

MeB – Pagine Elettroniche

Volume VIII

Gennaio 2005

numero 1

IL PUNTO SU

Le malattie mitocondriali

Marco Carrozzi¹, Tania Gerarduzzi²¹Neuropsichiatria Infantile, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste²Clinica Pediatrica, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste

Indirizzo per corrispondenza: carrozzi@burlo.trieste.it

Mitochondrial diseases

Key words: Mitochondrial diseases, Respiratory chain, mtDNA, Oxidative phosphorylation, Pediatric neurology, Heteroplasmy, Leigh syndrome

Abstract Mitochondrial diseases (MD) due to respiratory chain defects represent one of the most frequent groups of pediatric neuromuscular disorders, with an estimated prevalence of 4.7/100,000 in children. This review discusses the multisystemic clinical presentation of MD, their genetic basis involving both mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA) mutations, diagnostic criteria adapted for the pediatric age, and current therapeutic strategies. The extreme phenotypic variability, determined by heteroplasmy, mitotic segregation, and threshold effect, poses significant diagnostic challenges. Six diagnostic criteria (clinical, histological, enzymatic, functional, laboratory, and molecular) are reviewed. Therapeutic options remain largely unsatisfactory, including antioxidants, dietary modifications, and cofactor supplementation, with very few controlled studies available.

LA MEDICINA MITOCONDRIALE. SEGNI E SINTOMI: QUANDO PENSARCI

Il caso clinico di Sindrome di Pearson atipica suggerisce una riflessione sulle malattie mitocondriali (MM) dovute a deficit della catena respiratoria e sulla loro variabilità fenotipica.

I mitocondri sono presenti in tutti i tessuti e il metabolismo ossidativo che essi controllano è indispensabile per il corretto funzionamento di ogni tessuto. All'interno dei mitocondri, sono presenti le tre vie biochimiche direttamente coinvolte nella produzione energetica: quella preposta all'utilizzazione dei combustibili glicidici (*glicogenolisi e glicolisi*), quella preposta all'utilizzazione dei combustibili lipidici (*attivazione e trasporto di acidi grassi all'interno del mitocondrio e beta-ossidazione*) e quella responsabile per la produzione finale di energia chimica in forma di ATP (*la catena respiratoria mitocondriale*). Alcuni tessuti sono particolarmente dipendenti dal metabolismo ossidativo perché hanno alte richieste energetiche (muscolo scheletrico, muscolo cardiaco, sistema nervoso centrale, retina, rene) e di conseguenza sono anche particolarmente vulnerabili a blocchi, anche parziali, della funzione mitocondriale. Ne consegue che oltre a quelle che coinvolgono il sistema nervoso centrale e periferico, numerose MM sono multisistemiche¹⁻³.

La lista di apparati ed organi coinvolti nelle MM è sempre più lunga (muscolo, occhio, sangue, cuore, sistema endocrino solo per citarne alcuni - *Tabella 1*) e quindi possiamo parlare di medicina mitocondriale, termine utilizzato per la prima volta nel 1962 da Rolf Luft dell'Università Karolinska di Stoccolma che descrisse la prima paziente con una chiara malattia mitocondriale.

Per quanto riguarda la clinica, i sintomi e segni possono essere inquadrati in alcune specifiche sindromi (p.es. S. di Pearson, S. di Leigh, Myoclonic epilepsy with ragged-red fibres - MERRF - ecc.) secondo una classificazione clinica (*Tabella 2*). Oppure è possibile raggruppare i sintomi/sindromi in base al tipo di modificazione del DNA mitocondriale e nucleare operando una classificazione genetica (*Tabelle 4 e 5*), tenendo presente che alcune mutazioni sono in comune con diverse sindromi.

Tessuto	Sintomi/segni
Sistema nervoso centrale	Epilessia, Atassia, Mioclono, Ritardo/Regressione psicomotorio, Ritardo mentale, Emiparesi/Emianopsia, Cecità corticale, Cefalea migraine-like, Distonia
Sistema nervoso periferico	Neuropatia periferica
Muscolo	Debolezza/esauribilità/intolleranza all'esercizio/crampi, Rabdomiolisi, Oftalmoplegia, Ptosi
Occhio	Retinopatia pigmentaria, Atrofia ottica, Cataratte
Sangue	Anemia sideroblastica
Sistema endocrino	Diabete mellito, Bassa statura, Ipoparatiroidismo
Cuore	Blocco di conduzione, Cardiomiopatia ipertrofica, Sindrome del cuore non compatto

Apparato gastroenterico	Disfunzione del pancreas esocrino, Pseudo ostruzione intestinale
Fegato	Epatopatia
Orecchio	Ipoacusia/sordità su base sensoriale
Rene	Sindrome di Fanconi
Aspetti clinici connessi all'età evolutiva	Abortività connessa a povertà di movimenti fetali, morte in epoca neonatale, ritardo di accrescimento severo, ipotonia/ipertonìa neonatale, encefalopatia intermittente/remittente
Ereditarietà	mtDNA: Materna, Sporadica ndNA: Autosomica dominante/recessiva, X linked
Reperti di laboratorio	Acidosi lattica, iperalaninemia

Malattia/Sindrome	Sintomi principali	Altri segni clinici
Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)	Oftalmoplegia esterna, Ptosi bilaterale	Miopatia prossimale lieve
Kearns-Sayre syndrome (KSS)	PEO prima dei 20 anni; Retinopatia pigmentaria; Inoltre: proteinorachia > 1 gr/l, atassia cerebellare, blocco cardiaco	Sordità bilaterale, Miopatia, Disfagia, Diabete mellito, Ipoparatiroidismo, Demenza
Pearson syndrome	Anemia sideroblastica, Pancitopenia, Deficit del pancreas esocrino	Difetto renale tubulare
Infantile myopathy and lactic acidosis (fatal and non-fatal forms)	Ipotonia del 1° anno di vita; Difficoltà di alimentazione e respirazione	La forma fatale può essere associata a cardiomiopatia e/o sindrome di Toni-Fanconi-Debré
Leigh syndrome (LS)	Encefalopatia subacuta remittente; Segni di disfunzione cerebellare e del tronco dell'encefalo; Esordio in età infantile	Iperintensità dei nuclei della base; Storia materna di malattia neurologica o s. di Leigh
Neurogenic weakness with ataxia and retinitis pigmentosa (NARP)	Neuropatia ad esordio in adolescenza o età adulta; Atassia; Retinopatia pigmentaria	Iperintensità dei nuclei della base; Elettroretinogramma anormale; Neuropatia senso-motoria
Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)	Episodi stroke-like prima dei 40 anni; Epilessia/Demenza; Fibre ragged-red e/o acidosi lattica	Diabete mellito, Cardiomiopatia (inizialmente ipertrofica; poi dilatativa), Sordità bilaterale, Retinopatia pigmentaria, Atassia cerebellare
Myoclonic epilepsy with ragged-red fibers (MERRF)	Mioclonie, Epilessia, Atassia cerebellare, Miopatia	Atrofia ottica, Sordità bilaterale, Neuropatia periferica, Spasticità, Lipomi multipli
Leber hereditary optic neuropathy (LHON)	Deficit visivo bilaterale senza dolore; Rapporto maschi:femmine ~4:1; Età media di insorgenza 24 anni	Distonia; Sindrome di pre-eccitazione ventricolare

QUANTO SONO FREQUENTI

Alcuni recenti studi di prevalenza mostrano che le mitocondriopatie in età evolutiva colpiscono 4.7/100.000 abitanti^{4,5} (~11.5/100.000 per la popolazione totale) ma il dato è probabilmente sottostimato (*Tabella 3*). L'estrema variabilità dell'espressione delle MM giustifica un certo grado di sotto-diagnosi e solo la continua scoperta di nuove mutazioni sta mettendo in evidenza come le MM siano più comuni di quanto era stato stimato in passato.

Le patologie correlate alla fosforilazione ossidativa e alle vie produttrici di energia sono considerate ormai le cause più frequenti di patologia neuromuscolare pediatrica (seguono a ruota le malattie di accumulo lisosomiale considerate nella loro globalità e la distrofia muscolare di Duchenne⁵), seppur spesso si manifestino appunto anche con sintomi non solo neuromuscolari.

La Cochrane ha in corso due protocolli di revisione sulle evidenze terapeutiche in merito alle MM che riportano una stima di prevalenza delle stesse pari a 1 caso ogni 8.000 riferito alla popolazione generale^{6,7}.

Popolazione in studio	Mutazione o malattia	Prevalenza malattia/100.000 (95% C.I.)
Northern England Point prevalence, August 1997; population size = 2,122,290 [Chinnery et al 2000]	Tutte le delezioni del mtDNA	1.33 (0.76-1.89)
Tutte le mutazioni puntiformi del mtDNA	5.24 (4.12-6.37)	
G11778A & G3460A (LHON)*	3.29 (2.39-4.18)	
A3243G*	0.95 (0.47-1.43)	
A8344G*	0.25 (0.01-0.5)	
Tutte le mutazioni del mtDNA	6.57 (5.30-7.83)	
Northern Finland Adult point prevalence; population size = 245,201	A3243G*	5.71 (4.53-6.89)
Western Sweden; children <16 = 385,616	Encefalomiopatie dell'età evolutiva	4.7 (2.8-7.6)
Victoria, Australia; birth prevalence: 1,710,000 births	Malattia della catena respiratoria in età evolutiva	4.7 (3.2-5.0)
Summary	Bambini ed adulti con malattia mitocondriale	~11.5

* indica la posizione della base mutata ed il tipo di cambio: G11778A significa che nella posizione 11778 la Guanina viene sostituita da Adenina

LA GENETICA DELLE MITOCONDRIOPATIE

Gli apparati mitocondriali sono regolati da due genomi: uno autonomo (un piccolo DNA circolare - mtDNA - composto da 37 geni: 2 per rRNA o RNA ribosomiali, 22 per il tRNA o RNA transfer, 13 per le subunità della catena respiratoria) e l'altro nucleare (nDNA, che oltre a codificare per le restanti subunità della catena respiratoria, "controlla" anche il mantenimento qualitativo e quantitativo dei mitocondri e quindi del mtDNA)⁸. Le alterazioni del mtDNA (*Tabella 4*) possono colpire direttamente le proteine strutturali della catena respiratoria, oppure interferire con i meccanismi della sintesi proteica mitocondriale coinvolgendo i tRNA o gli rRNA². Le mutazioni del nDNA (*Tabella 5*) si possono classificare in base alle strutture codificate dai geni coinvolti: componenti strutturali, fattori di assemblaggio delle subunità della catena respiratoria, fattori che garantiscono la stabilità mitocondriale, e fattori coinvolti nella biogenesi dei mitocondri^{2,3}.

L'mtDNA si trasmette secondo un'ereditarietà materna, l'nDNA sempre secondo ereditarietà mendeliana.

La presentazione/espressività clinica della MM è forse l'aspetto che merita più attenzione; infatti per diversi meccanismi correlati alla modalità di trasmissione di questi due

genomi, gravità, età di insorgenza etc. sono molto variabili. Le "regole" delle malattie da difetto del mtDNA sono principalmente quattro:

- Ereditarietà materna: solo pochi mitocondri sono contenuti nello spermatozoo e quindi le caratteristiche codificate dal mtDNA vengono trasmesse dalla madre ai figli, sia maschi che femmine, ma saranno poi sempre solo le femmine a continuare a trasmettere l'eventuale mutazione.
- Eteroplasmia: ogni mitocondrio contiene dalle 2 alle 10 molecole di mtDNA che mutano rapidamente e può accadere che nello stesso mitocondrio coesistano molecole sane cioè "wild type" e molecole mutate.
- Segregazione mitotica: quando una cellula eteroplasmica si divide la % di genomi mutati può cambiare nelle cellule figlie e quindi nel tempo può variare l'espressione fenotipica della malattia.
- Effetto soglia: le copie di mtDNA mutate e quindi il numero di mitocondri "inefficienti" si accumulano e si mescolano a mitocondri "normali", quindi l'effetto soglia si riferisce alla quantità critica di DNA mutato necessario a causare un deficit energetico tanto grave da provocare la sintomatologia clinica³.

In generale, e quindi contemplando alcune eccezioni, le malattie dovute a mutazioni del nDNA esordiscono precocemente in età infantile, mentre quelle dovute a mutazioni del mtDNA si presentano in tarda infanzia o nella vita adulta³.

Quadro clinico	Tipo di gene	Mutazione del mtDNA
Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), Kearns-Sayre syndrome, Pearson syndrome, Diabetes and deafness		Riarrangiamento (delezione/duplicazione)
LHON	Proteine catena respiratoria	G11778A, T14484C, G3460A
NARP/Leigh syndrome	Proteine catena respiratoria	T8993G/C
Exercise intolerance and myoglobinuria	Proteine catena respiratoria	Mutazione del citocromo b
MELAS	tRNA	A3243G, T3271C, A3251G
MERRF	tRNA	A8344G, T8356C
CPEO	tRNA	A3243G, T4274C
Myopathy	tRNA	T14709C, A12320G
Encephalomyopathy	tRNA	G1606A, T10010C
Cardiomyopathy	tRNA	A3243G, A4269G
Diabetes and deafness	tRNA	A3243G, C12258A
Nonsyndromic sensorineural deafness	tRNA	A7445G
Aminoglycoside-induced nonsyndromic deafness	tRNA	A1555G

Categoria	Quadri clinici
Mutazioni di geni che codificano per proteine strutturali	Leigh syndrome (coinvolti 5 diversi geni nucleari), Cardio-encephalomyopathy, Atypical Leigh syndrome, Leukodystrophy/myoclonus, Phaeochromocytoma, Cervical paraganglioma/Hereditary paraganglioma, Ataxia/myopathy/seizures
Mutazioni di geni che codificano per fattori di assemblaggio	Leigh syndrome (2 geni), Ketoacidotic coma/hepatopathy, Infantile cardiomyopathy, Tubulopathy/leucodystrophy, Hypertrophic cardiomyopathy, Tubulopathy, Encephalopathy, Liver failure, GRACILE syndrome*
Mutazioni di geni responsabili della stabilità del mtDNA	adCPEO (3 geni)**, arCPEO°/Alpers Syndrome, MN-GIE°, MDS^ forma epato-cerebrale, MDS^ forma miopatica, Congenital microcephaly of Amish
Mutazioni di geni coinvolti nella biogenesi dei mitocondri	X-linked deafness-dystonia, X-linked ataxia/sideroblastic anemia, Friedreich's ataxia, Hereditary spastic paraplegia, Autosomal dominant optic atrophy, Barth syndrome

GRACILE:** Growth Retardation, Aminoaciduria, Cholestasis, Iron overload, Lactacidosis, Early death *adCPEO:** autosomal dominant Chronic External Ophthalmoplegia °**arCPEO:** autosomal recessive Chronic External Ophthalmoplegia °°**MNGIE:** Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalomyopathy ^**MDS:** Mitochondrial DNA Depletion Syndrome

LA DIAGNOSI: A CHE PUNTO SIAMO

Per quanto riguarda la diagnosi, in età evolutiva, pur in presenza di un quadro clinico sospetto, non sempre è possibile documentare mutazioni del DNA. In un recente lavoro in cui si sono analizzati 113 pazienti con diagnosi certa di malattia mitocondriale⁹, si è quindi tentato di adattare le classificazioni messe a punto per l'adulto^{10,11} all'età pediatrica e che prevedono in particolare sei criteri:

- Clinico: prende in considerazione i sintomi multiorgano che possono derivare dal deficit mitocondriale.

- Istologico: presenza di reperti tipici alla biopsia muscolare come le cosiddette "Ragged Red Fibres" – ovvero fibre negative per la COX.
- Enzimatico: valutazione biochimica degli enzimi della catena respiratoria.
- Funzionale: produzione di ATP dai fibroblasti.
- Laboratoristico: presenza di reperti evocatori di deficit della funzione metabolica (iperlattacidemia).
- Molecolare: presenza di mutazioni del mtDNA o nDNA.

Questi criteri diagnostici vengono divisi in maggiori e minori. Sicuramente un aspetto aggiuntivo estremamente importante è il ricorso alle tecniche di imaging ed in particolare alla neuroradiologia, che in alcuni casi in cui è coinvolto il SNC è quasi patognomonica (come i reperti di RMN nella s. di Leigh). Al momento non vi è un "gold standard" per stabilire la diagnosi di encefalomiopatia mitocondriale.

Un dato importante invece è che il fattore discriminante rispetto alla prognosi quoad vitam è la presenza o meno di **cardiomiopatia**⁹.

Da un punto di vista pratico, sarà il criterio clinico a far nasce-

re il sospetto di MM (*valorizzare quindi l'associazione di più sintomi ma soprattutto ricostruire in maniera precisa l'ereditarietà che, nel caso delle malattie da mutazioni del mtDNA, è fortemente evocatrice*) e verranno inizialmente avviati una serie di atti diagnostici che possono essere compiuti in strutture non specialistiche che coinvolgono laboratorio (*iperlatta-*

cidemia su sangue e liquor, iperalaninemia...) e neuroradiologia (se vi è coinvolgimento del sistema nervoso centrale). Successivamente è possibile rivolgersi ad un ambiente più specialistico per proseguire gli accertamenti (*biopsia muscolare, saggi enzimatici, analisi genetica su mtDNA e nDNA*). (Tabella 6)

Ambito diagnostico	Descrizione
Clinica	“Cast a wide net”; si devono considerare non solo i sintomi tipici ma anche tutti i segni e i sintomi già elencati. Isolati o in combinazioni varie devono far venire il sospetto di una malattia mitocondriale.
Ereditarietà	Verificare la presenza di ereditarietà materna che può non essere chiara vista l'eteroplasmia e l'effetto soglia. Indagare la presenza di “soft signs” nei parenti materni (bassa statura, sordità, emicrania...). Attenzione però perché alcune malattie mitocondriali sono trasmesse con ereditarietà mendeliana ed altre sono sporadiche.
Esami di laboratorio	I livelli ematici del lattato e del piruvato (meglio se da sangue arterioso) nei bambini malati, di solito sono elevati. Un rapporto lattato/piruvato alto suggerisce un blocco a livello della catena respiratoria; un rapporto normale (< 20) indica che il blocco è a valle. L'acido lattico e piruvico nei bambini con encefalopatia può essere elevato solo nel liquor. In caso di deficit della catena respiratoria vi può essere associata un'elevazione dell'alanina. Un valore di acido lattico normale non esclude una malattia mitocondriale.
Neuroradiologia	Iperintensità di segnale nei nuclei della base sono tipici della S. di Leigh. Lesioni ischemiche nelle regioni posteriori dell'encefalo sono tipiche della MELAS; lesioni della sostanza bianca della capsula interna sono presenti nella sindrome KSS; tipiche di entrambi sono le calcificazioni dei nuclei della base.
Biopsia muscolare	La presenza di RRF* sono tipiche delle malattie mitocondriali (di solito mutazioni dei tRNA). Fibre COX negative sparpagliate (con e senza RRF) suggeriscono mutazioni del mtDNA. L'assenza di RRF però non esclude una malattia mitocondriale. *RRF: ragged red fibers.
Biochimica	L'attività della catena respiratoria può essere valutata sui fibroblasti e su cellule muscolari. Ove possibile è meglio studiare il muscolo perché: (1) l'attività ossidativa degli enzimi è più alta; (2) alcuni difetti enzimatici sono espressi nel muscolo ma non nei fibroblasti. Lo studio biochimico può rivelare specifici difetti enzimatici; in particolare difetti combinati di subunità codificate dal mtDNA suggeriscono la presenza di una sua mutazione.
Genetica molecolare	Quando gli elementi sopra indicati suggeriscono una mutazione del mtDNA è necessario ricercarla con l'analisi genetica molecolare. Per quanto riguarda il tessuto da studiare, le mutazioni (puntiformi o delezioni) responsabili di alcune sindromi sono evidenti su sangue, altre solo su muscolo, altre su entrambe o su altri tessuti.

Ricordiamo infine che i bambini con MM hanno diritto alla certificazione per malattia rara (Tabella 7), anche se non tutte

le MM sono codificate.

Malattia	Esenzione	ICD9	ICD9-CM	ICD10	MIM
Malattia di Leigh	RF0030	330.8	330.8	G31.8	#256000
Sindrome MELAS	RN0710		277.9		
Sindrome MERRF	RN0720		277.9		
Atrofia ottica di Leber (LHON)	RF0300	377.1	377.16	H47.2	#535000
Sindrome di Kearns-Sayre (KSS)	RF0020		759.89		
MNGIE	RFG080	359.1	359.1	G71.0	*277320
Sindrome di Pearson	RN1600		277.9		#557000

TERAPIA E PROSPETTIVE FUTURE

Riassumendo:

- Le MM sono probabilmente sottostimate (forse anche per

un limite tecnologico dei “protocolli di diagnosi mutazionale”), nello stesso tempo però alcuni difetti della catena respiratoria sono secondari e non primitivi.

- In età pediatrica le presentazioni possono essere sistemiche precoci ed atipiche (epatopatia, pancitopenia, ma-

- lassorbimento, atrofia dei villi, pseudo-ostruzione, tubulopatia prossimale, cardiomiopatia, endocrinopatia multipla), ovvero aspecifiche (ritardo psicomotorio, convulsioni, regressione, ipo-ipertonica).
- Può esistere una variabilità fenotipica, anche in presenza di una mutazione del nDNA e quindi le mitocondriopatie non rientrano nel modello di “un gene una malattia”.

Da un punto di vista terapeutico, gli interventi finora applicabili sono largamente insoddisfacenti e cadono in tre gruppi: agenti farmacologici e nutrizionali, modifiche della composizione dietetica (dieta chetogenica), terapia fisica. Le sostanze somministrate a pazienti affetti da MM includono: antiossidanti (coenzima Q10, vitamina C, vitamina E e menadiolo), agenti rivolti al controllo dell'acidosi lattica (dicloroacetato), agenti che correggono deficienze biochimiche secondarie (carnitina, creatina), cofattori della catena respiratoria che possano “spingere” l'attività dei mitocondri intatti (nicotinamide, tiamina, riboflavina, succinato e co-enzima Q10) e ormoni (ormone della crescita, corticosteroidi).

Sono pochissimi gli studi controllati e tutti chiaramente con un numero molto piccolo di pazienti arruolati, peraltro ricordiamo che sono in corso due metanalisi della Cochrane^{6,7}. Le difficoltà di valutare l'efficacia degli interventi è chiaramente correlata all'incredibile variabilità clinica di ciascuna patologia oltre alla rarità di ciascuna sindrome presa singolarmente.

Le domande sarebbero ancora tante ma quanto brevemente riportato dà la misura di come la ricerca nel campo della medicina mitocondriale sia un terreno ricco di prospettive soprattutto per quanto riguarda i processi fisiopatologici con la speranza di poter individuare eventuali approcci terapeutici efficaci, al momento purtroppo non disponibili.

Bibliografia

- Johns DR. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 1995;333:638-44.
- Di Mauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain disease. *N Engl J Med* 2003;348:2656-68.
- Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004;127:2153-72.
- Chinnery PF, Turnbull DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Gen* 2001;106:94-101.
- Thornburn DR. Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *J Inher Metab Dis* 2004;27:349-362.
- Chinnery P, Majamaa K, Thornburn D, Turnbull D. Treatment for mitochondrial encephalopathies. *The Cochrane Database of Systemic Reviews* vol.4, 2004.
- Chinnery P, Majamaa K, Thornburn D, Turnbull D. Treatment for mitochondrial myopathy. *The Cochrane Database of Systemic Reviews* vol.4, 2004.
- Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today* 2000;6:425-432.
- Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, et al. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 2004;114:925-31.
- Walker UA, Collins S, Byrne E. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur Neurol* 1996;36:260-7.
- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, et al. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002;59:1406-11.