto de vista morfológico, bioquímico y molecular.

a) Historia clínica y exploración

Se realiza una anamnesis completa a los pacientes. Se revisa la historia clínica de cada paciente con especial interés en los datos de filiación del paciente, la procedencia, la edad de inicio de los síntomas y la forma en que se inició la clínica, la existencia de antecedentes familiares de trastorno miopático, consanguinidad, los antecedentes personales del paciente, la coexistencia de otras enfermedades de base, el patrón de debilidad muscular y los síntomas asociados.

La exploración incluye una exploración física general por aparatos y sistemas y una exploración neurológica sistemática. En la exploración neurológica se pone un énfasis particular en la distribución de la debilidad muscular que presenta cada paciente. El balance motor se explora comprobando la fuerza muscular manualmente a partir de la observación de la actividad funcional (Tabla 3) (Brooke, 1986).

Se incluye en la exploración la fatigabilidad muscular clínica que, en general, deberá de estar ausente. Se enfatiza también en la búsqueda de otros signos o síntomas orientativos de patología mitocondrial tales como la exploración del fondo de ojo advirtiendo retinitis pigmentaria, la presencia de paladar ojival o la existencia de hipoacusia neurosensorial.

Localización	Signos o síntomas de debilidad
Facial	Incapacidad de fruncir las cejas, sonrisa horizontal, incapacidad de silbar
Ocular	Visión doble, ptosis palpebral, movimientos oculares no conjugados
Bulbar	Voz nasal, grito débil, regurgitación nasal de líquidos, dificultad para sorber, dificultad para tragar, neumonía por aspiración recidivante, tos durante las comidas
Cuello	Mal control de la cabeza
Tronco	Escoliosis, lordosis lumbar, abdomen protuberante, dificultad para sentarse
Cintura escapular	Dificultad para levantar objetos por encima de la cabeza, balanceo escapular
Antebrazo/mano	Incapacidad de cerrar el puño con fuerza, caída de los dedos o de la muñeca, incapacidad de evitar que se caigan las cosas
Cintura pélvica	Dificultad para subir escaleras, marcha de pato, signo de Gowers
Pierna/pie	Pie péndulo, incapacidad de caminar sobre los talones o la punta de los pies
Respiratoria	Uso de músculos accesorios

Tabla 3. Evaluación funcional de la debilidad muscular

b) Determinaciones en sangre periférica:

En sangre periférica se realizan los siguientes estudios de laboratorio:

1.- Enzimas musculares: Creatinkinasa, aldolasa, lactatodeshidrogenasa (LDH).

La Creatinkinasa (CK), también conocida como Creatinfosfokinasa (CPK) es una enzima, presente en varios tipos de tejido muscular. La energía requerida para la realización del proceso de contracción muscular se genera en un proceso bioquímico en el que interviene la CPK, interviniendo en la catálisis de la fosfocreatina para que ésta done su fosfato a la molécula de ADP, convirtiéndola en ATP, y haciendo de ésta un nuevo reservorio de energía química, lista para ser convertida en la energía mecánica necesaria para el proceso de contracción del músculo. Cuando realizamos un esfuerzo físico es

de esperar que en nuestra sangre exista siempre cierto nivel de esta enzima. Los valores normales de CPK son aquellos que se encuentran por debajo de 195 UI/L. La raza y el sexo pueden afectar a la CPK sérica (Wong et al, 1983). El valor de referencia que se toma para la CK en este estudio es de 24-95 UI/L.

2.- Determinación basal de ácido láctico, ácido pirúvico, cuerpos cetónicos, ácidos grasos libres y carnitina. El valor normal del ácido láctico basal se considera 0.6-2.44 mmol/L. El valor de referencia para el ácido pirúvico es de 30 a 60 mcmol/L y para los ácidos grasos libres de 120 a 600 mcmol/L. El valor para la carnitina está entorno a 33-70 μ mol/L. El índice láctico/pirúvico mayor de 25 indica un bloqueo de la fosofrilación del ATP reflejando un fallo en la vía glucolítica por déficit de piruvato carboxilasa o en la cadena respiratoria mitocondrial. Las muestras de sangre se extraen estando el paciente en ayunas.

3.- Curva de ácido láctico obtenida en el test de esfuerzo. Esta medición se realiza en anaerobiosis mediante el test de ejercicio en isquemia del antebrazo, según el protocolo de Munsat (Munsat, 1970). El test de isquemia consiste en la realización de un trabajo muscular, realizando una flexo-extensión de los dedos de la mano de manera continuada con el brazo en isquemia, conseguida ésta mediante la colocación en el antebrazo de un manguito de presión insuflado a 200 mmHg durante un minuto. Previamente se ha de canalizar una vía antecubital y el paciente ha de estar al menos 30 minutos en reposo. Se miden las cifras de lactato y amoníaco previo al inicio del ejercicio, es decir, en estado basal, y una vez realizado éste, a los 1, 3, 5, 10, y 20 minutos. El pico máximo de lactato se observa entre el primer y el tercer minuto, generando valores de entre

2 a 4 veces sobre el basal, siendo patológica una curva plana o elevaciones por encima del cuádruple del nivel basal. El pico máximo de amoníaco se obtiene entre los 2 y 5 minutos, incrementándose el valor entre 5 y 10 veces el basal. Los pacientes que no desarrollan un esfuerzo máximo pueden ser detectados porque la menor elevación del lactato se acompaña de una menor producción de amoníaco. Un incremento normal de lactato sin elevación paralela del amoníaco indica un déficit de mioadenilatodeaminasa (Munsat, 1970; Coleman et al, 1986). En los casos en los que el lactato basal es normal es útil someter al paciente a un ejercicio moderado ya que es más sensible para demostrar un aumento patológico de lactato venoso. Este test se realiza en la propia consulta médica con ayuda del personal enfermería para realizar las extracciones de sangre.

4.- Estudio de las mutaciones puntuales del mtDNA más frecuentes asociadas a enfermedades mitocondriales: A3243G, T3271C, C3256T, A3260G, T3250C (Goto et al, 1990; Ciafaloni et al, 1992; Moraes et al, 1993). Este estudio se realiza en el laboratorio de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío.

c) Estudio de la biopsia muscular:

El estudio de la biopsia muscular incluye la valoración de hallazgos morfológicos, inmuno-histoquímicos, el estudio bioquímico de la cadena respiratoria mitocondrial y el estudio molecular, todo ello realizado en muestras de músculo esquelético de cada paciente obtenidas a través de la realización de una biopsia muscular. La biopsia muscular se realiza en un quirófano anexo a la consulta, usando anestesia local, con material estéril adecuado y previa

firma del consentimiento informado por parte del paciente. En la mayoría de los casos se toma la muestra de músculo bíceps, aunque dependiendo de cada caso en concreto, también puede obtenerse de músculos diferentes (cuádriceps, deltoides o tibial anterior). La muestra de músculo se divide en dos partes, una parte para estudios de actividad enzimática y DNA, y la otra parte se procesará en el laboratorio de anatomía patológica para estudios histológicos.

c.1.) Estudio morfológico e inmuno-histoquímico del músculo.

El tratamiento de las muestras comprende las prácticas siguientes según el protocolo habitual (Chinchón, 1992) del laboratorio de Anatomía Patológica de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío:

1. Recepción en fresco de la muestra de músculo extraída. El tiempo desde la extracción hasta su llegada al laboratorio no debe superar los 15 minutos.
2. Orientación y praticado de la muestra. Esto permite obtener posteriormente secciones de orientación convenida (trasversales) de la muestra en el criomicrotomo y posibilitar la fijación de pequeños fragmentos de músculo en una solución de glutaraldehído para su posterior inclusión en epon.
3. Congelación por inmersión de fragmentos en metil butano, precongelado en nitrógeno líquido, durante unos 3 minutos.
4. Montado y fijado de la pieza congelada en los soportes del criomicrotomo y obtención de secciones múltiples de 10 μ de espesor.
5. Práctica histoquímica de las secciones con las diferentes tinciones.

El estudio morfológico de la biopsia muscular se realiza en el Departamento de Neuropatología de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla. Las técnicas rutinarias utilizadas para el estudio morfológico de la biopsia muscular son las siguientes (Chinchón, 1992): tinción con hematoxilina- eosina, tinción con tricrómico de Gomori, técnicas oxidativas (COX, SDH y NADH), técnica del ácido periódico de Schiff (PAS), técnica del rojo oleoso (ORO) y técnica de demostración de actividad ATPasa miosínica. Posteriormente, según las observaciones del patólogo y el enfoque clínico, podrían realizarse otros estudios con otras tinciones específicas. A continuación se describen los métodos utilizados de rutina:

a) Método tricrómico modificado de Gomori: Primero se tiñen las secciones durante 5 minutos con hematoxilina de Harris y se lava con abundante agua corriente. Inmediatamente se procede al tratamiento con la solución de Gomori (Chomotrope 2R 0,6 g, Fast-green FCF 0,3 g, ácido fosfotúngstico 0.6 g y agua destilada 100 ml en un pH ajustado a 3,4 con hidróxido sódico 1 molar) durante 10 minutos, lavado en ácido acético al 0,2%, deshidratación y montado. Las fibras toman un color uniforme verdoso, más intenso para las fibras tipo 1, destacándose gránulos rojizos subsarcolemales y sarcoplásmicos. El tejido conectivo fibroso se observa con un tono azulado claro. Esta técnica es utilizada para demostrar RRF, bastones nemalínicos y vacuolas ribeteadas.

b) Técnica para la demostración de fotocromo-oxidasa (COX): Se parte de un medio de incubación [5 mg de tetrahidroclorato 3-3'-diaminobenzidina (DAB) disueltos en 9 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 con adición de una

catalasa (20 mg/ml), 10 mg de citocromo c y 750 mg de sucrosa]. Las secciones se incuban cubiertas del medio descrito 30-60 minutos a 22°C. Posteriormente se lavan con agua destilada, se deshidratan y montan. La actividad citocromo-oxidasa se manifiesta en forma de grumos pardo dorados.

c) Técnica de la NADH tetrazolium reductasa: Tras el secado breve de las secciones se incuban 30 minutos a 37°C en la solución madre [MTT tetrazolium (1mg/ml) 5 ml, amortiguador tris (0,1 M pH 7,4) 5 ml, cloruro de cobalto (0,5 M) 1 ml y agua destilada 7 ml] almacenada a -20°C con pH ajustado a 7. Se escurre acto seguido y se cubren las secciones con formol salino durante 15 minutos. Se lava bien y se monta en gelatina-glicerina tras contrateñido con verde de metilo. Los puntos de actividad NADH mitocondrial se evidencian en coloración negro azulada. La intensidad de la actividad es más patente en las fibras de tipo 1.

d) Técnica de la succino deshidrogenasa (SDH): Se mezclan las dos soluciones madre de las que se parte, una solución del medio de incubación [MTT tetrazolium (1 mg/ml) 2,5 ml, amortiguador tris (0,1 M pH 7,4) 2,5 ml, cloruro de cobalto (0,5 M) 0,5 ml y agua destilada 3,5 ml] almacenada con pH ajustado a 7 en arcón congelado a -20°C, y otra solución madre del substrato (succinato sódico 1,620 g, agua destilada 8 ml y ácido clorhídrico 1N 0,05 ml) almacenada de la misma manera. La mezcla se realiza a nueve partes de la primera por una parte de la segunda. Las secciones se secan brevemente y se incuban durante 40-60 minutos a 37°C convenientemente cubiertas por la mezcla de soluciones madre. Se escurren y se fijan con formol salino durante 15 minutos, se lavan y se montan con gelatina-glicerina contrateñidas,

opcionalmente, con verde de metilo. Los grumos reactivos negro-azulados expresan el enzima succino dehidrogenasa mitocondrial.

e) Técnica de PAS: Se lavan las secciones con agua destilada, se cubren acto seguido con ácido periódico al 0,5% durante 10 minutos y posteriormente se lava con agua destilada. Seguidamente se cubren las secciones con el reactivo de Schiff (fucsina básica 1 g, metabisulfito sódico 2 g, ácido clorhídrico concentrado 2 ml, carbón decolorante 2 g y agua destilada 200 ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavan con agua sulfurosa varias veces. Posteriormente se tiñen con hematoxilina de Harris acetificada y se viran con carbonato de litio. Se cubren tras lavado y deshidratación. Con esta técnica se consigue una coloración rosada de las fibras, sutilmente más intensa en las de tipo 2, evidenciando el glucógeno como gránulos purpúreos. Por tanto, es una técnica que se utiliza para demostrar los acúmulos de glucógeno.

f) Técnica del ORO: Se parte de una solución madre de rojo oleoso disuelto en 100 ml de isopropanolol, de los que 6 ml se diluyen, anteriormente, en 4 ml de agua destilada filtrando la dilución tras 15 minutos. Se cubren las secciones durante 10 minutos con esta solución y se lavan con agua destilada, contratinción con hematoxilina de Harris durante 5 minutos, posterior lavado en agua destilada y montado en gelatina. Esta técnica evidencia vacuolas lipídicas.

g) Técnica de demostración de actividad ATPasa miosínica: Las secciones se incuban a temperatura ambiente en la solución [veronal sódico (0,1 M) 2 ml, cloruro cálcico (0,18 M) 2 ml y agua destilada 6 ml ajustando el pH a 9.4 con hidróxido sódico 0,1N] y se reincuban 4 minutos y medio en veronal

sódico (0,1 M) 2 ml, cloruro cálcico (0,18 M) 1 ml, agua destilada 7 ml y sal disódica ATP 25 mg ajustando el pH a 9,4 con hidróxido sódico 0,1 N. Se lavan las secciones en tres cambios con cloruro cálcico al 1% un total de 10 minutos y se tratan con cloruro de cobalto al 2% 3 minutos, lavado con agua corriente durante unos 15-30 segundos, y posteriormente se trata con cloruro de amonio al 1% durante 20-30 segundos. Una vez realizado todo esto se lava abundantemente, seguido de deshidratación, aclarado y montado. Esta técnica nos permite diferenciar los diferentes tipos de fibras. El pH 9,4 define las fibras tipo 2 pardo-oscuros y claras las de tipo 1. El pH 4,6 define las fibras tipo 1 pardo-oscuros, las 2A uniformemente claras y las 2B pardo-grisáceas. El pH 4,3 define las fibras de tipo 1 pardo-oscuros y todas las de tipo 2 claras.

c.2.) Estudio bioquímico del músculo.

El estudio bioquímico de la cadena respiratoria mitocondrial con determinación de los diferentes complejos se realiza en Laboratorio de Biología Celular del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo-CSIC, situada en la Universidad Pablo de Olavide (UPO) de Sevilla. Este estudio nos permite conocer si existe déficit de alguno de los complejos de la cadena respiratoria y de qué complejo o complejos se trata. El músculo es el tejido que hoy en día aporta más información en este sentido.

Una vez realizada la biopsia muscular se congela inmediatamente a -80°C la parte de la muestra de músculo extraída destinada a este estudio. La muestra congelada se envía a la UPO donde se lleva a cabo la determinación de las actividades enzimáticas del metabolismo del piruvato y de la cadena respiratoria

mitocondrial, mediante métodos espectrofotométricos en homogenado de tejido enriquecido en la fracción mitocondrial. También puede llevarse a cabo la determinación de la concentración de coenzima CoQ en el músculo. Se realizan métodos que miden la actividad de los complejos individualmente, realizando también la valoración conjunta de las actividades de los complejos I+III (NADH-citocromo c reductasa) y II+III (succinato-citocromo c reductasa). Por último, se normalizan los resultados de la actividad de cada complejo por la actividad de citrato sintasa, que es un indicador del número de mitocondrias y permite corregir la actividad enzimática en función del grado de proliferación mitocondrial (DiMauro et al, 1999).

d) Estudio de mutaciones en el DNA mitocondrial.

Consiste en el estudio de deleciones a gran escala en el mtDNA. Se estudia mediante la técnica de Southern-blot, digiriendo previamente el DNA con las enzimas de restricción /BamHI/ y /PvuII/ (Tang et al, 2000; Moraes et al, 1989) y posteriormente, realizando una electroforesis en gel de agarosa y una transferencia a membrana de nylon. El marcaje de los fragmentos de DNA se realizará con sondas marcadas con digoxigenina y el revelado con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. La técnica se compone de seis pasos sucesivos:

1. Determinación de la concentración y pureza del DNA
2. Digestión del DNA total
3. Electroforesis en gel de agarosa del DNA digerido
4. Tratamiento del gel y transferencia a blot

5. Hibridación con sonda marcada con Digoxigenina
6. Revelado con anticuerpos Anti-Digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina.

Para determinar la concentración y pureza del mtDNA se mide la absorbancia de las muestra sin diluir a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro de haz ultravioleta con corrección a 320nm para eliminar la contaminación por proteínas. La concentración de DNA se expresa en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se considera suficientemente pura la muestra si el valor del coeficiente $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ es cercano a 1,8. Si la muestra de DNA no está lo suficientemente pura, se vuelve a extraer DNA de nuevo, puesto que la contaminación con proteínas interferiría con los estudios posteriores. Posteriormente se digieren paralelamente dos muestras de mtDNA de 40 μl con dos enzimas independientes (*Bam*HI/ y *Pvu*II/, 10 U) durante 2 horas (figura 14). Esto permite un estudio más profundo de posibles deleciones (Hao et al, 1995).

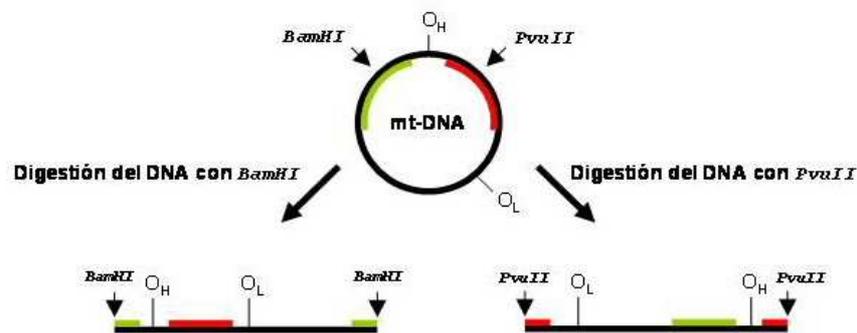


Figura 14. Digestión del mtDNA por las enzimas de restricción

El DNA digerido se carga en un preparado de gel de agarosa al 0.75% junto a 5µl de marcadores de peso molecular (λ -HindIII) preteñidos con digoxigenina y se realiza la electroforesis a 50 voltios durante toda la noche. Finalizada la electroforesis se comprueban los resultados en un transiluminador ultravioleta. El siguiente paso es preparar el gel con las diferentes soluciones para llevar a cabo la transferencia al blot. Para la hibridación con sonda marcada con digoxigenina se usa el kit de Roche® (cat.#11-585-614-910) llamado DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit II. La sonda se prepara previamente con PCR (Sato et al, 1989; Tengan y Moraes, 1996) y se marca con digoxigenina según se marca en el protocolo de Roche®. La sonda está compuesta por dos fragmentos de DNA amplificados directamente de mtDNA, uno a la derecha del origen de replicación O_H (representado en rojo en la figura 15 y cubriendo los genes que codifican para los RNA ribosómicos) y otro a la izquierda (representado en verde en la figura 15 y cubriendo el gen que codifica para el citocromo b5).

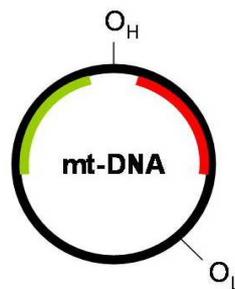


Figura 15. Sonda de mtDNA

Terminada la hibridación se lava la membrana y se incuba con solución de anticuerpo del kit de Roche® durante al menos 30 minutos. Por ultimo, se expone una placa de radiografía para visualizar el resultado. El revelado de la placa radiográfica se lleva a cabo en el Servicio de Radiología de los

3.2.7. Método estadístico

Se recogen los datos de los paciente con diagnóstico de miopatía ocular mitocondrial estudiados en la consulta Patología Neuromuscular, remitidos desde los diferentes lugares de Andalucía. Las variables a analizar en cada paciente para llevar a cabo este estudio son las que se detallan a continuación:

- Localidad de origen
- Sexo
- Fecha de nacimiento
- Edad actual: se anota la edad del paciente en el año 2007
- Fecha en que se inició el estudio del paciente en la consulta
- Edad a la que se iniciaron los síntomas o edad de debut de la enfermedad
- Tiempo de evolución de la enfermedad: calculándolo según la edad en que se iniciaron los síntomas y la edad de estudio actual
- Tiempo de seguimiento del paciente en consulta o tiempo de observación: calculándolo según la fecha de inicio del estudio en la consulta hasta la fecha del presente estudio
- Antecedentes familiares
- Consanguinidad
- Herencia: anotando el patrón de herencia si éste existiese (materna o herencia autosómica dominante) o bien como ausencia de herencia
- Hijos afectados
- Presencia de paladar ojival
- Presencia de hipoacusia o sordera

- Exploración del fondo de ojo: retinitis pigmentaria
- Enfermedades asociadas: otras enfermedades que padece el paciente
- Síntomas oculares: ptosis palpebral, oftalmoparesia u oftalmoplejía
- Ptosis palpebra: unilateral o bilateral
- Severidad de la oftalmoparesia: leve (alteración de la motilidad ocular en una dirección, horizontal o vertical, pero con más del 10% de la motilidad ocular normal conservada) o compleja (limitación en todas las direcciones de la mirada, con afectación marcada y menos del 10% de la movilidad normal)
- Diplopia: se anota si el paciente refiere visión doble
- Síntomas de la musculatura esquelética: se anota la presencia o ausencia de estos síntomas. En caso de existir se gradúa según presenten síntomas como mialgias, calambres musculares, cansancio, fatiga precoz o intolerancia al ejercicio, o bien exista una paresia muscular objetivada en la exploración del balance muscular
- Edad a la que aparecen los síntomas de afectación de la musculatura esquelética
- Síntomas bulbares: disfagia, disfonía
- Curso clínico de los síntomas: estable, progresivo, fluctuante. Se considera estable si la enfermedad se limita a la afectación ocular y progresivo si hay afectación de la musculatura esquelética. El curso fluctuante de la ptosis palpebral también se anota.
- Lactato: basal y curva, normal o hiperlactacidemia
- Valor de CK: normal o elevada
- Músculo biopsiado

- Edad a la que se realizó la biopsia
- Datos morfológicos de la biopsia muscular: presencia de RRF, fibras COX negativas, aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal, aumento de lípidos, variabilidad en el tamaño de las fibras, presencia de vacolas ribeteadas (“rimmed-vacuols”)
- Cadena respiratoria: normal o alterada
- Complejos de la cadena respiratoria (I – IV): normal o deficitario
- Presencia de delección en el mtDNA: detectada o no detectada
- Tamaño de la delección: medida en Kilobites, pequeña cuando ocupa ~1 Kb o grande cuando es mayor de 3 Kb
- Localización de la delección: zona de alta frecuencia
- Heteroplasmia: porcentaje de mtDNA normal y mtDNA mutado

Las variables son recogidas en una base de datos utilizando el paquete estadístico SPSS. Los datos son analizados utilizando este programa (SPSS versión 15.0). Se comparan las variables clínicas, bioquímicas, morfológicas y moleculares entre los pacientes de la serie. Las variables cualitativas se expresarán como porcentajes y se compararán mediante el test de la Chi-cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher en el caso de que las frecuencias obtenidas sean pequeñas. Las variables cuantitativas se expresarán mediante medidas de centralización, posición y dispersión, como son la media, la desviación estándar o típica (DE o DT), la moda, la mediana y el rango o amplitud. Se compararán mediante la t de Student en caso de mostrar una distribución normal y con test no paramétricos en caso contrario. La correlación entre una variable cualitativa o discreta y una continua se hará

mediante el análisis de la varianza, utilizando ANOVA de una vía. Una vez medidas las variables de interés en los sujetos de estudio, se presentarán los datos mediante gráficos y tablas. Las tablas se emplearán para resumir los resultados de las variables cuantitativas y cualitativas. Para la representación de una sola variable se utilizará el diagrama de barras y el diagrama de sectores o tarta. También se empleará el diagrama de cajas. Los diagramas de caja hacen énfasis en las medidas de posición y resulta muy útil para hacer comparaciones gráficas entre muestras de distintos subgrupos. Consisten en construir un rectángulo sobre el eje en donde se representan los valores de la variable cuya longitud es el recorrido intercuartílico, dividido por un segmento a la altura de la mediana y complementado por dos líneas (llamadas bigotes) que parten de los extremos del rectángulo, cuya longitud no supera 1.5 veces el rango intercuartílico y que intentan alcanzar los valores mínimo y máximo observados (valores adyacentes). Cuanto más centrada esté la mediana en la caja y más similares sean las distancias desde ella hasta los valores adyacentes, más simétrica será la distribución. Se considerará significación estadística un valor de p inferior a 0.05 (Burgos Rodríguez, 1998).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Datos Epidemiológicos

El total de pacientes estudiados es de 57 ($N = 57$), de los cuales 27 sujetos son de sexo masculino y 30 pacientes son de sexo femenino, representando el 47.4% y el 52.6%, respectivamente, del total de individuos (Gráfico 1).

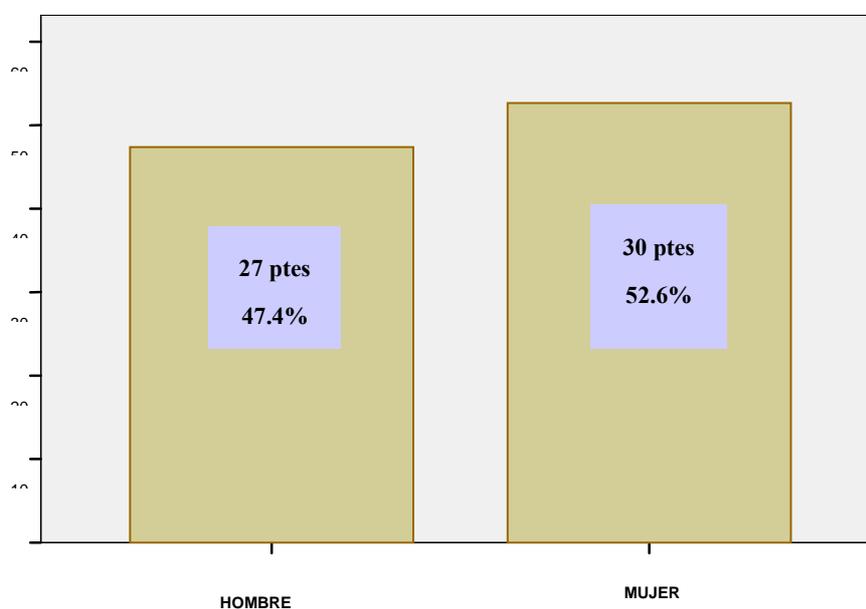


Gráfico 1. Distribución por género (N= 57)

La edad media de los pacientes de la serie es de 45.75 años, con una mediana de 45.99 años y una desviación típica de 15.53 años. El 49.12% de los pacientes son jóvenes, con una edad inferior o igual a 20 años (Tabla 4). Respecto a la edad de debut o de inicio de los síntomas, la media es de 25.31 \pm 18.76 años, con una mediana de 23.64 años. En once de los pacientes (19.29%) de la serie el inicio de los síntomas se remonta a la etapa pre-

connatal, estando presente los síntomas desde el nacimiento. De estos casos, 7 pacientes son varones (63.63%) y 4 casos mujeres (36.36%). Consultar la tabla 9 más adelante.

Intervalos de edad	Número de pacientes	Porcentaje total
0 – 20 años	28	49.12%
20 – 40 años	15	26.32%
40 – 60 años	12	21.05%
> 60 años	2	3.51%
Total (N)	57	100%

Tabla 4. Distribución de los pacientes en grupos de edad cronológica.

Los pacientes presentan una media de tiempo de evolución de su enfermedad de 20.44 ± 13.24 años, con una mediana de 16 años. El paciente de la serie que mayor tiempo de evolución de su enfermedad presenta (caso 57) tuvo el debut de su enfermedad en el nacimiento y lleva 55 años de evolución. En el gráfico 2 y en la tabla 5 vemos expresado gráficamente el tiempo de evolución de la enfermedad de los pacientes.

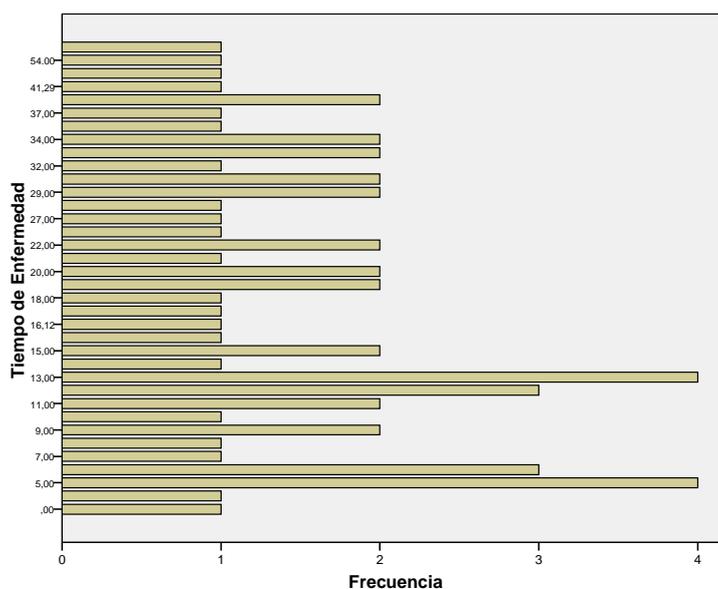


Gráfico 2. Gráfico de barras. Eje Y: tiempo de evolución de la enfermedad expresada en años. Eje X: número de pacientes (frecuencia).

P	T	P	T	P	T	P	T	P	T	P	T	P	T
1	37 años	11	12 años	21	12 años	31	40 años	41	11 años	51	13 años		
2	5 años	12	27 años	22	31 años	32	9 años	42	21 años	52	17 años		
3	22 años	13	7 años	23	19 años	33	22 años	43	15 años	53	40 años		
4	54 años	14	13 años	24	10 años	34	6 años	44	0 años	54	29 años		
5	35 años	15	19 años	25	5 años	35	34 años	45	41 años	55	9 años		
6	13 años	16	5 años	26	13 años	36	32 años	46	16 años	56	8 años		
7	31 años	17	16 años	27	12 años	37	4 años	47	20 años	57	55 años		
8	34 años	18	5 años	28	20 años	38	33 años	48	28 años				
9	14 años	19	6 años	29	33 años	39	25 años	49	29 años				
10	48 años	20	6 años	30	11 años	40	18 años	50	15 años				

Tabla 5. Tiempo de evolución de enfermedad en cada paciente. P: numeración asignada al paciente. T: tiempo.

Respecto al lugar de procedencia de los pacientes estudiados, 29 casos, es decir, el 50.9% del total, provienen de Sevilla. El resto de los casos, 28 pacientes, fueron remitidos a la consulta desde otras ciudades de Andalucía (25 casos), Madrid (1 caso) y Badajoz (2 casos). Ver gráfico 3.

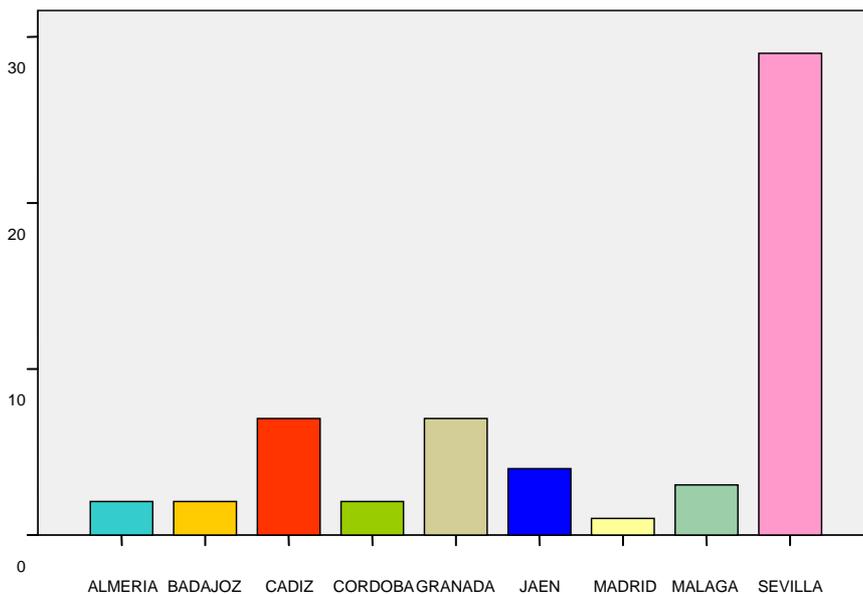


Gráfico 3. Localidad de origen de los pacientes. Eje Y: frecuencia.

3.3.2. Antecedentes familiares y forma de herencia.

No se describe antecedente de consanguinidad entre los padres de los pacientes en ninguno de los casos estudiados. No se ha identificado antecedente de historia familiar en 51 pacientes. En 5 pacientes se describe historia de enfermedad en la línea familiar materna, madre y/o abuela materna, y en un paciente el antecedente es paterno. Los pacientes número 10, 33, 49 y 56 tienen hermanos afectos, pero en ninguno de estos casos se describe un patrón de herencia establecido (Tablas 6 y 7).

Transmisión/Herencia	Frec	%
NO HEREDITARIA	51	89.5%
MATERNA	5	8.8%
AUTOSÓMICA DOMINANTE	1	1.8%
Total	57	100%

Historia familiar	Frec	%
Ausente	44	77.2%
PADRE AFECTO	1	1.8%
MADRE AFECTA	3	5.3%
ABUELA PATERNA	1	1.8%
ABUELA MATERNA	1	1.8%
HERMANOS	4	7%
FAMILIAR 2º GRADO	2	3.5%
FAMILIA MATERNA	1	1.8%
Total	57	100%

Tablas 6 y 7. Análisis de frecuencias de la forma de herencia e historia familiar. Frec: frecuencia de casos, %: porcentaje total que representan.

En el grupo de pacientes con formas hereditarias se han encontrado diferentes formas de expresión clínica de los síntomas, sin encontrarse una relación estadísticamente significativa entre el patrón de herencia y la forma clínica ($p > 0.05$). Los síntomas de la musculatura esquelética están presentes en cuatro pacientes de los seis casos del subgrupo con presencia de herencia

($p = 0.484$). En la tabla 8 se resumen las características clínicas de los pacientes que presentan patrón de herencia.

C	Sexo	Edad (años)	Edad debut (años)	Forma de herencia	Síntomas oculares	Síntomas musc. esquelética	Otros síntomas
1	Hombre	50	13	Mat	Ptosis y oftalmoplejía compleja	Paresia proximal	Disfagia y disfonía
4	Hombre	72	18	Mat	Ptosis y oftalmoparesia leve	Paresia proximal	-
21	Hombre	49	40	Mat	Ptosis	Mialgias	-
30	Hombre	74	60	Mat	Ptosis y oftalmoplejía compleja	-	-
53	Hombre	40	0	Mat	Ptosis	-	-
29	Mujer	43	0	AD	Ptosis y oftalmoparesia leve	Cansancio, intolerancia al ejercicio	-

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con formas hereditarias. C: número de identificación del paciente. Forma de herencia: Mat = materna, AD = autonómica dominante.

3.3.3. Características clínicas

En todos los casos los síntomas se inician por la afectación ocular, siendo éste el motivo de consulta en la mayoría de los pacientes. Los síntomas oculares aparecen en el 100% de los pacientes, bien en forma de ptosis palpebral, bien como limitación de la motilidad ocular, o bien como una

combinación de ambos. Los síntomas musculares están presentes en el 59.65% de los pacientes de la serie, bien como expresión de síntomas subjetivos o bien como paresia muscular objetivada en el balance motor de la exploración clínica. Ocho pacientes (14.03%) presentan fenotipo óculo-faríngeo con afectación de la musculatura bulbar. Otros síntomas y signos como hipoacusia, retinitis pigmentaria en la exploración del fondo de ojo y paladar ojival, también se describen en estos pacientes. En la tabla 9 vemos un resumen de las principales características de todos pacientes de la serie.

Paciente (sexo)	Edad	Edad de debut	Casos familiares	Síntomas oculares	Síntomas m. esquelética	Otros síntomas
1 (H)	50	13	Mat	+++	++	DF, DG
2 (M)	18	13	-	++	-	-
3 (M)	61	40	-	+	-	-
4 (H)	72	18	Mat	++	++	-
5 (M)	50	15	-	+++	-	S
6 (H)	30	17	-	+	++	DG
7 (M)	49	18	-	+++	++	-
8 (H)	62	28	-	+++	-	-
9 (M)	61	47	-	+	-	DF, DG
10 (M)	48	0	H	+	+	-
11 (M)	56	44	-	+	+	-
12 (H)	27	0	-	+	++	PO
13 (M)	26	19	-	+	+	-
14 (M)	79	66	-	+	-	-
15 (H)	64	45	-	+	+	-
16 (H)	38	33	-	+++	++	-
17 (M)	16	0	-	+++	++	-
18 (M)	35	30	-	+++	++	R

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes (continúa en la siguiente página).

Paciente (sexo)	Edad	Edad de debut	Casos familiares	Síntomas oculares	Síntomas m. esquelética	Otros síntomas
19 (H)	53	47	-	+	+	-
20 (M)	46	40	-	+	-	-
21 (H)	52	40	Mat	+	+	-
22 (M)	61	30	-	+++	-	DG, R
23 (H)	58	39	-	++	-	-
24 (M)	54	44	-	+++	++	-
25 (M)	45	40	-	+	-	-
26 (H)	33	20	-	+++	++	-
27 (M)	46	34	-	+++	++	R
28 (M)	34	14	-	+++	-	-
29 (M)	33	0	AD	++	+	-
30 (H)	71	60	Mat	+++	-	-
31 (H)	40	0	-	+++	-	-
32 (M)	61	52	-	++	++	DG
33 (H)	22	0	H	++	++	R
34 (H)	69	63	-	+	-	-
35 (H)	54	20	-	+++	-	-
36 (H)	42	10	-	+++	++	PO
37 (H)	17	13	-	+	-	-
38 (M)	33	0	-	+	+	-
39 (M)	40	15	-	+++	+	-
40 (H)	18	0	-	+	+	-
41 (H)	63	52	-	+	-	-
42 (M)	36	15	-	+++	++	R
43 (H)	61	46	-	+++	-	DG
44 (M)	23	23	-	+	++	-
45 (H)	41	0	-	+++	++	DF
46 (M)	41	25	-	+++	++	-

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes (continúa en la siguiente página).

Paciente (sexo)	Edad	Edad de debut	Casos familiares	Síntomas oculares	Síntomas m. esquelética	Otros síntomas
47 (M)	53	33	-	+++	++	S
48 (M)	52	24	-	+	-	DG
49 (M)	45	16	H	+	+	S
50 (H)	60	45	-	+++	-	R, DG
51 (M)	25	12	-	++	-	R
52 (M)	29	12	-	+++	++	R
53 (H)	40	0	Mat	+	-	-
54 (H)	54	25	-	+++	++	R, S
55 (M)	38	29	-	+	++	-
56 (H)	63	55	H	++	+	S
57 (H)	55	0	-	+++	-	R

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes. Abreviaturas: m : musculatura esquelética. Casos familiares: - = ausentes, H = hermanos afectados, Mat = herencia materna, AD = herencia autosómica dominante. Síntomas oculares: + = ptosis palpebral aislada; ++ = ptosis con oftalmoparesia leve; +++ = ptosis con oftalmoplejía compleja. Síntomas de la musculatura esquelética: - = ausentes, + = intolerancia al ejercicio, fatiga precoz, mialgias o calambres musculares, ++ = paresias objetivadas en la exploración. Otros síntomas: DG = disfagia, DF = disfonía, R = retinitis pigmentosa, S = sordera; PO = paladar ojival.

3.3.3.1. Síntomas oculares

Los síntomas oculares están presentes en los 57 casos estudiados. El 100% de los pacientes presentan ptosis palpebral, bilateral en más del 80% de los casos (tabla 10). El 59.6% (34 pacientes) presenta oftalmoparesia. La diplopia se recoge en la anamnesis de 19 pacientes (33.3%). La edad media de inicio de los síntomas oculares es 25.31 años \pm 18.76.

Ptosis palpebral	Frecuencia	Porcentaje
Bilateral	47	82.5%
Unilateral derecha	7	12.3%
Unilateral izquierda	3	5.3%

Tabla 10. Características de la ptosis palpebral

Encontramos tres formas de expresión clínica de los síntomas oculares:

1. Ptosis aislada en 23 pacientes (40.4%)
2. Ptosis con oftalmoparesia leve en 9 pacientes (15.8%) y
3. Ptosis con oftalmoplejía compleja en 25 pacientes (43.9%).

En la tabla 11 se exponen los estadísticos descriptivos de la edad de inicio de los síntomas en estos subgrupos.

Edad de inicio de los síntomas	Media y DE	Mediana	Edad mínima-Edad máxima
<i>Ptosis aislada</i>	29 años ± 20.96	29.68 años	0 – 66.92
<i>Ptosis y oftalmoparesia leve</i>	24.7 años ± 20.90	18.24 años	0 – 54.94
<i>Ptosis y oftalmoplejía compleja</i>	22.13 años ± 15.79	20 años	0 - 60

Tabla 11. Edad de inicio de los síntomas en los diferentes subgrupos clínicos según los síntomas oculares. DE: desviación estándar.

Existe una homogeneidad tanto intergrupos como intragrupos respecto a la edad de inicio de los síntomas oculares, salvo el paciente número 30 del tercer grupo, que tiene su edad de debut a los 60 años para una media de 22.13 años ± 15.79 y una mediana de 20 años en este grupo (gráfico 4). No existen diferencias estadísticamente significativas para la edad de inicio de los

síntomas oculares en los diferentes grupos ($p = 0.453$).

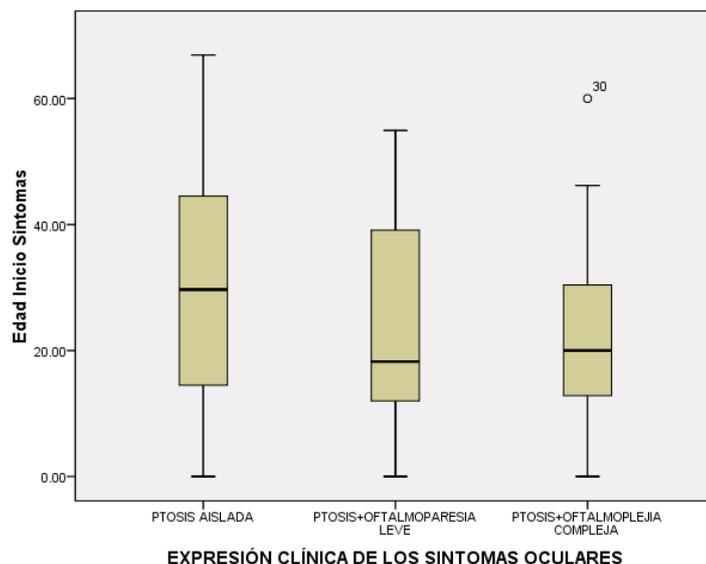


Gráfico 4. Diagrama de cajas. Representación de la edad de inicio de los síntomas en los subgrupos clínicos oculares.

El tiempo medio de enfermedad es de 20.44 años con una desviación estándar de 13.25. En la tabla 12 vemos la descripción de este valor según los subgrupos clínicos oculares. Existe una tendencia a la relación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y las características clínicas de los síntomas oculares ($p = 0.09$).

<i>Tiempo de evolución de síntomas oculares</i>	<i>Media y DE</i>	<i>Mediana</i>	<i>Rango (mínimo-máximo)</i>
Ptosis aislada	16.60 ± 12.41 años	13 años	48 (0 – 48)
Ptosis y oftalmoparesia leve	20.33 ± 15.28 años	19 años	49 (5 – 54)
Ptosis y oftalmoplejía compleja	24.01 ± 12.76 años	21 años	50 (5 – 55)

Tabla 12. Tiempo de evolución de los síntomas en los subgrupos oculares. DE: desviación estándar.

La muestra presenta homogeneidad tanto intragrupos como intergrupos, salvo el paciente número 4, que es el paciente del segundo grupo que mayor tiempo de evolución lleva (Gráfico 5).

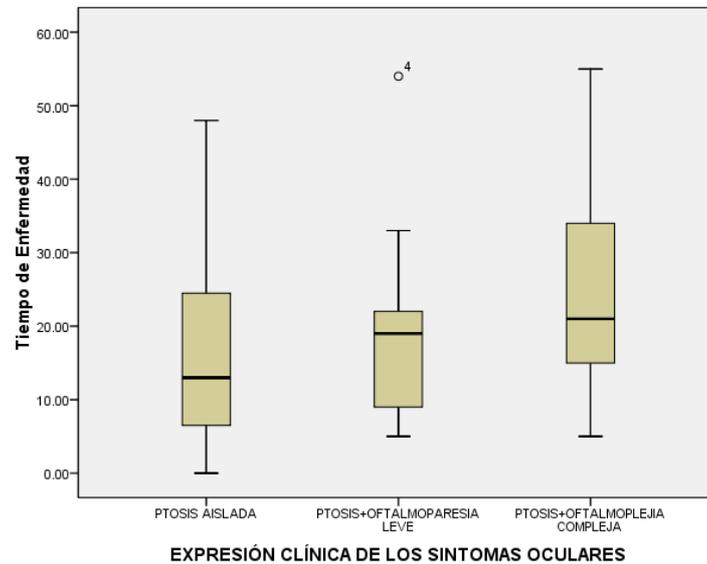


Gráfico 5. Diagrama de cajas. Representación del tiempo de evolución de la enfermedad en relación con los subgrupos clínicos oculares

3.3.3.2. Síntomas musculares

De los 57 pacientes de la muestra, 34 pacientes presentan síntomas musculares (59.65%) y los 23 casos restantes no (40.35%). Dentro de los 34 casos que sí presentan afectación de los músculos esqueléticos, podemos diferenciar dos subgrupos:

1. Subgrupo de pacientes con balance motor normal. Presentan síntomas como intolerancia al ejercicio, fatiga precoz, mialgias y/o calambres musculares. Este grupo lo representan 12 pacientes, que corresponden a un porcentaje del 21.05% del total de pacientes de la muestra y al

35.29% de los pacientes con afectación de la musculatura esquelética.

- Subgrupo de pacientes con balance motor alterado. Presentan paresia leve proximal objetivada en la exploración física. Este grupo corresponde a 22 pacientes, que representan un 38.59% del total de pacientes y un 64.70% de los pacientes con afectación de la musculatura esquelética.

En la tabla 13 y en el gráfico 6 podemos observar los valores calculados en referencia a la edad de debut de la enfermedad en los diferentes subgrupos de afectación de la musculatura esquelética ($p = 0.177$).

Edad de inicio de la enfermedad	Media y DE	mediana	Edad mínima-Edad máxima
Ausencia de síntomas musculares	30.80 años \pm 20.43	20.43 años	0 – 66.92
IE, fatiga precoz, mialgias, calambres	23.45 años \pm 21.46	17.5 años	0 – 54.94
Paresia proximal	20.59 años \pm 14.21	19.12 años	0 - 52

Tabla 13. Edad de inicio de los síntomas en los diferentes subgrupos clínicos según los síntomas de la musculatura esquelética. IE: intolerancia al ejercicio. DE: desviación estándar.

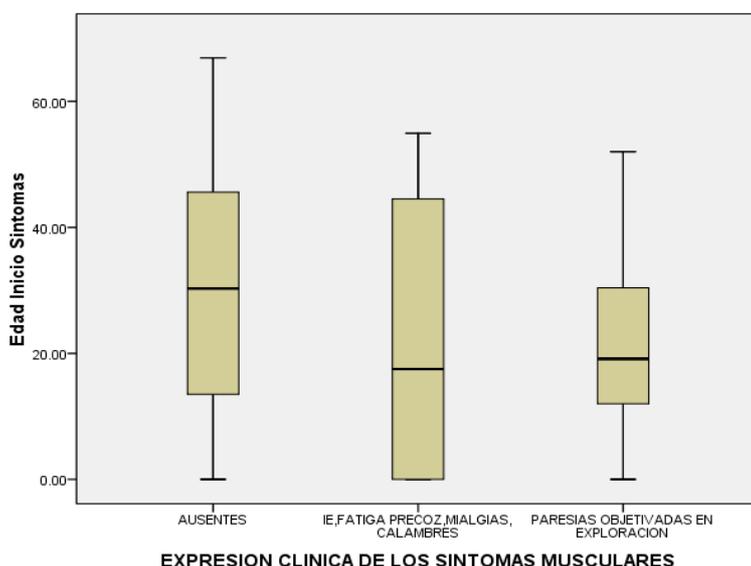


Gráfico 6. Diagrama de cajas. Representación de la edad de debut de la enfermedad en relación con los subgrupos clínicos según la afectación de la musculatura esquelética.

En la tabla 14 y el gráfico 7 vemos representados los valores hallados para la relación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y la afectación de la musculatura esquelética. Existe una homogeneidad en los subgrupos aunque no se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.978$).

Tiempo de evolución de la enfermedad	Media y DE	mediana	Rango (mínimo – máximo)
Ausencia de síntomas musculares	20.69 años ± 13.92	15 años	51 (4 – 55)
IE, fatiga precoz, mialgias, calambres	20.83 años ± 13	18.49 años	42 (6 -48)
Paresia proximal	19.97 años ± 13.25	16.55 años	54 (0 – 54)

Tabla 14. Tiempo de evolución de la enfermedad en los diferentes subgrupos clínicos según los síntomas de la musculatura esquelética. IE: intolerancia al ejercicio. DE: desviación estándar.

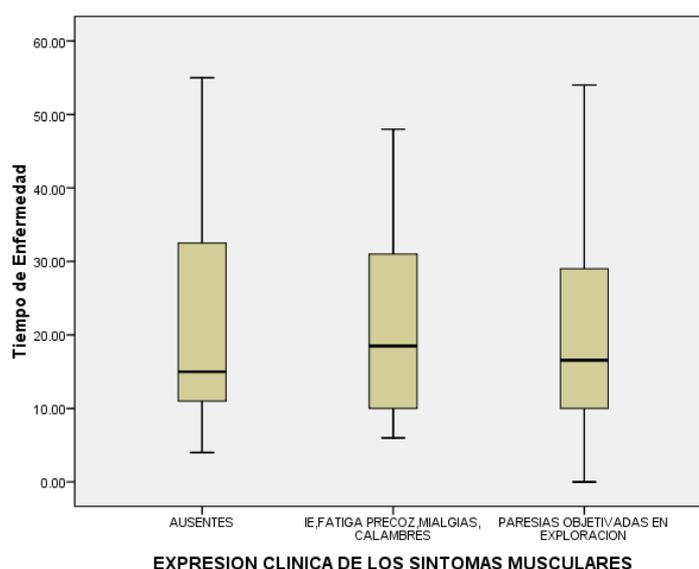


Gráfico 7. Diagrama de cajas. Representación del tiempo de evolución de la enfermedad en relación con los subgrupos clínicos según la afectación de la musculatura esquelética.

La paresia proximal está presente en 22 pacientes. Ésta aparece a los 10.55 años de haberse iniciado la enfermedad como media. El rango de edad de inicio de la afectación muscular oscila desde el nacimiento hasta los 46 años. En cinco pacientes, este síntoma se encuentra presente desde el nacimiento. Aparecieron antes de los 20 años en 16 pacientes (72.73%), entre los 20 y los 40 años en 5 pacientes (22.73%) y por encima de los 40 años en 1 paciente (4.55%). La edad de debut de la enfermedad no presenta una relación estadísticamente significativa con la edad de aparición de las paresias ($p=0.236$).

3.3.3.3. Formas de expresión clínica de la enfermedad

Al analizar la sintomatología de los pacientes de esta serie podemos dividirlos en cuatro grupos según la forma de expresión clínica de su enfermedad. Estos grupos son:

- 1) Ptosis palpebral aislada
- 2) Ptosis con oftalmoparesia, leve o compleja
- 3) Ptosis con paresias de la musculatura esquelética, sin oftalmoparesia
- 4) Ptosis con oftalmoparesia y afectación de la musculatura esquelética

En el siguiente esquema (gráfico 8) se muestra de manera gráfica la frecuencia y distribución en cada grupo. El grupo 3, ptosis con afectación de la musculatura esquelética, es el que presenta menor representación de pacientes.

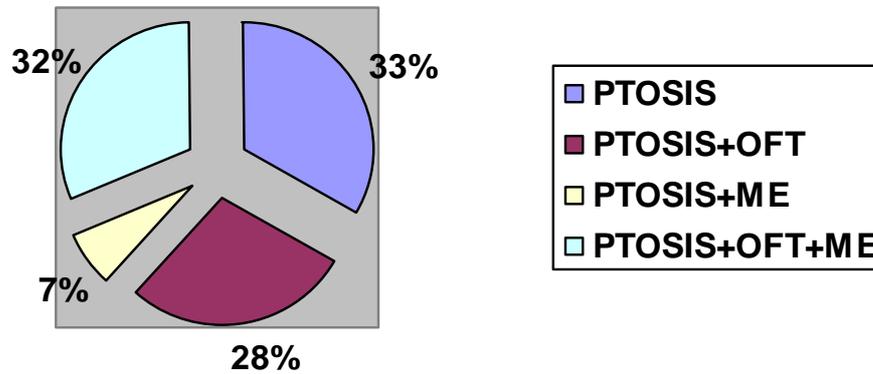


Gráfico 8. Diagrama de sectores. Grupos de expresión clínica de la enfermedad. En el grupo de ptosis palpebral aislada hay 19 pacientes (33.3%), en el grupo de ptosis con oftalmoparesia 16 pacientes (28.1%), en el grupo de ptosis con afectación muscular esquelética 4 pacientes (7.1%) y en el grupo con ptosis, oftalmoparesia y afectación de la musculatura esquelética 18 pacientes (31.2%). Entiéndase por las abreviaturas: ME = musculatura esquelética, OFT = oftalmoparesia.

Los grupos 1 y 2 son formas de enfermedad con afectación ocular exclusiva (“miopatía ocular simple”), sin debilidad de la musculatura esquelética. Los grupos 3 y 4 son formas clínicas mixtas, con afectación ocular y de la musculatura esquelética (“miopatía ocular plus”). Estudiamos las características de estos pacientes agrupándolos en dos formas resumidas: afectación ocular exclusiva y afectación mixta, con los subgrupos explicados dentro de cada una de ellas.

A) Pacientes con afectación ocular exclusiva (“miopatía ocular simple”):

Este subgrupo lo componen 35 pacientes (61.40%). Encontramos pacientes con una ptosis palpebral aislada como única sintomatología y pacientes con ptosis palpebral acompañada de limitación de los movimientos

oculares. (Gráficos 9, 10 y 11).

A.1.) Ptosis palpebral aislada:

- Total: 19 pacientes, 33.33% del total de pacientes de la serie y 54.28% de los pacientes con afectación ocular exclusiva.

- Edad de debut: media 31.41 años, mediana 39.73 años, DT 21.78, mínimo 0 años, máximo 66.92 años.

- Tiempo de evolución de la enfermedad: media 17.52 años, mediana 13 años, DT 12.74 años, rango de 4 años con un mínimo de 4 años y un máximo de 48 años.

- Edad de realización de la biopsia muscular: media 42.42 años, mediana 45 años y DT 15.53.

- Síntomas musculares: 10 pacientes (52.63%) no presentan síntomas musculares y 9 (47.36%) pacientes sí aquejan síntomas leves, en forma de intolerancia al ejercicio, fatiga crónica, mialgias y/o calambres musculares. En ningún caso existe alteración del balance motor. La relación entre los síntomas oculares y la presencia de síntomas musculares subjetivos muestra una tendencia a la relación con un valor de $p=0.076$.

A.2.) Ptosis con oftalmoparesia:

- Total: 16 pacientes, 28.07% del total de pacientes de la serie y 45.71% de los pacientes con afectación ocular exclusiva.

- Edad de debut: media 24.56 años, mediana 17.73 años, DT 19.54, mínimo 0 años, máximo 60 años.
- Tiempo de evolución de la enfermedad: media 24.56 años, mediana 22.50 años, DT 13.60 años, rango de 50 años con un mínimo de 5 años y un máximo de 55 años.
- Edad de realización de la biopsia muscular: media 42 años, mediana 44.50 años y DT 13.53.
- Síntomas musculares: 13 pacientes (81.25%) no presentan estos síntomas y 3 (18.75%) pacientes sí aquejan síntomas leves, en forma de intolerancia al ejercicio, fatiga crónica, mialgias y/o calambres musculares. En ningún caso existe alteración del balance motor. La relación entre los síntomas oculares y la presencia de síntomas musculares subjetivos muestra una tendencia a la relación con un valor de $p=0.076$.

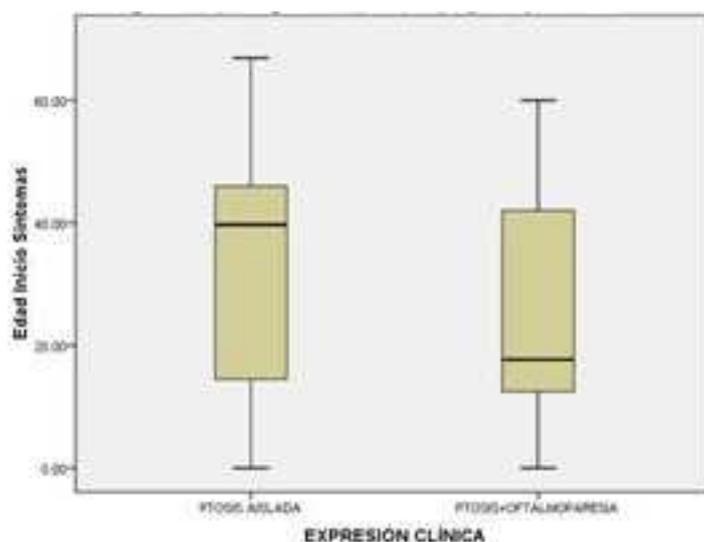


Gráfico 9. Diagrama de cajas. Representación gráfica de la relación entre la edad de debut y las formas de “miopatía ocular simple”.

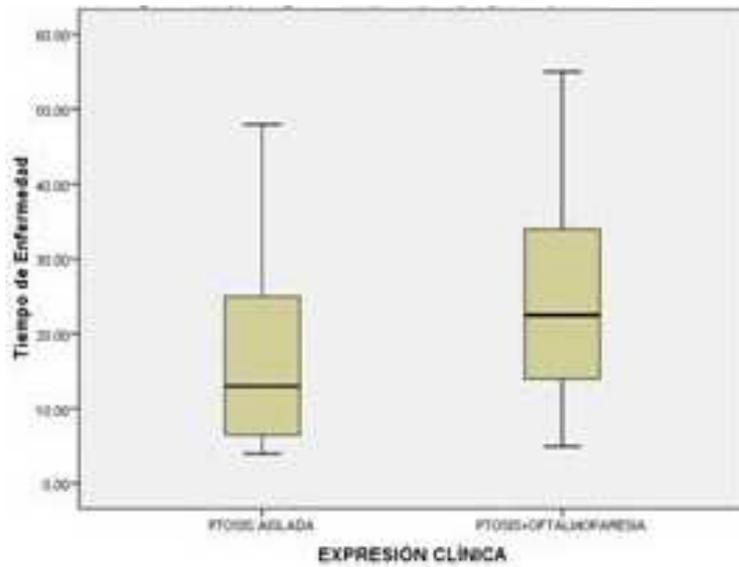


Gráfico 10. Diagrama de cajas. Representación gráfica de la relación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y las formas de “miopatía ocular simple”.

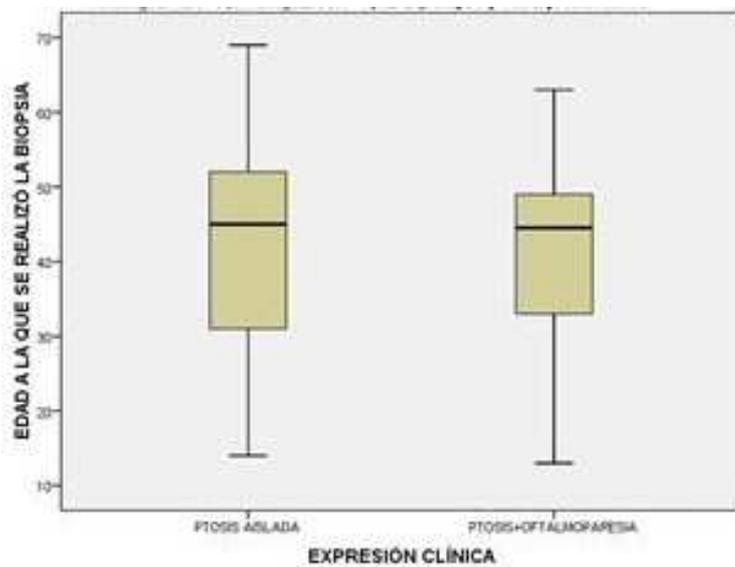


Gráfico 11. Diagrama de cajas. Representación gráfica de la relación entre la edad en la que se realizó la biopsia muscular y las formas de “miopatía ocular simple”.

B) Pacientes con afectación mixta (“miopatía ocular plus”):

En este subgrupo se ubican 22 pacientes, 38.59% del total de la muestra. Estos pacientes presentan afectación ocular en forma de ptosis palpebral en todos los casos. La oftalmoparesia está presente sólo en un grupo de ellos. La afectación de la musculatura esquelética que se contempla en este subgrupo es la existencia de un balance motor alterado con paresia proximal. No se incluyen los síntomas subjetivos (mialgias, calambres musculares, etc). (Gráficas 12, 13 y 14).

B.1.) Ptosis con afectación de la musculatura esquelética:

- Total: 4 pacientes, 7.02% del total de los pacientes de la serie y 18.18% de los pacientes con afectación mixta.
- Edad de debut: media 17.58 años, mediana 20.32 años, DT 12.81, mínimo 0 años, máximo 29.69 años.
- Tiempo de evolución de la enfermedad: media 12.24 años, mediana 10.99 años, DT 11.23 años, rango de 27 años con un mínimo de 0 años y un máximo de 27 años.
- Edad de realización de la biopsia muscular: media 29.50 años, mediana 28 años y DT 5.19.

B.2.) Ptosis con oftalmoparesia y afectación de la musculatura esquelética:

- Total: 18 pacientes, 31.58% del total de pacientes de la serie y 81.82% de los pacientes con afectación mixta.
- Edad de debut: media 21.26 años, mediana 19.12 años, DT 14.76, mínimo 0 años, máximo 52 años.
- Tiempo de evolución de la enfermedad: media 21.69 años, mediana 18.50 años, DT 13.33 años, rango de 49 años con un mínimo de 5 años y un máximo de 54 años.
- Edad de realización de la biopsia muscular: media 37.06 años, mediana 36 años y DT 14.57.

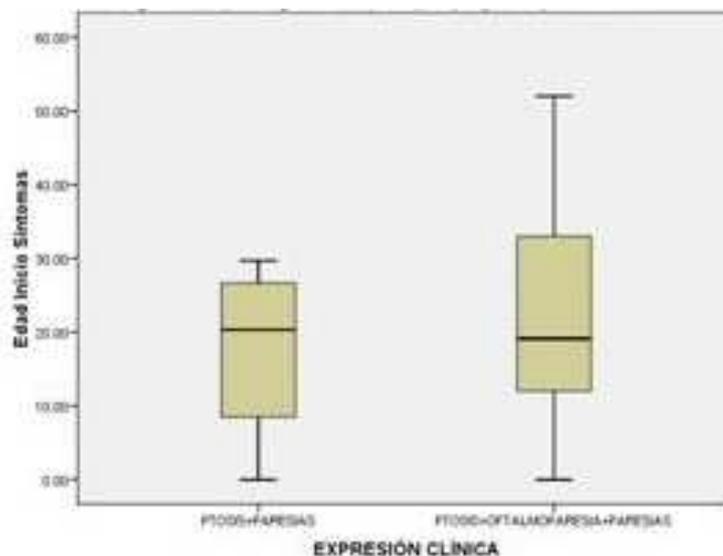


Gráfico 12. Diagrama de cajas. Representación gráfica de la relación entre la edad de debut y las formas de “miopatía ocular plus”.

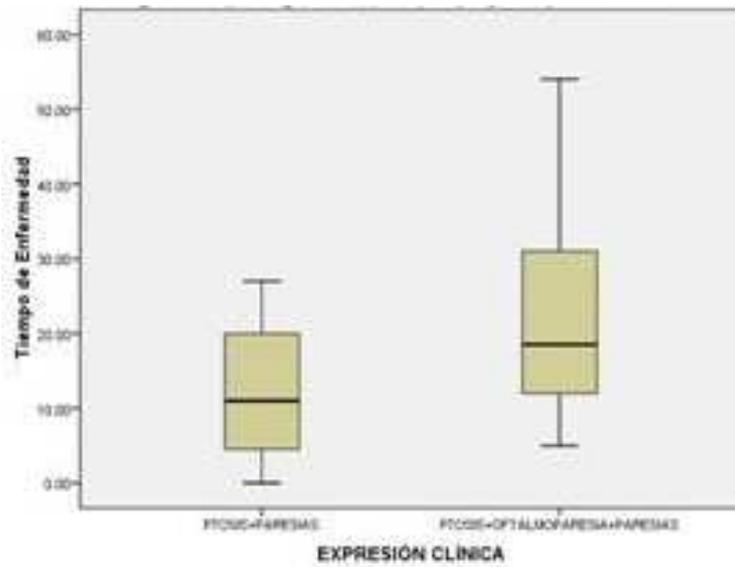


Gráfico 13. Diagrama de cajas. Representación gráfica de la relación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y las formas de “miopatía ocular plus”.

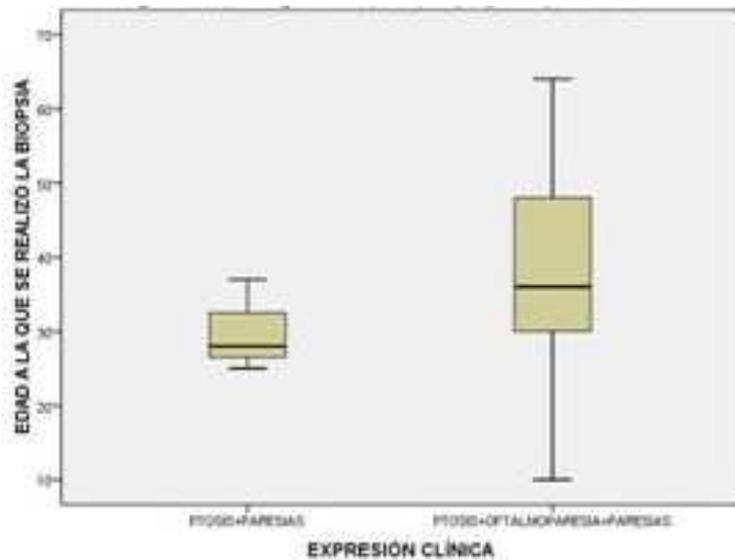


Gráfico 14. Diagrama de cajas. Representación gráfica de la relación entre la edad de realización de la biopsia muscular y las formas de “miopatía ocular plus”.

No se ha encontrado significación estadística entre las variables edad de inicio de los síntomas, tiempo de enfermedad y edad en que se realizó la biopsia, y las diferentes formas de expresión clínica, tanto en las formas oculares exclusivas como en las formas mixtas ($p > 0.05$). Existe una tendencia a la relación entre las formas oculares exclusivas y el tiempo de enfermedad ($p = 0.079$). Sí se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre las formas oculares exclusivas y la presencia de oftalmoparesia, e igualmente ocurre para las formas mixtas y la presencia de oftalmoparesia ($p < 0.0005$).

3.3.3.4. Clínica según grupos de edad

Los grupos de edad que se han considerado en este estudio para analizar a los pacientes son los tres siguientes:

- a) Edad menor o igual a 20 años
- b) Edad comprendida entre los 21 años y los 40 años
- c) Edad superior a 40 años

La mayoría de los pacientes de la muestra presentan una edad superior a los 40 años en el momento que se realiza este estudio (61.4%). De los 57 pacientes, sólo 4 de ellos tienen una edad inferior a los 20 años. El resto de pacientes, el 31.58%, se encuentran en el grupo intermedio de edad, entre los 21 y los 40 años. En la siguiente tabla (tabla 15) se resume la distribución y frecuencia de los pacientes con las diferentes formas clínicas y según los grupos de edad descritos.

Clínica según grupos de edad	0-20 años	20-40 años	>40 años	<i>Total de la muestra</i>
<i>Ptosis aislada</i>	2 ptes (50%)	3 ptes (16.7%)	14 ptes (40%)	19 ptes (33.3%)
<i>Ptosis y oftalmoparesia</i>	1 pte (25%)	5 ptes (27.8%)	10 ptes (28.6%)	16 ptes (28.1%)
<i>Ptosis y paresias</i>	0	4 ptes (22.2%)	0	4 ptes (7.02%)
<i>Ptosis, oftalmoparesia y paresias</i>	1 pte (25%)	6 ptes (33.3%)	11 ptes (31.4%)	18 ptes (31.6%)
<i>Total de pacientes por grupos de edad</i>	4 ptes (7.02%)	18 ptes (31.58%)	35 ptes (61.40%)	57 pacientes (100%)

Tabla 15. Formas de expresión clínica en los pacientes según la edad cronológica.

3.3.3.5. Edad de inicio de los síntomas

La edad de debut o de inicio de los síntomas de los pacientes de la serie presenta una media de 25.31 años \pm 18.76, con una mediana de 23.64 años. En la tabla 16 se resumen las medidas de centralización calculadas para la edad de debut de la enfermedad en los diferentes grupos de edad cronológica.

Edad de debut	0-20 años	20-40 años	>40 años
Media	6.5 años	13.40 años	33.59 años
Desv estándar	7.5 años	11.42 años	17.96 años
Mediana	6.5 años	14.5 años	39.12 años
Rango	0 - 13	0 - 33	0 – 66.92

Tabla 16. Edad de debut de la enfermedad en los subgrupos según la edad.

3.3.3.6. Otros síntomas

Se ha encontrado retinitis pigmentaria en la exploración del fondo de ojo de 10 pacientes (17.5%). Dos pacientes (3.5%) presentan paladar ojival. La sordera o hipoacusia se ha registrado en 5 pacientes (8.8%). Nueve pacientes (15.79%) presentan afectación bulbar, en forma de disfagia en 6 casos, disfonía en 1 caso y disfagia y disfonía combinadas en 2 casos.

3.3.3.7. Curso clínico de la enfermedad

El curso clínico de la enfermedad es estable en 35 pacientes (61.40%) y lentamente progresivo en 22 casos (38.6%). Se observa un carácter fluctuante de la ptosis palpebral en 4 pacientes (7%). En las siguientes tablas (tabla 17 y 18) se muestra cada caso de la serie mostrando el tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas hasta finalizar la observación, y la expresión de síntomas a lo largo de la historia natural de la enfermedad.

Caso	Edad debut	Edad en el primer examen	Edad actual (año 2007)	Tiempo de observación	Tiempo de evolución
1	13 años	44 años	50 años	6 años	37 años
2	13 años	18 años	18 años	0 años	5 años
3	40 años	53 años	61 años	8 años	22 años
4	18 años	64 años	72 años	8 años	54 años
5	15 años	48 años	50 años	2 años	35 años
6	17 años	30 años	30 años	0 años	13 años
7	18 años	36 años	49 años	13 años	31 años
8	28 años	53 años	62 años	9 años	34 años
9	47 años	57 años	61 años	4 años	14 años
10	0 años	45 años	48 años	3 años	48 años
11	44 años	49 años	56 años	7 años	12 años
12	0 años	27 años	27 años	0 años	27 años
13	19 años	26 años	26 años	0 años	7 años
14	66 años	69 años	79 años	10 años	13 años
15	45 años	50 años	64 años	14 años	19 años
16	33 años	38 años	38 años	0 años	5 años
17	0 años	10 años	16 años	6 años	16 años
18	30 años	34 años	35 años	1 año	5 años
19	47 años	53 años	53 años	0 años	6 años
20	40 años	42 años	46 años	4 años	6 años
21	40 años	45 años	52 años	7 años	12 años
22	30 años	48 años	61 años	13 años	31 años
23	39 años	49 años	58 años	9 años	19 años
24	44 años	54 años	54 años	0 años	10 años
25	40 años	45 años	45 años	0 años	5 años
26	20 años	33 años	33 años	0 años	13 años
27	34 años	46 años	46 años	0 años	12 años
28	14 años	32 años	34 años	2 años	20 años
29	0 años	33 años	33 años	0 años	33 años
30	60 años	64 años	71 años	7 años	11 años
31	0 años	40 años	40 años	0 años	40 años

Tabla 17. Cronopatología 1. Continúa en la siguiente página.

Caso	Edad debut	Edad en el primer examen	Edad actual (año 2007)	Tiempo de observación	Tiempo de evolución
32	52 años	54 años	61 años	7 años	9 años
33	0 años	7 años	22 años	15 años	22 años
34	63 años	65 años	69 años	4 años	6 años
35	20 años	46 años	54 años	8 años	34 años
36	10 años	42 años	42 años	0 años	32 años
37	13 años	15 años	17 años	2 años	4 años
38	0 años	30 años	33 años	3 años	33 años
39	15 años	28 años	40 años	12 años	25 años
40	0 años	15 años	18 años	3 años	18 años
41	52 años	62 años	63 años	1 año	11 años
42	15 años	36 años	36 años	0 años	21 años
43	46 años	54 años	61 años	7 años	15 años
44	23 años	25 años	23 años	0 años	2 años
45	0 años	27 años	41 años	14 años	41 años
46	25 años	40 años	41 años	1 año	16 años
47	33 años	53 años	53 años	0 años	20 años
48	24 años	40 años	52 años	12 años	28 años
49	16 años	32 años	45 años	13 años	29 años
50	45 años	60 años	60 años	0 años	15 años
51	12 años	15 años	25 años	10 años	13 años
52	12 años	18 años	29 años	11 años	17 años
53	0 años	27 años	40 años	13 años	40 años
54	25 años	43 años	54 años	11 años	29 años
55	29 años	37 años	38 años	1 año	9 años
56	55 años	62 años	63 años	1 año	8 años
57	0 años	53 años	55 años	2 años	55 años

Tabla 17. Tabla de cronopatología 1. Se muestra en cada caso y por orden, la edad de debut, la edad que presentaba en la primera visita médica en la consulta específica de Neurología (HUVR), la edad en el momento del estudio, el tiempo de observación o seguimiento, y el tiempo de evolución. El tiempo de observación es la edad en el momento del estudio menos la edad en el primer examen. El tiempo de evolución es el tiempo, expresado en años, que ha transcurrido desde el inicio de los síntomas de cada paciente hasta la fecha del estudio.

P	Forma de debut	Evolución m. ocular	Evolución m. esquelética	Otros síntomas
1	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (7)	DF, DG (30)
2	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-
3	Ptosis	-	-	-
4	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (46)	-
5	Ptosis+Ofatalmoparesa	-	-	S (0)
6	Ptosis	-	Paresia (12)	DG (10)
7	Ptosis+Oftalmoparesia	Ptosis U→B,F	Paresia (18)	-
8	Ptosis+Oftalmoparesia	Ptosis U→B	-	-
9	Ptosis	-	-	DF, DG (10)
10	Ptosis	Ptosis U→B	Calambres (40)	-
11	Ptosis	Ptosis U→B	Cansancio (5)	-
12	Ptosis+Paresia	-	Paresia (0)	-
13	Ptosis	-	Cansancio (7)	-
14	Ptosis	-	-	-
15	Ptosis	Ptosis F	Cansancio (15)	-
16	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (5)	-
17	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (8)	-
18	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (4)	-
19	Ptosis	-	Cansancio (6)	-
20	Ptosis	-	-	-
21	Ptosis	-	Mialgias (5)	-
22	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	DG (18)
23	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-
24	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (5)	-
25	Ptosis	-	-	-
26	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (13)	-
27	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (12)	-
28	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-
29	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Cansancio (30)	-
30	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-
31	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-
32	Ptosis+Oftalm+Paresia	-	Paresia (0)	DF (0)
33	Ptosis+Oftalm+Paresia	-	Mialgias,paresia (0)	-

Tabla 18. Cronopatología 2. Continúa en la siguiente página.

P	Forma de debut	Evolución m. ocular	Evolución m. esquelética	Otros síntomas
34	Ptosis	-	-	-
35	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-
36	Ptosis+Oftalmoparesia	-	IE (0), paresia (30)	-
37	Ptosis	-	-	-
38	Ptosis	-	Calambres,cans (30)	-
39	Ptosis+Oftalmoparesia	Ptosis F	Cansancio (19)	-
40	Ptosis	-	Calambres (15)	-
41	Ptosis	-	-	-
42	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (8)	-
43	Ptosis+Oftalmoparesia	Ptosis U→B	-	DG (7)
44	Ptosis	-	Paresia (2)	-
45	Ptosis+Oftalm+Paresia	-	Paresia (0)	DF (27)
46	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (15)	-
47	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (20)	S (20)
48	Ptosis	-	-	DG (16)
49	Ptosis	-	Mialgias (16)	S (16)
50	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	DG (15)
51	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-
52	Ptosis+Oftalm+Paresia	-	Paresia (0)	-
53	Ptosis	Ptosis F	-	-
54	Ptosis+Oftalmoparesia	-	Paresia (18)	S (18)
55	Ptosis	-	Paresia (9)	-
56	Ptosis+Oftalmoparesia	Ptosis F	IE (7)	S (7)
57	Ptosis+Oftalmoparesia	-	-	-

Tabla 18. Cronopatología 2. Se muestra la forma de debut clínico de cada paciente y la evolución de dichos síntomas en el tiempo. Entre paréntesis se muestra el punto de la evolución en el que aparecen los síntomas, de manera que el número expresa a qué años de evolución desde el debut aparecen los síntomas que no estaban presentes en el inicio de la enfermedad. Entiéndase en las abreviaturas: Oftalm = oftalmoparesia, F = fluctuante, U = unilateral, B = bilateral, IE = intolerancia al ejercicio, Cans = cansancio, S = sordera, DF = disfonía, DG = disfagia. La expresión "Ptosis U→B" indica un inicio unilateral de la ptosis con progresión a la bilateralidad posteriormente.

La clínica ocular existe desde un principio en los 57 casos, bien en forma de ptosis palpebral aislada (22 casos) o bien en forma de ptosis con oftalmoparesia (35 casos). De los pacientes que inician la enfermedad con oftalmoparesia, 18 casos desarrollan paresia muscular esquelética, indistintamente del momento de inicio de los síntomas o del tiempo de evolución, lo que supone un 51.43 % ($p < 0.005$). Los pacientes que inician la enfermedad con ptosis aislada no desarrollan en ningún caso oftalmoparesia y la paresia muscular esquelética aparece sólo en 4 de ellos (18.18 %), indistintamente del momento de inicio de los síntomas o del tiempo de evolución.

La afectación de la musculatura esquelética aparece años después de haber comenzado los síntomas oculares, excepto en 5 casos, en los que la debilidad muscular está presente desde el inicio de la enfermedad (casos 12, 32, 33, 45 y 52). El tiempo medio en el que aparece la debilidad muscular es de 10.54 años desde que se inician los síntomas y la desviación estándar 11.18 años. La paresia es proximal y fija. Ver los diagramas 1, 2 y 3, en los que se representa la clínica de inicio y la evolución de cada paciente de la serie. Algunos pacientes presentan síntomas inespecíficos como mialgias, calambres musculares o cansancio, tiempo antes de desarrollar una paresia objetiva. En 11 casos, en cambio, existen síntomas musculares sin llegar a desarrollar una paresia objetiva, a pesar de que el tiempo de evolución de estos pacientes es prolongado (tabla 19). Los síntomas de disfagia y disfonía se presentan paralelos en el tiempo a la afectación de la musculatura esquelética.



Diagrama 1. Representación de los síntomas al inicio de la enfermedad y en la evolución de cada paciente de la serie. Entiéndase por C: caso, numeración de los pacientes (columna izquierda), T: años de evolución (fila superior), colores: ● ptosis con oftalmoparesia (síntoma inicial), ● paresia de la musculatura esquelética (síntoma en la evolución) y ● ptosis palpebral aislada (síntoma inicial)

En los siguientes diagramas (diagramas 2 y 3) se muestran los grupos clínicos por separado. En el diagrama 2 se muestran los pacientes que inician la enfermedad con ptosis y oftalmoparesia (barra amarilla). Los pacientes que desarrollan paresia de la musculatura esquelética se señalan con una barra roja. La barra roja se inicia en el momento de la evolución clínica en el que aparecen las paresias, es decir, a los años de evolución que aparecen, y finaliza señalando el tiempo de evolución de enfermedad que lleva el paciente. La interpretación del diagrama 3 es del mismo modo.

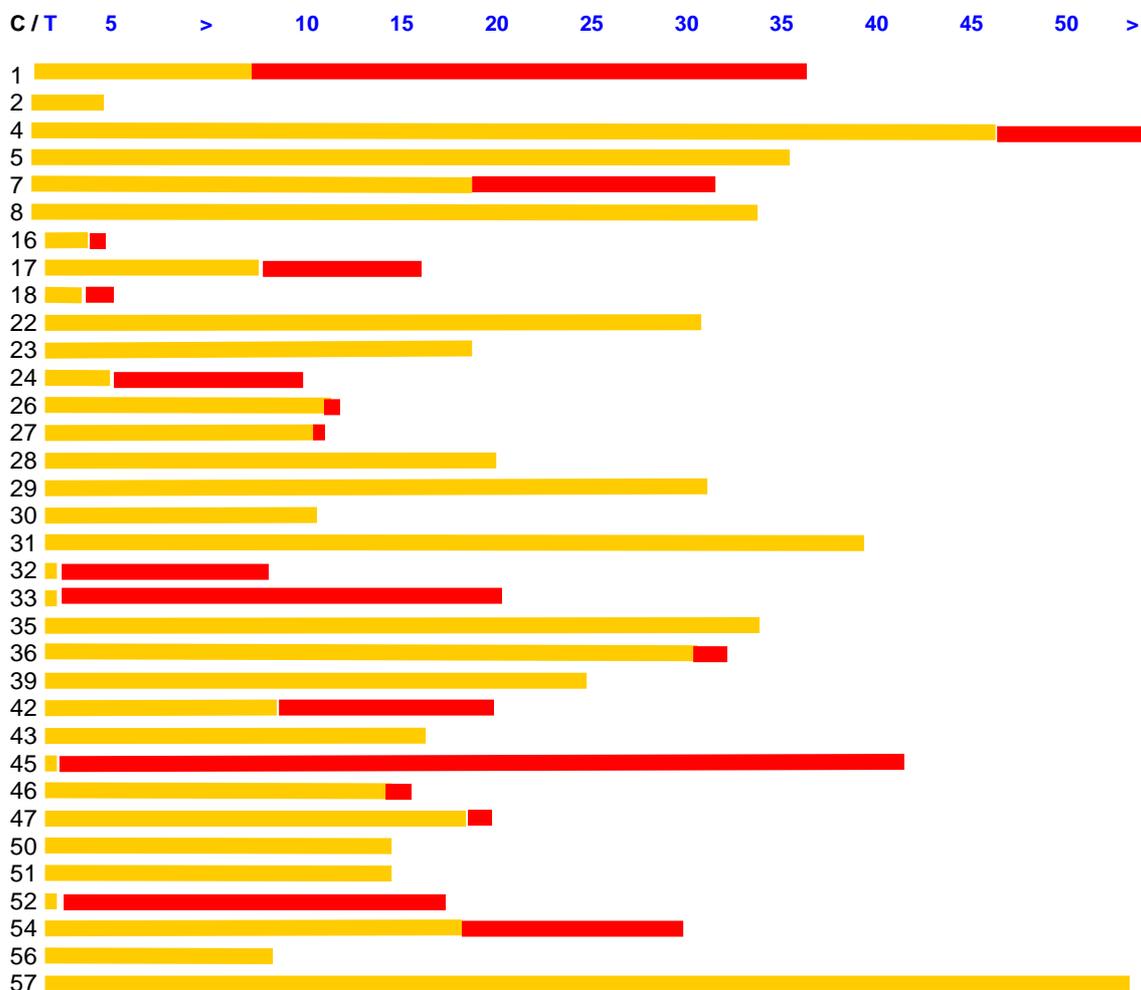


Diagrama 2. Representación de los síntomas al inicio de la enfermedad y en la evolución de cada paciente de la serie. Entiéndase por C: caso, numeración de los pacientes (columna izquierda), T: años de evolución (fila superior), colores: ● ptosis con oftalmoparesia (síntoma inicial) y ● paresia de la musculatura esquelética (síntoma en la evolución).

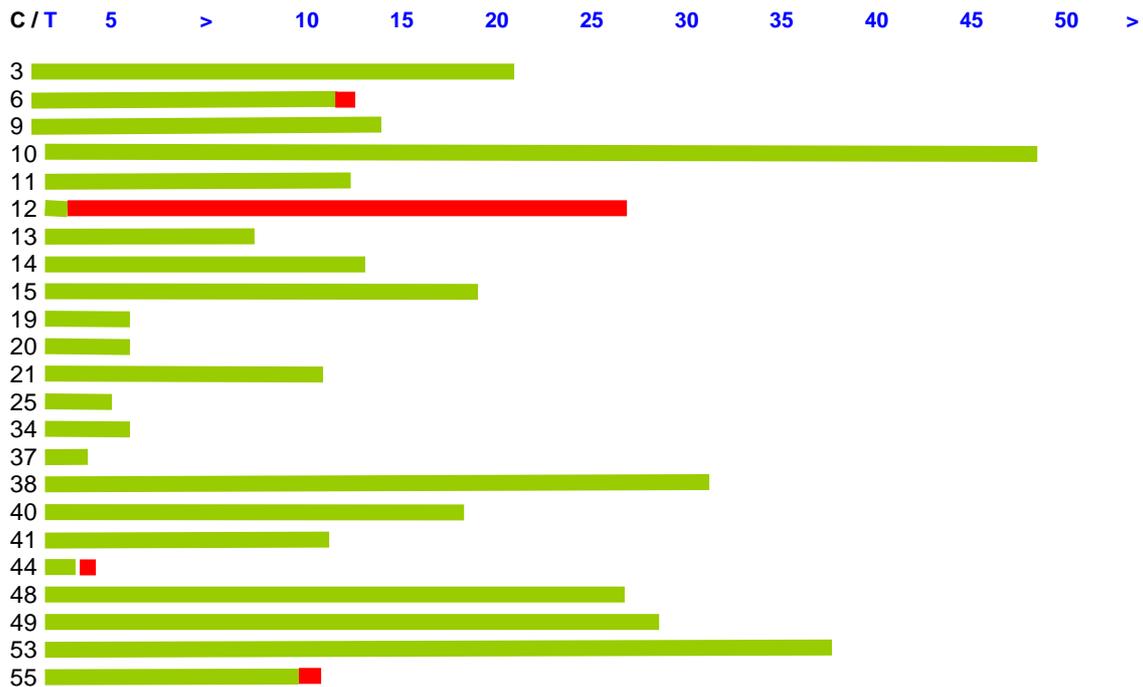


Diagrama 3. Representación de los síntomas al inicio de la enfermedad y en la evolución de cada paciente de la serie.: casos con ptosis palpebral aislada. Entiéndase por C: caso, numeración de los pacientes (columna izquierda), T: años de evolución (fila superior), colores: ● paresia de la musculatura esquelética (síntoma en la evolución) y ● ptosis palpebral aislada (síntoma inicial).

Caso	Síntomas musculares	Tiempo de evolución
10	Calambres musculares	48 años
11	Cansancio	12 años
13	Cansancio	7 años
15	Cansancio	19 años
19	Cansancio	6 años
21	Mialgias	12 años
29	Cansancio	33 años
38	Calambres musculares, cansancio	33 años
39	Cansancio	25 años
40	Calambres musculares	18 años
49	Mialgias	29 años

Tabla 19. Casos con afectación de la musculatura esquelética que no han desarrollado una paresia de la musculatura esquelética objetiva.

3.3.3.8. Patologías asociadas

El 85.96% (49 pacientes) de los pacientes no presentan ninguna patología asociada al problema de la miopatía ocular. Se ha observado glomerulonefritis en un paciente (caso 40), parkinsonismo en un paciente (caso 35), epilepsia en un paciente (caso 46) y cardiopatía, tipo estructural o tipo trastorno de conducción cardíaca, en 6 pacientes (casos 14, 21, 34, 45, 47, 49). En la tabla 20 se describe el tipo de enfermedad cardíaca que presenta cada paciente.

Caso	Edad	Patología cardíaca
14	79 años	Cardiopatía isquémica: angor
21	52 años	Cardiopatía hipertensiva
34	69 años	Miocardopatía dilatada
45	41 años	Cardiopatía isquémica: infarto de miocardio
47	53 años	Síndrome Wolf-Parkinson-White
49	45 años	Bloqueo aurículo-ventricular

Tabla 20. Patología cardíaca en los pacientes con miopatía ocular mitocondrial.

3.3.4. Determinaciones bioquímicas.

La determinación de CK en sangre periférica fue realizada en todos los casos. El ácido láctico basal se determinó en 50 casos y la curva de ácido láctico se realizó en 45 pacientes. En la tabla 21 se muestra la normalidad o elevación de los valores obtenidos de estas determinaciones en cada caso. El resto de determinaciones realizadas de rutina dentro de la batería de pruebas realizadas en sangre periférica como por ejemplo el perfil tiroideo, fueron normales.

Caso	CK	Lactato basal	Test de isquemia/ Curva de Lactato	Afectación de la musculatura esquelética
1	Normal	Normal	Normal	Paresia
2	Elevada	Normal	Normal	No
3	Normal	Normal	Normal	No
4	Normal	Normal	Hiperproducción de lactato	Paresia
5	Normal	Normal	Normal	No
6	Normal	Elevado	Normal	Paresia
7	Normal	Elevado	-	Paresia
8	Normal	Elevado	Normal	No
9	Normal	-	-	No
10	Normal	Normal	Normal	Calambres
11	Normal	Normal	Normal	Cansancio
12	Normal	Normal	Hiperproducción de lactato	Paresia
13	Normal	Normal	Normal	Cansancio
14	Elevada	Normal	Normal	No
15	Normal	Normal	Normal	Cansancio
16	Normal	Normal	No valorable	Paresia
17	Normal	Normal	Normal	Paresia
18	Normal	Elevado	Normal	Paresia
19	Normal	Elevado	-	Cansancio
20	Normal	Normal	Normal	No
21	Elevada	Normal	Normal	Mialgias
22	Normal	Elevado	Normal	No
23	Elevada	Normal	Normal	No
24	Normal	Normal	Normal	Paresia
25	Normal	Normal	Normal	No
26	Elevada	Normal	Normal	Paresia
27	Normal	-	-	Paresia
28	Normal	Elevado	-	No
29	Normal	Elevado	Elevado	Cansancio
30	Normal	Normal	Normal	No
31	Normal	-	-	No
32	Normal	Normal	No valorable	Paresia
33	Normal	Normal	Normal	Mialgias, paresia
34	Normal	Elevado	Hiperproducción de lactato	No
35	Elevada	Elevado	-	No
36	Elevada	Elevado	Hiperproducción de lactato	Intolerancia ejerc, Paresia
37	Normal	Normal	Normal	No
38	Normal	Normal	Normal	Calambres, cansancio
39	Normal	Normal	Normal	Cansancio
40	Normal	Normal	Normal	Calambres
41	Normal	Normal	Normal	No
42	Normal	-	-	Paresia
43	Normal	Normal	Normal	No
44	Normal	Normal	Normal	Paresia
45	Normal	Normal	Normal	Paresia
46	Normal	Normal	-	Paresia
47	Normal	-	-	Paresia
48	Normal	-	-	No
49	Normal	-	-	Mialgias
50	Normal	Normal	Normal	No
51	Normal	Normal	Normal	No
52	Normal	Elevado	Hiperproducción de lactato	Paresia
53	Normal	Normal	Normal	No
54	Normal	Normal	Hiperproducción de lactato	Paresia
55	Elevada	Normal	Normal	Paresia
56	Normal	Normal	Normal	Intolerancia al ejercicio
57	Normal	Normal	Normal	No

Tabla 21. Resultados de las determinaciones de CK y ácido láctico. En la última columna se muestra la afectación de la musculatura esquelética. Valor desconocido, no realizado: -.

El resultado de la CK fue normal en 49 pacientes (86%) y mostró una elevación discreta en 8 casos (14%), por encima del doble de su valor normal. El lactato basal sanguíneo se midió en 50 pacientes; el resultado fue normal en 38 de ellos (66.7%) y se encontró hiperlactacidemia en 12 casos (21.1%). Cuarenta y cinco pacientes fueron sometidos al test anaerobiótico de ejercicio en isquemia del antebrazo. La curva de lactato venoso fue normal en 37 casos (64.9%) y 6 pacientes (10.5%) presentaron una curva de ascenso con hiperproducción de lactato. En dos pacientes la prueba no fue valorable por realización incorrecta de la técnica. En los pacientes en los que existe afectación de la musculatura esquelética los resultados de la CK y del ácido láctico son variados como puede observarse en la tabla 21.

3.3.5. Biopsia muscular: morfología.

La biopsia muscular fue realizada en los 57 pacientes. El músculo utilizado para la biopsia fue seleccionado en función de las características clínicas de cada paciente. En 40 casos (70.2%) se tomó la muestra del músculo bíceps, en 5 casos (8.8%) del músculo tibial anterior, en dos casos (3.5%) del músculo cuádriceps y en un caso (1.8%) del músculo deltoides. Existen 14 muestras de las que desconocemos el músculo del que se tomó la biopsia. Se encontraron hallazgos morfológicos compatibles con enfermedad mitocondrial en 54 casos (94.7%). En la siguiente tabla (tabla 22) se muestra la frecuencia de los hallazgos anatomopatológicos.

Hallazgo morfológico	Frecuencia	Porcentaje
<i>Fibras raged-red</i>	41	71.9%
<i>Fibras COX negativas</i>	34	59.6%
<i>Aumento de AOS</i>	32	56.1%
<i>Aumento de lípidos</i>	32	56.1%

Tabla 22. Hallazgos morfológicos en la biopsia muscular.

Existe una relación entre la presencia de RRF y la presencia de fibras COX negativas en la biopsia muscular ($p = 0.033$). La edad a la que se realizó la biopsia no presenta relación con la presencia de RRF en la biopsia muscular ($p = 0.051$). Tampoco existe relación entre la edad en que se realizó la biopsia y la presencia de fibras COX negativas en la biopsia ($p = 0.310$).

Otros hallazgos morfológicos que se han encontrado en la biopsia muscular son una variabilidad en el tamaño de la fibras musculares en 6 pacientes (casos 1, 3, 8, 14, 31, 47) y vacuolas ribeteadas en 5 pacientes (casos 11, 23, 30, 47, 50).

Se encuentran hallazgos de patología mitocondrial en las biopsias musculares de los pacientes con diferentes formas clínicas de presentación. Se muestra en la tabla 23 los hallazgos morfológicos de etiología mitocondrial en los distintos subgrupos clínicos.

Forma clínica	N	RRF	COX -	↑AOS	↑LÍPIDOS
Ptosis aislada	19	10 (52.63%)	9 (47.37%)	12 (63.16%)	9 (47.37%)
Ptosis +Oftalmoparesia	16	15 (93.75%)	9 (56.25%)	7 (43.75%)	8 (50%)
Ptosis+Afectación musc esquelética	4	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)
Ptosis+Oftalmoparesia +Afectación musc esquelética	18	13 (72.22%)	13 (72.22%)	10 (55.55%)	12 (66.66%)

Tabla 23. Hallazgos morfológicos en la biopsia muscular en los subgrupos según las diferentes formas clínicas. Se muestran los hallazgos en el número de pacientes (número superior) y el porcentaje que representan dentro de cada subgrupo (entre paréntesis). Entiéndase por N = número de individuos del subgrupo, m. = musculatura, esq = esquelética, COX- = citocromo oxidasa negativa, ↑AOS = aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal.

3.3.6. Cadena respiratoria.

El estudio de la cadena respiratoria se ha realizado en 53 muestras de músculo. Resultó normal en 31 casos (58.49%) y alterado, con déficit de alguno de los complejos de la cadena respiratoria, en 22 casos (41.50%). En seis casos se trata de un déficit combinado de complejos de la cadena respiratoria (caso 12: I, III, IV; caso 14: III, IV; caso 27: III, IV; caso 30: I, IV; caso 31: I, II, III, IV; caso 36: I, IV). En los restantes 16 casos se trata de déficit de un complejo aislado; en 8 casos déficit del complejo I, en 7 casos déficit del complejo IV y en un caso déficit del complejo III. El déficit del complejo II sólo se ha detectado en 1 caso (paciente 31) y se encuentra en el contexto de varios complejos

deficitarios. En la tabla 24 se muestra el número de pacientes que presenta déficit de cada complejo de la cadena respiratoria, bien de modo aislado o bien en el contexto de déficit múltiple.

Complejo CR	Frecuencia
Complejo I	12
Complejo II	1
Complejo III	5
Complejo IV	13

Tabla 24. Déficit de los complejos de la cadena respiratoria

En la siguiente página se expone una tabla en la que se plasman los casos con déficit de la cadena respiratoria, mostrando el tipo de déficit, las características clínicas y morfológicas. En esta tabla 25 se expresa en la primera columna los casos según la numeración asignada a cada paciente. La segunda columna muestra el tipo de déficit de la cadena respiratoria que se ha detectado. con déficit de uno varios complejos de la cadena respiratoria. A continuación se anota el sexo, la edad y el tiempo de evolución. La columna de edad muestra la edad de cada paciente en el año 2007. Las siguientes columnas muestran la clínica y los hallazgos morfológicos de la biopsia muscular de estos pacientes. Entiéndase por las abreviaturas: CR = cadena respiratoria, T = tiempo de evolución, M = mujer, H = hombre, OFT = oftalmoparesia, ME = musculatura esquelética, COX = fibras citocromo oxidasa negativas, RRF = fibras rojo-rasgadas, ↑AOS = aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal.

Caso	Déficit CR	Sexo	Edad	T	Forma clínica	Biopsia muscular
1	I	H	50	37	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Paresia proximal - Afectación bulbar	RRF
2	IV	M	18	5	- PTOSIS+OFThorizontal	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos
6	IV	H	30	13	- PTOSIS+ME - Afectación bulbar	↑lipidos
12	I, III, IV	H	27	27	- PTOSIS+ME - Paresia proximal - Mialgias	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos
13	I	M	26	7	- PTOSIS aislada - Cansancio	RRF, COX, ↑AOS
14	III, IV	M	79	13	- PTOSIS aislada	COX, ↑AOS
23	IV	H	58	19	- PTOSIS+OFTvertical	RRF, COX
24	III	M	54	10	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Paresia proximal	RRF, COX
27	III, IV	M	46	12	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Retinitis pigmentaria	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos
28	IV	M	34	20	- PTOSIS+OFTcompleja	RRF, COX
30	I, IV	H	71	11	- PTOSIS+OFTcompleja	RRF
31	I, II, III, IV	H	40	40	- PTOSIS+OFTcompleja	RRF, ↑AOS, ↑lipidos
34	I	H	69	6	- PTOSIS aislada	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos
36	I, IV	H	42	32	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Paresia proximal - IE, calambres, mialgias	RRF, COX, ↑AOS
37	I	H	17	4	- PTOSIS aislada	Biopsia normal
43	I	H	60	14	- PTOSIS+OFTcompleja - Afectación bulbar	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos
44	I	M	23	0	- PTOSIS+ME - Paresia proximal	RRF, COX, ↑AOS
47	IV	M	53	20	-PTOSIS+OFThorizotl+ME - Paresia proximal - Hipoacusia	COX, ↑AOS, ↑lipidos
51	I	M	25	13	- PTOSIS+OFThorizontal - Retinitis pigmentaria	RRF
52	IV	M	29	17	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Retinitis pigmentaria	COX, ↑AOS, ↑lipidos
53	I	H	40	40	- PTOSIS aislada - Fluctuante	RRF
57	IV	H	55	55	- PTOSIS+OFTcompleja	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos

Tabla 25. Casos con déficit de en la cadena respiratoria. Véase la leyenda en el texto superior.

3.3.7. Estudio genético del mtDNA.

Se ha realizado el estudio de delección en el mtDNA en las muestras de músculo de los 57 pacientes. Se ha encontrado estudio positivo para delección en 14 casos, lo que representa un 24.6% del total de la serie. No se ha encontrado relación entre la edad de inicio de los síntomas y la presencia o ausencia de delección. La longitud de la delección es variable, oscilando de 1 a 8 Kilobases (Kb), con un valor medio de 3.93 ± 2.16 Kb. La delección es pequeña en 8 casos y grande en 6 casos. En los pacientes 13, 22 y 28, la delección abarca la zona de corte de la enzima de restricción *BamHi*. No parece existir una relación entre la longitud de la delección y la edad de inicio de los síntomas ($p = 0.149$). En 10 casos de los 14 con estudio positivo, la delección se encuentra situada en la llamada zona de alta frecuencia de mutación. Se ha determinado la proporción de mtDNA delecionado en las muestras de músculo esquelético de 8 pacientes. No ha podido establecerse una correlación con significación estadística entre la edad de inicio de los síntomas y la heteroplasmia. Todos los pacientes con delección en su mtDNA excepto uno, el caso número 6, presentan hallazgos morfológicos característicos de patología mitocondrial en su biopsia muscular. No existe una asociación estadísticamente significativa entre las variables delección del mtDNA, presencia de RRF y presencia de fibras COX negativas ($p = 0.063$ para la relación con las RRF y $p > 0.005$ para la relación con las fibras COX negativas). A continuación, en la tabla 26, se muestra un resumen de los datos genéticos obtenidos en los casos con delección del mtDNA.

P	Tamaño	Kb	Localización	Heteroplasmia
1	Grande	5	-	mtDNA mutado > mtDNA normal.
2	Grande	6	-	No determinado
5	Grande	6-7	Zona de alta frecuencia	mtDNA mutado < mtDNA normal
6	Pequeña	3	Zona de alta frecuencia	No determinado
13	Pequeña	2	Zona de alta frecuencia	mtDNA mutado = mtDNA normal
22	Pequeña	1	Zona de alta frecuencia	mtDNA mutado > mtDNA normal (90%)
24	Grande	8	-	mtDNAm mutado > mtDNA normal (> 50%)
26	Grande	5	Zona de alta frecuencia	mtDNA mutado > mtDNA normal (> 60%)
28	Pequeña	2-3	Zona de alta frecuencia	mtDNA mutado = mtDNA normal
30	Pequeña	2-3	Zona de alta frecuencia	No determinado
39	Grande	4	-	No determinado
43	Pequeña	2	Zona de alta frecuencia	mtDNA mutado = mtDNA normal
50	Pequeña	1	Zona de alta frecuencia	No determinado
55	Grande	4-5	Zona de alta frecuencia	mtDNA mutado < mtDNA normal

Tabla 26. Tamaño de la deleción, localización y heteroplasmia. P: paciente. Kb: Kilobases..

3.4. CORRELACIÓN ENTRE GENOTIPO Y FENOTIPO

Los pacientes con delección del mtDNA tienen una edad media de inicio de los síntomas de 27.24 ± 15.55 años, con una mediana de 19.5 años y un rango de 47.17 años, que oscila desde los 12.83 años a los 60 años. No existe en esta serie ningún caso con delección positiva cuyo debut de la enfermedad haya sido en el nacimiento. En todos los casos el debut es por encima de los 12 años de edad. En el grupo de pacientes en los que no se ha detectado delección la edad media de inicio de los síntomas es discretamente menor (24.68 ± 19.82 años, mediana 24 años) y el rango de edad de inicio de los síntomas más amplio (66.92 años), existiendo casos en los que el debut es desde el nacimiento y abarcando hasta los 66.92 años como máximo, similar al límite máximo del grupo de pacientes con delección. El valor de p obtenido para relación entre la presencia de delección en el mtDNA y la edad de inicio de los síntomas de la enfermedad es de 0.642.

El tiempo medio de evolución de la enfermedad en el grupo de pacientes con delección es de 17.57 ± 10.46 años, con una mediana de 13.99 años, y un rango de 32 años, que oscila desde los 5 años de evolución a los 37 años máximo. En los pacientes sin delección el tiempo medio de enfermedad es algo mayor (21.38 ± 14.01 años, mediana 18.99 años). También el rango es más amplio en este grupo (55 años), variando desde aquellos que llevan menos de un año de evolución a aquellos que llevan 55 años con su cuadro clínico. El valor de p obtenido para relación entre la presencia de delección en el mtDNA y el tiempo de evolución de la enfermedad es de 0.464.

La ptosis palpebral es de predominio bilateral independientemente de la presencia o ausencia de delección ($p = 0.007$). De los 14 pacientes en los que se ha detectado delección en el mtDNA, 10 pacientes (71.4%) presenta una forma de ptosis bilateral, 1 paciente (7.1%) ptosis unilateral derecha y 3 pacientes (21.4%) ptosis unilateral izquierda. De los 43 pacientes en los que no se ha detectado delección en el mtDNA, 37 pacientes (86%) presentan ptosis bilateral, 6 pacientes (14%) ptosis derecha y ningún paciente presenta ptosis unilateral izquierda.

En aproximadamente un 70% de los pacientes con delección, la expresión fenotípica de los síntomas oculares que observamos es la ptosis palpebral y la oftalmoplejía compleja combinadas. Sin embargo, el fenotipo ocular más frecuente en los pacientes sin delección es la ptosis palpebral aislada. En la relación entre la presencia de delección y la expresión fenotípica de los síntomas oculares se ha encontrado una tendencia a presentar una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.057$). En la tabla 27 se analizan las frecuencias de los síntomas oculares en los dos grupos.

Síntomas oculares	Grupo <u>con</u> delección mtDNA	Grupo <u>sin</u> delección mtDNA
PTOSIS	3 pacientes (21.4%)	20 pacientes (46.5%)
PTOSIS+OFT leve	1 paciente (7.1%)	8 pacientes (18.6%)
PTOSIS+OFT compleja	10 pacientes (71.4%)	15 pacientes (34.9%)
<i>Total</i>	14 pacientes (100%)	43 pacientes (100%)

Tabla 27. Síntomas oculares en los pacientes con y sin delección del mtDNA. Entiéndase por OFT : oftalmoparesia.

El fenotipo con afectación musculatura esquelética es más frecuente en los pacientes en los que no se ha detectado delección en el mtDNA ($p = 0.647$). Obsérvese que de los 12 pacientes que presentan intolerancia al ejercicio, fatiga precoz, mialgias y/o calambres, 10 casos (83.3%) no tienen delección y tan sólo en 2 casos (16.7%) sí se ha encontrado delección. De igual modo, de los 22 pacientes con afectación muscular esquelética en forma de paresia proximal, 17 casos no presentan delección (77.3%), encontrándose ésta sólo en 5 casos (22.7%). En la tabla 28 se muestra la distribución de los síntomas musculares en los diferentes grupos.

Síntomas de la musculatura esquelética	Grupo <u>con</u> delección mtDNA	Grupo <u>sin</u> delección mtDNA
<i>No síntomas</i>	7 pacientes (50%)	16 pacientes (37.21%)
<i>Síntomas musc esquelética</i>	2 pacientes (14.28%)	10 pacientes (23.25%)
<i>Paresia proximal</i>	5 pacientes (35.71%)	17 pacientes (39.53%)
<i>Total</i>	14 pacientes (100%)	43 pacientes (100%)

Tabla 28. Síntomas musculares en los pacientes con y sin delección. El subgrupo de síntomas de la musculatura esquelética se refiere a intolerancia al ejercicio, fatiga precoz, mialgias y/o calambres.

La expresión fenotípica global de la enfermedad es diferente en cada grupo. En los pacientes con delección en el mtDNA la forma más frecuente de presentación es la combinación ptosis palpebral y oftalmoparesia, mientras que en el grupo de pacientes sin delección, la forma clínica que se observa con mayor frecuencia es la ptosis palpebral aislada. El tamaño de la muestra no nos permite identificar si existe una diferencia estadísticamente significativa para esta relación. Se muestra en la tabla 29 las frecuencias de las diferentes formas clínicas en los pacientes con y sin delección.

Forma Clínica	Grupo <u>con</u> delección mtDNA	Grupo <u>sin</u> delección mtDNA
Ptosis palpebral	1 paciente (7.1%)	18 pacientes (41.9%)
Ptosis+Oftalmoparesia	8 pacientes (57.1%)	8 pacientes (18.6%)
Ptosis+ME	2 pacientes (14.3%)	2 pacientes (4.7%)
Ptosis+Oftalmoparesia+ME	3 pacientes (21.4%)	15 pacientes (34.9%)
<i>Total</i>	14 pacientes (100%)	43 pacientes (100%)

Tabla 29. Forma clínica de expresión en los pacientes con y sin delección. Entiéndase por ME: afectación de la musculatura esquelética.

En 5 casos de los 14 en los que se ha encontrado delección (35.71%), existe un fenotipo óculo-faríngeo con síntomas de disfagia y/o disfonía añadidos al resto de cuadro clínico. En la tabla 30 se muestran los casos con dicho fenotipo y las características de los mismos.

Caso (sexo)	Edad	Edad de debut	Herencia	Síntomas oculares	Síntomas ME	Síntomas bulbares	Delección mtDNA
1 (H)	50	13	Mat	+++	++	DF, DG	SI
6 (H)	30	17	-	+	++	DG	SI
9 (M)	61	47	-	+	-	DF, DG	NO
22 (M)	61	30	-	+++	-	DG	SI
32 (M)	61	52	-	++	++	DG	NO
43 (H)	61	46	-	+++	-	DG	SI
45 (H)	41	0	-	+++	++	DF	NO
48 (M)	52	24	-	+	-	DG	NO
50 (H)	60	45	-	+++	-	DG	SI

Tabla 30. Casos de miopatía ocular mitocondrial con fenotipo óculo-faríngeo. Entiéndase por las abreviaturas: ME: musculatura esquelética. Herencia: - = ausente, Mat = herencia materna. Síntomas oculares: + = ptosis palpebral aislada; ++ = ptosis con oftalmoparesia leve; +++ = ptosis con oftalmoplejía compleja. Síntomas de la musculatura esquelética: - = ausentes, + = intolerancia al ejercicio, fatiga precoz, mialgias o calambres musculares, ++ = paresias objetivadas en la exploración. Síntomas bulbares: DG = disfagia, DF = disfonía.

Los hallazgos morfológicos en la biopsia muscular son altamente concordantes con patología mitocondrial en ambos grupos. En los pacientes que presentan delección del mtDNA, las RRF están presentes en más del 90% de ellos ($p = 0.045$) y las fibras COX negativas en más del 50% ($p = 0.684$). En la siguiente tabla se muestra la proporción de RRF y fibras COX negativas en ambos grupos de pacientes.

Hallazgos morfológicos Biopsia muscular	Grupo <u>con</u> delección mtDNA	Grupo <u>sin</u> delección mtDNA
RRF	13/14 pacientes (92.9%)	28/43 pacientes (65.1%)
COX negativas	9/14 pacientes (64.3%)	18/43 pacientes (49.9%)

Tabla 31. Hallazgos morfológicos en la biopsia muscular: RRF y fibras COX negativas.

Para valorar si la heteroplasmia podría jugar un papel en la manifestación fenotípica, se ha determinado la proporción de mtDNA delecionado en el músculo esquelético de 8 pacientes sobre el análisis Southern blot (tabla 32). Se han hallado los valores en función de si la cantidad de mtDNA delecionado es menor, igual o superior a la cantidad de mtDNA normal en cada muestra de músculo esquelético estudiada. La edad de inicio de los síntomas no muestra grandes variaciones en función de la proporción de mtDNA delecionado. En la tabla 33 se muestran las medidas de centralización y dispersión de la edad de inicio de los síntomas en función de la heteroplasmia. No se ha encontrado correlación entre la edad de inicio de los síntomas, las manifestaciones clínicas y la heteroplasmia.

Caso	Heteroplasmia
1	mtDNA mutado > mtDNA normal.
2	No determinado
5	mtDNA mutado < mtDNA normal
6	No determinado
13	mtDNA mutado = mtDNA normal
22	mtDNA mutado > mtDNA normal (90%)
24	mtDNA mutado > mtDNA normal (> 50%)
26	mtDNA mutado > mtDNA normal (> 60%)
28	mtDNA mutado = mtDNA normal
30	No determinado
39	No determinado
43	mtDNA mutado = mtDNA normal
50	No determinado
55	mtDNA mutado < mtDNA normal

Tabla 32. Casos en los que se ha determinado la heteroplasmia.

Heteroplasmia	Media	Desv. estándar	Rango
<50%	22.57 años	10.06	15.45 – 29.69
50%	26.40 años	17.32	14.00 – 46.19
>50%	21.03 años	8.77	12.83 – 30.28

Tabla 33. Edad de inicio de los síntomas en función de la heteroplasmia.

Finalmente, en la página siguiente se muestra una tabla que resume las características clínicas, morfológicas y bioquímicas de los casos de la serie en los que se ha detectado delección del mtDNA (tabla 34).

Caso (Sexo)	Debut	Edad (años)	T evol (años)	Características clínicas	Biopsia muscular	Delección mtDNA	CR
1(H)	13	50	37	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Paresia proximal - Afectación bulbar	RRF	Grande	I
2 (M)	13	18	5	- PTOSIS+OFThorizontal	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos	Grande	IV
5 (M)	15	52	37	- PTOSIS+OFTcompleja - Hipoacusia	RRF, COX, ↑AOS	Pequeña	-
6 (H)	17	30	13	- PTOSIS+ME - Afectación bulbar	↑lipidos	Pequeña	IV
13 (M)	19	26	7	- PTOSIS AISLADA - Cansancio	RRF, COX, ↑AOS	Pequeña	I
22 (M)	30	61	16	- PTOSIS+OFTcompleja - Retinitis - Afectación bulbar	RRF, ↑AOS, ↑lipidos	Pequeña	-
24 (M)	44	54	10	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Paresia proximal	RRF, COX	Grande	III
26 (H)	20	40	20	- PTOSIS+OFTcompleja+ME - Paresia proximal	RRF, COX	Grande	-
28 (M)	14	34	20	- PTOSIS+OFTcompleja	RRF, COX	Pequeña	IV
30 (H)	60	71	11	- PTOSIS+OFTcompleja	RRF	Pequeña	I, IV
39 (M)	15	40	25	- PTOSIS+OFTcompleja - Cansancio	RRF, COX	Grande	-
43 (H)	46	60	14	- PTOSIS+OFTcompleja - Afectación bulbar	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos	Pequeña	I
50 (H)	45	60	15	- PTOSIS+OFT compleja - Retinitis - Afectación bulbar	RRF RV	Pequeña	-
55 (M)	29	38	9	- PTOSIS+ME - Paresia proximal	RRF, COX, ↑AOS, ↑lipidos	Grande	-

Tabla 33. Características clínicas, morfológicas y bioquímicas de los pacientes con estudio genético positivo para delección en el mtDNA. CR: en esta columna se muestra el complejo deficitario de la cadena respiratoria, “-” significa CR sin déficit. ME: músculos esqueléticos afectados.

3.6. DISCUSIÓN

Nosotros examinamos 57 pacientes con miopatía ocular de origen mitocondrial desde el punto de vista clínico, bioquímico, morfológico y genético. Todos los pacientes presentan características clínicas de CPEO, sin embargo hemos observado que en nuestra serie hay pacientes con una afectación ocular exclusiva (“miopatía ocular simple”), los cuales representan más del 60% de la muestra, y otros pacientes que muestran una afectación más amplia, incluyendo patología en la musculatura esquelética sumada a su afectación ocular (“miopatía ocular plus”). En este sentido, podemos clasificar a los pacientes en cuatro grupos clínicos según su grado de afectación clínica:

1. Ptosis palpebral aislada
2. Ptosis con afectación de los músculos oculomotores
3. Ptosis sin afectación de los músculos oculomotores pero con afectación muscular esquelética
4. Ptosis con afectación de los músculos oculomotores y de la musculatura esquelética

La distribución de las frecuencias de pacientes en los cuatro grupos es similar, en torno a los 16-19 casos en cada uno de ellos, lo que representa aproximadamente un 30%, excepto para el grupo tercero, en el que no existe afectación de la motilidad ocular, ya que en él la frecuencia es bastante menor, 4 pacientes, lo que supone tan sólo un 7% del total de la serie. Por tanto, podemos afirmar que la afectación de la motilidad ocular es un hallazgo frecuente, aunque no constante, en este tipo de pacientes, ya que se presenta

en el 60% de los casos aproximadamente. Por otro lado, la ptosis palpebral, la manifestación más común de la CPEO, sí es un hallazgo constante en nuestra serie de pacientes con miopatía ocular, encontrándose presente en el 100% de los pacientes.

Tradicionalmente la CPEO se ha considerado una miopatía mitocondrial de inicio tardío, debutando en un alto porcentaje en edades avanzadas de la vida. Nosotros hemos observado que la edad media de debut de los síntomas se encuentra en torno a los 25 años y que casi la mitad de los pacientes de nuestra serie tienen en el momento del estudio una edad comprendida entre los 0 y los 20 años. Además aproximadamente el 20% presentan los síntomas oculares desde su nacimiento, en forma de ptosis palpebral principalmente, sin haber desarrollado posteriormente y hasta la fecha del estudio una patología mitocondrial más agresiva como podría ser una encefalomiopatía o un SKS. Este dato se considera relevante ya que la media de tiempo de evolución de los pacientes es amplia, superando los 15 años en la mayoría de ellos. No obstante, un 25% de pacientes aproximadamente debuta por encima de los 40 años de edad.

A pesar de tratarse de una miopatía, el valor de CK es normal en la mayoría de los casos. Esto es debido probablemente a que la destrucción de células musculares no es llamativa, dato de esperar en las enfermedades mitocondriales. La hiperlactacidemia, a pesar de ser una alteración bioquímica típica, sólo suele encontrarse alrededor del 30% en la mayoría de las series. En nuestro estudio hemos encontrado valores aproximados a los descritos en

estudios previos, encontrando el lactato basal elevado en el 21.1% de los casos.

El tiempo de evolución ha mostrado una tendencia a la relación con la intensidad de los síntomas oculares (ptosis aislada > ptosis con oftalmoparesia > ptosis con oftalmoplejía compleja), de manera que aquellos pacientes que presentan mayor tiempo de evolución muestran una clínica ocular más severa.

La mayoría de los pacientes presentan un curso clínico estable o lentamente progresivo. Este hecho puede condicionar el diagnóstico tardío de la enfermedad en algunos casos debido a que al ser una patología relativamente benigna, puede ser que los síntomas no incomoden en demasía al paciente y por tanto éste retrase la consulta al médico. No obstante, un pequeño número de pacientes (7%) se caracteriza por una fluctuación de la ptosis palpebral. Existe un caso descrito en la literatura de un paciente con CPEO que desarrolló fatigabilidad muscular y mostró elevación de anticuerpos antireceptor de acetilcolina. Los síntomas no mejoraron tras el tratamiento con prednisona y la biopsia muscular mostraba hallazgos claros de patología mitocondrial (Behbahan et al, 2007). Casos como el descrito enfatizan la dificultad en el diagnóstico diferencial entre la citopatía mitocondrial y la miastenia gravis.

El seguimiento en el tiempo de estos pacientes nos permite conocer la historia natural de la enfermedad. Hemos observado que los pacientes que no presentan oftalmoparesia en el inicio de su enfermedad, no la desarrollan

posteriormente, manteniendo la ptosis palpebral como única manifestación de afectación ocular. Los pacientes que sí presentan oftalmoparesia tienden a la afectación de la musculatura esquelética en forma de paresia con mayor frecuencia que el grupo de pacientes que sólo presenta ptosis. Esto nos permite diferenciar dos entidades diferentes de miopatía ocular. Por un lado, ptosis palpebral aislada, y, por otro lado, ptosis con oftalmoparesia. En ambos casos puede coexistir o no una afectación muscular esquelética, siendo la paresia más frecuente en la forma clínica que se manifiesta con oftalmoparesia.

A diferencia de otras miopatías en las que la afectación del miocardio es frecuente, en esta serie de pacientes no hemos encontrado una frecuencia elevada de patología cardíaca. No obstante, deleciones parciales en el mtDNA han sido encontradas por acumulación en pacientes con cardiopatía isquémica y otras miocardiopatías (Corral-Debrinski et al, 1997; Takeda, 1997).

Nosotros hemos encontrado deleción del mtDNA en 14 pacientes, lo que supone un porcentaje del 24.6%, valor similar al encontrado en otras series. Observamos que aquellos casos con una longitud de la deleción mayor (deleciones grandes) presentan una edad de debut de los síntomas más precoz que aquellos cuya deleción es pequeña. Además dentro del grupo de pacientes que presentan deleción en su mtDNA, la afectación de la musculatura esquelética sólo está presente en aquellos casos en los que la deleción es grande, limitándose los síntomas a la esfera ocular en aquellos pacientes cuya longitud de deleción es pequeña. De los 9 pacientes con fenotipo óculo-faríngeo, 5 casos (55.55%) presentan deleción en su mtDNA de diferente

longitud, tanto pequeña como grande. Hace años que se puso de manifiesto que la presencia de delección en el mtDNA coincide con CPEO sea cual fuera la extensión tisular del trastorno (Laforet et al, 1994) y que parece existir una relación entre el tamaño de la delección y el inicio de los síntomas, de modo que los pacientes con delecciones más largas se manifiestan a una edad de debut más temprana (Goto et al, 1990; Yamamoto et al, 1991). Estudios posteriores de series casos de encefalomiopatías mitocondriales han seguido esta línea de investigación, llegando a diferentes conclusiones según el grupo de trabajo del que se trate (Yamashita et al, 2008). En nuestra serie de pacientes con miopatía ocular podemos decir que existe una relación entre el tipo de delección en el mtDNA y la expresión fenotípica. Posiblemente, si ampliásemos el número de casos de la muestra, la relación estadística sería más significativa, sin embargo, como hemos visto se trata de una patología poco prevalente y por tanto el número de pacientes incluidos en nuestra serie es bastante significativo para la patología que estudiamos.

Las delecciones son normalmente heteroplásticas. Los estudios previos (Goto et al, 1990; Aure et al, 2007; Yamashita et al, 2008) y el nuestro muestran que no existe correlación entre la proporción de mtDNA deleccionado en el músculo esquelético y la edad de debut. Aure et al publicaron en su estudio que la presencia y proporción de mtDNA deleccionado en sangre periférica pero no en músculo esquelético mostraba una relación con un pronóstico severo en términos de velocidad de progresión, extensión tisular y tasa de supervivencia. En nuestro estudio se extrajeron muestras de mtDNA de sangre periférica en 13 pacientes pero no fue posible la detección de mtDNA

mutado en ningún caso, probablemente debido a la continua regeneración de las células sanguíneas y a la selección genética que ocurre entre ellas.

Este tipo de enfermedades puede deberse a mutaciones del mtDNA, defectos de interacción entre el mtDNA y el nDNA, y mutaciones del nDNA. Por tanto, el hecho de que en 43 pacientes no hayamos encontrado alteración del mtDNA no quiere decir que no exista un substrato genético en la fisiopatología de su proceso. Cabría la posibilidad de ampliar el estudio genético secuenciando tanto el mtDNA como el nDNA, en busca de mutaciones no descritas con la técnica empleada en nuestro estudio.

3.5. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con miopatía ocular de origen mitocondrial, en nuestro medio, no muestran un predominio por hombres o mujeres en cuanto a la distribución por género, presentándose en ambos sexos en proporciones similares.

2. La edad media de debut de la enfermedad es de 25 años, aunque el rango de edad en el que se inician los síntomas es amplio. El síntoma inicial suele ser una ptosis palpebral.

3. El seguimiento en el tiempo de esta serie de casos nos permite establecer dos formas clínicas diferenciadas de Miopatía Ocular en base a la evolución observada:

- Ptosis palpebral aislada en pacientes que no van a desarrollar oftalmoparesia a lo largo de toda su evolución y en los que raramente va a aparecer una paresia en musculatura esquelética. Los pacientes que no presentan oftalmoparesia al inicio de la enfermedad no la desarrollan posteriormente.
- Ptosis con oftalmoparesia desde el inicio de la enfermedad. La progresión hacia paresia muscular esquelética es más frecuente en este grupo, independientemente de la edad de inicio de la enfermedad y del tiempo de evolución.

4. En el estudio de esta serie de casos hemos observado un grupo de pacientes con Miopatía Ocular Mitocondrial que presentan un fenotipo oculofaríngeo.

6. En los pacientes con Miopatía Ocular Mitocondrial de esta serie no hemos observado una correlación entre el fenotipo y los hallazgos con morfológicos, histoquímicos y bioquímicos de la biopsia muscular.

7. La forma clínica de presentación más frecuente en el grupo de pacientes de la serie en los que se ha detectado delección del mtDNA es ptosis palpebral con oftalmoparesia. La longitud de la delección puede considerarse en nuestra serie un marcador biológico ya que los pacientes con delección de gran tamaño presentan una edad de debut más temprana y tienden a desarrollar una afectación de la musculatura esquelética, frente a los que presentan delección de pequeño tamaño, que tienden a limitar la sintomatología a la esfera ocular.

8. La Miopatía Ocular de origen mitocondrial es una enfermedad que presenta un curso clínico estable en más del 60% de los pacientes.

Parte 4:

ANEXOS

4. ANEXOS

4.1. Anexo 1:

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE ENFERMEDAD MITOCONDRIAL

Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. Neurology 2002. 59:1406-11.

1. Criterios diagnósticos mayores

a) Clínica:

Se considera que se trata de una encefalomiopatía asociada a defecto de CR o una citopatía mitocondrial (Enfermedad de Leigh, Enfermedad de Alpers, Trastorno mitocondrial infantil letal, Síndrome de Pearson, Síndrome de Keárns-Sayre, Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ictus MELAS, Epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas MERRF, Neuropatía-ataxia-retinitis pigmentosa NARP, Encefalomiopatía neuro-gastrointestinal mitocondrial MNGIE, y Neuropatía óptica hereditaria de Leber LHON) definida cuando se cumplen las siguientes tres condiciones:

1. Combinación no explicable de síntomas multisistémicos que son esencialmente patognomónicos de trastornos de la CR. Los síntomas deben incluir afectación de al menos tres de los siguiente sistemas: neurológico, muscular, cardíaco, renal, nutricional, hepático, endocrino, hematológico, otológico, oftalmológico, dermatológico o dismorfismo.
2. Un curso clínico progresivo con episodios de exacerbación o una historia familiar fuertemente indicativa de una mutación del mtDNA (al menos una relación materna con cada probando lo cual es predictivo de un probable definitivo trastorno de la CR).

3. Otros posibles trastornos metabólicos o no han sido excluidos por los exámenes apropiados, los cuales deben incluir metabolitos, enzimas, análisis de mutaciones, imagen, estudios de electrofisiología e histología.

b) Histología: > 2% fibras RRF en músculo esquelético

c) Enzimología:

> 2% fibras COX-negativas si < 50 años

> 5% fibras COX-negativas si > 50 años

< 20% actividad de algún complejo de la cadena respiratoria (CR) en un tejido

< 30% actividad de algún complejo de CR en una línea celular

< 30% actividad de algún complejo de CR en dos o más tejidos

d) Funcional: Síntesis de ATP por los fibroblastos < 3 SD

e) Molecular: Identificación de una mutación del DNA nuclear o mitocondrial descrita como patogénica de enfermedad mitocondrial.

2. Criterios diagnósticos menores.

a) Clínica: Síntomas compatibles con defectos de la CR.

b) Histología:

1%–2% fibras RRF si edad entre 30–50 años

Ninguna fibra RRF > 30 años

> 2% acúmulos mitocondriales subsarcolemales en pacientes <16 años

Anormalidades generalizadas en la microscopía electrónica en algún tejido

c) Enzimología:

Anticuerpos demostrativos de un defecto en la expresión de complejos de la cadena respiratoria (CR)

20%–30% actividad de algún complejo de la CR en un tejido

30%– 40% actividad de algún complejo de la CR en una línea celular

30%– 40% actividad de algunos complejos de la CR en dos o más tejidos

d) Funcional:

Razón de síntesis de ATP por fibroblastos 2-3 SD bajo su valor

Fibroblastos con imposibilidad para crecer en un medio con glucosa reemplazado por galactosa

e) Molecular: Identificación de una mutación del DNA nuclear o mitocondrial de probable patogenicidad.

f) Metabólico: Uno o más indicadores metabólicos de afectación de la función de la CR.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE ENFERMEDAD MITOCONDRIAL

- ❖ Diagnóstico **definitivo**: identificación de cada criterio mayor o un criterio mayor más dos criterios menores.

- ❖ Diagnóstico **probable**: un criterio mayor más un criterio menor cualquiera o al menos tres criterios menores.

- ❖ Diagnóstico **posible**: cualquiera de un criterio mayor sólo o dos criterios menores, uno de los cuáles debe ser clínico.

4.2. Anexo 2: Mutaciones en el DNA mitocondrial

<i>CUADRO CLÍNICO</i>	<i>ALTERACIÓN GENÉTICA</i>	<i>GEN</i>	<i>HERENCIA</i>
KSS	Deleciones únicas/Duplicación		Esporádica
	Deleciones múltiples		
Síndrome de Pearson	Deleciones únicas/Duplicación		Esporádica
CPEO	Deleciones únicas/Duplicación		Esporádica
	A3243G	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	T4274C	tRNA ^{Ile}	Esporádica?
	T4285C	tRNA ^{Ile}	Materna
	G4309A	tRNA ^{Ile}	Materna
	A5692G	tRNA ^{Asn}	Materna
	C5703T	tRNA ^{Asn}	Materna
	T12311C	tRNA ^{Leu (CUN)}	Materna
	G12315A	tRNA ^{Leu (CUN)}	Esporádica
MELAS	G583A	tRNA ^{Phe}	Esporádica?
	G1642A	tRNA ^{Val}	Materna
	A3243G	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	A3252G	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	A3260G	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	T3271C	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	T3291C	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	A5814G	tRNA ^{Cys}	Materna
	T9957C	COX III	Materna
	G13513A	ND5	Materna
	T9957C	COX III	Materna
MERRF	T7512C	tRNA ^{Ser (UCN)}	Materna
	A8344G	tRNA ^{Lys}	Materna
	T8356C	tRNA ^{Lys}	Materna
	G8363A	tRNA ^{Lys}	Materna

Mutaciones en el DNA mitocondrial (continuación)

Miopatía/Intolerancia al ejercicio	T618C	tRNA ^{Phe}	Materna
	T3250C	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	A3302G	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	T4409C	tRNA ^{Met}	Esporádica
	G5521A	tRNA ^{Trp}	Materna
	A12320G	tRNA ^{Leu(CUN)}	Esporádica
	C15990T	tRNA ^{Pro}	Materna
	Microdelección 15 pb	COX III	Esporádica
	G14486A	Citocromo b	Esporádica
	G15059A	Citocromo b	Esporádica
	G15084A	Citocromo b	Esporádica
	G15168A	Citocromo b	Esporádica
Miocardiopatía	A3260G	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	C3303T	tRNA ^{Leu (UUR)}	Materna
	A4300G	tRNA ^{Ile}	Materna
	C4320T	tRNA ^{Ile}	Materna
	G8363A	tRNA ^{Lys}	Materna
	T9997C	tRNA ^{Gly}	Materna
Síndrome de Leigh/ Necrosis estriatal bilateral	T8993G	ATPasa 6	Materna
	T8993C	ATPasa 6	Materna
	A9176C	ATPasa 6	Materna
	T8851C	ATPasa 6	Materna
	C1644A	tRNA ^{Val}	Materna
Atrofia óptica de Leber (LHON)	G3460A	ND1	Materna
	G11778A	ND 4	Materna
	T14484C	ND 6	Materna
LHON/Distonia	A11696G	ND4	Materna
	G14459A	ND 6	Materna
Encefalopatías	G1606A	TRNA ^{Val}	Materna
	3271-T	tRNA ^{Leu (UUR)}	Esporádica
	G6930A	COX I	Esporádica
	G9952A	COX III	Esporádica
	T14709C	tRNA ^{Glu}	Esporádica
Sordera no sindrómica	A1555G	12S rRNA	Materna
Sordera neurosensorial sindrómica	T7445C	tRNA ^{Ser (UCN)}	Materna
	T7511C	tRNA ^{Ser (UCN)}	Materna

4.2. Anexo 3: Mutaciones en el DNA nuclear

TIPO DE ALTERACIÓN	FENOTIPO	GEN	HERENCIA
Mutaciones en genes nucleares codificantes de proteínas de los complejos I-V	<i>S. de Leigh</i>	NDUFS1	AR
	<i>Encefalopatía y miocardiopatía</i>	NDUFS2	AR
	<i>Síndrome Leigh-like</i>	NDUFS4	AR
	<i>S. de Leigh</i>	NDUFS7	AR
	<i>S. de Leigh</i>	NDUFS8	AR
	<i>S. de Leigh, leucodistrofia</i>	NDUFV1	AR
	<i>S. de Leigh</i>	SDHA	AR
	<i>Feocromocitoma, paraganglioma</i>	SDHB	AD, E
	<i>Paraganglioma hereditario</i>	SDHC y SD	AR
	<i>Hipoglucemia y acidosis láctica</i>	UQCRB	AR
Mutaciones en genes nucleares implicados en el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria	<i>S. de Leigh</i>	SURF1	AR
	<i>Hepatopatía y cetoacidosis</i>	SCO1	AR
	<i>Miocardiopatía infantil</i>	SCO2	AR
	<i>Leucodistrofia y tubulopatía</i>	COX10	AR
	<i>Miocardiopatía hipertrófica</i>	COX15	AR
	<i>Encefalopatía, tubulopatía, fallo hep.</i>	BCS1L	AR
	<i>S. de Leigh</i>	LRPPRC	AR
	<i>Encefalopatía</i>	ATP12	AR
Mutaciones en genes nucleares implicados en la comunicación intergenómica	<i>CPEO con deleciones múltiples en el ADNmt</i>	ANT1	AD
	<i>CPEO con deleciones múltiples</i>	POLG1	AD, AR
	<i>SANDO y deleciones múltiples</i>		AR
	<i>Encefalopatía, parkinsonismo y deleciones múltiples</i>		AR
	<i>S. de Alpers y depleción</i>		AR
	<i>MNGIE</i>	TP	AR
	<i>CPEO y deleciones múltiples</i>	C10orf2 (Twinkle)	AD
	<i>Hepatopatía infantil fatal y depleción del ADNmt</i>	DGUK	AR

Leyenda tabla: AR: autosómica recesiva, AD: autosómica dominante, E: esporádica, X: ligada al cromosoma X.

Mutaciones en el DNA nuclear (continuación)

Mutaciones en genes nucleares implicados en la comunicación intergenómica	Miopatía infantil fatal con o sin tubulopatía y depleción	TK2	AR
	Cuadro hepatocerebral con déficit de los complejos I, III, IV y V	EGF1	AR
	Hipotonía, hepatopatía, acidosis láctica, dismorfia y déficit multienzimático	MRPS16	AR
	Miopatía y anemia sideroblástica	PSU1	AR
Mutaciones genes codificantes de componentes no proteicos de CR	Ataxia, crisis, miopatía mioglobinuria	CoQ	¿?
Mutaciones en genes nucleares que regulan componentes lipídicos de las membranas	S. de Barth	G 4.5	X
Mutaciones en genes nucleares que regulan la fusión, fisión y movilidad mitocondrial	Paraplegia espástica AD	KIF5A	AD
	Atrofia óptica AD	OPA1	AD
	Charcot-Marie-Tooth 2A	MNF2	AD
Mutaciones en genes nucleares codificantes de factores indirectamente relacionados con la CR	Ataxia de Fredreich	FRDA1	AR
	Paraplegia espástica	SPG7	AR
	Sordera y distonía	DDP1	X
	Atrofia óptica	OPA1	AD
	Anemia sideroblástica y ataxia	ABC7	X
	Enfermedad de Wilson	ATP7B	AR

Leyenda tabla: AR: autosómica recesiva, AD: autosómica dominante, E: esporádica, X: ligada al cromosoma X.

4.4. Anexo 4: CASOS CLÍNICOS

A continuación se expone un resumen de los casos clínicos de aquellos pacientes de la serie estudiada en los que se ha encontrado delección en el mtDNA.

▪ Caso clínico 1	página 137
▪ Caso clínico 2	página 138
▪ Caso clínico 3	página 139
▪ Caso clínico 4	página 140-141
▪ Caso clínico 5	página 142
▪ Caso clínico 6	página 143
▪ Caso clínico 7	página 144
▪ Caso clínico 8	página 145
▪ Caso clínico 9	página 146
▪ Caso clínico 10	página 147
▪ Caso clínico 11	página 148
▪ Caso clínico 12	página 149
▪ Caso clínico 13	página 150
▪ Caso clínico 14	página 151

Caso clínico 1

Paciente nº 1 (RLP)

Género: Varón

Edad: 50 años

Procedencia: Sevilla

Antecedentes familiares: Abuela materna con ptosis palpebral

Antecedentes personales: Hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo, enolismo, tromboembolismo pulmonar.

Anamnesis: A los 13 años comienza con un cuadro progresivo de caída de párpados, dificultad para tragar y cambio en la voz. Precisó de intervención quirúrgica sobre los músculos elevadores de los párpados ya que la ptosis progresiva le dificultaba la visión. Sobre los 30 años empezó a notar debilidad muscular sobre todo en las extremidades superiores.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoplejía compleja. Paresia de deltoides, tríceps y musculatura distal de manos. Arreflexia generalizada. Disfagia. Disfonía.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: Variabilidad en el calibre de las fibras musculares. RRF. Inclusiones eosinófilas cristalinas.

Estudio de la cadena respiratoria: Déficit del complejo I

Estudio genético: Deleción de 5 Kb en el mtDNA. La cantidad de mtDNA mutado es mayor que la cantidad de mtDNA normal.

Otros estudios: EMG: polineuropatía mixta axonal y desmielinizante

Diagnóstico: Miopatía ocular de origen mitocondrial. Afectación bulbar.

Caso clínico 2

Paciente nº 2 (CLLP)

Género: Mujer

Edad: 18 años

Procedencia: Jerez

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: convulsiones febriles en la infancia

Anamnesis: A los 13 años comienza con caída del párpado izquierdo y visión doble. La clínica ha permanecido estable a lo largo de los años, sin fluctuaciones ni claros empeoramientos.

Exploración: Ptosis palpebral izquierda. Oftalmoparesia horizontal bilateral, más marcada en la mirada horizontal hacia la izquierda (paresia de músculo recto lateral izquierdo y recto medial derecho). Balance motor normal.

Valor de CPK: Elevada (200 UI/L)

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Aumento de la actividad oxidativa difusa y subsarcolemal. Aumento de lípidos. Múltiples fibras COX negativas.

Estudio de la cadena respiratoria: Déficit del complejo IV

Estudio genético: Deleción de 6 Kb en el mtDNA

Otros estudios: EMG con estimulación repetitiva normal. LDH 823 UI/L.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial

Caso clínico 3

Paciente nº 5 (AGM)

Género: Mujer

Edad: 50 años

Procedencia: Sevilla

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: Diabetes mellitus tipo 2, dislipemia, asma bronquial, síndrome de colon irritable, poliposis nasosinusal.

Anamnesis: Cuando tenía 15 años comenzó con visión doble en todas las posiciones de la mirada y se notaba los párpados caídos. Ha presentado caídas aunque no refiere debilidad en extremidades ni otros síntomas musculares.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoplejía compleja. Hipoacusia. Hiposmia. Balance motor normal.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF abundantes. Aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal. Frecuentes fibras COX negativas.

Estudio de la cadena respiratoria: Normal

Estudio genético: Delección grande de 6-7 Kb en el mtDNA, en zona de alta frecuencia. La cantidad de mtDNA mutado es menor que la cantidad de mtDNA normal.

Otros estudios: EMG: velocidad de conducción nerviosa normal

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial

Caso clínico 4

Paciente nº 6 (RFM)

Género: Varón

Edad: 30 años

Procedencia: Cádiz

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: Parto prematuro. Comenzó a caminar a los 4 años, con caídas frecuentes. Por lo demás, tuvo un desarrollo psicomotor normal.

Anamnesis: A sus 17 años comenzó a sentir los párpados caídos, más acentuado en el lado derecho. Desde su infancia le notaban que tenía menos fuerza que los niños de su edad, pero ha sido en los últimos años cuando él ha comenzado a notar debilidad muscular predominantemente a nivel proximal. Ocasionalmente ha presentado dificultad para tragar.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral más acentuada en el lado derecho. Facies miopática con discreta debilidad facial bilateral y en músculo orbicular de los párpados. Escasa movilización del velo del paladar. Motilidad ocular normal. Paresia proximal con ileopsoas y cuádriceps a 4+/5, glúteos mayores a 4/5, infraespinoso, deltoides y supraespinoso 4+/5.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Elevado (3.5 mmol/L)

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: Aumento del contenido lipídico. La demostración de inmunohistoquímica de fosforilasa, fosfofructoquinasa, mioadenilato deaminasa, citocromo C oxidasa, muestran una reacción normal.

Estudio de la cadena respiratoria: Normal

Estudio genético: Deleción única de 3 Kb en el mtDNA, en zona de alta

frecuencia.

Otros estudios: Examen de placa neuromuscular para el nervio cubital derecho estimulando en la muñeca y detectando en el adductor de 5ºdedo muestra una estimulación repetitiva patológica en baja frecuencia de estimulación. Anticuerpos antireceptores de acetilcolina negativos.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial con fenotipo óculo-faríngeo

Caso clínico 5

Paciente nº 13 (JBGP)

Género: Mujer

Edad: 26 años

Procedencia: Granada

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: Traumatismo palpebral izquierdo a los 9 años de edad

Anamnesis: A los 19 años empieza a notar que el párpado izquierdo lo tiene más bajo que el derecho. Refiere sensación de falta de fuerzas y cansancio excesivo con el ejercicio. No presenta clara intolerancia al ejercicio.

Exploración: Ptosis palpebral izquierda, con ausencia de fatigabilidad. Motilidad ocular normal. Balance motor normal.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF abundantes. Aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal. Ocasionales fibras COX negativas.

Estudio de la cadena respiratoria: Déficit de complejos I y IV

Estudio genético: Deleción única pequeña de 2 Kb en el mtDNA, en zona de alta frecuencia. La cantidad de mtDNA mutado es igual a la cantidad de mtDNA normal.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial

Caso clínico 6

Paciente nº 22 (HCF)

Género: Mujer

Edad: 61 años

Procedencia: Sevilla

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: Miastenia gravis, timectomizada. Síndrome de apnea obstructiva del sueño. Obesidad. Tiroiditis de Hashimoto.

Anamnesis: A los 30 años comenzó a ver doble y se notaba los párpados caídos. Aquejaba dificultad para la deglución.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoparesia. Retinitis pigmentaria en el fondo de ojo. Disfagia.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Elevado discretamente (2.78 mmol/L)

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal. Aumento del contenido lipídico.

Estudio de la cadena respiratoria: Normal

Estudio genético: Deleción de 1 Kb en el mtDNA, en zona de alta frecuencia. La cantidad de mtDNA mutado supone el 90% del mtDNA total de la célula. Mutación puntual T4216C en el gen ND1 del mtDNA.

Otros estudios: EMG: estimulación repetitiva normal

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial. Afectación bulbar.

Caso clínico 7

Paciente nº 24 (AMGC)

Género: Mujer

Edad: 54 años

Procedencia: Cádiz

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: No

Anamnesis: A los 44 años consulta porque nota una caída de párpados bilateral progresiva. Con posterioridad a notado visión doble y dificultad para subir escaleras, levantarse desde la posición de cuclillas y para mantener los brazos en alto.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoplejía externa compleja. Paresia de ambas cinturas discreta, escapular y pelviana, más acusada en esta última.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Fibras COX negativas. Predominio de fibras tipo 1.

Estudio de la cadena respiratoria: Déficit del complejo III

Estudio genético: Deleción grande de 8 Kb en el mtDNA. La proporción de mtDNA mutado supera la cantidad de mtDNA normal.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial con afectación de cinturas

Caso clínico 8

Paciente nº 26 (JMMS)

Género: Varón

Edad: 33 años

Procedencia: Córdoba

Antecedentes familiares: Abuela paterna con degeneración retiniana

Antecedentes personales: No

Anamnesis: A los 20 años consulta porque nota una caída de párpados bilateral progresiva. En el interrogatorio dirigido puede extraerse que unos años antes comenzó a notar debilidad muscular a la que no dio importancia por no afectarle en su vida diaria.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoplejía externa compleja. Paresia proximal y distal.

Valor de CPK: Elevada ligeramente (280 UI/L)

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Fibras COX negativas. Predominio de fibras tipo 1.

Estudio de la cadena respiratoria: Normal

Estudio genético: Deleciones múltiples, de 5 Kb de tamaño, en el mtDNA, en zona de alta frecuencia. La proporción de mtDNA mutado supera la cantidad de mtDNA normal.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial

Caso clínico 9

Paciente nº 28 (RMA)

Género: Mujer

Edad: 34 años

Procedencia: Sevilla

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: Migraña. Hipotiroidismo subclínico.

Anamnesis: A los 14 años consulta porque nota una caída de párpados bilateral progresiva. Precisó de intervención quirúrgica sobre los músculos elevadores del párpado por dificultad para la visión.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoplejía externa compleja. Paresia de ambas cinturas, escapular y pelviana.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Elevado (3.3 mmol/L)

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Fibras COX negativas.

Estudio de la cadena respiratoria: Déficit del complejo IV

Estudio genético: Deleción única de 2-3 Kb en el mtDNA. La proporción de mtDNA mutado y la cantidad de mtDNA normal es similar.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial con afectación de cinturas.

Caso clínico 10

Paciente nº 30 (JSL)

Género: Varón

Edad: 71 años

Procedencia: Sevilla

Antecedentes familiares: Madre con ptosis palpebral

Antecedentes personales: Neoplasia pulmonar (“oat-cell”) y prostática. HTA. EPOC.

Anamnesis: A partir de los 60 años empieza a notarse una caída de párpados progresiva, sin ningún otro síntoma acompañante.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Motilidad ocular normal. Balance muscular normal.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. “Rimmed vacuols”. Centralización de núcleos. Atrofia de fibras tipo 2.

Estudio de la cadena respiratoria: Déficit del complejo I y IV

Estudio genético: Deleción de 2-3 Kb en el mtDNA, en zona de alta frecuencia. Mutación secundaria T4216C y mutación G15928A en el tRNA de la treonina.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial

Caso clínico 11

Paciente nº 39 (FCG)

Género: Mujer

Edad: 40 años

Procedencia: Badajoz

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: No

Anamnesis: Consulta por caída de párpado derecho progresiva y visión doble desde los 15 años. Fluctúa ligeramente empeorando por las noches, tras el consumo de alcohol y tras poco descanso nocturno. Se ensayó tratamiento con anticolínerásicos y corticoides, sin presentar mejoría. En los últimos meses presenta cansancio en las piernas y problemas articulares.

Exploración: Ptosis palpebral derecha. Oftalmoparesia de la musculatura extraocular derecha más acusada en el músculo recto superior y recto interno, y limitación del músculo recto interno izquierdo. Balance muscular normal.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Abundantes fibras COX negativas.

Estudio de la cadena respiratoria: Normal

Estudio genético: Deleción grande de 4 Kb en el mtDNA.

Otros estudios: EMG, RM craneal, estudio de anticuerpos contra receptores de acetilcolina, todo normal.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial

Caso clínico 12

Paciente nº 43 (FSM)

Género: Varón

Edad: 61 años

Procedencia: Jaen

Antecedentes familiares: Cataratas en la familia paterna

Antecedentes personales: No

Anamnesis: A los 56 años empezó a notar una caída del párpado izquierdo que progresivamente se hizo bilateral. Desde hace un año ha comenzado a notar dificultad para deglutir. Se realizó blefaroplastia bilateral.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoplejía externa compleja.

Balance motor normal.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF dispersas. Abundantes Fibras COX negativas. Aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal. Predominio de fibras tipo 1.

Estudio de la cadena respiratoria: Déficit del complejo I

Estudio genético: Deleción de 2 Kb en el mtDNA, en zona de alta frecuencia.

La proporción de mtDNA mutado y la cantidad de mtDNA normal es similar.

Otros estudios: RM craneal normal.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial con fenotipo óculo-faríngeo

Caso clínico 13

Paciente nº 50 (JMMR)

Género: Varón

Edad: 61 años

Procedencia: Jaen

Antecedentes familiares: Cataratas en la familia paterna

Antecedentes personales: No

Anamnesis: A los 45 años empezó a notar una caída del párpado bilateral. Poco tiempo después comenzó a notar visión doble en determinadas posiciones de la mirada. En ocasiones presenta dificultad para la deglución.

Exploración: Ptosis palpebral bilateral. Oftalmoplejía externa compleja. Balance motor normal.

Valor de CPK: Normal

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo bíceps. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Presencia de "rimmed vacuols".

Estudio de la cadena respiratoria: Normal

Estudio genético: Deleción pequeña de 1 Kb en el mtDNA, en zona de alta frecuencia.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial. Afectación bulbar.

Caso clínico 14

Paciente nº 55 (RPM)

Género: Mujer

Edad: 38 años

Procedencia: Sevilla

Antecedentes familiares: No

Antecedentes personales: No

Anamnesis: Con 29 años empezó a notar que el párpado izquierdo se le caía, fluctuando durante el día. Precisó de intervención quirúrgica sobre el músculo elevador del párpado izquierdo ya que la caída progresiva del párpado llegó a dificultarle la visión.

Exploración: Ptosis palpebral izquierda. Motilidad ocular normal. Paresia leve de músculos deltoides.

Valor de CPK: Elevada (249 UI/L); Normal en análisis posteriores

Lactaco basal: Normal

Test de isquemia: Normal

Biopsia muscular: Músculo tibial anterior. Hallazgos anatomopatológicos: RRF. Abundantes Fibras COX negativas. Aumento de la actividad oxidativa subsarcolemal. Aumento del contenido de lípidos.

Estudio de la cadena respiratoria: Normal

Estudio genético: Deleción de 4-5 Kb el mtDNA, en zona de alta frecuencia. La proporción de mtDNA mutades menor que la cantidad de mtDNA normal.

Diagnóstico: Miopatía ocular mitocondrial.

Parte 5:

ABREVIATURAS

5. ABREVIATURAS

ADP: Difosfato de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

CoA: Coenzima A (acetil-CoA)

COX: Citocromo oxidasa

CPEO: Oftalmoplejía externa crónica progresiva

CPT: Carnitina palmitoil transferasa

CR: Cadena respiratoria

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DAB: Diaminobenzidina

DE: Desviación estándar

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DT: Desviación típica

EMG: Electromiografía

ENS: Encefalomielopatía necrotizante subaguda

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

g: gramos

H-E: Hematoxilina-eosina

HTA: Hipertensión arterial

HUVR: Hospital Universitario Virgen del Rocío

LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber

MELAS: Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ictus

MERRF: Epilepsia mioclónica con miopatía de fibras rojo rasgadas

mL: mililitros

MNGIE: Encefalopatía mioneurogastrointestinal

mtDNA: ADN mitocondrial

NADH: Nicotinamida adeninucleótido glucohidrolasa

NARP: Síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa

nDNA: ADN nuclear

ORO: rojo oleoso

PAS: ácido periódico de Schiff

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pol: polimerasa

RNA: Ácido ribonucleico

RRF: fibras rojo-rasgadas

rRNA: RNA ribosómico

SD: Desviación estandar

SDH: succinato deshidrogenasa

SKS: Síndrome de Kearns-Sayre

tRNA: RNA de transferencia

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UPO: Universidad Pablo de Olavide

Parte 6:

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Agostino A, Valletta L, Chinnery PF, Ferrari G, Carrara F, Taylor RW, Schaefer AM, Turnbull DM, Tiranti V, Zeviani M. Mutations of SLC25A4, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology* 2003;60:1354-1360.

Akaike M, Hawaii H, Tokio K, Kunishige M, Mine H, Nishida Y, Saito S. Cardiac dysfunction in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. *Clin Cardiol* 1997;20(3):239-243.

Akman CI, Shanke S, Tanji K, Bonilla E, Ojaimi J, Krishna S, Schubert R, DiMauro S. Mitochondrial DNA deletion in a child with megaloblastic anemia and recurrent encephalopathy. *J Child Neurol* 2004;19:258-261.

Amanti-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo E, Bornstein B, Boissière A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carrocia R, Iommarini R, Labauge P, Figarella-Branger D, Macarellles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liquori R, La Morgia C, Montagna P, Liquori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martín MA, Arenas J, Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D, Carelli V. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy « plus » phenotypes. *Brain* 2008;131(Pt 2):338-351.

Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, de Bruijin MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schereier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981,290:257-465.

Andreu AL y Gonzalo-Sanz R. Las enfermedades mitocondriales: una clasificación para el siglo XXI. *Neurología* 19[1], 15-22, 2004.

Artuch R, Pineda M, Vilaseca MA, Briones P, Ribes A, Colomer J, Vernet A, Campistol J. Respiratory chain and pyruvate metabolism deficiencies in pediatric patients: evaluation of biochemical tests for selective screening. *Rev Neurol* 1998 ;26(149):38-42.

Auré K, Favet G, Leroy JP, Lacène E, Romero NB, Lombès A. Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain* 2006;129(5):1249-59.

Aure K, Ogier de Baulny H, Laforet P, Jardel C, Eymard B, Lombes A. Chronic progressive ophthalmoplegia with large-scale mtDNA rearrangement: can we predict progression? *Brain* 2007; 130:1516-1524.

Barohn RI. General approach to muscle diseases. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil textbook of medicine*. 22nd Ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004;2370-2379.

Barrientos A. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 2002, 26:307-316.

Behbehani R, Sharfuddin K, Anim JT. Mitochondrial ophthalmoplegia with fatigable weakness and elevated acetylcholine receptor antibody. *J Neuroophthalmol* 2007;27(1):41-42.

Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* . 2006;38:515-517.

Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002. 59:1406-11.

Bet L, Bresolin N, Moggio M, Meola G, Prella A, Schapira AH, Binzoni T, Chomyn A, Fortunato F, Cerretelli P, et al. A case of mitochondrial myopathy, lactic acidosis and complex I deficiency. *J Neurol* 1990;237:399-404.

Bogenghagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mtDNA nucleoids. *J Biol Chem* 2007.

Bohr VA and Anson RM. Mitochondrial DNA repair pathways. *J Bioenerg Biomembr* 1999;31:391-98.

Bonilla E, Schotland DL, Di Mauro S. Ultrastructural study of globular inclusions in human skeletal muscle mitochondria. *Acta Neuropathol (Berl)* 1980;52:35-40.

Bonilla E, Sciacco M, Tanji K, Sparaco M, Petruzzella V, Moraes CT. New morphological approaches to the study of mitochondrial encephalomyopathies. *Brain Pathol* 1992; 2:113-19.

Bosbach S, Kornblum C, SchroÈder R, Wagner M. Executive and visuospatial deficits in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *Brain* 2003;126:1231-1240.

Brooke MH. A clinician's view of neuromuscular disease. 2nd edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

Burgos Rodríguez R. Metodología de la investigación y escritura científica en clínica. 3^a Ed. 1998.

Campos Y, Arenas J, Cabello A, Gómez-Reino JJ. Respiratory chain enzyme defects in patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:491-93.

Campos y, Huertas R, Bautista J, Gutiérrez E, Aparicio M, Lorenzo G, Segura D, Villanueva M, Cabello A, Alesso L, et al. Muscle carnitine deficiency and lipid storage myopathy in patients with mitochondrial myopathy. *Muscle and Nerve* 1993; 16:778-81.

Carod-Artal FJ, López-Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Ruiz-Pesini E, Montoya J. Deleciones en el ADN mitocondrial asociadas a oftalmoplejía crónica extrínseca progresiva con fibras rojo rasgadas en 2 pacientes brasileños. *Med Clin (Barc)* 2006a;126(12):457-60.

Carod-Artal FJ, López Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Herrero MD, Montoya J. Mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre síndrome. *Neurología* 2006b;21(7):357-64.

Castro-Gago M y Novo I. Encefalopatías mitocondriales de comienzo en la infancia y la adolescencia. *Revista de Neurología* 26, 61-71, 1998.

Chinchón I, Miopatías metabólicas por afectación de cadenas productoras de energía. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, 1992.

Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, Carrara F, Lombes A, Laforet P, Oqier H, Jaksch M, Lochmüller H, Horvath R, Deschauer M, Thorburn DR, Bindoff LA, Poulton J, Taylor RW, Matthews JN, Turnbull DM. Risk of developing mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 2004; 364:592-596.

Chinnery PF, Johnson MA, Taylor RW, Lightowlers RN, Turnbull DM. A novel mitochondrial tRNA phenylalanine mutation presenting with acute rhabdomyolysis. *Ann Neurol* 1997; 41:408-10.

Chinnery PF, Turnbull DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am Med Genet* 2001; 106:94-101.

Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Silvestri G, Hirano M, Simonetti S, Angelini C, Donati MA, Garcia C, Martinuzzi A, Mosewich R, Servidei S, Zammarchi E, Bonillo E, DeVivo DC, Rowland LP, Schon EA, DiMauro S: MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol* 1992, 31:391-398

Clark KM, Taylor RW, Johnson MA, et al. A mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome c oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 1999;64:130-39.

Coleman RA, Stajich JM, Pact VW, Pericak-Vance MA. The ischemic exercise test. *Muscle and Nerve* 1986;9:216.

Cormio A, Milella F, Vecchiet J, Felzani G, Gadaleta MN, Cantatore P. Mitochondrial DNA mutations in RRF of healthy subjects of different age. *Neurobiol Aging*. 2005;26(5):655-64.

Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res* 1992;275:169-180.

Coulter-Mackie MB, Applegarth DA, Toone JR, Gagnier L. A protocol for detection of mitochondrial DNA deletions: characterization of a novel deletion. *Clin Biochem* 1998;31:627-32.

Charla S, Coku J, Forbes T, Kannan S. Kearns-Sayre Syndrome Presenting as Complete Heart Block. *Pediatr Cardiol* 2008;29:659–662.

Dahmani Y, Marcuello A, Díez-Sánchez C, Ruiz-Pesisni E, Montoya J, López-Pérez MJ. Association of human mitochondrial DNA variants with plasma LDL levels. *Mitochondrion* 2008;8(3):247-253.

Di Mauro S and Hirano M. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromusc Disord* 2005; 15: 276-86.

Di Mauro S and Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 2001;106:18-26.

Di Mauro S and Schon EA. Mitochondrial Respiratory-Chain diseases. *N Engl J Med* 2003; 26:2656-68.

Di Mauro S, Moraes C. Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch Neurol* 1993;50:1197-1208.

DiMauro S, Bonilla E, De Vivo DC. Does the patient have a mitochondrial encephalomyopathy?. *J Child Neurol* 1999; 14: S23-S35.

DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, editors. *The molecular and genetic basis of neurological disease*. Boston: Butterwothr-Heinemann; 1997a; p. 389-446.

DiMauro S, Nicholson JF, Hays AP, Eastwood AB, Papadimitriou A, Koenigsberqer R, DeVivo DC. Benign infantile micochondrial myopathy due to reversible cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol* 1983; 14:226-34.

Dubowitz V and Brooke MH. The biopsy: normal and diseased muscle. In: *Muscle biopsy: a practical approach*. 2^a Ed. London, Balliere Tindall 1985:74-104.

Elliot DL, Buist NR, Goldberg L, Kennaway NG, Powell BR, Kuehl KS. Metabolic myopathies: evaluation by graded exercise testing. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:163-172.

Engel WK and Cunningham GC. Rapid examination of muscle tissue: An improved trichrome stain method for fresh frozen biopsy sections. *Neurology* 1963; 13:919-26.

Filosto M, Mancuso M, Nishigaki Y, Pancrudo J, Harati Y, Gooch C, Mankodi A, Bayne L, Bonilla E, Shanske S, Hirano M, DiMauro S. Clinical and genetic heterogeneity associated with mitochondrial ophthalmoplegia due to mutations in polymerase gamma. *Arch Neurol* 2003;60:1279-1284.

Galán-Ortega A, Coll-Cantí J, Padrós-Fluvià A, Arambarri-Hervias M, Pintos-Morell G. Diagnostic strategy for mitochondrial diseases. *Rev Neurol*. 1999;29(1):52-8.

García-Cazorla A, Duarte S, Serrano M, Nascimento A, Ormazabal A, Carrillo I, Briones P, Montoya J, Garesse R, Sala-Castellvi P, Pineda M, and Artuch R. Mitochondrial diseases mimicking neurotransmitter defects. *Mitochondrion* 2008;8(3):273-278.

Garcidueñas Calderón A, Pérez Loria O, Sagástegui J, Farías García R. Oftalmoplegia progresiva externa secundaria a miopatía mitocondrial. *Gac Méd Méx* 2000;136(3) :267-271.

González-Crespo R, Arenas J, Gomez-Reino JJ, Campos Y, Borstein B, Martin MA, Cabello A, García-Rayó R, Ricoy JR. Muscle dysfunction in elderly individuals with hip fracture. *J Rheumatol* 1999; 26:2229-32.

González-Vioque E, Blázquez A, Fernández-Moreira D, Bornstein B, Bautista J, Arpa J, Navarro C, Campos Y, Fernández Moreno MA, Garesse R, Arenas J, Martín MA. Association of novel POLG mutations and multiple mitochondrial DNA deletions with variable clinical phenotypes in a Spanish population. *Arch Neurol* 2006;63:107-11.

Goto Y, Koga Y, Horai S, Nonaka I. Chronic progressive external ophthalmoplegia: a correlative study of mitochondrial DNA deletions and their phenotypic expression in muscle biopsies. *J Neurol Sci* 1990a; 100: 63-69.

Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA-leu(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990b;348:651-653.

Greaves LC and Taylor RW (2006). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *IUBMB Life* 2006 58, 143-151.

Haller RG, Lewis SF, Estabrook RW, DiMauro S, Servidei S, Foster DW. Exercise intolerance, lactic acidosis, and abnormal cardiopulmonary regulation in exercise associated with adult skeletal muscle cytochrome C oxidase deficiency. *J Clin Invest* 1989;84:155-161.

Hao H, Bonilla E, Manfredi G, DiMauro S, Moraes CT: Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 1995, 56:1017-1025.

Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 1991; 29: 601-05.

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988;331:717-19.

Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990 ; 46:428-33.

Horvath R, Hudson G, Ferrari G, Futterer N, Ahola S, Lamantea E, Prokisch H, Lochmüller H, McFarland R, Ramesh V, Klopstock T, Freisinger P, Salvi F, Mayr JA, Santer R, Tesarova M, Zeman J, Udd B, Taylor RW, Turnbull D, Hanna M, Fialho D, Suomalainen A, Zeviani M, Chinnery PF. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006;129:1674-1684.

Houshmand M, Panahi M, Oseni BN. Investigation on mtDNA deletions and twinkle gene mutation (G1423C) in progerssive external ophthalmoplagia. *Neurol India* 2006; 54(2):182-85.

Hu J, Li N, Yuan JH, Zhao Z, Shen HR, Mei L. A clinical and pathological analysis of inclusion body myositis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*.

Hudson G, Amanti-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reyner P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF, Taylor RW. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external opthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 2008;131(Pt 2):329-337.

Hwang JM, Choung HK, Ko HS, Seong MW, Kim JY, Park SS. Ophthalmoplegia diagnosis. *Ophtalmol*. 2009;116(4):813-814,814.e1-2.

Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1996, 14:146-151.

Johns DR. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 1995;333:638-644.

Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen A. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 2000; 289:782-785.

Kogelnik AM, Lott MT, Brown MD, Navathe SB, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database: 1998 update. *Nucleic Acids Res* 1998;26:112-115.

Kraysberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 2006;38:507-508.

Laforet P, Lombès A, Eymard B, Danan C, Chevallay M, Rouche A, Frachon P, Fardeau. Chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers: clinical, morphological and genetic investigations in 43 patients. *Neuromusc Disord* 1995 ;5 :399-413.

Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, Papadimitriou A, Spelbrink H, Silvestri L, Casari G, Gomi GP, Zeviani M. Mutations of mitochondrial DNA polymerase gamma A are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol* 2002; 52:211-219.

Larsson NG, Eiken HG, Boman H, Holme E, Oldfors A, Tulinius MH. Lack of transmission of deleted mtDNA from a woman with Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989;320:1293-99.

Lombes A, Bonilla E, Di Mauro S. Mitochondrial encephalomyopathies. *Rev Neurol (Paris)* 1989;145:671-689.

Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, Hudson G, Dirham SE, Taylor RW, Nightingale S, Turnbull DM, Copeland WC, Chinnery PF. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 2006;78:1026-1234.

Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Olfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 2004; 364:875-882.

Maeso E, Rueda A, Jiménez S, Del Hoyo P, Martín R, Cabello A, Mendoza LM, Arenas J, Campos Y. A novel mutation in the mitochondrial DNA tRNA Leu (UUR) gene associated with late-onset ocular myopathy. *Neuromuscul Disord* 2007;17(5):415-8.

Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Kärppä M, Majamaa-Voltti KA, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes: prevalence of the mutation in adult population. *Am J Hum Genet* 1998; 63:447-454.

Mariotti C, Savarese N, Suomalainen A, Rimoldi M, Comi G, Prella A, Antozzi C, Servidei S, Jarre L, DiDonato S, Zeviani M. Genotype to phenotype correlations in mitochondrial encephalomyopathies associated with the A3243G mutation of mitochondrial DNA. *J Neurol* 1995;242:304-12.

McKenzie M, Liolitsa D and Hanna M. Mitochondrial Disease: Mutations and Mechanisms. *Neurochemical Research* 2004;29, 589-600.

Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Fabrizi GM, Koga Y, DiMauro S, Schon EA. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 1990;18:561-567.

Mita S, Schmidt B, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E. Detection of “deleted” mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9509-9513.

MITOMAP: A human mitochondrial genome database. Center for Molecular Medicine, Emory University. www.gen.emory.edu/mitomap.html.

Molesmi AR, Melberg A, Holme E, Oldfors A. Clonal expansion of mitochondrial DNA with multiple deletions in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol* 1996;40:707-713.

Monnat RJ, Jr, Reay DT. Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues. *Gene* 1986, 43:205-211.

Montoya J. Equipo de investigación de la Universidad de Zaragoza. 2002.

Montoya J, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ and Ruiz-Pesini E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim Biophys Acta* 2009;1785(5):476-483.

Moraes CT, Atencio DP, Oca-Cossio J, Díaz F. Techniques and pitfalls in the detection of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *J Mol Diagn.* 2003;5(4):209-11.

Moraes CT, Ciacci F, Silvestri G, Shanske S, Sciacco M, Hirano M, Schon EA, Bonilla E, DiMauro S: Atypical clinical presentations associated with the MELAS mutation at position 3243 of human mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disord* 1993, 3:43-50.

Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, Nonaka I, Koga Y, Spiro AJ, Brownell KW, Schmidt B, Schotland DL, Zupanc M, DeVivo DC, Schon EA, Rowland LP. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989;320:1293-99.

Moraes CT, Schon EA. Detection and analysis of mitochondrial DNA and RNA in muscle by in situ hybridization and single-fiber PCR. *Methods Enzymol* 1996, 264:522-540

Morgan-Hughes JA. Mitochondrial diseases. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, ed. *Myology. Basic and clinical*. New York: McGrawHill 1994; p. 1632-33.

Munsat TL. A standardized forearm ischemic exercise test. *Neurology* 1970;20:1171.

Musumeci O, Naini A, Slonim AE, Skavin N, Hadjigeorgiou GL, Krawiecki N, Weissman BM, Tsao CY, Mendell JR, Shanske S, De Vivo DC, Hirano M, DiMauro S. Familial cerebellar ataxia with muscle Q10 deficiency. *Neurology* 2001, 56:849-855.

Nguyen KV, Ostergaard E, Ravn SH, Balslev T, Danielsen ER, Vardag A, McKiernan PJ, Gray G, Naviaux RK. POLG mutations in Alpers syndrome. *Neurology* 2005;65:1493-1495.

Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;238:689-692.

Nonaka I, Koga Y, Shikura K, Kobayashi M, Sugiyama N, Okino E, Nihei K, Tojo M, Segawa M. Muscle pathology in cytochrome C oxidase deficiency. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988;77:152-160.

Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2379.

Pagliarini DJ and Dixon JE. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends in Biochemical Sciences* 2006;31: 26-34.

Peterson PL, Martens ME, Lee CP. Mitochondrial encephalomyopathies. *Neurol Clin* 1988;6:529-544.

Petty RKH, Harding AE, Morgan-Hughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain* 1986;109:915-38.

Poulton J, Deadman ME, Gardier RM. Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. *Lancet* 1989;1:236-240.

Reichman H, Gold R, Meuers B, Naumann M, Seibel P, Walter U, Klopstock T. Progression of myopathy in Kearns-Sayre syndrome: a morphological follow-up study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1993;85(6):679-681.

Rivera H, Blázquez A, Carretero J, Álvarez-Cermeño JC, Campos Y, Cabello A, González-Vioque E, Borstein B, Garesse R, Arenas J, Martín MA. Mild ocular myopathy associated with a novel mutation in mitochondrial twinkle helicase. *Neuromusc Disord* 2007;17(9-11):677-80.

Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fisher A, Saudubray JM, Munnich A. Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* 1989;1:902-3.

Rubio González T y Verdercia Jarque M. Las enfermedades mitocondriales: un reto para las ciencias médicas. *Medisan* 8[1], 43-50. 2004.

Sato W, Tanaka M, Ohno K, Yamamoto T, Takada G, Ozawa T. Multiple populations of deleted mitochondrial DNA detected by a novel gene amplification method. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 162:664-672.

Sawyer DE and Van Houten B. Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat Res* 1999;434:161-76.

Scelsi R. Morphometric analysis of skeletal muscle fibers and capillaries in mitochondrial myopathies. *Pathol Res Pract* 1992;188(4-5):607-611.

Schapira AHV. Mitochondrial disease. *Lancet* 2006;368:70-82.

Schapira AHV, Morgan-Hughes JA, Cleeter MJW, et al. Molecular basis of mitochondrial myopathies: polypeptide analysis in complex-I deficiency. *Lancet* 1998;5:500-503.

Schooser BG, Pongratz D. Extraocular mitochondrial myopathies and their differential diagnoses. *Strabismus* 2006;14:107-113.

Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New Engl J Med* 2002; 347:576-580.

Servidei S. Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord* 2002, 12:524-529.

Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletions: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7952-7956.

Soga F, Ueno S, Yorifuji S. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Nippon Rinsho* 1993;51(9):2386-2390.

Solano A, Playán A, López-Pérez MJ y Montoya J. Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Pública Mex* 43[2], 151-160. 2001.

Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santero L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genet* 2001; 28:223-231.

Spinazzola A and Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene*. 2005;354:162-8.

Stadhouders AM, Jap PH, Winkler, Eppenberger HM, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a major constituent of pathological inclusions seen in mitochondrial myopathies. *Prod Natl Acad Sci USA* 1994;91(11):5089-5093.

Suomalainen A and Kaukonen J. Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability. *Am J Med Genet* 2001;106(1):53-61.

Takeda N. Cardiomyopathies and mitochondrial DNA mutations. *Mol Cell Biochem* 1997;176:287-290.

Tang Y, Schon EA, Wilichowski E, Vázquez-Memije ME, Davidson E, King MP. Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): a new insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression. *Mol Biol Cell* 2000;11:1471-1485.

Tanji K, Bonilla E. Optical imaging techniques (histochemical, immunohistochemical, and in situ hybridization staining methods) to visualize mitochondria. *Methods Cell Biol* 2001, 65:311-332.

Tengan CH, Moraes CT. Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR. *Biochem Mol Med* 1996, 58:130-134.

Tritschler HJ, Andreetta F, Moraes CT, et al. Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mitochondrial DNA. *Neurology* 1992; 42:209-17.

Tzoulis C, Engelsen BA, Telstad W, Aasly J, Zeviani M, Winterthum S, Ferrari G, Aarseth JH, Bindoff LA. The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study of 26 cases. *Brain* 2006;129(7):1685-1692.

Van Maldergem L, Trijbels F, DiMauro S, Sindelar PJ, Musumeci O, Janssen A, Delberqhe X, Martin JJ, Gillerot. Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Ann neurol* 2002; 52:750-754.

Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genet* 2001; 28:211-212.

Van Goethem G, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Progressive external ophthalmoplegia and multiple mitochondrial DNA deletions. *Acta Neurol Belg.* 2002;102(1):39-42.

Van Goethem G, Schwartz M, Lofgren A, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Vissing J. Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:547-549.

Van Hove JL, Cunningham V, Rice C, Ringel SP, Zhan Q, Chou PC, Truong CK, Wong LJ. Finding twinkle in the eyes of a 71-year-old lady: a case report and review of the genotypic and phenotypic spectrum of TWINKLE-related dominant disease. *Am J Genet A.* 2009;149A(5):861-7.

Verma A y Moraes CT. Trastorno mitocondriales. En: *Neurología clínica.* 4ª Ed. Walter G. Bradley 2006 Vol II. p.1821-33.

Vilarinho L, Santorelli FM, Cardoso ML, Coelho T, Guimaraes A, Countinho P. Mitochondrial DNA analysis in ocular myopathy. Observations in 29 Portuguese patients. *Eur Neurol* 1998; 39(3): 148-53.

Vogel H. Mitochondrial myopathies and the role of the pathologist in the molecular era. *J Neuropath Exp Neurol* 2001; 60:217-27.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988;242:1427-30.

Wallace DC. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: On the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene* 2005;354, 169-180.

Wong ET, Cobb C, Umehara MK, Wolff GA, Haywood LJ, Greenberg T, Shaw ST Jr. Heterogeneity of serum creatine kinase activity among racial and gender groups of the population. *Am J Clin Pathol* 1983;79:582-586.

Yamamoto M, Clemens PR, Engel AG. Mitochondrial DNA deletions in mitochondrial cytopathies: observations in 19 patients. *Neurology* 1991;41:1822-1828.

Yamashita S, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single large-scale mitochondrial DNA deletions. *J Hum Genet.* 2008; 53(7):598-606.

Zeviani M and Carelli V. Mitochondrial disorders. *Neuromuscular diseases. Current opinion in reumatology* 2007;20[5], 564-571.

Zeviani M, Bertagnolio B, Uziel G. Neurological presentations of mitochondrial diseases. *J Inher Metab Dis* 1996 ;19 :504-520.

Zeviani M, Bonilla E, De Vivo DC, Di Mauro S. Mitochondrial diseases. *Neurol Clin* 1989;7:123-156.

Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Pannacci M, Amati P, Moggio M, Servidei S, Scarlato G, DiDonato S. Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: a new autosomal dominant disease. *Am J Hum Genet* 1990;47:904-914.

Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004; 127: 2153-2172.

Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988;38:1339-1346.

Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 1989;339:309-311.

Zeviani M. OPA1 mutations and mitochondrial DNA damage: keeping the magic circle in shape. *Brain* 2008; 131: 314-317.

Zhang S, Tong AL, Zhang Y, Nie M, Li YX, Wang H. Heteroplasmy level of the mitochondrial tRNA Leu(UUR) A3243G mutation in a Chinese family is positively associated with earlier age-of-onset and increasing severity of diabetes. *Chin Med Sci J.* 2009;24(1):20-5.

Zhang XN and Qi M. Mitochondrion and its related disorders: Making a comeback. *Journal of Zhejiang University. Science B* 2008;9[2], 90-92.

Parte 7:

AGRADECIMIENTOS

Quisiera finalizar este trabajo expresando en unas líneas mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de manera desinteresada confiaron en mí y que, de algún modo u otro, me alentaron a la realización de este proyecto, ya que la orientación, consejos y estímulos que he recibido han supuesto un enriquecimiento para mi formación como profesional de la Medicina y como persona.

En primer lugar mi agradecimiento al Dr. Juan Bautista Lorite, director de esta tesis doctoral, por haberme adentrado en el mundo de la patología mitocondrial y haberme permitido trabajar junto a él, haciendo posible la realización de este trabajo. Sus conocimientos y experiencia me han aportado grandes valores para mi formación.

Agraceder al Profesor Dr. José Villar Ortiz el haberme permitido realizar la tesis bajo su tutela. Sus comentarios han contribuido de manera importante a mejorar la calidad y presentación de este documento.

Mis agradecimientos a Daniel José Moreno Fernández-Ayala por su colaboración en el procesamiento y análisis de las muestras en el laboratorio de la Universidad Pablo de Olavide. Sus conocimientos en el área de la Biología Celular han contribuido enormemente a la realización de este trabajo.

A Eloy Rivas Infante por los conocimientos que me ha transmitido sobre la lectura de la biopsia muscular durante mi periodo de formación. Gracias por tener siempre abiertas las puertas de tu despacho de Neuropatología.

A Antonio, mi marido, por su apoyo constante y sus consejos que tanto me han ayudado en la elaboración y confección de la tesis. Y *por estar siempre ahí*, gracias.

A mi madre, por confiar en mí y dotarme de los medios para que este proyecto se convirtiese en una realidad.