



ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT

Alba Valiente Pallejà

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

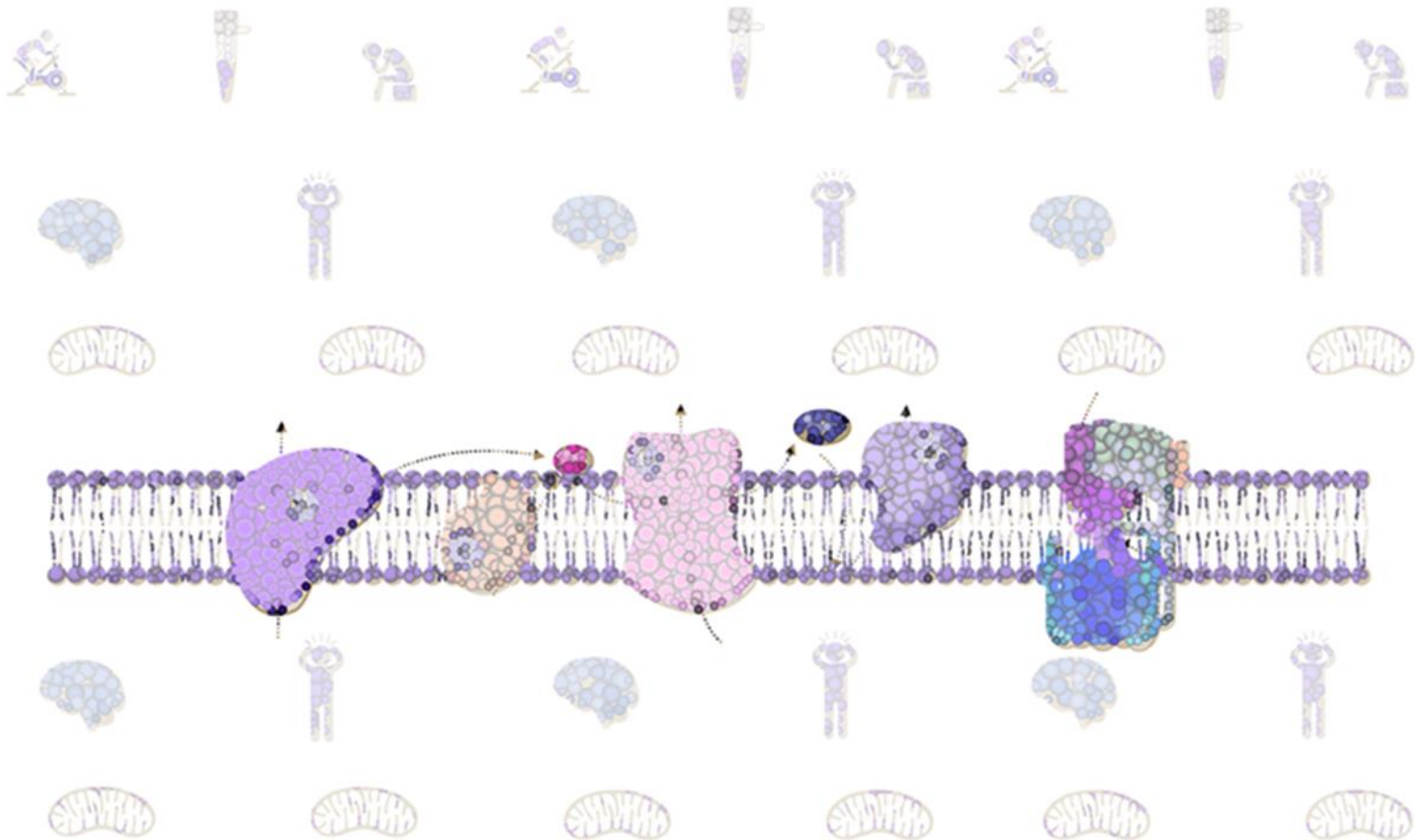
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Anàlisi de la funció mitocondrial en Trastorns del Neurodesenvolupament

ALBA VALIENTE PALLEJÀ



TESI DOCTORAL
2020

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

Alba Valiente Pallejà

ANÀLISI DE LA FUNCIO MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT

TESI DOCTORAL

dirigida per la Dra. Lourdes Martorell Bonet

i la Dra. Yolanda Alonso Pérez

Departament de Medicina i Cirurgia

Universitat Rovira i Virgili

Reus

2020



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI





UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Departament de Medicina i Cirurgia
Unitat de Psiquiatria i Psicologia Mèdica
C/ Sant Llorenç, 21
43201 Reus
Tel: 977 759 345

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "Anàlisi de la funció mitocondrial en trastorns del neurodesenvolupament", que presenta l'Alba Valiente Pallejà, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d'aquesta Universitat i compleix tots els requeriments necessaris per a l'obtenció del títol de Doctora.

Reus, 25 d'octubre de 2020.

Les directores de la tesi doctoral:

Dra. Lourdes Martorell Bonet

Dra. Yolanda Alonso Pérez

Agraïments

A la meva tutora, la Lourdes, per acompanyar-me a través d'aquest aprenentatge. Per ensenyar-me a tenir ull crític, a ser rigorosa i a posar una mica d'ordre al meu caos. També per fer-me partícip dels seus valors i conviccions fermes, per les empentes en moments de pujada i pels somriures en els de boira.

A l'Hospital Universitari Institut Pere Mata i a tot el grup de recerca per donar-me suport. A l'Elisabet per ser al capdavant. A la Yolanda per la codirecció. A la Nerea i a la Irene, pels moments compartits. I al Gerard, per parlar clar i català.

A totes les companyes i companys del CSMA Reus; per deixar-me formar part d'aquest equipàs i fer-me sentir com a casa. Pel suport constant i per les paraules d'ànim.

A les persones que visito i/o que han participat i participen en els estudis del nostre grup de recerca, esperant millorar d'alguna manera el seu dia a dia.

A totes les dones valentes de la meva vida. En especial a la meva mare per ensenyar-me a estimar i a viure. A la Laura, la Cris i les Laies per ser-hi sempre i a totes. I sobretot, a la més valenta de totes: la meva àvia.

També a tots els homes que ens acompanyen en el camí. Al meu pare per fer dels meus somnis els seus. Per ensenyar-me el valor de l'esforç i la perseverança. Al Josep, el meu germà, perquè no hi ha millor paraula per definir-te. I per últim i no menys important; al Jordi, el meu company de vida, de lluita i de viatge(s). Per les llargues converses de ciència i de vida; per agafar-me fort de la mà en els millors moments però també en els pitjors. I sobretot, pel que ens queda per descobrir i per viure plegats.

Seguim, seguirem!

***“El futur del planeta depèn de la possibilitat de donar
a totes les dones l'accés a la instrucció i al lideratge.”***

Rita Levi-Montalcini
Neuròloga (1909 - 2012)
Premi Nobel de Fisiologia i Medicina 1986

***“La vida és una unió simbiòtica i cooperativa
que permet triomfar als que s'associen.”***

Lynn Margulis
Biòloga (1938 - 2011)
Mare de la teoria endosimbiòtica sobre l'origen dels mitocondris

ÍNDIX

I. JUSTIFICACIÓ	1
II. ABREVIATURES	3
III. INTRODUCCIÓ	8
1. Trastorns del neurodesenvolupament (TN).....	8
1.1. Trastorn de l'Espectre Autista (TEA)	13
1.2. Discapacitat Intel·lectual (DI)	21
1.3. Esquizofrènia (ESQ)	28
2. Mitochondri.....	36
2.1. Qüestions generals	36
2.2. Origen.....	36
2.3. Estructura	36
2.4. Genètica mitocondrial	38
2.5. Funcions del mitocondri	45
2.6. Metabolisme mitocondrial	48
3. Malalties mitocondrials.....	53
3.1. Epidemiologia.....	53
3.2. Característiques clíniques	53
3.3. Característiques psiquiàtriques	56
3.4. Mutacions.....	57
3.5. Diagnòstic	58
3.6. Tractament i pronòstic	62
3.7. Malalties mitocondrials més rellevants	66
3.8. Altres malalties amb disfunció mitocondrial	69

4. Mitochondri i TN.....	74
4.1. Mitochondri i TEA	75
4.2. Mitochondri i DI	77
4.3. Mitochondri i ESQ	78
IV. HIPÒTESI.....	80
V. OBJECTIUS.....	81
VI. RESULTATS I TREBALLS PUBLICATS.....	82
❖ Publicació 1: <i>“Genetic and clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability”</i>	82
❖ Publicació 2: <i>“Increased blood lactate levels during exercise and mitochondrial DNA alterations converge on mitochondrial dysfunction in schizophrenia”</i>	95
❖ Publicació 3: <i>“High frequency of clinical conditions commonly associated with mitochondrial disorders in schizophrenia”</i>	111
❖ Publicació 4: <i>“Mitochondrial dysfunction in a family with psychosis and chronic fatigue syndrome”</i>	117
VII. DISCUSSIÓ	128
VIII. CONCLUSIONS.....	149
IX. PERSPECTIVES DE FUTUR.....	149
X. BIBLIOGRAFIA	151

ÍNDIX DE FIGURES

1. Mecanismes i vies per les que el distrès matern afecta el fetus i el nen incrementant així el risc de psicopatologia	9
2. Proposta d'alteracions bioenergètiques i metabòliques en l'etiopatogènia dels trastorns psiquiàtrics	11
3. Curs de l'ESQ al llarg de la vida	29
4. Parts del mitocondri	37
5. Esquema de l'ADNmt	38
6. Exemples de transmissió d'ADNmt heteroplàsmica de la mare a la seva descendència	41
7. Distribució de l'ADNmt al món durant l'evolució de l'espècie humana	42
8. Alteracions genètiques que porten a disfunció mitocondrial	43
9. Esquema de la cadena respiratòria mitocondrial (CRM) i l'ATP sintasa	46
10. Interacció de l'exposició a l'estrès i les alteracions mitocondrials a través dels sistemes inflamatori i endocrí i conseqüències en població vulnerable	47
11. Metabolisme del lactat en la cèl·lula.....	49
12. Acoblament bioenergètic fisiològic neuronal	51
13. Signes i símptomes de malaltia mitocondrial.....	55
14. Algoritme diagnòstic per les malalties mitocondrials	62
15. Compostos en desenvolupament, farmacèutics i nutricèutics, per millorar diversos aspectes de la funció mitocondrial de les principals vies afectades en la disfunció mitocondrial	63
16. Visió general de nous enfocaments terapèutics per al tractament de trastorns mitocondrials	65
17. Aspectes més rellevants de disfunció mitocondrial en TEA	76
18. Alteració de complexes de la CRM en alguns TN	78
19. Síntesi dels mecanismes de disfunció mitocondrial que duu a canvis neuroprogressius o de neuroprotecció en ESQ	79
20. Variants identificades en TEA+DI al nostre estudi	83
21. Variants identificades en DI al nostre estudi	83
22. Variants identificades en ESQ al nostre estudi	96
23. Variants identificades en ESQ+Síndrome de Fatiga Crònica (SFC) al nostre estudi	118

ÍNDIX DE TAULES

1. Criteris diagnòstics segons el DSM-5 pels TN	10
2. Criteris diagnòstics segons el DSM-5 pel TEA	16
3. Criteris diagnòstics segons el DSM-5 per la DI	21
4. Fases de l'ESQ	28
5. Criteris diagnòstics segons el DSM-5 per ESQ	33
6. Número de subunitats codificades per ADNmt i ADNn en els complexos de la CRM	39
7. Complexos de la CRM	46
8. Signes i símptomes de les malalties mitocondrials	54
9. Característiques sospitoses de malaltia mitocondrial (<i>RED FLAGS</i>)	56
10. Diagnòstic de les malalties mitocondrials	59
11. Mol·lècules que s'utilitzen en el tractament de malalties mitocondrials	64
12. Criteris Internacionals de Fukuda per al diagnòstic de SFC	71

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

I. JUSTIFICACIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

I. JUSTIFICACIÓ

En aquesta última dècada s'ha produït un progrés exponencial en el coneixement de la base genètica dels trastorns psiquiàtrics. S'han identificat diferents variants genètiques localitzades en l'ADN nuclear que augmenten de forma significativa el risc de patir trastorns tan greus i prevalents com poden ser els trastorns de l'espectre autista, la discapacitat intel·lectual i l'esquizofrènia.

Aquesta tesi doctoral ha posat el focus en un altre genoma molt menys estudiat fins ara: l'ADN mitocondrial (ADNmt), una petita molècula de "només" 16.569 parelles de bases que, en funció de la cèl·lula, pot tenir-ne fins a centenars o milers de còpies. El mitocondri té un paper crucial en la vida ja que és l'òrganul que s'ocupa de produir, mitjançant la cadena respiratòria mitocondrial (CRM), la major part de l'energia que les cèl·lules de l'organisme requereixen. L'ADNmt codifica per 13 subunitats proteiques d'aquesta cadena, a més d'RNA ribosomals i de transferència que participen en la seva síntesi, que són essencials per al seu adequat funcionament, i és per aquest motiu que alteracions genètiques en aquesta molècula repercuteixen en la generació d'energia. Degut a l'alt requeriment energètic que precisen les cèl·lules del teixit cerebral, que juntament amb les musculars, són les que tenen un nombre més elevat de mitocondris i, per tant, un nombre més elevat de molècules d'ADNmt. Es coneixen determinades alteracions genètiques en aquest genoma que produeixen alteracions en aquests i altres teixits ocasionant el que es coneix com malalties mitocondrials.

L'ADNmt només s'hereta per via materna. El nostre grup d'investigació va observar en alguns arbres genealògics del nostre entorn un patró d'herència aparentment materna en famílies amb dos o més membres amb diagnòstic d'esquizofrènia. És, precisament, després d'aquesta observació d'on va néixer l'interès al nostre grup per estudiar la genètica mitocondrial en els trastorns mentals. Actualment la disfunció mitocondrial s'associa a una gran varietat de característiques físiques i metabòliques i, també, a determinats símptomes psiquiàtrics com la psicosi o la depressió.

Aquest treball de tesi doctoral es centra en l'estudi de la disfunció mitocondrial en el trastorn de l'espectre autista, la discapacitat intel·lectual i l'esquizofrènia. L'objectiu és conèixer si, a partir d'estudis clínics, genètics i metabòlics, determinades alteracions mitocondrials poden tenir un paper rellevant en el seu desenvolupament

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

II. ABREVIATURES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

II. ABREVIATURES

A

ADI-R: *Autism Diagnostic Interview-Revised*; entrevista pel diagnòstic de l'autisme revisada.

ADNmt: ADN mitocondrial.

ADOS-2: *Autism Diagnostic Observation Schedule-2*; escala d'observació per al diagnòstic de l'autisme- 2.

ARID1B: *AT-rich interaction domain 1B*.*

ARN: àcid ribonucleic.

ARNr: ARN ribosòmic.

ADN: àcid desoxiribonucleic.

ADNc: ADN complementari.

ADNn: ADN nuclear.

ADP: adenosina difosfat.

ANKRD11: *ankyrin repeat domain 11*.*

ARNm: ARN missatger.

ARNt: ARN de transferència.

ATP: adenosina trifosfat.

B

RBF: *Ragged-Blue Fibres*; fibres blaves esquinçades.

C

C1: complex I; NADH deshidrogenasa.

CIII: complex III; coenzim Q: citocrom C reductasa.

CV: complex V; ATP sintasa.

CCAMMs: Condicions Clíniques Associades a Malalties Mitocondrials.

CK: creatina cinasa.

CNTNAP2: *contactin associated protein 2*.*

CPEO: *Chronic Progressive External Ophthalmoplegia*; oftalmoplegia externa progressiva crònica.

CII: complex II; succinat deshidrogenasa.

CIV: complex IV; citocrom c oxidasa.

CARS: *Childhood Autism Rating Scale*; escala de valoració de l'autisme infantil.

CNV: *Copy Number Variant*; variant de número de còpia.

CoA: coenzim A.

CRM: cadena respiratòria mitocondrial.

CTNNB1: *catenin beta 1*.*

CI: coeficient intel·lectual.

D

DAOA: *D-amino acid oxidase activator.**

DISC1: *DISC1 scaffold protein.**

DRD2: *dopamine receptor D2.**

DYRK1A: *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A.**

DI: discapacitat intel·lectual.

D-loop: *displacement loop;* bucle de desplaçament.

DSM: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders;* manual diagnòstic i estadístic dels trastorns mentals.

E

ECG: electrocardiograma.

EEG: electroencefalograma.

ESQ: esquizofrènia.

F

FADH₂: dinucleotid de flavina-adenina.

FMR1: *FMRP translational regulator 1.**

G

GABA: àcid gamma-aminobutíric.

GRIA1: *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1.**

GRM3: *glutamate metabotropic receptor 3.**

GI: gastrointestinal.

GRIN2A: *glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A.**

GWAS: *Genome-Wide Association Study;* estudi d'associació de genoma complet.

H

HDL3: *high-density lipoprotein subfraction 3;* lipoproteïna d'alta densitat, subfracció 3.

I

ICD: *International Classification of Diseases;* classificació internacional de malalties.

IL6: Interleucina-6.

IMC: índex de massa corporal

K

KCNQ2: *potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2.**

L

LCR: líquid cefalorraquidi.

LHON: *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*;
neuropatia òptica hereditària de Leber.

LES: lupus eritematós sistèmic.

LOF: *Loss-of-function*; pèrdua de funció.

M

MECP2: *methyl-CpG binding protein 2*.*

MELAS: *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes*; encefalopatia mitocondrial amb acidosi làctica i ictus.

MET: *MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*.*

MRT: *Mitochondrial Replacement Therapy*; teràpia de reemplaçament mitocondrial.

MT-ATP6: *mitochondrially encoded ATP synthase 6*.*

MT-ND1: *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1*.*

MT-ND3: *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3*.*

MT-ND4L: *mitochondrially encoded NADH 4L dehydrogenase*.*

MT-ND6: *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6*.*

MT-RNR2: *mitochondrially encoded 16S RNA*.*

MT-TE: *mitochondrially encoded tRNA glutamic acid*.*

MT-TH: *mitochondrially encoded tRNA histidine*.*

MT-TM: *mitochondrially encoded tRNA methionine*.*

MT-TT: *mitochondrially encoded tRNA Threonine*.*

MED13L: *mediator complex subunit 13L*.*

MERRF: *Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres*; encefalopatia mioclònica amb fibres vermelles esquinçades.

MNGIE: *Mitochondrial Neuro Gastrointestinal Encephalopathy*; encefalomiopatia neuro gastrointestinal mitocondrial.

MT-7S: *mitochondrially encoded 7S DNA*; regió 7S de l'ADNmt.

MT-CYB: *mitochondrially encoded cytochrome b*.*

MT-ND2: *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2*.*

MT-ND4: *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4*.*

MT-ND5: *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5*.*

MT-RNR1: *mitochondrially encoded 12S RNA*.*

MT-TA: *mitochondrially encoded tRNA alanine*.*

MT-TG: *mitochondrially encoded tRNA glycine*.*

MT-TI: *mitochondrially encoded tRNA isoleucine*.*

MT-TL1: *mitochondrially encoded tRNA leucine 1 (UUA/G)*.*

MT-TQ: *mitochondrially encoded tRNA glutamine*.*

N

NADH: dinucleòtid de nicotinamida-adenina.

NF1: *neurofibromin 1*.*

NARP: neuropatia, ataxia i retinitis pigmentària.

NMDAR: receptor NMDA (N-metil-D-aspartat).

O

OMS/WHO: Organització Mundial de la Salut/*World Health Organization*.

OXTR: *oxytocin receptor*.*

OXPHOS: *oxidative phosphorylation system*;
fosforil·lació oxidativa.

P

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; reacció en cadena de la polimerasa.

PPAR: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*;
receptors activats per proliferadors peroxisòmics.

PET: *Positron Emission Tomography*; tomografia per emissió de positrons.

qPCR: PCR quantitativa.

R

RMN: ressonància magnètica nuclear.

RRF: *Ragged-Red Fibres*; fibres vermelles esquinçades.

ROS: *Reactive Oxygen Species*; espècies reactives d'oxigen.

S

SATB2: *SATB homeobox 2*.*

SCN2A: *sodium voltage-gated channel alpha subunit 2*.*

SFC: síndrome de fatiga crònica.

SLC6A4: *solute carrier family 6 member 4*.*

SNC: sistema nerviós central.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*;
polimorfisme d'un sol nucleotid.

SCQ: *Social Communication Questionnaire*;
qüestionari de comunicació social.

SETD1A: *SET domain containing 1A, histone lysine methyltransferase*.*

SNA: sistema nerviós autònom.

SRR: *serine racemase*.*

STAT: *Screening Tool for Autism in Toddlers & Young Children*; eina de detecció de l'autisme en infants i joves.

STXBP1: *syntaxin binding protein 1.**

SRS: *Social Responsiveness Scale*; escala de resposta social.

SYNGAP1: *synaptic Ras GTPase activating protein 1.**

SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography*; tomografia per emissió de positrons.

T

TAC: tomografia axial computaritzada.

TCA: àcid tricarboxílic

TAH: trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat.

TN: trastorns del neurodesenvolupament.

TP: trastorn de personalitat.

TB: trastorn bipolar.

TEA: trastorn de l'espectre autista.

TOC: trastorn obsessiu compulsiu.

TSC1: *TSC complex subunit 1.**

TSC2: *TSC complex subunit 2.**

W

WES: *whole exome sequencing*; seqüenciació de l'exoma complet.

*Nom oficial del gen.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

III. INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

III. INTRODUCCIÓ

1. Trastorns del neurodesenvolupament (TN)

El cervell és la part més voluminosa i complexa de l'encèfal humà que controla l'activitat del cos i percep sensacions com la temperatura i el dolor i, encara més important, permet pensar. Aquesta part del cos humà es comença a desenvolupar abans del naixement. De fet, és en el període prenatal quan es produeix una extensa formació de les neurones i de l'organització dels circuits neuronals. Després del part, la composició genètica juntament amb l'àmplia gamma d'exposicions ambientals que afecten cada persona configuraran les diferències individuals en les diferents trajectòries neuroconductuals i, per tant, amb les conseqüents i variades expressions psicològiques i psicopatològiques.

Una probable hipòtesi de l'origen de la psicopatologia postula que, a més de la càrrega genètica i la seva interacció amb els esdeveniments vitals que ocorren al llarg de la vida de la persona, també tindria un paper rellevant l'estrès matern, és a dir, esdeveniments vitals d'estrès percebut per la mare que modularien el cervell fetal durant el desenvolupament^{1,2}. Aquesta és la principal tesi de la teoria del neurodesenvolupament, que podria explicar part de l'origen dels trastorns mentals ja que estableix que en períodes crítics i sensibles de desenvolupament es produïria un impacte dels factors ambientals (per exemple: restricció nutricional, tractaments hormonals o altres tipus d'exposició, etc.) sobre l'organització dels sistemes biològics, alterant les reaccions i sistemes adaptatius neurofisiològics i la plasticitat neuronal, que són extremadament importants en els primers estadis del neurodesenvolupament. Com a actors d'aquesta teoria s'hi inclouen el sistema nerviós central (SNC), el sistema nerviós autònom (SNA), el sistema neuroendocrí (l'eix hipotàlem-hipofisiari-adrenal (HPA)), el sistema cardiovascular i el sistema immunològic. Així doncs, les alteracions en aquests sistemes poden sorgir a partir de factors com: estrès matern, malnutrició, infeccions i factors immunològics relacionats amb la mare o baix pes fetal, entre d'altres. Aquests factors impactarien sobre l'eix HPA generant canvis en la sensibilitat del receptor de glucocorticoides, en proteïnes i en neurotransmissors implicats en el desenvolupament neuronal. Aquests canvis poden influir en el neurodesenvolupament i com a conseqüència augmentar la susceptibilitat a malalties metabòliques i cardiovasculars com l'obesitat, la hipertensió i la diabetis mellitus tipus 2 (DM2) però també a malalties psiquiàtriques com la depressió o l'esquizofrènia. Per tant, la interacció de factors genètics i ambientals seran determinants en l'estat de salut global de l'individu³.

MODULADORS

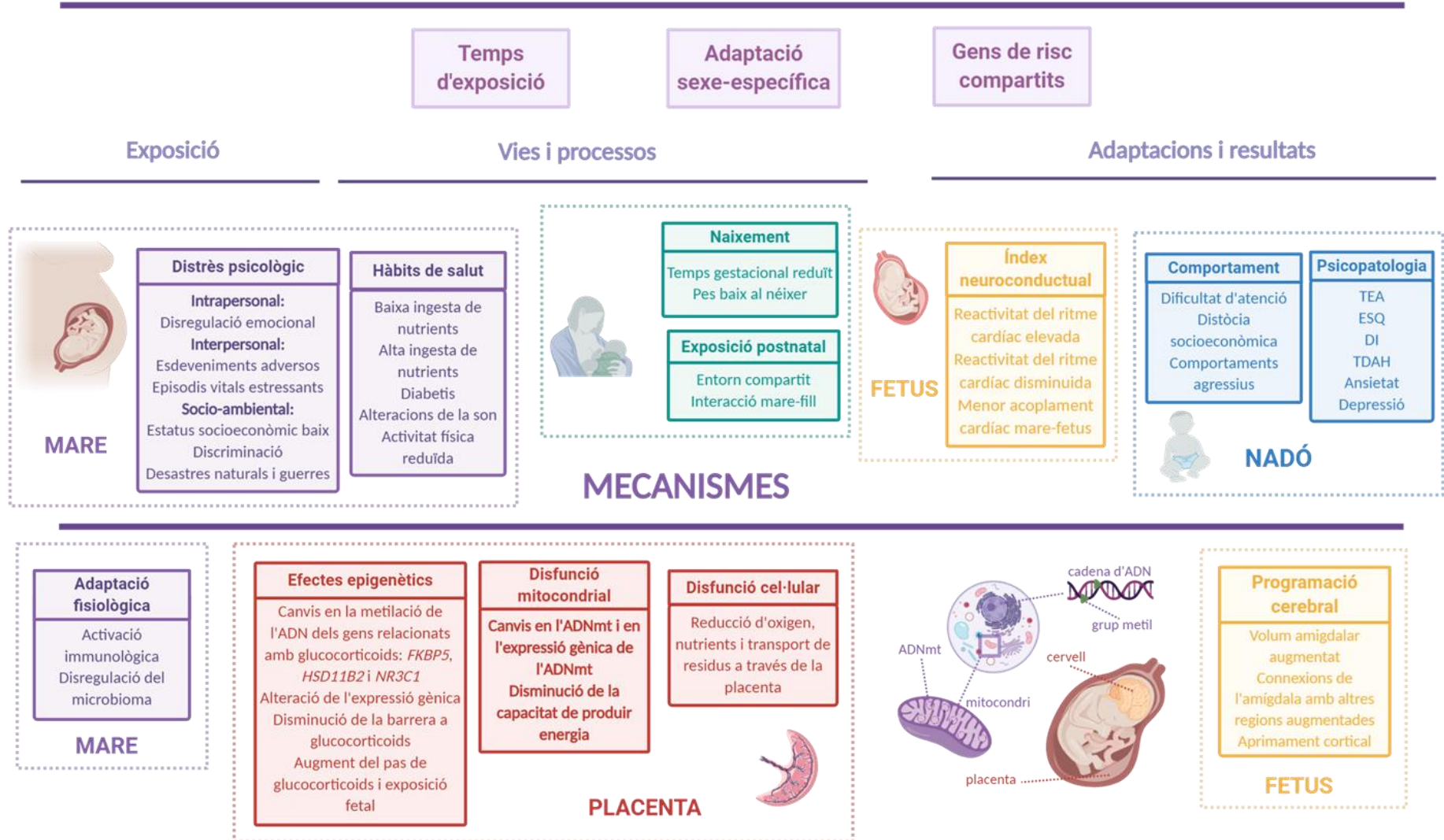


Figura 1. Mecanismes i vies per les quals el distrès matern afecta al fetus i al nen incrementant així el risc de psicopatologia. (Adaptat de Monk et al. 2019²)

La discapacitat intel·lectual (DI), els trastorns de l'espectre autista (TEA) i l'esquizofrènia (ESQ) estan considerats trastorns del neurodesenvolupament (TN) que tindrien el seu inici en el període del desenvolupament cerebral i es manifestarien generalment de manera precoç, és a dir en els primers anys de vida. Tant la DI com el TEA s'inclouen en el DSM-5 dins de la categoria de TN mentre que l'ESQ no s'hi contempla, tot i els múltiples treballs que recolzen aquesta classificació^{4,5}.

Taula 1. Criteris diagnòstics segons DSM-5 pels TN	
DISCAPACITAT INTEL·LECTUAL (Trastorn del desenvolupament intel·lectual)	
<i>amb especificació de gravetat:</i>	lleu (317) (F70)
	moderat (318.0) (F71)
	greu (318.1) (F72)
Retard global de desenvolupament (315.8) (F88)	
Discapacitat Intel·lectual no especificada (319) (F79)	
TRASTORNS DE LA COMUNICACIÓ	
Trastorn del llenguatge (315.32) (F80.2)	
Trastorn fonològic (315.39) (F80.0)	
Trastorn de fluïdes d'inici en la infància (tartamudeig) (315.35) (F80.81)	
Trastorn de la comunicació social (pragmàtic) (315.39) (F80.89)	
Trastorn de la comunicació no especificat (307.9) (F80.9)	
TRASTORN DE L'ESPECTRE AUTISTA (299.00) (F84.0)	
TRASTORN PER DÈFICIT D'ATENCIÓ AMB HIPERACTIVITAT	
<i>Especificar si:</i>	amb presentació combinada (314.01) (F90.2)
	presentació predominant amb falta d'atenció (314.00) (F90.0)
	presentació predominant hiperactiva/impulsiva (314.01) (F90.1)
	altre TDAH especificat (314.01) (F90.8)
	TDAH no especificat (314.01) (F90.9)
TRASTORN ESPECÍFIC DE L'APRENENTATGE	
<i>Especificar si:</i>	amb dificultats en la lectura (315.00) (F81.0)
	amb dificultats en l'expressió escrita (315.02) (F81.81)
	amb dificultat matemàtica (315.1) (F81.2)
TRASTORNS MOTORS	
Trastorn del desenvolupament de la coordinació (315.4) (F82)	
Trastorn de moviments estereotipats (307.3) (F98.4)	
TRASTORNS DE TICS	
Trastorn de la Tourette (307.23) (F95.2)	
Trastorns de tics motors o vocals persistent (crònic) (307.22) (F95.1)	
Trastorns de tics transitori (307.21) (F95.5)	
Altres Trastorns de tics especificat (307.20) (F95.8)	
Trastorns de tics no especificat (307.20) (F95.9)	
ALTRES TRASTORNS DE NEURODESENVOLUPAMENT	
Altres trastorn de neurodesenvolupament especificat (315.8) (F88)	

(Entre parèntesi s'indiquen els codis DSM-5 i CIE10)

Malgrat que l'inici de l'ESQ és més tardana que la del TEA i la DI, també es considera un TN i s'inclou en l'anomenat model de factor de risc de desenvolupament ja que es tracta d'un trastorn

multidimensional i espectral. A més, posa de manifest un contínuum de símptomes psicòtics subclínic, associats sovint a dèficits cognitius de diferent gravetat que estarien presents abans de la presentació clínica de la malaltia⁶. Les alteracions durant el desenvolupament neurològic intrauterí també semblen estar implicades en l'ESQ però, a diferència d'altres TN, les manifestacions clíniques com a conseqüència d'una maduració anòmala dels circuits límbics i corticals no es diagnostiquen fins anys després. La placenta també hi juga un paper important ja que alguns gens que s'han identificat de risc per a l'ESQ fan sensible aquest òrgan a l'estrès ambiental augmentant així la possibilitat d'alterar el desenvolupament fetal. Els canvis epigenètics durant l'etapa fetal, vehiculitzats o no per la placenta, deixen una empremta en el cervell que arribarà fins a l'edat adulta, suggerint que, tant el risc genètic com l'ambiental, tenen un impacte molecular en el desenvolupament de la malaltia des d'abans del naixement, possiblement a causa de canvis en l'expressió gènica produïts per una modulació ambiental^{2,3}.

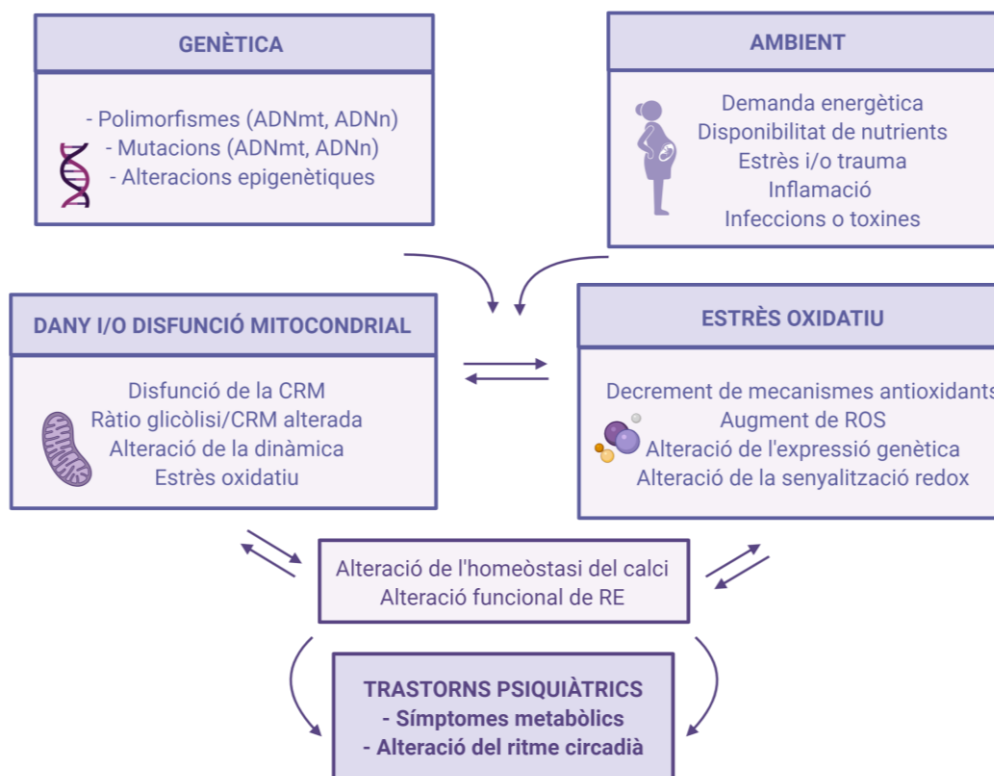


Figura 2. Proposta d'alteracions bioenergètiques i metabòliques en l'etiopatogènia dels trastorns psiquiàtrics. (Adaptat de Kim et al. 2019⁷) [CRM: cadena respiratòria mitocondrial; RE: reticle endoplasmàtic; ROS: espècies reactives d'oxigen]

S'han descrit mecanismes etiopatogènics comuns a la DI, el TEA i l'ESQ, però cal destacar que en el cas de l'ESQ les alteracions serien més discretes a l'inici de la vida i/o afectarien a mecanismes

neuronal compensables en aquesta fase i amb una millor capacitat funcional fins a l'inici dels símptomes de la malaltia, generalment al final de l'adolescència i inici de l'etapa adulta³. És encara poc clar com variants genètiques de risc compartides per aquests tres diagnòstics produeixen variacions de simptomatologia i d'etapa vital de presentació; però segurament podrien estar influïdes per variacions genòmiques i per factors ambientals⁸.

Així doncs, els TN es caracteritzen per alteracions biològiques en els períodes primerencs de la vida que es tradueixen en dèficits en el funcionament personal, social, acadèmic i ocupacional que poden ser visibles en els primers anys o, en alguns casos, més endavant. El rang dels dèficits de funcionament varia des de limitacions molt específiques de l'aprenentatge o del control de les funcions executives fins a dèficits globals de les habilitats socials o de la intel·ligència. El possible origen comú dels TN fa que el diagnòstic d'aquestes patologies prenguin una visió més dimensional i que es superposin diagnòstics o que se'n diagnostiquin dos o més alhora. Hi ha estudis que postulen que un 41% dels nens entre 4 i 18 anys diagnosticats de DI compleixen criteris, d'almenys, un altre trastorn psiquiàtric, podent ser aquest un altre TN⁹. Per exemple: un 2-3% de les persones amb DI compleix criteris d'ESQ⁹; fins un 70% de nens amb trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat (TDAH) compleixen criteris per un trastorn psiquiàtric comòrbid; i, aproximadament, el 30% d'infants amb TEA pateixen també DI¹¹. D'altra banda, els diagnòstics que es presenten poden traspasar la frontera de la salut mental; així doncs, per exemple, la combinació de DI, TEA i epilèpsia s'aproxima a un 0'07% de la població general^{9,10}.

1.1 Trastorn de l'Espectre Autista (TEA)

El 1867 Henry Maudsley va identificar un grup de nens en la primera infància amb retard en el desenvolupament i alteracions en la sociabilització, entre altres particularitats, als quals per primera vegada se'ls va diferenciar de les psicosis infantils. Però no fou fins el 1943 que Leo Kanner va proposar el terme "autisme infantil precoç".

Aquest trastorn es caracteritza per la concurrència de dèficits en la comunicació i interacció social i la presència habitual de patrons restrictius i restringits de comportaments, activitats i/o interessos. És considerat un trastorn espectral i això fa que les persones amb TEA puguin ser molt diferents les unes de les altres¹⁶.

1.1.1 Característiques clíniques

El TEA es caracteritza per dèficits persistents en la comunicació i la interacció social en múltiples contextos, inclosos els dèficits en la reciprocitat social, en els comportaments comunicatius no verbals usats per a la interacció social i en les habilitats per desenvolupar, mantenir i entendre les relacions. Requereix també la presència de patrons de comportament, interessos o activitats de tipus restrictiu o repetitiu. Aquests símptomes estan presents des de la primera infància i limiten o impedeixen el funcionament quotidià. És important destacar que els símptomes poden canviar durant les diferents etapes del desenvolupament i poden emmascarar-se per mecanismes compensatoris. Els criteris diagnòstics poden complir-se basant-se en la informació històrica, encara que la simptomatologia actual ha de ser causa de deteriorament significatiu i cal considerar el TEA com un espectre, ja que les manifestacions del trastorn també varien molt segons la gravetat de l'afectació, el nivell del desenvolupament i l'edat cronològica¹⁷. Les deficiències verbals i no verbals de la comunicació social tenen diferents manifestacions segons l'edat, el nivell intel·lectual i les capacitats lingüístiques de l'individu, a més d'altres factors, com l'evolució del tractament i les ajudes actuals rebudes¹⁰.

1.1.2 Prevalença

La majoria d'estudis indiquen que la prevalença del TEA és aproximadament d'un 1% en la població¹⁰, encara que recentment s'ha elevat fins a un 1'5% en països desenvolupats¹². D'altres, però, indiquen xifres menors situant la prevalença entre 6'2/1000 i 7'6/1.000 o d'un cas per cada 132 persones^{14,15}.

Existeixen diversos factors que s'han relacionat amb l'augment de la prevalença de TEA en la població. Entre aquests hi ha l'edat de maternitat avançada (≥ 40 anys), l'edat de paternitat

avançada (≥ 50 anys) i un interval entre embarassos curt (<24 mesos)¹². Altres factors relacionats amb un lleuger augment del risc del TEA són les alteracions metabòliques maternes com l'augment de pes i la hipertensió, l'ingrés matern hospitalari a causa d'infeccions bacterianes o virals i una història familiar de malalties autoimmunitàries, entre d'altres. Algunes medicacions com l'àcid valproic també estan associades a un increment de risc de TEA; així com el part prematur (<32 setmanes), un baix pes al néixer (<1500 g) o tenir un pes per sobre o per sota del percentil 95. També s'han identificat factors protectors com la suplementació amb àcid fòlic durant l'embaràs, que s'ha associat a un menor risc de TEA¹². Cal remarcar que el risc de TEA és de 3 a 4 vegades superior en nens respecte a nenes, indicant que el sexe masculí, per ell mateix, ja és un factor de risc¹².

1.1.3 Etiologia

Avui en dia es considera que el TEA és una malaltia complexa i multifactorial i s'intenta explicar per la suma de la interacció de diversos factors genètics i ambientals.

La taxa de concordança de TEA en bessons monozigòtics, reportada recentment (92%), és molt superior a la dels bessons dizigòtics (10%), cosa que indica que els factors genètics tenen molt més pes en el desenvolupament del TEA que els factors ambientals¹⁶. En la mateixa línia, l'heretabilitat en el TEA s'ha estimat entre el 74% i el 93%, en funció de l'estudi¹². Estudis en germans indiquen que després d'un primer fill amb TEA, en un 7-20% de casos, el segon fill també estarà afectat per aquest trastorn¹². Aquestes xifres augmenten si s'és el tercer germà de dues persones amb diagnòstic de TEA.

Pel que fa a factors de l'ambient i prenatals, s'han recollit com a possibles factors que contribueixen al TEA les infeccions virals, l'edat parental i la deficiència de zinc¹⁶, factor imprescindible per a la immunitat, la síntesi proteica, la cura de ferides i la regulació de l'expressió gènica. Aquests tres factors han demostrat tenir relació amb un desenvolupament cerebral fetal alterat, encara que de manera no conclouent¹⁶.

La genètica del TEA és d'alta complexitat, perquè hi ha diferents tipus d'alteracions genètiques que estan involucrades en el seu desenvolupament. S'han identificat variants comunes (SNPs, de l'anglès *Single Nucleotide Polimorphism*) que individualment aporten un risc insignificant. En canvi hi ha altres variants que també canvien un únic nucleòtid, però són molt menys freqüents que les anteriors i tenen un elevat risc pel TEA; es coneixen com SNVs (de l'anglès *Single Nucleotide Variants*). Aquestes variants tenen un fort impacte en la funció del gen i, fins a data d'avui, s'han identificat SNVs en més de 100 gens, com per exemple *CNTNAP2*, *MET*, *OXTR*, i

SLC6A4, entre d'altres¹⁷. Un dels gens més freqüentment afectat és el *CHD8*, tot i que es troba alterat en menys del 0'5% dels nens amb TEA¹². Alguns d'aquests gens també es consideren gens de risc per DI ja que són dues patologies freqüentment associades i que expressen proteïnes que intervenen en les mateixes o en superposades xarxes moleculars¹⁷. Tots els estudis coincideixen que es necessita recerca més específica, i amb una mostra molt més gran, per a concloure el paper d'aquests gens en aquests trastorns. A diferència d'aquestes variants, que impliquen un o uns pocs nucleòtids, s'han detectat variants que involucren regions més grans del genoma, >1000 parelles de bases, conegudes com variants de número de còpia (CNVs, de l'anglès *Copy Number Variant*), que poden ser heretades o *de novo*, confereixen un risc molt elevat i es creu que estan directament relacionades amb el TEA en una minoria de pacients. S'ha informat d'almenys 65 gens fortament associats, a més d'altres sis *loci* de CNVs que confereixen un efecte reconegut per a risc de TEA¹⁸. S'han detectat algunes CNVs recurrents associades al TEA, per exemple: eliminacions i duplicacions de la regió 16p11.2 i duplicacions maternes de 15q11-q13. Altres regions cromosòmiques on s'han detectat CNVs són 1q21, 7q11.23 i 22q11.2. En conjunt, s'han descrit unes 15 CNVs recurrents que, a més de conferir risc pel TEA, també s'ha vist que confereixen risc per l'ESQ, els trastorns de l'humor, l'epilèpsia i la DI¹⁹.

Diversos treballs indiquen que hi ha alteracions sinàptiques mediades, entre d'altres, per gens de risc de TEA que interactuen en rutes específiques i en diferents tipus de cèl·lules; especialment en les neurones glutamatèrgiques corticals i del desenvolupament del cervell fetal, i en grups de gens que participen en la senyalització, expressió i maduració neuronal^{19,20}.

Per tant, sembla que la hipòtesi que explicaria millor l'etiologia del TEA és la que suggereix que moltes variants d'efecte petit combinades o no amb variants d'efecte més gran, farien un efecte sumatori en un determinat individu i, que influïdes per factors vitals i de l'entorn causarien el TEA quan es superaria un determinat llindar¹⁹.

1.1.4 Diagnòstic

El TEA és el resultat d'una alteració primerenca en la reorganització neural durant el neurodesenvolupament. Avui en dia, encara no hem pogut identificar biomarcadors fiables, a part del diagnòstic genètic i, generalment, el diagnòstic es basa en l'observació del comportament.

En la primera infància, es basa en la combinació de l'observació clínica del facultatiu i de la informació dels cuidadors principals de l'infant.

Taula 2. Criteris diagnòstics segons el DSM-5 per TEA	
A. Dèficits persistents en comunicació i en interacció social en diversos contextos, manifestant el següent, ara o pels antecedents (els ex. són il·lustratius però no exhaustius):	
1. Els dèficits en la reciprocitat social i emocional varien, p.ex. des d'un apropament social anormal i fracàs de la interacció normal en ambdós sentits, disminució d'interessos, emocions o afectes compartits, fins al fracàs en iniciar o respondre a interaccions socials.	
2. Els dèficits en les conductes comunicatives no verbals utilitzades en la interacció social varien, p.ex. des d'una comunicació verbal i no verbal poc integrada, passant per anomalies del contacte visual i del llenguatge corporal o deficiències de la comprensió i l'ús de gesticulació, fins a una falta total d'expressió facial i de comunicació no verbal.	
3. Els dèficits en el desenvolupament, manteniment i comprensió de les relacions varien, p.ex. des de dificultats per ajustar el comportament en diversos contextos socials, dificultats per compartir jocs imaginatius o per fer amics, fins a l'absència d'interès per altres persones.	
B. Patrons restrictius i repetitius de comportament, interessos o activitats, que es manifesten en ≤2 dels següents, ara o pels antecedents (els ex. són il·lustratius però no exhaustius):	
1. Moviments, utilització d'objectes o parla estereotipats/repetitius (p.ex. estereotípies motores simples, alineació de joguines o canvi de lloc d'objectes, ecolàlia, frases idiosincràtiques).	
2. Insistència en la monotonia, excessiva inflexibilitat de rutines o patrons ritualitzats de comportament verbal o no verbal (per exemple, gran angoixa per canvis petits, dificultats amb les transicions, patrons de pensament rígids, rituals de salutació, necessitat de prendre el mateix camí o de menjar els mateixos aliments cada dia).	
3. Interessos molt restringits i fixes que són anormals en quant a la seva intensitat o focus d'interès (per exemple, fort vincle o preocupació per objectes inusuals, interessos excessivament circumscrits o perseverants).	
4. Hiper- o hiporeactivitat als estímuls sensorials o interès inhabitual per aspectes sensorials de l'entorn (p.ex. indiferència aparent al dolor/temperatura, resposta adversa a sorolls o textures específiques, olfacte o palpació excessiva d'objectes, fascinació visual per llums o moviment).	
C. Els símptomes han d'estar presents en les primeres fases del període desenvolupament, però poden no manifestar-se totalment fins que la demanda social supera les capacitats limitades, o poden estar emmascarats per estratègies apreses en fases posteriors de la vida.	
D. Els símptomes causen un deteriorament clínicament significatiu en la part social, laboral o altres àrees importants del funcionament habitual.	
E. Aquestes alteracions no s'expliquen millor per la DI (trastorn del desenvolupament intel·lectual) o per el retard global del desenvolupament. La DI i el TEA amb freqüència coincideixen; per fer diagnòstics de comorbiditats de TEA i DI, la comunicació social ha d'estar per sota del previst pel nivell general de desenvolupament.	
Especificadors de gravetat:	<ul style="list-style-type: none"> - Grau 1 "necessita ajuda" - Grau 2 "necessita ajuda notable" - Grau 3 "necessita ajuda molt notable"
Especificar si:	<ul style="list-style-type: none"> - Amb o sense dèficit intel·lectual acompanyant. - Amb o sense deteriorament del llenguatge acompanyant. - Associat a afecció mèdica o genètica o a un factor ambiental coneguts. - Associat a un altre TN, trastorn mental o del comportament. - Amb catatonia.

El diagnòstic es pot complementar amb l'ús d'instruments validats com l'STAT (*Screening Tool for Autism in Toddlers and Young Children*), l'ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*), l'ADI-R (*Autism Diagnostic Interview-Revised*), la CARS (*Childhood Autism Rating Scale*), l'SRS (*Social Responsiveness Scale*) i la SCQ (*Social Communication Questionnaire*)^{10,12}.

Els infants amb TEA que no tenen retard en el llenguatge, les persones de sexe femení, les d'un

nivell socioeconòmic baix, que no parlen l'idioma principal de la regió on es troben, i les de minories ètniques rebran el diagnòstic més tardanament que les altres. També retarda el diagnòstic el fet de patir altres trastorns mentals que són comòrbids al TEA com són, de manera freqüent, el TDAH, els trastorns d'ansietat o els trastorns afectius^{11,21-25}.

En el diagnòstic del TEA és important fer una avaluació paral·lela de la intel·ligència, ja que això condiona el maneig terapèutic i el pronòstic.

Cada cop existeixen més evidències per a recomanar proves genètiques després d'un diagnòstic de TEA. Tot i que les proves les pot demanar qualsevol facultatiu, seria interessant la derivació del cas a l'especialista, un genetista clínic, per a cercar, en funció del quadre clínic i de les particularitats físiques, les alteracions genòmiques específiques. Les més usuals solen ser un cariotip d'alta resolució amb un bioxip d'ADN i proves per descartar la mutació de la síndrome de l'X fràgil. També es pot valorar la seqüenciació completa de l'exoma o del genoma; que en breu podria convertir-se en el test de referència per al correcte estudi i diagnòstic del TEA¹².

Els adults que, per motius propis, són conscients i s'interessen per les dificultats que presenten i acaben tenint un diagnòstic de TEA, habitualment no presenten DI i solen patir condicions psiquiàtriques comòrbides. Els pacients amb un diagnòstic de TEA en l'edat adulta acostumen a ser més lleus, ja que aquests són els que més costen de diagnosticar a la infància²³. També és d'interès destacar que en una mostra de la població comunitària, és a dir, no clínica, aproximadament un terç dels adults que van rebre un diagnòstic de TEA a la infància i tenien una intel·ligència mitjana o superior, d'adults no presentaven simptomatologia evident de TEA encara que sí que presentaven simptomatologia psiquiàtrica menor²³.

Per últim, també es coneix que les persones de sexe femení reben de mitjana un diagnòstic de TEA més tardà, fins i tot s'ha comprovat que estan infradiagnosticades. Una de les possibles explicacions podria ser que les dones serien més capaces d'adaptar-se a diverses situacions socials, així com més facilitat per adoptar estratègies socials, a més de tenir més capacitat d'abstracció i d'imaginació²³.

1.1.5 Diagnòstic diferencial

Les coexistència de diagnòstics mèdics i psiquiàtrics en el TEA és elevada i això es tradueix, entre d'altres, en la necessitat d'una atenció en serveis especialitzats i transversals per tal de, a més de fer un diagnòstic diferencial, poder detectar de manera proactiva els possibles diagnòstics comòrbids.

Principalment, el TEA s'ha de diferenciar d'altres TN i és per aquest motiu que és important una

anamnesi i una exploració física exhaustives. Hi ha quadres sindròmics que van acompanyats d'alteracions característiques, com per exemple, les lesions cutànies típiques de l'esclerosi tuberosa o de la neurofibromatosi que poden cursar amb TEA. És important, també, descartar alguna alteració sensorial, sobretot de vista i oïda^{21,26}.

Els diagnòstics psiquiàtrics diferencials i/o comòrbids comuns inclouen trastorns depressius, trastorns d'ansietat, el trastorn obsessiu compulsiu (TOC), TDAH i trastorns de la personalitat, especialment el trastorn de personalitat esquizoide però també d'altres. Cal dir que és comú que el diagnòstic de TEA es confongui amb altres diagnòstics amb símptomes comuns o que s'emetin diagnòstics comòrbids de manera equivocada. Un estudi amb adults en TEA mostra que la concurrència amb altres diagnòstics psiquiàtrics és el doble d'altres adults amb altre diagnòstic psiquiàtric no TEA²⁷.

1.1.6 Comorbiditats

Més del 70% de persones amb el diagnòstic de TEA pateixen també condicions mèdiques comòrbides, alteracions del desenvolupament i/o comorbiditats psiquiàtriques, la majoria de les quals tendeixen a persistir al llarg dels anys¹¹. A més, cada vegada hi ha més evidències de que les persones amb TEA presenten mortalitat prematura, increment del risc d'autolesions, així com de suïcidi²¹.

Les persones amb TEA sovint també pateixen altres dificultats com retard del desenvolupament o dificultats del llenguatge (hi ha estudis que situen les xifres al voltant del 50%) i/o retard motor. El TDAH és la comorbiditat més comuna en pacients amb TEA; alguns estudis indiquen que un 30-40% dels pacients amb TEA, també pateixen TDAH, el qual és més freqüent en infants amb DI o intel·ligència límit¹². La DI també és una condició comòrbida molt freqüent. Les estadístiques són molt disperses i xifren entre un 11 i un 65% el gruix de nens amb edat escolar que pateixen TEA comòrbidament amb DI¹¹, en funció de les característiques dels pacients i la gravetat de la DI. Alguns estudis mostren que fins a un 70% de nens amb TEA poden presentar algun grau de DI. D'aquests aproximadament, un 40% tenen una DI moderada-greu (amb un CI<50), un 30% presenten una DI lleu (CI<70) i un 30% presenten un CI normal però amb capacitats disharmòniques. També s'hi associen trastorns de l'aprenentatge, retard del llenguatge i tics, presents en un 9% d'infants en edat preescolar i escolar^{10,12,21}. L'elevada xifra de comorbiditat es podria explicar per coexistència de característiques fisiopatològiques compartides, per exemple, amb l'epilèpsia, el TDAH, el TOC o l'ansietat; per les conseqüències pròpies del TEA, per exemple, depressió o ansietat; o per criteris diagnòstics superposats, per exemple, amb el trastorn de la personalitat esquizoide, esquizotípic o personalitat obsessiva. Pel que fa a comorbiditats físiques

hi trobem: alteracions de la son (25-40%), tria d'aliments rígida i restringida (42-61%), obesitat (23%), símptomes gastrointestinals (GI) (47%) i restrenyiment (12%). L'epilèpsia presenta una prevalença d'entre un 5 i un 15% en persones amb TEA, i està especialment relacionada amb la DI i el sexe femení¹². També s'observa una incidència elevada d'altres anomalies de SNC, i de trastorns metabòlics i immunològics.

L'ansietat en moltes de les seves formes, ansietat social, ansietat generalitzada, ansietat per separació i fòbies, també s'associa al TEA donat que més d'un 50% de les persones amb TEA de totes les edats en presenten²³. Pel que fa a la simptomatologia depressiva i als trastorns depressius s'ha descrit que també estan presents en més del 50% d'adults amb TEA²³. L'ansietat i la depressió és més observable en individus verbalment més competents. La ideació suïcida s'ha de tenir molt en compte en persones amb TEA, i especialment, si s'hi associa clínica ansiosa i/o depressiva. El percentatge de pensaments i intents autolítics en joves amb TEA es troba al voltant d'un 11-14%, però en adults amb TEA sense DI la ideació autolítica està present en xifres al voltant del 66% i els intents o la ideació autolítica estructurada està present en un 35%. Les xifres són encara més elevades si hi ha una depressió comòrbida²³. Els pacients amb TEA tenen un diagnòstic de TOC associat en un 30% més que la població general; tot i que aquesta xifra es podria explicar per errors diagnòstics o per la superposició de símptomes de les dues patologies. L'agressivitat i la irritabilitat també són freqüents en un 25% dels individus amb TEA, més que en altres trastorns del desenvolupament. Altra simptomatologia psiquiàtrica com els trastorns psicòtics o el trastorn bipolar (TB) també es pot associar al TEA. Síntomes psiquiàtrics comòrbids com, per exemple, la depressió o l'ansietat greu poden empitjorar els símptomes de TEA i són alguns símptomes pels quals alguns adults poden acudir als serveis de salut mental²³. Tot i que algunes comorbiditats poden ser degudes a mecanismes biològics compartits, també podrien ser conseqüència d'un suport insuficient per part de l'entorn i de la societat²³.

1.1.7 Tractament i Pronòstic

És molt rellevant poder establir un diagnòstic precoç per tal de proporcionar al pacient una intervenció el més aviat possible amb l'objectiu de treballar llenguatge i comunicació no verbal, així com habilitats socials i cognició social. La intervenció primerenca dirigida a modular el comportament i la comunicació és una prioritat, donada la major plasticitat cerebral dels nens en edat preescolar, i sembla que podria aportar més beneficis a llarg termini²¹. Tot i la importància d'establir el diagnòstic precoçment, molts infants i joves amb TEA també poden beneficiar-se d'intervencions en edats posteriors. Existeixen diversos programes que se centren

en les dificultats principals de comunicació en el TEA entrenant habilitats socials. Aquest programes tenen evidències de beneficis més moderats que els programes d'intervenció precoç²¹. D'adolescents i adults és important rebre un suport i/o supervisió en termes d'adaptació escolar i laboral, així com treballar habilitats comunicatives i vehicular una vida el més autònoma possible. La teràpia farmacològica és una opció si la persona amb TEA presenta simptomatologia tractable amb alguna de les medicacions que han mostrat evidència com, per exemple, la risperidona o l'aripiprazol, indicats si hi ha irritabilitat o agitació, entre d'altres. Si hi ha una condició comòrbida, per exemple, ansietat o depressió, el tractament farmacològic també pot ser una opció²¹.

Totes aquestes intervencions van lligades a un millor pronòstic en el nen i en l'adult amb TEA. Aquest, però, pot ser molt variable segons la gravetat dels símptomes que el pacient presenti i segons la intervenció que s'hagi dut a terme prèviament. Tot i així, en persones amb TEA sense DI o d'altres condicions comòrbides tenen una disminució de la qualitat de vida i una menor o més irregular presència en el món laboral i, per tant, de l'adaptació del dia a dia¹¹.

1.2 Discapacitat Intel·lectual (DI)

El 1838, el psiquiatre francès Jean Esquirol fa la primera distinció en l'àmbit de la salut entre capacitat intel·lectual i malaltia mental. Des d'aleshores el concepte ha anat evolucionant enormement. Actualment, segons l'*American Association on Intellectual and Developmental Disabilities*, AAIDD (<https://www.aaidd.org>), la DI fa referència a un estat particular de funcionament intel·lectual i adaptatiu que s'origina a la infància i en el que les limitacions, tant en funcionament intel·lectual com en conducta adaptativa, s'associen a habilitats conceptuals, socials i pràctiques. La DI es troba dins de la classificació dels TN.

Taula 3. Criteris diagnòstics segons DSM-5 per la DI	
S'han de complir els tres criteris següents:	A. Deficiències de les funcions intel·lectuals com el raonament, la resolució de problemes, la planificació, el pensament abstracte, el judici, l'aprenentatge acadèmic i l'aprenentatge a partir de l'experiència, confirmats mitjançant l'avaluació clínica i proves d'intel·ligència estandarditzades individualitzades.
	B. Deficiències en el comportament adaptatiu que produeixen el fracàs del compliment dels estàndards de desenvolupament i socioculturals per l'autonomia personal i la responsabilitat social. Sense recolzament continu, les deficiències adaptatives limiten el funcionament en una o més activitats en la vida quotidiana, com la comunicació, la participació social i la vida independent en múltiples entorns, tals com la llar, l'escola, la feina i la comunitat.
	C. Inici de les deficiències intel·lectuals i adaptatives durant el període de desenvolupament.
Especificar la gravetat actual:	<ul style="list-style-type: none">- Lleu (317; F70)- Moderat (318.0) (F71)- Greu (318.1) (F72)- Profund (318.2) (F73)

(Entre parèntesi s'indiquen els codis DSM-5 i CIE10)

1.2.1 Característiques clíniques

Les persones que presenten DI tenen dificultats en el funcionament adaptatiu, de tal manera que l'individu no assoleix els objectius esperats de la vida quotidiana, per exemple: en la comunicació, la participació social, el funcionament acadèmic o ocupacional i en la independència personal a casa o a la comunitat. Aquestes dificultats poden ser degudes a un dany congènit o bé a un dany adquirit durant el període del desenvolupament¹⁰.

En un infant que presenta DI es pot detectar, a l'inici, un retard en l'expressió i en la recepció del llenguatge, retards en habilitats adaptatives (vestir-se, anar al bany, ...), dèficits motors fins, dificultats en habilitats de resolució de problemes, immaduresa social i dificultats en el comportament. Com més sever sigui el grau de DI més aviat es detectaran les dificultats i, per tant, el diagnòstic serà més primerenc²⁸. És important destacar que el nivell de gravetat de la DI es defineix segons el funcionament adaptatiu i no segons les puntuacions de coeficient

intel·lectual (CI), ja que és el funcionament adaptatiu el que determina el nivell de suport requerit. A més, les mesures de CI són menys vàlides per les puntuacions més baixes del rang.

L'inici de la DI es produeix durant el període de desenvolupament. L'edat i els trets característics a l'inici depenen de l'etiologia i de la gravetat de la disfunció cerebral. L'alentiment per assolir fites motores, de llenguatge i socials poden identificar-se en els primers dos anys de vida en els casos de DI més greus, mentre que els nivells lleus poden no ser identificables fins a l'edat escolar¹⁰.

Quan la DI s'associa a una síndrome genètica poden presentar un aspecte físic característic, com per exemple la síndrome de Down. Algunes síndromes tenen un fenotip conductual que fa referència a comportaments específics que són característics d'un trastorn genètic particular, per exemple: la síndrome de Lesch-Nyhan, en la que freqüentment es caracteritza per presentar autolesions i per un comportament agressiu. En les formes adquirides, l'inici pot ser abrupte després d'una malaltia, com una meningitis o una encefalitis, o d'un traumatisme cranial quan aquest es produeix durant el període de desenvolupament¹⁰.

Les característiques clíniques varien molt en funció de la severitat de la DI²⁸ i és per això que es diferencien quatre graus:

- ❖ **DI lleu:** és el tipus més freqüent ja que està present en un 85% de les persones amb DI²⁹. La puntuació del CI oscil·la de 55 a 70. Generalment es detecten durant l'últim tram de l'etapa preescolar o en el primer dels anys d'escolarització. Presenten dificultats en qüestions acadèmiques com llegir i escriure i, més tard, en l'aritmètica, el temps i els diners. Semblen més socials i immadurs comparats amb altres infants de la mateixa edat. La comunicació i el pensament pot ser més concret i menys madur que el dels altres. Presenten un funcionament adequat i poden viure independentment en l'edat adulta. Tot i això, necessiten suports puntuals en situacions complexes de la vida diària.
- ❖ **DI moderada:** present en un 10% de persones amb un diagnòstic de DI²⁹. El rang del CI varia entre 40 i 55. Les dificultats es detecten, generalment, abans que en la DI lleu. A l'etapa preescolar ja manifesten dificultats en les habilitats socials, comunicatives i de comportament. Requereixen suport i supervisió de forma substancial. Poden dur a terme tasques bàsiques d'atenció personal, però aquestes sovint requereixen entrenament i suport. Durant l'edat adulta poden desenvolupar-se en treballs adaptats que requereixen una comunicació escassa i mínimes habilitats cognitives i poden participar en totes les tasques domèstiques amb un suport i una docència continuades.
- ❖ **DI severa:** present en un 3-4% de les persones amb DI²⁹ i amb un CI d'entre 25 i 40 punts.

Les persones amb DI severa tenen una capacitat molt limitada d'entendre el llenguatge escrit i els conceptes de números i temps, així com una limitació important en la comprensió del llenguatge parlat i gestual. Necessiten suport continu tota la vida.

- ❖ **DI profunda:** present en un 1-2% de les persones amb DI²⁹, és la forma més severa de DI amb un rang de CI inferior a 25. Poden entendre instruccions molt bàsiques, però tenen una comprensió extremadament limitada del llenguatge simbòlic. Requeriran suport intensiu i constant en tots els aspectes de la cura personal i de la vida diària.

1.2.2 Prevalença

La prevalença global de DI en la població general és de l'1%^{10,30}, tot i que algunes fonts assenyalen que podria arribar al 3%²⁸. La prevalença de DI severa i profunda és aproximadament de 6 per 1000¹⁰.

Les dades epidemiològiques indiquen que la proporció home/dona diagnosticats de DI és d'1'2/1, encara que aquestes proporcions varien molt segons els estudis publicats¹⁰. Aquesta major freqüència en homes podria ser deguda, en part, a les formes de DI lligades al cromosoma X³¹.

1.2.3 Etiologia

L'etiopatogènia de la DI és multifactorial i com més elevat és el grau de DI més factible és identificar-ne l'origen. La DI lleu pot estar més influenciada per factors culturals, lingüístics i socials. Cal destacar que, aproximadament, en un 75% de les persones que pateixen DI se'n coneix la causa; no obstant, no cal oblidar que en el 25% restant, la causa de la DI és desconeguda. Si la DI és lleu, la proporció de coneixement sobre la causa o causes de DI disminueix fins a la meitat^{9,10}. Entre les diverses causes implicades en l'etiologia de la DI destaquen²⁸:

- ❖ **Factors genètics:** La DI pot ser deguda per l'alteració d'un **sol gen** i s'han identificat diversos gens nuclears relacionats amb la DI com, per exemple, *FMR1*, *TSC1*, *TSC2*, *NF1* i *MECP2*, entre molts d'altres¹⁷. S'ha estimat que mutacions en ~1000 gens diferents podrien estar implicats en la DI. Alguns autors parlen de fins a 2000 gens d'herència autosòmica dominant³² i també en són alguns exemples: *ARID1B*, *SCN2A*, *ANKRD11*, *SATB2*, *SYNGAP1*, *DYRK1A*, *MED13L*, *STXBP1*, *CTNNB1*, *KCNQ2*, etc. En herència autosòmica recessiva trobem que la DI s'ha relacionat amb mutacions en més de 3000 gens³³.

La DI també pot ser deguda a alteracions de grans **regions cromosòmiques** que inclouen

delecions, translocacions i cromosomes marcadors supernumeraris, o a alteracions cromosomòmiques submicroscòpiques que poden comprendre diversos gens. La identificació submicroscòpica identifica pèrdues de segments cromosòmics petits.

Algunes conductes específiques i predictibles s'associen a determinats casos de DI amb base genètica clara i formen **síndromes genètiques**. Aquests fenotips conductuals es defineixen com una síndrome de conductes observables que té lloc, amb una major probabilitat de l'esperada, en persones amb una anomalia genètica específica. S'han identificat 800 síndromes genètiques diferents associades a la DI amb herència autosòmica dominant, recessiva o lligada al cromosoma X. En són alguns exemples, d'entre els més freqüents: la síndrome de Down, que és el prototip d'anomalia citogenètica visible al microscopi i és el trastorn genètic més comú associat a DI³⁴; la síndrome X fràgil, que és la condició hereditària més freqüent³⁵; la síndrome de Rett, la síndrome de Williams, la síndrome d'Angelman i Prader-Willi, la síndrome d'Smith-Magenis, la síndrome de Miller-Dieker, la síndrome de Rubinstein-Taybi i l'esclerosi tuberosa, entre moltes d'altres.

- ❖ **Factors adquirits i evolutius prenatals i perinatals**³⁶: En el **període prenatal** és rellevant la salut física, psicològica i nutricional de la mare durant l'embaràs. Hi ha condicions clíniques de la mare que poden influir en el correcte desenvolupament fetal si no es supervisen de manera adequada, com per exemple: diabetis, anèmia, emfisema o hipertensió. També poden ser molt rellevants algunes infeccions maternes durant la gestació perquè poden causar DI, per exemple: la rubèola, el citomegalovirus, la sífilis, la toxoplasmosi, el virus de l'herpes i el virus de la immunodeficiència humana. I, per últim, l'ús de substàncies tòxiques, com per exemple: l'alcohol, que provoca la síndrome alcohòlica fetal, està associat a la DI. Complicacions de l'embaràs que provoquen anòxia, com hemorràgies en el part, placenta prèvia, despreniment prematur de placenta o prolapse de cordó, també poden ser causa de DI.
Alteracions i/o accidents en el propi nadó en **l'etapa perinatal** també s'associen a la DI. Per exemple: néixer prematur i/o amb baix pes, patir una hemorràgia intracranial o isquèmia cerebral, malnutrició i/o dèficit de iode, entre d'altres³⁷.
- ❖ **Trastorns adquirits durant la infància**: Algunes infeccions o alteracions durant els primers anys de vida com la meningitis o l'encefalitis, els traumatismes cranioencefàlics, l'asfíxia o les exposicions cròniques a algunes substàncies, poden causar DI.
- ❖ **Factors ambientals i socioculturals**: La carència significativa d'atenció bàsica, mèdica o nutricional s'ha associat a la DI lleu³⁶.

1.2.4 Diagnòstic

El diagnòstic de la DI es fonamenta en combinar l'anamnesi amb una exploració física completa a més de proves diagnòstiques de laboratori, incloent les proves genètiques i les proves d'imatge. Només amb la història clínica i l'exploració física es pot identificar l'etiologia en, aproximadament, un 17-34% dels casos²⁸.

La història clínica ha d'incloure els antecedents prenatals, neonatals i perinatals; la història de les etapes del neurodesenvolupament i les condicions mèdiques, així com els antecedents familiars. És indispensable, també, un examen físic i neurològic que compti amb l'avaluació del perímetre cranial, un examen de la pell i annexes cutanis i la detecció de característiques dismòrfiques, per les que és recomanable l'ajuda d'un genetista clínic.

S'hauria d'incloure, també, una avaluació exhaustiva de la capacitat intel·lectual i del funcionament adaptatiu, la identificació de les possibles etiologies genètiques i no genètiques, l'avaluació de les afeccions mèdiques associades com, per exemple, paràlisi cerebral i trastorn convulsiu, i l'avaluació dels trastorns mentals, emocionals i conductuals concurrents¹⁰. El funcionament intel·lectual es mesura habitualment amb proves d'intel·ligència administrades individualment, que són psicomètricament vàlides, completes i apropiades culturalment i psicomètricament. És necessària i imprescindible la valoració clínica per interpretar els resultats de les proves de CI.

En funció de cada cas, per a un correcte diagnòstic s'ha de valorar la realització de proves complementàries. Aquestes poden ser l'avaluació genètica, un cribratge metabòlic i/o proves de neuroimatge. Un bioxip d'ADN és la prova de primera elecció tot i tenir un rendiment diagnòstic que oscil·la entre el 12 i el 20%³⁸. Entre altres proves genètiques destaquen l'anàlisi del cariotip per detectar alteracions cromosòmiques conegudes (per exemple la síndrome de Down) i les proves específiques per síndromes genètiques conegudes¹⁰. S'haurien de realitzar proves d'hibridació *in situ* amb fluorescència si sospitem de la síndrome de Prader-Willi/Angelman, la síndrome de Smith-Magenis, la síndrome de Williams, la deleció 22q11, la síndrome de Miller-Dieker, la síndrome de *cri du chat* i la síndrome de Wolf-Hirschhorn. Si sospitem d'infeccions TORCH (toxoplasmosi, rubeola citomegalovirus, herpes simple i virus d'immunodeficiència humana (VIH)) i Zika seran necessàries la realització de proves serològiques, de neuroimatge i un examen ocular i d'audició²⁸.

Per avaluar formes no sindròmiques o d'etiologia desconeguda es recomana, en primer lloc, l'anàlisi amb bioxips d'ADN. També són recomanables el test per l'X fràgil i un cariotip. Amb dones amb DI greu o profunda es recomana també les proves per a la síndrome de Rett (anàlisi

mutacional del gen *MECP2*)²⁸. Una altra opció menys accessible tècnica i econòmicament, però que identifica la causa genètica d'un 40% de pacients amb DI d'origen desconegut, és la seqüenciació exòmica completa³⁹.

Fins a un 5% dels casos infantils amb DI d'origen desconegut es poden explicar per errors congènits del metabolisme. Per tant, la utilització de test metabòlics específics estarien justificats en cas de sospita. Una prova d'imatge, com pot ser la ressonància magnètica nuclear (RMN), podria ajudar a l'hora de detectar alteracions morfològiques cerebrals.

1.2.5 Diagnòstic diferencial

El diagnòstic de DI s'ha de realitzar en el context dels altres TN, en especial el TEA, ja que són dues patologies que sovint apareixen comòrbidament; però també amb trastorns neurodegeneratius, trastorns específics de l'aprenentatge, trastorns del llenguatge i dèficits sensorials¹⁰.

1.2.6 Comorbiditat

L'evidència científica mostra que les persones amb DI tenen pitjor salut que la resta de persones de la població general i, a més, l'atenció sanitària que reben no acostuma a ser adequada a les seves necessitats. Per tot això veuen disminuïda la seva esperança de vida i tenen una taxa de mortalitat tres vegades superior a la de la població general. També cal esmentar que l'edat i la severitat de la DI són directament proporcionals a l'augment del nombre de malalties comòrbides a la DI⁴⁰.

Pel que fa a l'estat de salut general, les persones amb DI presenten més freqüentment problemes mèdics com epilèpsia, diabetis, obesitat, restrenyiment crònic, síndrome de immunodeficiència adquirida pel VIH, malalties de transmissió sexual, reflux GI, demència, càncer GI, malaltia tiroïdal, osteoporosi, al·lèrgies, paràlisi cerebral, diferents síndromes genètiques i malalties del sistema genitourinari⁴⁰. Per exemple, la paràlisi cerebral o l'epilèpsia són de 3 a 4 vegades més freqüents en persones amb DI que en la població general¹⁰. També s'ha observat una major taxa de malalties dermatològiques, alteracions bucodentals, pèrdua de la sensibilitat, cataractes, anèmia, accidents cerebrovasculars, bronquitis, incontinència urinària, hipertensió, hipercolesterolèmia, trastorns del son, insuficiència cardíaca, migranyes, augment del risc de fractures i increment de la simptomatologia relacionada amb el dolor i la fatiga⁴⁰.

Pel que fa a la salut mental, cal destacar que la presència de trastorns mentals en la població amb DI s'estableix al voltant d'un 35%. El TEA, les alteracions conductuals i les psicosis són les comorbiditats de salut mental més freqüents en la DI. La presència de TEA i d'alteracions de

conducta augmenta a mesura que augmenta el grau de severitat de la DI. El TB, els trastorns afectius i els trastorns de personalitat acostumen a ser més freqüents en els casos de DI lleu. La freqüència dels trastorns d'ansietat és similar en tots els tipus de DI, independentment de la severitat. Estudis epidemiològics també han identificat que la taxa d'abús de substàncies és superior en persones amb DI i, especialment, en persones amb DI lleu⁴¹.

1.2.7 Tractament i pronòstic

El pronòstic de la DI està relacionat amb la presència de condicions mèdiques i psiquiàtriques associades; essent pitjor el pronòstic, de manera directament proporcional, si hi ha una major presència d'aquestes. La falta d'habilitats comunicatives pot predisposar a què hi hagi comportaments destructius i agressius i, quan s'associen a altres diagnòstics psiquiàtrics, el risc de suïcidi augmenta¹⁰. Cal tenir present que les persones amb DI són especialment fràgils i poden patir amb més freqüència explotació i victimització de tot tipus. L'eix principal del tractament és la inclusió del pacient en programes d'intervenció precoç. Les intervencions precoces i continuades poden millorar el funcionament adaptatiu durant tota la infància i posteriorment en l'edat adulta¹⁰.

És clau pel pronòstic i pel benestar de les persones que pateixen DI una bona avaluació, seguiment i, si ho requereixen, tractament. Es prioritzen les intervencions en un entorn segur i conegut per la persona ja sigui nen o adult i on es treballi en equip, no només a nivell clínic, sinó també educatiu i social.

1.3 Esquizofrènia (ESQ)

Històricament el concepte d'ESQ apareix a mitjans del segle XIX quan Morel va introduir el terme "demència precoç". El 1898 Kraepelin va diferenciar alguns tipus del que encara s'anomenava "demència precoç" i va aproximar la malaltia a l'entitat nosològica que encara avui dia coneixem. Però no va ser fins 1908 que, degut a la gran varietat i combinació dels símptomes, Bleuler va utilitzar el concepte "esquizofrènies" per referir-se a aquesta patologia.

L'ESQ és un trastorn psiquiàtric crònic i greu que compta amb antecedents genètics i neurobiològics heterogenis que influeixen en el desenvolupament cerebral precoç i s'expressa com una combinació de símptomes psicòtics positius (al·lucinacions, deliris, desorganització, etc.), negatius (retracció social, aplanament afectiu, anhedònia, disminució de l'energia, abúlia, etc.) i cognitius⁴².

1.3.1. Característiques clíniques i curs de la malaltia

El símptomes característics de l'ESQ comprenen un ventall de disfuncions cognitives, conductuals i emocionals associades a un deteriorament del funcionament laboral i social, encara que cap símptoma concret és patognomònic del trastorn. Cal tenir present que l'ESQ és una síndrome clínica heterogènia i que les persones que la pateixen poden presentar una gran variabilitat en els diferents signes i símptomes que la comprenen¹⁰.

Estadi	Característiques	Diagnòstic	Millorar pronòstic	Afectació
Premòrbid	- Risc genètic i ambiental - No símptomes	- Risc genètic - Història familiar	- Mesures de salut pública	- Cap/lleu - Dèficit cognitiu
Prodròmic	- Dèficits cognitius i socials - Cerca d'ajuda	- Escales diagnòstiques - Anamnesi i exploració psicopatològica - Proves cognitives i d'imatge	- Psicoeducació i prevenció	- Canvis a nivell social i laboral/escolar
Malaltia	- Psicosi aguda - Reaiguda i remissió - Risc de suïcidi	- Anamnesi i exploració - Avaluar consciència de malaltia	- Tractament farmacològic - Intervenció psicosocial	- Pèrdua marcada de funcionalitat - Afectació familiar
Residual	- Psicosi cronicada - Complicacions mèdiques	- Anamnesi i exploració - Tractament de comorbiditat	- Detecció de comorbiditat - Intervenció psicosocial i rehabilitació	- Disminució de la funcionalitat

Els primers signes de la malaltia apareixen molts abans (uns deu anys) dels símptomes psicòtics. Aquesta primera etapa s'anomena fase prodròmica i consisteix en un descens en el funcionament cognitiu i social, que sol iniciar-se en l'adolescència.

Pel que fa al **curs de l'ESQ**, l'aparició de símptomes psicòtics positius, com els deliris i les al·lucinacions, sovint és precedida per l'aparició de subtils canvis perceptius o de pensament. En

un 80-90% de les persones amb ESQ la fase prodròmica té una durada mitjana de 52 setmanes i en un 10-20% els símptomes psicòtics apareixen sense pròdroms.

El debut dels símptomes psicòtics sol aparèixer gairebé sempre al final de l'adolescència o durant els primers anys de l'edat adulta. Així doncs, podem dir que l'ESQ es manifesta generalment entre els 18 i els 25 anys, mentre el còrtex prefrontal encara està en desenvolupament.⁸

Aproximadament un terç dels pacients amb pròdroms progressen fins a presentar símptomes psicòtics francs, un terç presenten nivells mantinguts de símptomes subclínic i, en el terç restant, remeten fins a l'absència de símptomes. Atès que els tractaments farmacològics, actualment disponibles, per a l'ESQ són limitats i, sovint, són poc tolerats, la majoria dels pacients continuen mostrant dèficits substancials en el funcionament social, cognitiu i ocupacional durant tota la seva vida.

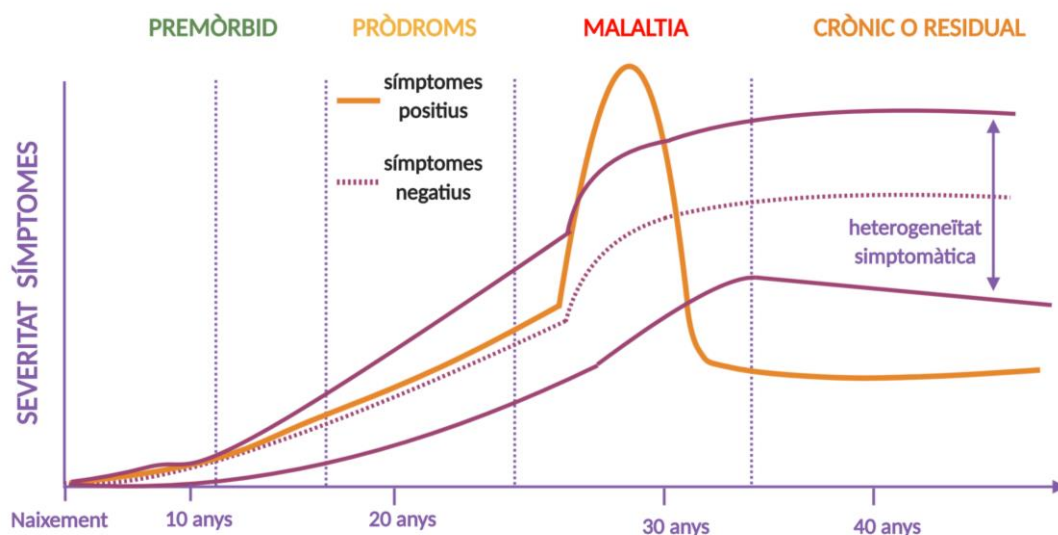


Figura 3. Curs de l'ESQ al llarg de la vida. (Adaptat de Kahn et al. 2015⁴²)

1.3.2. Prevalença

Les últimes dades mundials, del 2016, indiquen una prevalença global de l'ESQ d'un 0'28% i conclouen que no hi ha diferència entre sexes. La càrrega d'aquesta malaltia a nivell mundial presenta una tendència creixent i és especialment devastadora en països amb més dificultats econòmiques i amb dificultats d'accés a l'atenció sanitària, però també és preocupant en països amb ingressos mitjans degut a l'envelliment i a l'augment de població⁴³. Tenint en compte que l'esperança de vida mitjana es situa als 64'7 anys, tot i que és vuit anys menor en homes i en els continents asiàtic i, especialment, africà, es xifren en 14'5 els anys de vida perduts degut a l'ESQ; essent major en homes (15'9 anys) que en dones (13'6 anys)⁴⁴.

1.3.3. Etiologia

Durant més de tres dècades, el paradigma dominant per entendre les contribucions ambientals a l'ESQ ha estat la hipòtesi del neurodesenvolupament. Aquesta hipòtesi ha enfocat l'atenció cap als factors de risc establerts per a l'ESQ que afecten el neurodesenvolupament precoç durant l'embaràs, incloent-hi estrès matern, infeccions maternes, dèficits nutricionals de la mare, retard del creixement intrauterí i complicacions de l'embaràs i del part. L'efecte d'aquests és modest, augmentant a menys del doble el risc d'ESQ i no són factors de risc específic d'ESQ, però en conjunt demostren que noxes en les etapes primerenques augmenten el risc de desenvolupar ESQ al cap de dues dècades⁸. No obstant això, factors socioeconòmics, victimització infantil i la immigració (en la primera i segona generació) també s'han associat a ESQ. També s'ha observat taxes més elevades d'ESQ en individus nascuts a finals d'hivern o principis de primavera, en individus nascuts o criats a les ciutats, i en individus amb pares amb una edat de paternitat avançada (>40 anys) o molt primerenca (<20 anys). També s'ha evidenciat un augment del risc en l'ús de cànnabis a l'adolescència, especialment amb l'ús de compostos amb alt contingut en tetrahidrocannabinol. A més, factors com lesions cerebrals, epilèpsia, malalties autoimmunitàries i infeccions greus també s'han associat amb un major risc per ESQ⁴⁵.

La hipòtesi més plausible sobre l'etiopatogènia de l'ESQ postula que aquesta és el resultat d'una complexa interacció entre genètica i ambient; influint ambdós factors en el desenvolupament del cervell i en la trajectòria d'adaptació biològica a experiències vitals traumàtiques o no⁸.

A la segona meitat del segle XX, coincidint amb les emergents medicacions neurolèptiques, es va focalitzar l'estudi de l'etiologia de l'ESQ al cervell i al funcionament d'aquest i es va considerar que era un "trastorn dopaminèrgic". Aquesta hipòtesi es basava en la capacitat d'inducció de símptomes psicòtics per part de molècules alliberadores de dopamina (com les amfetamines) i la eficàcia antipsicòtica de drogues inhibidores dels receptors dopaminèrgics D2. Més recentment, centrant-se en la etiologia dels símptomes cognitius de l'ESQ, s'ha arribat a la "hipòtesi glutamatèrgica" i també s'ha demostrat una menor activitat dels receptors NMDA de les interneurons inhibidores del còrtex prefrontal⁸. Les hipòtesis que valoren els neurotransmissors com actors principals en aquesta malaltia no han estat confirmades encara, i no està clar si aquestes alteracions són la causa o bé la conseqüència d'aquest trastorn⁸. Estudis en cervells postmortem de pacients amb ESQ han identificat alteracions en la dopamina, el glutamat i el GABA⁸.

Pel que fa al paper de la genètica en l'etiologia de l'ESQ, trobem que és una de les malalties psiquiàtriques amb una major heretabilitat, essent aquesta d'al voltant del 80%⁴⁶. En el mateix

sentit, la concordança en bessons monozigòtics és del 50%; considerablement més alta que en bessons dizigòtics o germans⁸.

Tot i sabedors de l'elevada heretabilitat de l'ESQ, no s'han pogut concretar encara les alteracions genètiques específiques d'aquesta malaltia. Els loci de risc per ESQ coneguts fins ara són CNVs, deleccions o duplicacions de segments d'ADN que van des de milers fins a uns pocs milions de parells de bases⁴⁷. Aquestes, tot i tenir un efecte relativament gran sobre el risc d'ESQ amb una odd ratio d'entre 2 i 60, no contribueixen substancialment al risc de patir ESQ en població general. S'han identificat prop de 120 loci cromosòmics que contenen també variants de susceptibilitat a l'ESQ, la majoria dels quals (108) van ser detectats amb estudis d'associació de genom complet (GWAS, *Genome Wide Association Studies*), que comparen la freqüència de les variants entre casos i controls. Aquests loci contenen al·lels de risc amb freqüències d'≥1%, i cada al·lel individual confereix només una petita part del risc, amb una odds ratio ≤ 1'1. Acumulativament, aquests loci implicats, només expliquen al voltant d'un 3'5% de la variància en l'etiologia de l'ESQ.^{48,49} A part de les variants d'SNPs, s'han identificat també diverses variants genòmiques estructurals com CNVs, SNVs i translocacions. Aquestes variants són rares, és a dir, són poc freqüents, i tenen uns efectes causatius més grans que els SNPs indicats anteriorment, però la majoria no són específiques per a l'esquizofrènia⁸. És important destacar que totes les CNVs associades a ESQ són pleiotròpiques; és a dir, contribueixen al risc d'altres malalties com DI, TEA, TDAH, epilèpsia i a malformacions congènites, per la qual cosa part de la susceptibilitat genètica és compartida en les diferents entitats nosològiques esmentades^{18,48}. Recents consorcis internacionals han combinat dades d'SNPs de diversos estudis independents i han trobat associacions replicables amb gens de la regió del complex major d'histocompatibilitat (MHC) del cromosoma 6p21.3-22.1, del gen *ZNF804A* al cromosoma 2q32.1, del gen neuregulina 1 (*NRG1*) al cromosoma 8, així com el factor de transcripció 4 (*TCF4*) al 18q21.2⁴². Altres estudis han reportat SNPs de gens candidats com el gens de les vies de senyalització com la neuregulina-*ERBB4*, gens de proteïnes sinàptiques com *NRX1*, o de canals de potassi com *KCNH2* o gens que codifiquen altres proteïnes d'expressió cerebral com per exemple la dysbindina^{48,50}. Moltes de les variants estructurals associades a l'esquizofrènia comprenen gens relacionats amb el neurodesenvolupament implicats amb la proliferació i la migració neuronals o la formació de les sinapsis⁵¹. Els gens nuclears *DRD2* (que codifica el receptor D2 de dopamina), *GRM3*, *GRIN2A* i *GRIA1*, (que codifiquen components de receptors de glutamat), el gen *SRR* (que codifica un enzim del receptor NMDA) i una regió àmplia del cromosoma 6 (que conté la regió del complex major d'histocompatibilitat) confereixen un lleuger augment del risc individual de patir ESQ.

En resum, a data d'avui i a l'espera de la publicació del 3r GWAS sobre esquizofrènia, els estudis

genòmics han identificat un total de 108 SNPs de risc i especialment 11 loci de CNVs rares però recurrents, que individualment confereixen un risc relativament elevat d'ESQ¹⁸. Els estudis de seqüenciació completa del genoma han identificat també SNVs de novo i variants d'inserció i eliminació altament patogèniques i que també tindrien un paper rellevant en aquesta malaltia⁴⁵.

També s'ha informat de mutacions específiques en el gen *SETD1A*, que es va detectar com a mutació de novo a una freqüència molt superior a la que s'esperava per atzar, la qual cosa confia en la patogenicitat d'aquesta mutació específica¹⁸. El que no està clar és com aquestes alteracions genètiques es tradueixen en senyals moleculars. Diversos estudis i anàlisis bioinformàtics suggereixen que en la fisiopatologia de l'ESQ hi hauria una alteració de diversos mecanismes relacionats amb la biologia neuronal, funció sinàptica, neurotransmissió glutamatèrgica i senyalització de calci, vies de neurodesenvolupament i la resposta immune^{42,45}.

En últims anys també s'ha relacionat amb l'etiopatogènia de l'ESQ alteracions en el sistema immunològic i en els mecanismes inflamatoris. Un exemple clar d'aquesta relació la trobem en el LES (lupus eritematós sistèmic), una malaltia autoimmune amb un elevat component inflamatori. Al voltant d'un 30% de persones que la pateixen presenten anticossos dirigits contra l'ADN que es creua amb els epítops de la subunitat NR2 de glutamat, un component del NMDAR implicant el l'ESQ. És important destacar que algunes d'aquestes persones desenvolupen símptomes psicòtics. Altres malalties com l'encefalitis autoimmune, també amb anticossos dirigits contra la subunitat NR1 de glutamat de NMDAR, també poden cursar amb simptomatologia psicòtica associada⁵².

1.3.4. Diagnòstic

El diagnòstic d'ESQ es realitza en base als criteris diagnòstics del DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) o l'ICD (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*). Ambdues classificacions tenen en compte els tres eixos de símptomes principals de l'ESQ: positius, negatius i cognitius; així com també la durada d'aquests, el funcionament social i laboral que permeten i l'associació amb altres diagnòstics psiquiàtrics. Així doncs, en l'actualitat, el diagnòstic segueix essent eminentment clínic.

Per a establir el diagnòstic ens podem ajudar d'una entrevista semiestructurada per a recolzar l'orientació diagnòstica. Entre les entrevistes diagnòstiques més utilitzades en el nostre entorn destaquen l' "*Structured Clinical Interview for DSM*" (SCID) pels trastorns de l'Eix I del DSM i la "*Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry*" (SCAN); tot i que n'hi ha moltes més.

Taula 5. Criteris diagnòstics segons el DSM-5 per ESQ

A. Dos (o més) dels símptomes següents, cada un d'ells presents durant una part significativa de temps durant un període d'un mes (o menys si es va tractar amb èxit). Almenys un d'ells ha de ser (1), (2) o (3):
1. Deliris.
2. Al·lucinacions.
3. Discurs desorganitzat (per exemple, disgregació o incoherència freqüent).
4. Comportament molt desorganitzat o catatònic.
5. Símptomes negatius (és a dir, expressió emotiva disminuïda o abúlia).
B. Durant una part significativa del temps des de l'inici del trastorn, el nivell de funcionament en un o més àmbits principals com la feina, les relacions interpersonals o la cura personal, està molt per sota del nivell assolit abans de l'inici (o quan comença en la infància o l'adolescència, fracassa la consecució del nivell esperat de funcionament interpersonal, acadèmic o laboral).
C. Els signes continus del trastorn persisteixen durant un mínim de sis mesos. Aquest període de sis mesos ha d'incloure, al menys, un mes de símptomes (o menys si es va tractar amb èxit) que compleixin el Criteri A (és a dir, símptomes en fase activa) i pot incloure períodes de símptomes prodròmics o residuals. Durant aquests períodes prodròmics o residuals, els signes de trastorn es poden manifestar únicament per símptomes negatius o per dos o més símptomes enumerats al Criteri A presents de forma atenuada (per exemple, creences estranyes, experiències perceptives inhabituals).
D. S'han descartat el trastorn esquizoafectiu i el trastorn depressiu o bipolar amb característiques psicòtiques perquè 1) no s'han produït episodis maníacs o depressius majors de forma concurrent amb els símptomes de fase activa, o 2) si s'han produït episodis de l'estat d'ànim durant els símptomes de fase activa, han estat presents només durant una mínima part de la durada total dels períodes actiu i residual de la malaltia.
E. El trastorn no es pot atribuir als efectes fisiològics d'una substància (per exemple, una droga o medicament) o a altra afecció mèdica.
F. Si existeixen antecedents de TEA o d'un trastorn de la comunicació d'inici en la infància, el diagnòstic addicional d'esquizofrènia només es fa si els deliris o al·lucinacions notables, a més dels altres símptomes requerits per l'esquizofrènia, també estan presents durant un mínim d'un mes (o menys si es va tractar amb èxit).

En un futur, el diagnòstic d'ESQ es podria recolzar de proves complementàries com biomarcadors o proves de neuroimatge donat que hi ha estudis recents que han identificat alteracions a nivell de neuroimatge. Les principals troballes o les que s'han confirmat en més estudis indiquen que hi ha diferències en el volum cerebral; concretament una reducció de la matèria grisa i blanca amb el corresponent augment del volum ventricular⁴², essent aquestes més pronunciades amb pacients amb una pitjor evolució. També s'han observat diferències en l'activació i en la connectivitat de zones cerebrals en la neuroimatge de pacients respecte a controls⁵³.

Els estudis genètics realitzats en l'ESQ encara no tenen aplicació clínica directa. Les proves de CNV amb anàlisi de bioxips d'ADN, com ja hem revisat, són una prova de diagnòstica rutinària de primera línia en TEA i DI, trastorns en què el 10-20% dels casos tenen una deleció o duplicació de l'ADN clínicament rellevant. En l'ESQ la prevalença de CNVs clínicament rellevants és d'aproximadament el 2'5%, i també s'ha suggerit l'ús d'anàlisi de bioxips d'ADN com a prova diagnòstica. Una prova positiva tindria conseqüències per a l'assessorament genètic i la gestió

mèdica, ja que moltes CNVs s'associen amb patrons específics de morbiditat física. Un diagnòstic genètic també podria tenir beneficis psicològics per als pacients i les seves famílies, reduint l'estigma i la sensació de culpabilitat pel diagnòstic^{45,54}.

Actualment s'està treballant en el desenvolupament d'algoritmes de risc que podrien ajudar al diagnòstic. Aquests algoritmes combinarien els factors de risc genètic, la història familiar, variables ambientals (exposició a drogues, victimització, etc.) i marcadors de desenvolupament^{55,56}.

1.3.5. Diagnòstic diferencial

Aquest s'ha de fer sempre amb tots els altres trastorns psicòtics com el trastorn depressiu major o el TB amb característiques psicòtiques o catatòniques, el trastorn esquizoafectiu, trastorn esquizofreniform, trastorn psicòtic breu, i trastorn delirant. També caldrà considerar altres trastorns que comparteixen alguns símptomes o trets característics, com per exemple: trastorn de la personalitat esquizotípica, TOC, trastorn dismòrfic corporal, i trastorn d'estrès post-traumàtic i TEA.

1.3.6. Comorbiditats

Les persones que pateixen ESQ presenten un major risc de patir malalties físiques així com una mortalitat prematura comparat amb població general⁵⁷.

El tabaquisme i l'obesitat són dues comorbiditats importants i molt freqüents en persones amb ESQ, així com també paràmetres de la síndrome metabòlica com augment dels triglicèrids, alteració de la glicèmia, o augment de les xifres de tensió arterial. Alguns estudis han determinat una dependència a nicotina en un 58-90% dels casos i síndrome metabòlica en un 40% de persones que pateixen ESQ⁸. Altres condicions comòrbides que s'associen a l'ESQ són la dependència de l'alcohol i altres tòxics, el sedentarisme i hàbits alimentaris irregulars que acaben repercutint en la salut de les persones amb ESQ i contribueixen a la mortalitat prematura⁵⁷.

1.3.7. Tractament i pronòstic

Els antipsicòtics són, després del descobriment de la clorpromazina fa més de 60 anys, el tractament de primera elecció per al tractament de l'ESQ. Tots els antipsicòtics, tant de primera com de segona generació, actuen bloquejant d'alguna manera els receptors de la dopamina i, com a conseqüència, tenen un perfil comú d'efectes secundaris, amb algunes diferències entre les dues generacions d'antipsicòtics. S'estan duent a terme, sense èxit fins al moment, alguns estudis amb fàrmacs que afectarien altres vies de neurotransmissió, que també estan involucrades amb la malaltia com la glutamatèrgica o la colinèrgica.

Al tractament farmacològic s'hi afegeixen intervencions psicosocials com la teràpia cognitiva-conductual, rehabilitació cognitiva, tractament comunitari multidisciplinar, promoció d'hàbits higiènic-dietètics i d'activitat física, intervenció en crisi, suport ocupacional i/o laboral, suport familiar i de l'entorn... que han demostrat la seva eficàcia quan es combinen amb el tractament farmacològic.

El pronòstic de l'ESQ, igual que el seu curs, és variable i pot anar des d'una recuperació total fins a necessitar cures i atenció de manera crònica. L'esperança de vida de les persones amb ESQ es veu reduïda de mitjana entre 15 i 20 anys quan ho comparem amb la de la població general⁴². Això és degut, especialment, a les condicions mèdiques comòrbides, principalment diabetis, malaltia cardiovascular, malaltia pulmonar obstructiva crònica i càncer. Aquestes patologies escurcen l'esperança de vida molt més que esdeveniments com accidents, suïcidis o homicidis.

2. Mitochondri

2.1. Qüestions generals

Els mitocondris són orgànuls cel·lulars amb doble membrana i forma ovoidal que tenen al voltant d'un micròmetre de diàmetre. Es troben en constant moviment dins del citosol i contínuament s'estan fusionant i dividint. Poden variar de mida i de forma segons l'activitat metabòlica de la cèl·lula que els conté. En l'ésser humà es troben en totes les cèl·lules a excepció dels glòbuls vermells. El nombre de mitocondris per cèl·lula depèn del tipus cel·lular i, en especial, dels requeriments energètics de cada teixit; així doncs en teixits amb una despesa energètica elevada, com múscul o cervell, hi podem arribar a trobar 2.000 mitocondris per cèl·lula a diferència de teixits amb baix requeriment energètic com l'epitelial que n'hi poden haver només 10^{58} .

2.2. Origen

L'any 1967 la biòloga Lynn Margulis postulà la teoria endosimbiòtica segons la qual els mitocondris eren a l'inici, fa més de mil milions d'anys, bacteris de vida lliure que van ser fagocitats per una altra cèl·lula, originant així les cèl·lules eucariotes originals⁵⁹. Amb el temps, van transferir gran part del seu material genètic al nucli, però també van conservar una part del seu propi ADN. Aquesta relació simbiòtica dels mitocondris ens permet, com a organismes eucariotes, generar energia en forma d'ATP a través de la fosforilació oxidativa, que es duu a terme per la cadena de transport d'electrons mitocondrial.

2.3. Estructura

Els mitocondris estan formats per una membrana externa, una membrana interna, un espai intermembranós entre ambdues membranes i un espai intern delimitat per la membrana interna denominat matriu mitocondrial. La morfologia d'aquests orgànuls és molt variable, des de llargues estructures ramificades a petits el·lipsoides.

- ❖ **Membrana externa:** És una bicapa fosfolípídica llisa que engloba tot l'òrgànul. És altament permeable i conté moltes unitats de la proteïna porina que forma canals aquosos a través de la bicapa lipídica esdevenint una espècie de colador que és permeable a molècules més petites de 5.000 daltons, incloent-hi petites proteïnes. És important mantenir aquesta permeabilitat per tal de permetre un gradient de protons estable. Aquesta membrana forma diversos plecs cap a l'interior de l'òrgànul, denominats crestes mitocondrials, que és on s'hi troben les cadenes respiratòries i l'ATP sintasa^{60,61}.

- ❖ **Espai intermembranós:** És l'espai entre la membrana externa i la interna. Conté ions i sucres en una concentració similar al citosol cel·lular, així com també altres proteïnes clau per a l'adequada funció mitocondrial com el citocrom C^{60,61}.
- ❖ **Membrana interna:** També consisteix en una doble capa lipídica que forma replers o invaginacions, les crestes mitocondrials, que li confereixen molta més superfície que l'externa. Contràriament a l'externa, tan sols és permeable al pas de petites molècules i ions. De fet, només és permeable a O₂, CO₂ i H₂O i, per això, disposa de diverses proteïnes de transport que permeten el pas de metabòlits, com el piruvat, cap a l'interior del mitocondri. Té un contingut proteic molt elevat, per l'elevat nombre de tàndems de cadenes polipeptídiques que conté.^{60,61}

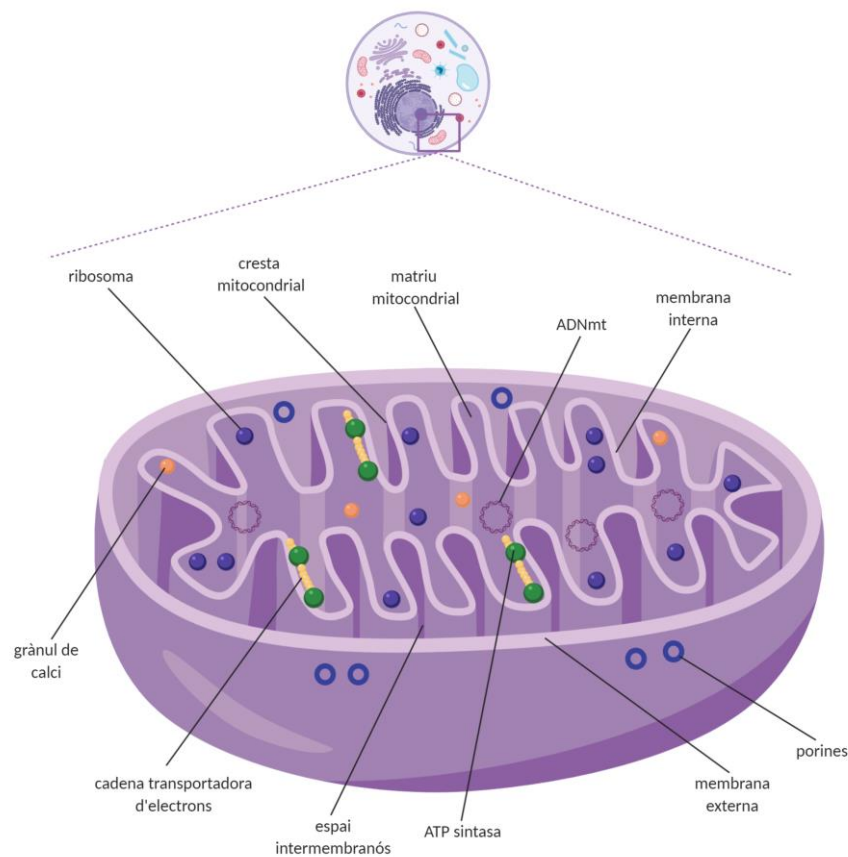


Figura 4. Parts del mitocondri.

- ❖ **Matriu mitocondrial:** Està formada en un 50% per aigua i és l'espai on es produeixen diferents reaccions metabòliques. S'hi troben les molècules d'ADN, els ribosomes i els enzims i metabòlits necessaris per dur a terme diferents processos metabòlics mitocondrials^{60,61}.

Concretament, els 13 gens proteics codifiquen per 7 subunitats del complex I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 i ND6); 1 subunitat del complex III (citocrom b); 3 subunitats del complex IV (COXI, COXII i COXIII); i 2 subunitats del complex V (ATP6 i ATP8). Totes les subunitats del complex II estan codificades pel genoma nuclear (ADNn). La replicació, transcripció i traducció de l'ADNmt estan controlades per una sola regió no codificant, coneguda com a bucle de desplaçament (D-loop, de l'anglès *Displacement loop*)⁶³.

2.4.3. Codificació de l'ADNmt

Hem de tenir en compte que el mitocondri està format per ~1500 tipus de proteïnes que estan codificades en el genoma nuclear (~1.200 gens, 2 còpies) i per 13 proteïnes codificades en el genoma mitocondrial (37 gens, dels que n'hi pot haver fins a milers de còpies)⁶³.

Taula 6. Número de subunitats codificades per ADNmt i ADNn en els complexos de la CRM.

	CI	CII	CIII	CIV	CV	Total
ADNn	37	4	10	11	17	79
ADNmt	7	0	1	3	2	13

Els gens nuclears codifiquen per a components anatòmics del mitocondri, del metabolisme mitocondrial intermedi, així com per a la biogènesi mitocondrial i per a la regulació del propi mitocondri⁶⁵. Una mutació en algun punt del genoma, que porti a una alteració en la funció mitocondrial, pot conduir a greus malalties mitocondrials "primàries"^{66,67}.

En referència a l'ADNmt, les dues cadenes de l'ADNmt tenen una distribució asimètrica de guanines i citosines generant així la cadena pesant (H, de l'anglès *heavy*) i lleugera (L, de l'anglès *light*). La replicació té el seu inici en la regió D-loop, que és una regió de triple cadena generada per la síntesi d'una peça curta d'ADN de la cadena H, l'ADN 7S i la cadena L. La cadena pesant codifica per la majoria de gens, mentre que la lleugera tan sols conté els gens per a la subunitat 6 de la NADH (dinucleòtid de nicotinamida-adenina) deshidrogenasa i vuit RNAs de transferència (RNAt)⁶³. Mutacions en l'ADNmt també poden portar a malalties.

2.4.4. Mutacions en l'ADNmt

L'ADNmt s'hereta quasi exclusivament via materna essent l'òcit el que aporta la immensa majoria de l'ADNmt en la fecundació i, posteriorment, en la primera fase de l'embriogènesi, s'acaben d'eliminar les escasses molècules d'ADNmt aportades per l'espermatozoide. Tot i així, en els últims anys s'han recollit casos concrets d'herència de l'ADNmt per via biparental⁶⁸. Encara que la transmissió per via materna es manté absolutament dominant mentre que la paterna seria ocasional. S'està treballant per elucidar aquest mecanisme d'herència inusual que podria

aportar nous coneixements sobre l'herència mitocondrial, així com noves vies per al tractament d'alteracions en els mecanismes d'herència de l'ADNmt.

És indispensable destacar l'elevada taxa de mutació de l'ADNmt, de fins a 10 vegades superior si la comparem amb la de l'ADNn. Això es dona per la manca d'histones que protegeixen les doble hèlix d'ADNmt, així com per un excés de molècules ROS (de l'anglès, *Reactive Oxygen Species*), subproductes de la fosforilació oxidativa que, juntament amb una absència de sistema de reparació de mutacions, fan de l'ADNmt un ADN làbil i acumulador de mutacions al llarg de l'evolució de les espècies⁶⁹. A més, compta amb mecanismes de correcció d'errors poc eficients durant la replicació⁷⁰.

Mentre que mutacions a cèl·lules de la línia germinal provoquen malalties d'herència materna, l'acumulació de mutacions somàtiques en teixits postmitòtics pot desembocar en un declivi progressiu del metabolisme mitocondrial, participant en el desenvolupament de malalties heretades i també en l'envelliment⁷¹. L'inici tardà i el curs progressiu de moltes malalties mitocondrials suggereixen que el funcionament dels mitocondris va empitjorant amb el temps i, això, contribueix a l'envelliment fisiològic^{72,73}. Fou a la dècada dels vuitanta que es posà de manifest que mutacions de canvi de nucleòtid i delecions en l'ADNmt podien ser causa de malaltia en humans. Des de llavors, s'ha constatat que defectes en l'ADNmt, ja siguin heretats o adquirits, són l'origen de malalties heterogènies en edat pediàtrica i adulta. Aquestes mutacions en l'ADNmt es sumen a d'altres en l'ADNn que codifiquen per gens mitocondrials o gens relacionats amb la replicació i manteniment de l'ADNmt i que, en conjunt, conformen tots els orígens coneguts de les malalties genètiques mitocondrials^{63,64}.

2.4.4.1. Heteroplàsmia

A l'hora de valorar els efectes patogènics d'una mutació mitocondrial, cal tenir en compte l'heteroplàsmia. Aquest concepte designa l'existència de diferents tipus de molècules d'ADNmt en un individu, teixit, cèl·lula o mitocondri, fenomen molt freqüent degut a la presència de múltiples còpies d'ADNmt en el mitocondri i de l'elevada taxa de mutació de l'ADNmt que afavoreix l'aparició de variants⁶³. Contràriament, el concepte d'homoplàsmia es refereix a la presència d'una única seqüència d'ADNmt en el mitocondri, en la cèl·lula, teixit o individu. La majoria de mutacions patogèniques en l'ADNmt són heteroplàsmiques, és a dir, coexisteixen molècules d'ADNmt salvatge o *wild-type* i d'ADNmt mutat dins d'una mateixa cèl·lula. Els nivells alts d'heteroplàsmia es refereixen a cèl·lules amb alts nivells d'ADNmt mutat i nivells baixos d'ADNmt de tipus salvatge, mentre que nivells baixos d'heteroplàsmia es refereixen a cèl·lules amb nivells baixos d'ADNmt mutat i nivells alts d'ADNmt salvatge⁶³. Variacions en el percentatge

d'ADNmt mutat respecte al salvatge donen lloc a variacions graduals en la funció del mitocondri i poden produir una elevada variabilitat fenotípica. D'altra banda, les mutacions en l'ADNmt es van acumulant als teixits amb el pas dels anys produint, també, una disminució de la funció mitocondrial que pot exacerbar altres defectes presents en els gens mitocondrials, ja sigui en l'ADNmt o en l'ADNn, produint d'aquesta manera una deficiència en els sistemes bioenergètics que podria afavorir la simptomatologia neuropsiquiàtrica. Aquestes mutacions, que s'acumulen amb l'edat, poden jugar un paper important en l'etiopatogènia de malalties neurodegeneratives com, per exemple, l'Alzheimer o Parkinson⁶⁵. Un estudi recent demostra que, de mitjana, cada individu és portador d'una variant heteroplàsmica, i un de cada vuit individus és portador d'una variant heteroplàsmica associada a malaltia, encara que amb una freqüència menor a l'1%⁷⁴.

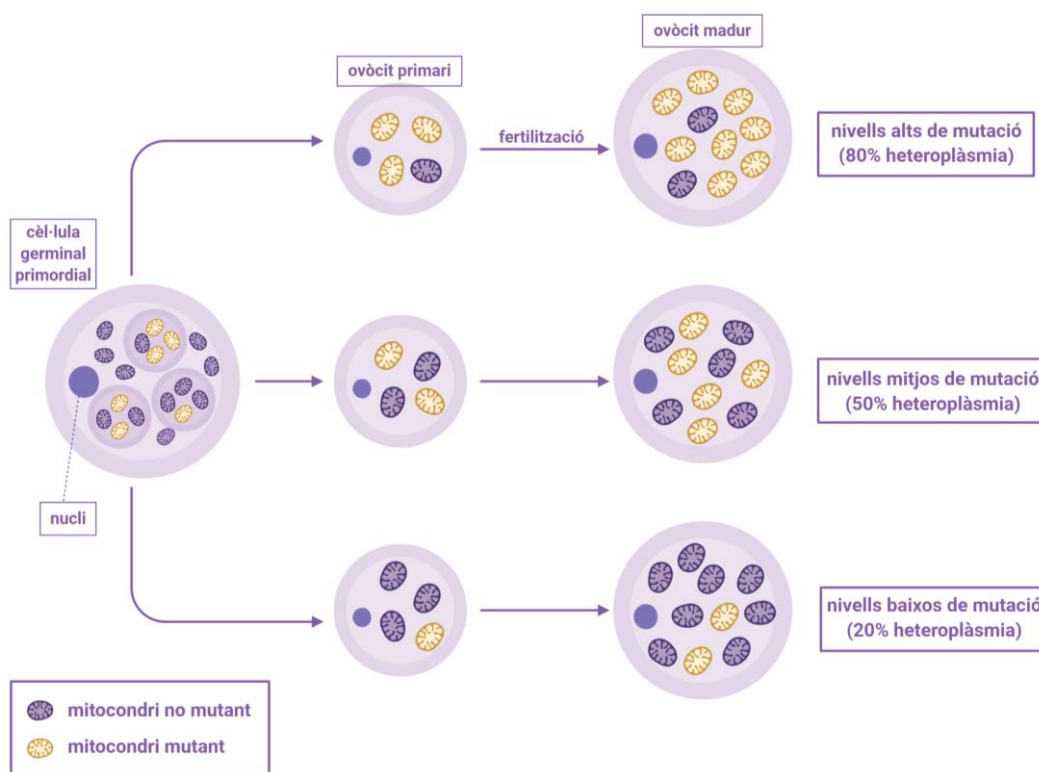


Figura 6. Exemples de transmissió d'ADNmt heteroplàsmica de la mare a la seva descendència. (Adaptat de Gorman et al. 2016⁶³)

El llindar o nivell d'heteroplàsmia a partir del qual es produeix una determinada deficiència depèn del tipus de mutació, és a dir, de l'efecte d'aquesta, i del tipus cel·lular afectat. Típicament, es requereixen nivells alts d'ADNmt mutat (>50%) per produir defectes del funcionament cel·lular, però algunes mutacions d'ADNmt només generen deficiències si es presenten en nivells molt elevats (>80-90%). Aquestes últimes solen ser mutacions en l'ARNt. Altres, però, poden produir alteracions funcionals al voltant de nivells d'heteroplàsmia del 60%⁶³.

2.4.4.2. Haplogrups

L'ADNmt ha anat incorporant, al llarg del procés d'evolució humana, variants que han quedat fixades en la molècula d'ADNmt i que estan agrupades segons els processos de migració. Aquests grups de variants formen el que es coneix com haplogrups i han seguit una distribució geogràfica clara fins el fenomen recent de globalització. La seqüència d'ADNmt que cada persona ha heretat s'anomena haplotip i el conjunt d'haplotips que tenen un origen comú conformen el que es coneix com haplogrup. Això és degut a que l'haplotip fundador va adquirir variants funcionals de l'ADNmt que van conferir alguns canvis en el metabolisme mitocondrial. Aquestes alteracions resultants van permetre als nostres avantpassats adaptar-se a nous factors ambientals com ara fonts d'aliments alternatives, canvis en la necessitat d'activitat física, variacions d'altitud geogràfica o de temperatura i protecció front a diversos agents infecciosos. Com a resultat, cada haplogrup d'ADNmt té variacions en la fisiologia mitocondrial particulars que cofereixen algunes particularitat en la fisiologia mitocondrial dels individus⁶⁶.

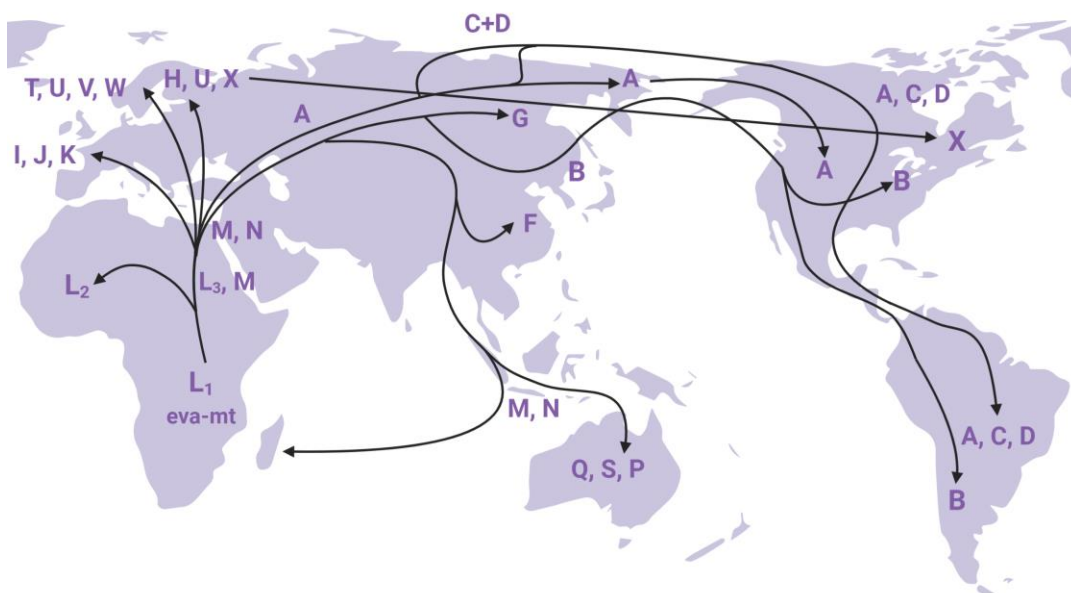


Figura 7. Distribució de l'ADNmt al món durant l'evolució de l'espècia humana. (Adaptat de Pei et al. 2018⁶⁶)

Aquests haplogrups mitocondrials, a part de ser rellevants en l'adaptació fisiològica normal, també tenen un paper clau en la modulació del risc de desenvolupar malalties que afecten diversos sistemes de l'organisme humà. Per exemple, en la diabetis^{75,76}, càncer⁷⁷⁻⁸⁰ i també en els trastorns psiquiàtrics^{81,82}. És important destacar que aquestes variants o SNPs que confereixen cert risc per determinades malalties requereixen d'altres factors genètics i/o ambientals per a produir un determinat efecte i, també, que pertànyer a un determinat haplogrup pot influir en la penetrància d'alteracions genètiques presents en el genoma nuclear. Aquests efectes es poden explicar bioquímicament pel fet que una mateixa mutació pot modular

l'activitat enzimàtica en funció de l'haplogrup d'ADNmt on és present. Per tant, encara que les diferències siguin modestes, poden tenir repercussions funcionalment rellevants en les proteïnes de la CRM i en el nombre de còpies d'ADNmt⁶².

2.4.4.3. Tipus de mutacions en l'ADNmt

Existeixen delecions, duplicacions i insercions en el genoma mitocondrial que poden portar canvis en la longitud de la molècula d'ADNmt, a més de variants que consisteixen en la modificació d'un únic nucleòtid que són patològiques. Cal tenir en compte, però, que les variants més freqüents són els SNPs que també comporten un canvi de nucleòtid i que estan presents en més d'un 1% de la població. La gran variabilitat de genoma mitocondrial confereix gran variabilitat a l'expressivitat dels gens mitocondrials⁸³.

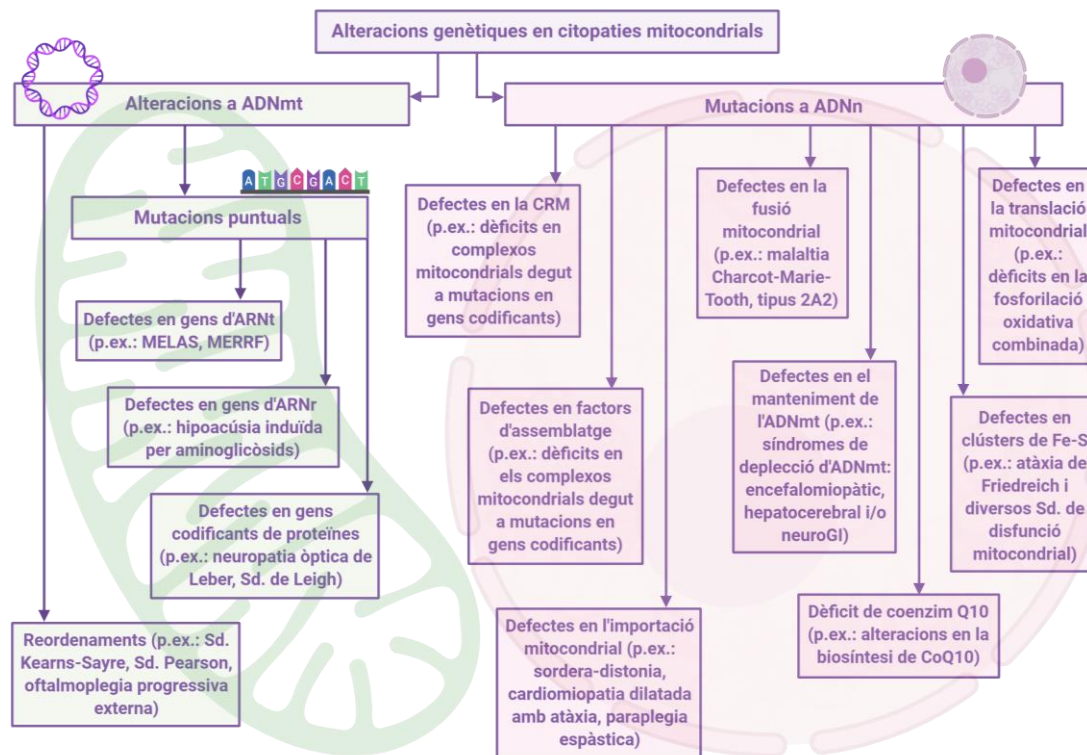


Fig 8. Alteracions genètiques que porten a disfunció mitocondrial. (Adaptat d'El-Hattab et al. 2016⁸³)

L'acumulació de determinades variants pot ser específica en determinats teixits, suggerint que factors no genètics presents en els teixits poden aplicar una pressió selectiva que influeixi en la segregació de certes mutacions de ADNmt. Tanmateix, els processos genètics i no genètics i, possiblement, també epigenètics, han d'interactuar per influir en l'heteroplàsmia de ADNmt i, en conseqüència, en la progressió de les malalties mitocondrials. Defectes mitocondrials subtils, resultants de mutacions heterozigotes en gens nuclears o mutacions heteroplàsmiques en l'ADNmt, a partir d'un percentatge determinat d'heteroplàsmia, poden reduir la funció

mitocondrial suficientment fins a aconseguir uns nivells bioenergètics de la cèl·lula insuficients que alterarien la funció mitocondrial normal⁶². Així doncs, a mesura que augmenta la proporció d'ADNmt mutat, la producció d'energia mitocondrial va disminuint fins que el nivell queda per sota del llindar bioenergètic mínim pel correcte funcionament d'aquest orgànu, fet que condueix a l'aparició dels símptomes clínics. Aquestes mutacions, ja es trobin a gens codificats de l'ADNmt o en l'ADNn, estan associades a un dèficit en el sistema de producció d'energia. Poden actuar a diferents nivells alterant directament les subunitats de la cadena transportadora d'electrons, compromentent el manteniment i/o l'expressió de l'ADNmt, modificant els patrons de regulació de la biogènesi mitocondrial o de l'activitat fosforilativa, empitjorant el transport i la síntesi de nucleòtids, o bé, canviant la composició i la dinàmica de les membranes mitocondrials⁵⁸.

Trobem diferents alteracions genètiques en l'ADNmt clínicament rellevants: mutacions puntuals, delecions, duplicacions, insercions, depleció mitocondrial i alteració en el número de còpies d'ADNmt^{65,66}:

- ❖ Les **mutacions puntuals** es produeixen en el moment que canvia la posició d'un parell de bases per una altra. Hi ha diverses malalties associades a mutacions puntuals de l'ADNmt, les quals presenten manifestacions clíniques molt heterogènies, entre les quals hi predominen la debilitat muscular, la hipotonia, la fatiga i episodis d'ataxia⁸⁴. Aquesta heterogeneïtat es pot explicar per l'existència d'**heteroplàsmia**; és a dir, proporcions diferents d'ADNmt salvatge i mutat en funció del teixit. A més, la proporció d'ADNmt mutat pot variar entre individus, entre teixits del mateix individu i entre cèl·lules d'un mateix teixit. A més, cada teixit pot tenir un llindar diferent de molècules d'ADNmt mutat per expressar la malaltia. Hi ha mutacions presents en les regions que corresponen als ARNt, als ARNr i a les regions codificants per proteïnes. Algunes d'elles són les causants de malalties mitocondrials com MELAS, MERRF o LHON, entre d'altres que repassarem en l'apartat següent.
- ❖ Les **delecions** poden ser simples (pèrdua d'una única regió en totes les molècules delecionades) o múltiples (pèrdua de diferents fragments en distintes molècules) que poden comportar la pèrdua des d'unes poques bases fins a grans fragments d'ADN. Freqüentment, afecten a la regió compresa entre el gen del citocrom b (*MT-CYB*) i el de la subunitat I de la citocrom oxidasa (*MT-CO1*). La majoria són esporàdiques, tot i que també s'han detectat delecions heretades. En aquest sentit s'han descrit un gran número de delecions que van des d'una kilobase (kb) fins a 8 kb. La deleció més comuna té una extensió de 4.977kb, del nucleòtid 8.470 al 13.447, del gen *MT-ATP8* al *MT-ND5*

suprimint gens clau per manteniment de la funció mitocondrial. Causa una pèrdua de quasi un terç del genoma de l'ADNmt i s'ha associat a la malaltia d'Alzheimer, la síndrome de Pearson, de Kearns-Sayre i amb el càncer. També s'ha associat a altres processos fisiològics com l'envelliment, essent un indicador d'estrès oxidatiu. Les delecions són rarament detectades en teixits amb una elevada taxa de recanvi, com per exemple el teixit sanguini. És possible que els ADNmt delecionats es perdin per selecció clonal en aquests teixits i, per contra, s'acumulin en teixits postmitòtics (cervell, múscul...) ^{85,86}.

- ❖ A les **duplicacions** es troba la presència repetida d'alguns segments d'ADNmt. En sang sí que es detecten duplicacions, cosa que facilita la cerca de mutacions de manera poc invasiva ^{85,86}.
- ❖ Una alteració en el número de còpies d'ADNmt, generalment una disminució, s'ha considerat també una alteració de l'ADNmt. Els mecanismes moleculars responsables d'aquest fenomen que s'ha anomenat **deplecció** no es coneixen del tot, però estan relacionats amb la replicació d'aquesta molècula. La deplecció de l'ADNmt és causa de determinades malalties que es tractaran en el punt 3.
- ❖ A través de l'evolució de la nostra espècie s'han anat inserint alguns fragments de seqüències de l'ADNmt al genoma nuclear. S'estima que formen part en un 0'016% del genoma nuclear i s'anomenen NUMT (*nuclear inserts of mtDNA*) podent ocasionar interrupcions en la lectura de l'ADNn ^{65,87,88}.

2.5. Funcions del mitocondri

El mitocondri té moltes funcions, totes claus en els principals processos vitals:

- 1) **Producció d'ATP:** L'ATP és la forma d'energia que les cèl·lules utilitzen per poder desenvolupar la seva activitat fisiològica (manteniment de gradients de ions a través de les membranes cel·lulars, acumulació i alliberament de les vesícules sinàptiques, tràfic de receptors i canals de ions a la superfície cel·lular, senyals intracel·lulars, transcripció genètica i regulació en mecanismes epigenètics). La producció d'energia és la funció principal del mitocondri ja que aquest proporciona al voltant d'un 90% del requeriment cel·lular d'ATP. L'ATP es genera a partir de l'oxigen, per això, aquest procés també és conegut com a respiració cel·lular aeròbica, i la glucosa, per un seguit de processos que tenen lloc als cinc complexos proteics de la membrana mitocondrial interna. La glicòlisi porta a la descarboxilació del piruvat per tot seguit tenir lloc el cicle de Krebs i, finalment, la fosforilació oxidativa. La cadena de transport d'electrons consisteix en una

sèrie de 4 complexos enzimàtics que es troben a la membrana mitocondrial interna i que funcionen acobats a l'ATP sintasa^{63,89,90}.

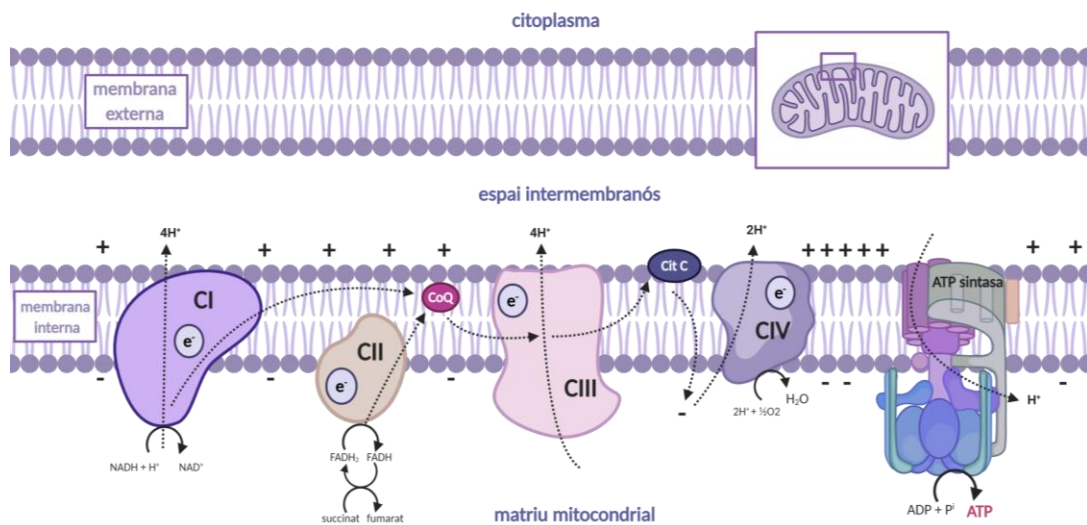


Figura 9. Esquema de la CRM i l'ATP sintasa. (Adaptat de Gorman et al. 2016⁶³)

Durant la fosforilació oxidativa, els cofactors reduïts generats a partir de l'oxidació de nutrients, com la glucosa, donen electrons al complex I així com al complex II. Els electrons es passen de complex a complex, per un conjunt de reaccions. El flux d'electrons està acoblat al bombeig de protons des de la matriu mitocondrial fins a l'espai intermembrana, formant un gradient electroquímic que s'utilitza per impulsar la producció d'ATP⁸⁹.

Taula 7. Complexes de la CRM.

Complex	Nom	Constituents*	Acció
I	NADH-deshidrogenasa	25 polipèptids (7)	Oxidació NADH
II	Succinat deshidrogenasa	5 polipèptids (0)	Oxidació substrats FADH ₂ dependents
III	Citocrom C oxidorreductasa	11 subunitats (1)	Oxidació substrats FADH ₂ i NADH dependents
IV	Citocrom C oxidasa	13 subunitats (3)	Transferència d'equivalents reductors del citocrom C a l'oxigen molecular
V	ATP sintasa	2 subunitats 12-14 polipèptids (2)	Converteix el gradient transmembrana a energia (ADP passa a ATP)

*entre parèntesi els codificats per l'ADNmt. (Adaptat d'Eiris et al. 2008⁹⁰)

- 2) **Regulació del Calci:** El mitocondri té un paper rellevant en l'homeòstasi del calci. Aquest es un segon missatger principal que contribueix a la regulació de la neurotransmissió i participa en la plasticitat neuronal⁹¹.
- 3) **Espècies reactives d'oxigen (ROS):** El mitocondri és la principal font intracel·lular de ROS derivades de les reaccions pròpies d'aquest orgànul cel·lular com a subproducte de la fosforilació oxidativa. Poden portar a un dany oxidatiu dels lípids, proteïnes i del propi

ADN i han estat també implicades en diverses malalties i en el procés d'envelliment. Cal destacar però, que el mitocondri sa és capaç d'usar diversos antioxidants com el coenzim Q10, la creatina o el glutatió per contrarestar l'efecte de les ROS. Tot i la seva indubtable contribució a la disfunció i, fins i tot, a la mort cel·lular hi ha dades que semblen indicar que les ROS també tindrien una funció fisiològica en la plasticitat sinàptica amb efectes sobre l'aprenentatge i la memòria⁹².

- 4) **Intervenció en estrès:** En la resposta de *fight-or-flight* quan hi ha un factor estressant per l'organisme es requereix energia en forma d'ATP per nodrir els comportaments de supervivència. Aquesta resposta a l'estrès augmenta la disponibilitat de substrats energètics, com la glucosa, que el cervell utilitza com a combustible. A més, les hormones esteroides com els glucocorticoides, són sintetitzades i metabolitzades pels mitocondris; a alts nivells d'exposició a aquestes hormones, els mitocondris disminueixen la capacitat d'amortiment del calci cosa que si es perpetua afavoreix la sensibilització a la mort cel·lular, també per augment de l'estrès oxidatiu, fragmentació mitocondrial i danys a l'ADNmt⁹³⁻⁹⁷.

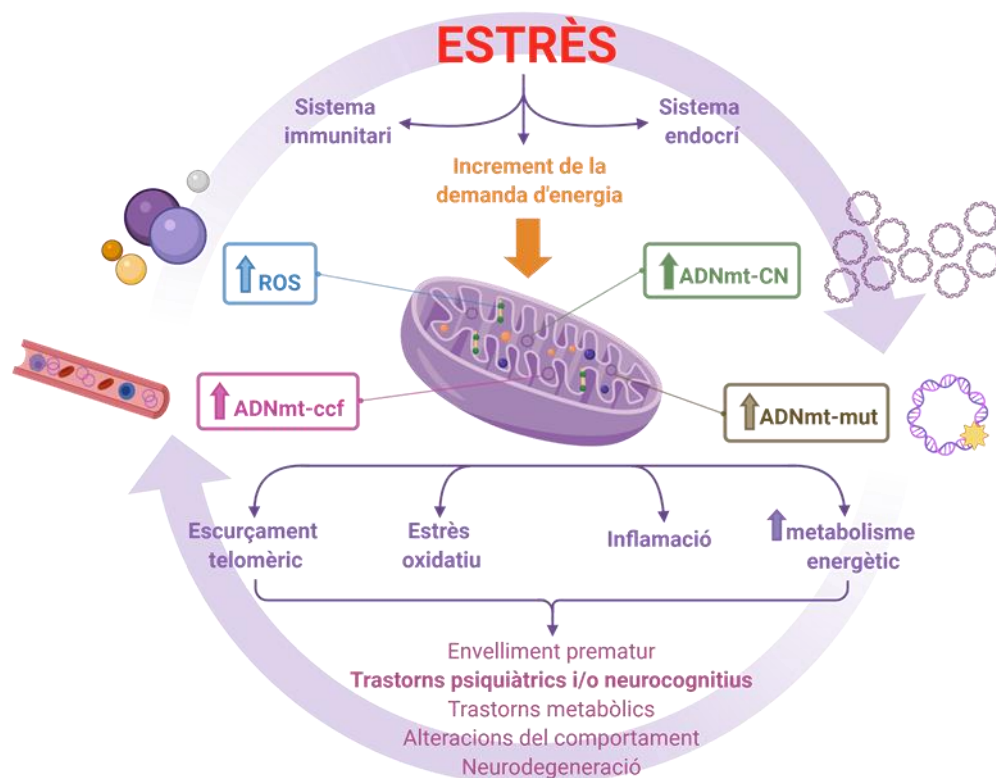


Figura 10. Interacció de l'exposició a l'estrès i les alteracions mitocondrials a través dels sistemes inflamatori i endocrí i conseqüències en població vulnerable. (Adaptat de Daniels al. 2020⁹⁸) [ROS: espècie reactiva d'oxigen; ADNmt-ccf: ADNmt circulant cell-free; ADNmt-CN: número de còpies d'ADNmt; ADNmt-mut: mutacions en l'ADNmt.]

- 5) **Apoptosi:** El mitocondri participa activament en l'apoptosi, tant en la via intrínseca com en l'extrínseca. És un procés fisiològic que es dona en el desenvolupament del cervell, especialment durant la neurogènesi⁸⁵.
- 6) **Activitat sinàptica i plasticitat neuronal:** Els mitocondris es mouen constantment al llarg dels axons i les dendrites, dividint-se i fusionant-se en resposta als canvis sinàptics i ajudant-ne a regular l'activitat. També són essencials per les funcions cerebrals. Tenen un paper clau en la neurotransmissió, en la plasticitat neuronal a curt i llarg termini, en la resistència cel·lular a l'estrès i en l'adaptació conductual. Alteracions en aquests processos metabòlics donen lloc a una gran varietat de malalties com les inflamatòries, metabòliques, tumorals i també als trastorns neuropsiquiàtrics⁹².
- 7) **Altres funcions:** Els mitocondris són també el lloc físic on esdevenen altres processos metabòlics cel·lulars clau, com la beta-oxidació dels àcids grassos, el cicle de l'urea i el cicle de Krebs. A més, són fonamentals per a l'homeòstasi cel·lular i participen en la senyalització intracel·lular, la síntesi d'ATP al teixit adipós marró, la síntesi del grup hemo al fetge i als precursors d'eritròcits, i la síntesi de diversos metabòlits com aminoàcids, fosfolípids, nucleòtids, etc^{60,61}.

2.6. Metabolisme mitocondrial

El sistema cardiorespiratori (pulmons, cor i sistema vascular) transporta oxigen i nutrients fins a les cèl·lules. Els aliments ingerits a través de la dieta són metabolitzats a través dels processos de digestió fins a obtenir molècules com la glucosa, que entren a l'interior de la cèl·lula i són catabolitzades en molècules més senzilles. Les molècules reduïdes de NAD i FAD (dinucleotid de flavina-adenina), NADH i FADH₂, resultants del metabolisme cel·lular, inicien la transferència i el flux d'electrons a través de la CRM on l'oxigen que respirem actua com a receptor d'electrons últim, mentre els protons són bombejats a través dels diferents complexos (I-IV) a l'exterior del mitocondri. El sistema cardiopulmonar proporciona així l'agent oxidant (oxigen) i el sistema GI proporciona els agents reductors (substrats alimentaris). Aquesta seqüència molecular d'esdeveniments genera un potencial electroquímic transmembrana a través de la membrana mitocondrial interna a partir del que mengem i respirem, aprofitada, finalment, per a la síntesi d'adenosina trifosfat (ATP), que permet la majoria de les reaccions cel·lulars que sostenen la vida, essent al voltant del 90% de l'energia requerida per l'organisme humà i garantint un funcionament cel·lular adequat^{62,86}. El recanvi mitocondrial és elevat i constant gràcies a l'equilibri entre la biogènesi mitocondrial i a la mitofàgia, que consisteix en la destrucció dels mitocondris defectuosos. La correcta funció mitocondrial és essencial per a un conjunt de

funcions vitals que tenen un requeriment energètic molt elevat, com la contracció muscular, l'alliberament dels neurotransmissors, la neurogènesi, la dendritogènesi, la sinaptogènesi i les funcions gials, entre molts altres processos⁹⁹.

El cervell consumeix quasi una quarta part de l'energia que genera l'organisme. Per això, en cas de disfunció mitocondrial, el cervell esdevé especialment vulnerable, no només per l'alta demanda d'energia d'aquest òrgan, sinó també per l'abundància d'àcids grassos no saturats en la capa de mielina i de lípids i àcids grassos de cadena llarga en les membranes cel·lulars, que són altament susceptibles a la peroxidació.

Els mitocondris tenen un paper clau en el metabolisme energètic cel·lular, però també estan implicats en el metabolisme lipídic, esteroidal i dels aminoàcids, en la modulació dels nivells de calci cel·lular, en la producció de radicals lliures i en la regulació de l'apoptosi. Així doncs, la disfunció mitocondrial no només afecta a la producció d'energia, sinó que també afecta a molts altres processos cel·lulars fonamentals per la vida. Els mitocondris es troben, com ja hem senyalat, formant xarxes dinàmiques com a conseqüència d'una constant fissió i fusió amb l'ajuda dels microtúbuls¹⁰⁰.

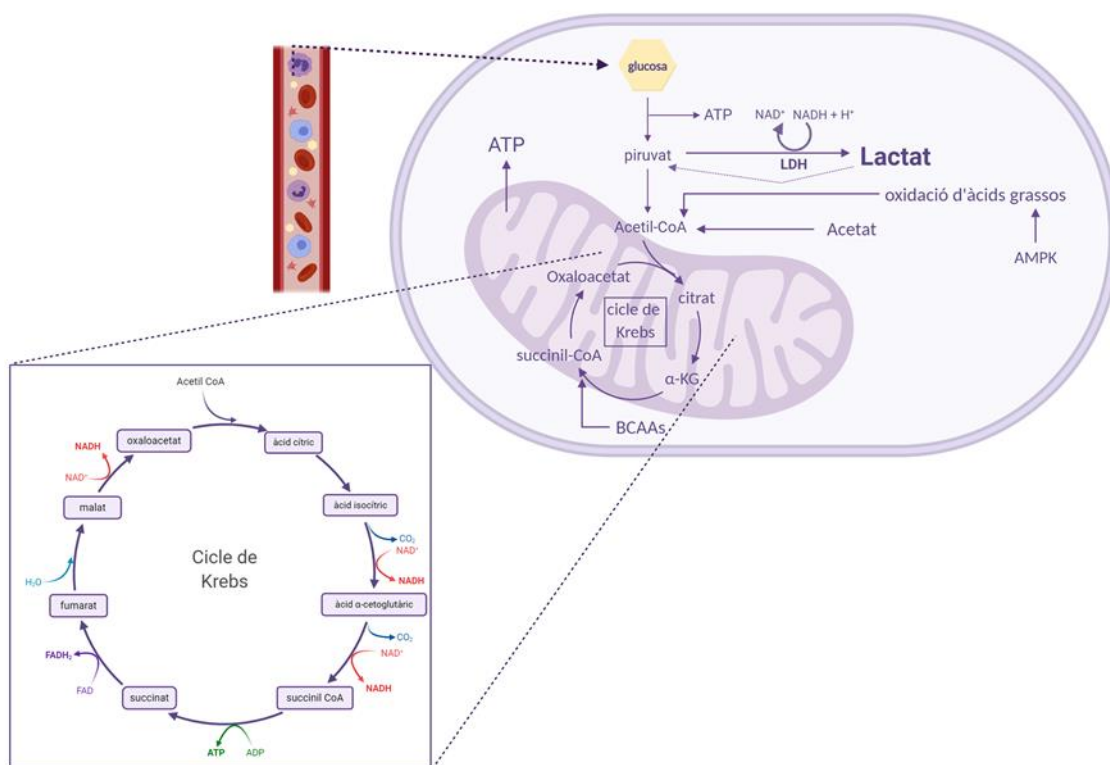


Figura 11. Metabolisme del lactat en la cèl·lula.

Alguns dels biomarcadors de malaltia mitocondrial són els nivells de lactat i piruvat en sang⁶³. Ja hem senyalat que l'ATP, el principal combustible cel·lular, es produeix majoritàriament en

condicions aeròbiques per la glicòlisi, cicle de Krebs i fosforilació oxidativa. En absència d'oxigen o quan la demanda d'aquest és superior a la disponibilitat, per exemple durant la realització d'exercici físic intens, disminueix enormement el rendiment de les anteriors vies i només es produeix ATP per la via de la glicòlisi anaeròbica amb la producció de piruvat i posteriorment d'àcid làctic que es sol trobar pràcticament en la seva totalitat en forma dissociada, lactat ($C_3H_6O_3$). És una reacció ineficient ja que només utilitza el 3% de l'energia total que conté una molècula de glucosa (en condicions aeròbiques el rendiment es troba al voltant del 66%), però aquest procés permet la supervivència cel·lular durant uns minuts en condicions anaeròbiques o de baixa disponibilitat d'oxigen. Utilitza la glucosa del citoplasma del miòcit o bé l'emmagatzemada en forma de glucogen. Després de la restitució de l'aport d'oxigen, l'àcid làctic es converteix en piruvat i es restitueix la via aeròbica¹⁰¹. L'àcid ℓ -làctic es produeix a partir de l'àcid pirúvic mitjançant l'enzim Lactat Deshidrogenasa (LDH), essent, en condicions fisiològiques, un producte "intermediari" de la glicòlisi i, predominantment, un combustible oxidatiu mitocondrial.

L'àcid ℓ -làctic és un intermediari crucial en el metabolisme d'hidrats de carboni i dels aminoàcids essencials. La glicòlisi és una via molecular necessària per a la regeneració de l'ATP en els glòbuls vermells ja que no tenen mitocondris. L'àcid ℓ -làctic també és produït per la pell, els teixits adiposos, el sistema nerviós central, el múscul i el tracte GI^{102,103}. Aquest s'elimina, en gran mesura, mitjançant gluconeogènesi al fetge (60%) i a l'escorça renal (30%) i, en molt menor grau, mitjançant processos oxidatius en molts òrgans (fetge, ronyó, múscul, cor i cervell). Aquest reciclatge intern de ℓ -lactat es coneix com a cicle de Cori. Durant l'exercici, el cor i el múscul esquelètic utilitzen ℓ -lactat com a principal font d'energia. Les acumulacions d'àcid ℓ -làctic poden ser causades per un augment en la seva producció i/o una disminució de la seva eliminació. L'augment de la producció d'àcid ℓ -làctic es produeix quan la taxa de regeneració de l'ATP als mitocondris és insuficient per satisfer els requisits de l'ATP per realitzar les funcions biològiques habituals. Una alteració de la CRM porta a una limitació en l'ATP intracel·lular, així com a una alteració metabòlica dels carbohidrats i de la beta-oxidació. Hi haurà un augment de la rati lactat/piruvat i beta-hidroxiabutirat/acetoacetat portant a l'augment dels cossos cetònics i dels nivells de lactat plasmàtic.

La glicòlisi i el metabolisme oxidatiu mitjançant el cicle d'àcid tricarboxílic (TCA) són vies clau pel manteniment de la funció sinàptica. Determinades cèl·lules, com neurones o miòcits, poden prendre la glucosa dels capil·lars de la circulació sanguínia. Tant en les neurones com els astròcits és crucial la glicòlisi, fins i tot en condicions aeròbiques i, per tant, enzims claus en aquest procés com l'hexoquinasa i el lactat deshidrogenasa (LDH). La glucosa, que alimenta aquesta via

glicolítica, pot entrar a les cèl·lules a través dels transportadors de glucosa (GLUT) i produeix piruvat, que és convertit, posteriorment, en lactat o aigua i CO_2 juntament amb l'obtenció de 38 ATPs a través de la fosforilació oxidativa al mitocondri. El lactat produït, per exemple, als astròcits pot també dirigir-se a la neurona a través de transportadors i pot ser usat com a substrat per produir energia a través de la seva conversió en piruvat al citoplasma de la neurona. Aquesta hipòtesi es basa en l'existència d'LDH a dins de la cèl·lula i la presència de MCTs (transportadors monocarboxílics) especialitzats en el transport de lactat transmembrana i que duen, ràpidament, el lactat generat pels astròcits a l'espai extracel·lular i, seguidament, a les neurones¹⁰⁴.

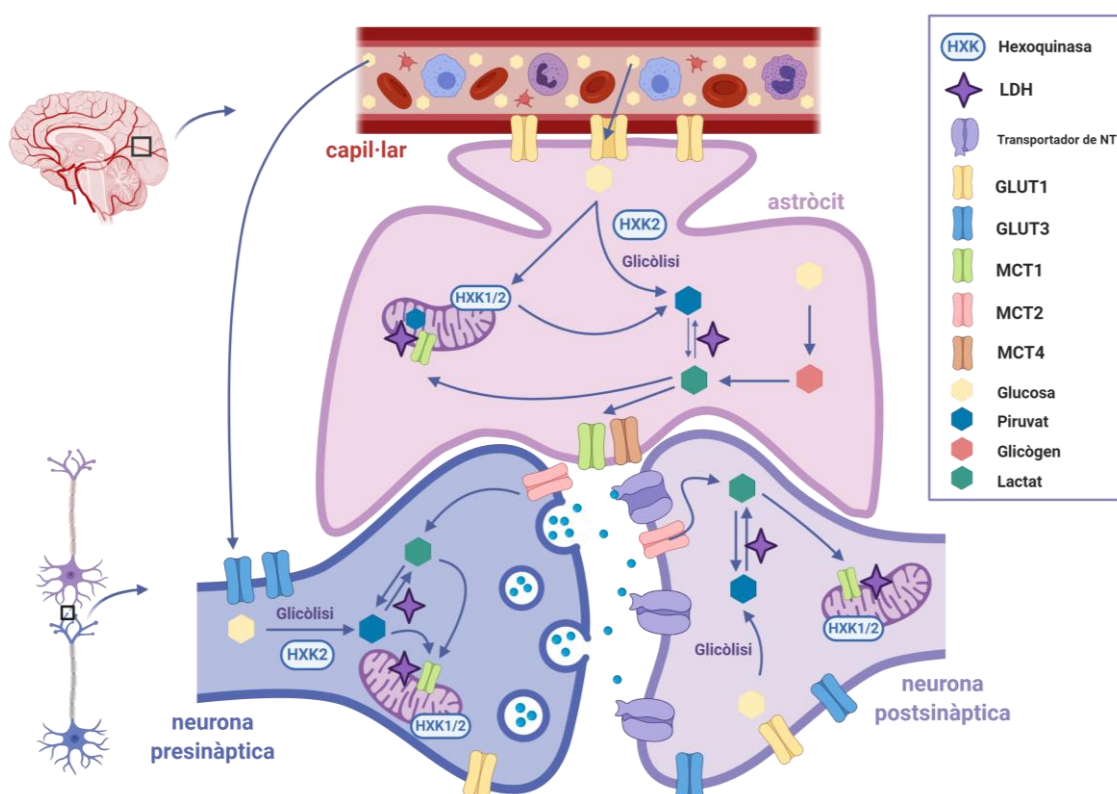


Figura 12: Acoblament bioenergètic fisiològic neuronal. (Adaptat de Sullivan et al. 2019)¹⁰⁷

El piruvat és un substrat per a la fosforilació oxidativa que té part dins del mitocondri. La reducció de la fosforilació oxidativa condueix a la glicòlisi. La glicòlisi produeix un augment de la producció de lactat, que provoca l'acidificació del teixit i disminueix, per tant, el pH intracel·lular^{105,106}. Aquesta acidificació del pH cel·lular de l'organisme té mecanismes per normalitzar-lo de nou com, per exemple, la neutralització a través del bicarbonat, el fosfat i les proteïnes intramusculars o també amb l'ajuda d'enzims com la fosfofructoquinasa. Un cop a les neurones, el lactat es torna a convertir en piruvat per LDH. Sembla, també, que hi pot haver una entrada de lactat al mitocondri i d'aquesta manera actuar com a combustible de la CRM ajudant a la

normalització del pH cel·lular. La satisfacció de la demanda energètica de les neurones depèn molt de l'acoblament metabòlic d'aquestes amb la glicòlisi i la producció de lactat en els astròcits; aquests són encarregats, entre d'altres funcions, de reciclar els neurotransmissors alliberats per les neurones, procés que representa gran proporció del pressupost energètic del cervell.

En el passat es considerava només un producte residual, però actualment és considerat un combustible cel·lular complementari però clau en estats hipoglicèmics o isquèmics, així com una molècula que intervé en la senyalització cel·lular¹⁰⁸. Recentment, se li ha atribuït també un paper en l'aprenentatge i la memòria¹⁰⁹ i, per tant, també en la disfunció cognitiva pròpia d'alguns trastorns psiquiàtrics. El 1934 ja es reporta un increment dels nivells de lactat i un decrement dels nivells de glutatió en pacients amb ESQ¹¹⁰. Així doncs, hi ha moltes evidències en la literatura que suggereixen que alteracions en la funció mitocondrial podrien provocar una alteració de la plasticitat neuronal fisiològica, fet que es podria traduir en simptomatologia psiquiàtrica, com per exemple, alteracions afectives o de l'àmbit psicòtic^{7,111,112}. Són conegudes certes entitats nosològiques on s'ha confirmat disfunció mitocondrial o, fins i tot, alteracions en la genètica mitocondrial, i que presenten una elevada incidència de malalties psiquiàtriques⁶⁷.

3. Malalties mitocondrials

El 1963 va ser descobert l'ADNmt¹¹³. Els posteriors avenços en aquest camp han senyalat una sèrie de malalties humanes amb notable prevalença que comparteixen una patogènia subjacent en què es veu afectada la funció mitocondrial⁶². Els òrgans diana de la disfunció mitocondrial són, en aquest ordre, cervell, cor i múscul, ronyons i sistema endocrí. Per tant, el cervell serà el primer òrgan que es veurà afectat des de l'inici de la disfunció mitocondrial. Quan aquesta disfunció esdevingui més severa, l'afectació es traslladarà als altres òrgans. Una funció mitocondrial ineficient serà menys capaç d'oxidar el piruvat i els àcids grassos, tenint com a resultat una acumulació de glucosa i triglicèrids a la sang com podem trobar, per exemple, en la diabetis, l'obesitat i la malaltia cardiovascular⁶⁶. Cal tenir present que el proteoma mitocondrial està constituït pel voltant de 1500 proteïnes de les quals només 13 estan codificades en l'ADNmt. Per tant, les malalties mitocondrials poden estar causades no només per alteracions en l'ADNmt, sinó també en l'ADNn⁶⁴, però en aquest treball només ens centrarem en les causades per l'ADNmt.

3.1. Epidemiologia

Una de cada 200 persones és portadora d'una mutació de l'ADNmt i una de cada 5000 pateix una malaltia mitocondrial severa. Si ens fixem en una consulta mèdica general, es pot afirmar que 1 de cada 200 pacients tenen una mutació que potencialment podria causar una malaltia mitocondrial¹¹⁴.

En les formes d'aparició infantil (<16 anys) la prevalença s'ha estimat entre 5 i 15 casos per cada 100.000 individus. En adults, la prevalença de malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNmt s'estima en 9,6 casos per cada 100.000 individus i la prevalença de malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNn és de 2,9 casos per cada 100.000 individus⁶³. S'estima que les mutacions en l'ADNmt són responsables d'aproximadament un 80% de les malalties mitocondrials en adults. Per altra banda, només s'han trobat mutacions en l'ADNmt en un 20–25% dels casos de malalties mitocondrials d'inici infantil i, en canvi, la majoria de malalties mitocondrials d'inici infantil són causades per mutacions autosòmiques recessives en l'ADNn⁶³.

3.2. Característiques clíniques

És important tornar a senyalar que les malalties mitocondrials són clínicament molt heterogènies ja que són molts els òrgans que depenen del bon funcionament del metabolisme aeròbic dut a terme pel mitocondri i una mateixa mutació pot associar-se a fenotips molt variables, i mutacions diferents poden provocar símptomes similars. Així doncs, la clínica amb la que es poden

expressar és molt diferent perquè depèn de l'òrgan que es vegi afectat i del llindar mínim d'aquest en la producció d'energia que necessita per funcionar adequadament. És a dir, els òrgans més dependents de l'energia poden mostrar símptomes amb una disminució relativament petita a la producció d'energia. Alguns trastorns mitocondrials poden afectar només un únic òrgan, com ara l'ocular en la neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON), però molts d'ells impliquen diversos sistemes d'òrgans^{89,90,115}.

Taula 8. Signes i símptomes de MALALTIA MITOCONDRIAL			
SISTEMA NERVIÓS CENTRAL		SENTITS	
Paràlisi cerebral atípica	Desenvolupament retardat	Pèrdua visual/ceguesa	Atròfia òptica
Microcefàlia	Demència	Alteracions de musculatura ocular	Ptosis
Convulsions	Coma	Degeneració retiniana amb signes de ceguesa nocturna	Dèficits de visió del color
Trastorns neuropsiquiàtrics	Retard mental/regressió	Retinitis pigmentosa o altres	Pèrdua auditiva i sordesa
Mioclònies	Trastorns del moviment	SISTEMA GASTROINTESTINAL I HEPÀTIC	
Atàxia	Migranyes	Dificultat a l'empassar	Hipoglucèmia
Accidents cerebrovasculars		Retard en el buidament gàstric	Reflux gastroesofàgic
SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC		Pseudo-obstrucció intestinal	Restrenyiment
Debilitat i/o hipotonia	Neuropatia	Vòmits crònics o recurrents	Alteracions pancreàtiques
Reflexos absents	Pèrdues de consciència transitòria	Fallada hepàtica inexplicable	Sensació d'ompliment gàstric
Absència o excés de transpiració i de termoregulació		Fallada hepàtica induïda per àcid valproic	
SISTEMA MÚSCULO ESQUELÈTIC		SISTEMA EXCRETOR	
Debilitat	Hipotonia	Síndrome nefròtic	Aminoacidúria
Dolor muscular i/o rampes	Rabdomiòlisi recurrent	Malaltia renal tubular proximal i pèrdua de proteïnes i electròlits	
SÍMPTOMES PSIQUIÀTRICS		SISTEMA CARDIOVASCULAR	
Clínica depressiva	Símptomes psicòtics	Defectes de conducció cardíaca	Cardiomiopatia hipertròfica
SISTEMA ENDOCRÍ		ALTRES	
Diabetis	Fallada pancreàtica exocrina	Retard en el creixement intrauterí	Intolerància a l'exercici
Excés de pel corporal	Estatuta baixa	Alteracions cutànies com lipomatosi simètrica	Fatiga
Hipotiroidisme	Hipoparatiroidisme	Problemes respiratoris	Anèmia sideroblàstica
Hipogonadisme	Infertilitat	Hipersensibilitat a l'anestèsia	Lipomatosi múltiple

Així doncs, qualsevol tipus de mutació a l'ADNmt té potencialment com a conseqüència l'alteració en el funcionament de la CRM i la disminució de la producció d'energia en forma d'ATP. El fet de que la presentació i la intensitat de la simptomatologia sigui tan variable es creu que

pot ser degut a l'acumulació secundària de mutacions a l'ADNmt en teixits postmitòtics associada a l'edat, podent ser aquest el factor el que desencadena l'aparició dels primers símptomes. Les persones que hereten una mutació amb un efecte "menor" a l'ADNmt necessitaran un major nombre de mutacions somàtiques per a arribar al llindar que compromet la funcionalitat del teixit mutant i, per tant, poden viure la major part de la seva vida sense manifestacions clíniques. En canvi, si la mutació heretada és deletèria, la capacitat respiratòria de l'individu serà limitada des del principi i caldran menys mutacions somàtiques per a l'aparició de la malaltia. Cal tenir present que, dins d'una família, la mateixa mutació pugui tenir efectes fenotípics diferents. És possible que les molècules amb ADNmt mutant del zigot es distribueixin de maneres diferents al llarg de les divisions cel·lulars que succeeixen durant el desenvolupament embrionari. Així, en un individu les molècules d'ADNmt mutants es podrien acumular al cervell i múscul esquelètic mentre que en un altre germà es podrien acumular al miocardi; donant, per tant, clínica molt heterogènia. És per això, que aquesta clínica tan heterogènia pot solapar-se amb molts quadres clínics i malalties diferents.

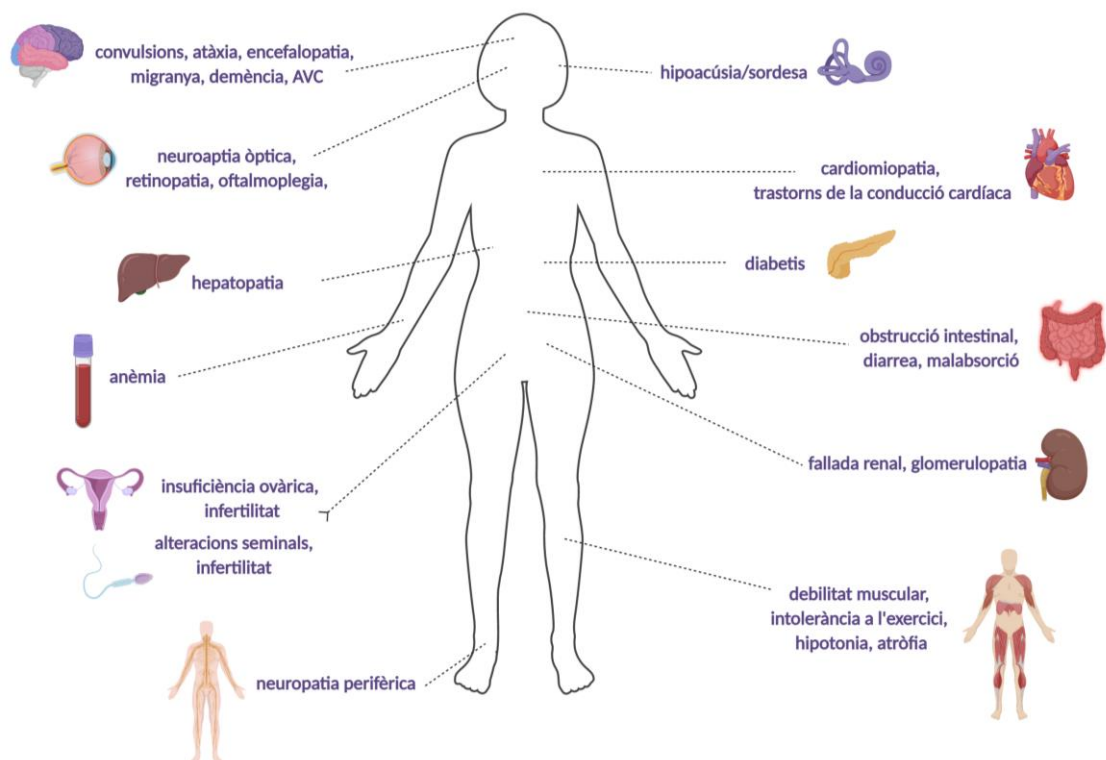


Figura 13. Signes i símptomes de malaltia mitocondrial. (Adaptat de Gorman et al. 2016⁶³)

És important estar alerta de les anomenades "RED FLAGS" que són característiques concretes de cada manifestació clínica i que han de fer que sospitem la presència d'una malaltia mitocondrial.

Taula 9. Característiques sospitoses de malaltia mitocondrial (*RED FLAGS*)

Pèrdua auditiva neurosensorial	Inici asimètric Edat d'aparició primerenca Història de recuperació parcial després d'un dany aparentment irreversible Afectació inicial en altes freqüències
Dèficits neurològics focals	Inici primerenc Precedit de pròdroms Territori afectat en la neuroimatge no segueix una lògica vascular Matèria gris afectada de manera predominant Calcificació de ganglis basals associada Bona recuperació clínica després d'un episodi Canvis en la neuroimatge desproporcionats al dèficit clínic S'hi associen convulsions focals o status epilèptic Augment de lactat en LCR
Convulsions	Aparició sobtada d'estats epilèptics Gatell fisiològic recurrent Episodis severos de convulsions amb períodes entre intervals benignes (sense requerir anticonvulsius per al seu control) Empitjoren amb valproic
Ptosi	Inici simètric Progressió lenta amb poques variacions diürnes Amb oftalmoplegia externa progressiva o canvis pigmentaris en la retina
Canvis pigmentaris retinians	Distribució perimacular Sense druses Sense amenaça de ceguesa
Diabetis	No associada a retinopatia diabètica ni neuropatia perifèrica Fàcilment controlada amb antidiabètics orals

3.3. Característiques psiquiàtriques

Un grup de símptomes que sovint estan presents en les malalties mitocondrial són els símptomes psiquiàtrics. Alguns estudis indiquen que entre un 50% i un 70% de pacients adults amb trastorns mitocondrials hereditaris patiran algun trastorn psiquiàtric major, entre ells ESQ, ja sigui de forma crònica o en algun moment de la seva vida, i en nens s'ha descrit que fins a un 50% d'afectats per malalties mitocondrials presentarien simptomatologia depressiva¹¹⁶. En aquest sentit, es sospita que alguns dels pacients amb malalties psiquiàtriques podrien tenir un diagnòstic subestimat de trastorns mitocondrials¹¹⁷.

Els trastorns psiquiàtrics més freqüents són els trastorns afectius seguits dels psicòtics però també hi trobem anorèxia nerviosa i TOC. Altres estudis recullen altres entitats psiquiàtriques, a part de les ja mencionades, com distímia, trastorns de personalitat o trastorn per ús de substàncies, entre d'altres¹¹⁸.

A més, cal tenir present que hi ha altres factors que poden col·laborar a augmentar altres tipus

de comorbiditats en les malalties psiquiàtriques com, per exemple, la severitat de la pròpia malaltia, la falta d'exercici físic, la dieta, l'abús de substàncies i el tractament. També cal tenir en compte altres mecanismes moleculars i condicionants que poden col·laborar-hi com la microbiota intestinal, alteracions prenatales del sistema renina-angiotensina, alteracions en intercanvis endocrins matern-fetals o alteracions en l'expressió gènica degut a canvis en la regulació epigenètica, que tenen a veure amb dèficits en la nutrició prenatal, entre d'altres^{119,120}. Aquestes vies biològiques interaccionen i conviuen entre elles, juntament amb factors de risc de l'entorn, convergint totes elles en algun punt d'alguna de les vies mitocondrials, fet que recolza el protagonisme d'aquest orgànu en els TN donant-nos així una visió encara més sistèmica d'aquests trastorns^{119,120}.

Cal tenir en compte que en alguns casos la simptomatologia psiquiàtrica és la primera que s'identifica i es tracta respecte al conjunt de símptomes del trastorn mitocondrial i que un gran nombre d'aquests pacients són resistents al tractament psiquiàtric habitual¹¹⁶.

3.4. Mutacions

Actualment, gràcies a les tècniques de seqüenciació de nova generació hi ha hagut una explosió en el descobriment de noves alteracions genètiques que afecten a la CRM amb mutacions patogèniques en més de 300 gens, tant nuclears com mitocondrials, identificades fins ara¹²¹. Diversos estudis han demostrat que els defectes genètics nuclears són la principal causa de malaltia mitocondrial infantil, mentre que les mutacions en l'ADNmt són més freqüents en casos d'adults¹²¹. Concretament, s'han identificat fins a 338 gens relacionats amb malalties mitocondrials: 36 a l'ADNmt (11%) i 302 a l'ADNn (89%)¹²².

S'han reportat centenars de mutacions patogèniques en l'ADNmt que causen malaltia i es poden consultar a la web del Mitomap⁸⁶. Les mutacions patogèniques més freqüents i conegudes de l'ADNmt són les mutacions amb error de sentit localitzades en gens proteics com la *MT-ND4* m.11778G>A (p.Arg340His), que causa ceguesa sobtada i neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON), i la *MT-ATP6* m.8993T>G (p.Leu156Arg), que està associada amb neuropatia, ataxia i retinitis pigmentària (NARP) i síndrome de Leigh. Les mutacions localitzades en ARNt més habituals són la mutació a *MT-TK* m.8344A>G, que causa encefalopatia mioclònica amb fibres vermelles esquinçades (MERRF) i la a *MT-TL1* m.3243A>G mutació, que causa encefalopatia mitocondrial amb acidosi làctica i ictus (MELAS).

Les mutacions patògenes de l'ADNmt poden presentar-se en homoplàsmia, com per exemple, les mutacions causants de LHON (*MT-ND4* m.11778G>A (p.Arg340His), *MT-ND1* m.3460G>

A(p.Ala52Thr) i *MT-ND6* m.14484T> C (p.Met64Val), i la variant que causa sordesa induïda per aminoglicòsids *MT-RNR1* m.1555A> G. Però, les mutacions més severes causen malalties quan són heteroplàsmiques, de manera que el percentatge d'ADNmt mutant afecta la gravetat del fenotip. Algunes mutacions heteroplàsmiques poden causar un fenotip característic; per exemple, certes mutacions del citocrom b causen miopatia mitocondrial, mentre que altres mutacions heteroplàsmiques produeixen una sèrie de símptomes que afecten el cervell, el cor, el múscul i altres teixits amb alta demanda energètica. Per exemple en portadors de la mutació m.8993T>G depenent de la càrrega mutant, el portador desenvoluparà una síndrome neurodegenerativa greu anomenada malaltia de Leigh si l'heteroplàsmia és superior al 90%, desenvoluparà neuropatia, atàxia i retinosi pigmentària (NARP) si es troba entre el 60 i el 75%, o serà totalment assintomàtic si el llindar d'heteroplàsmia es troba per sota del 60%¹²³.

A l'inici, les persones que tenien una mitocondriopatia eren ateses per especialistes en neurologia. Actualment, tot i desconèixer exactament l'origen pleiotròpic i multisistèmic dels símptomes, s'hi sumen altres especialitats mèdiques com l'endocrinologia, l'oncologia, la cardiologia, la immunologia i la digestologia entre altres.

3.5. Diagnòstic

El diagnòstic pot resultar complex degut a la múltiple i diversa simptomatologia amb què es presenten els trastorns mitocondrials. També cal tenir en compte que la presentació clínica pot variar enormement entre persones, tot i presentar la mateixa mutació genètica i en la mateixa família. Així doncs, la primera i principal eina diagnòstica és una bona valoració clínica. Cal sospitar d'una malaltia mitocondrial si:

- 1) Ens trobem al davant d'una "malaltia comuna" que presenta característiques clíniques atípiques o símptomes que no solen aparèixer habitualment o hi ha afectació de teixits i/o òrgans aparentment no relacionats entre sí.
- 2) Hi ha tres o més òrgans i/o sistemes implicats (o un o dos dels "senyals d'alerta").
- 3) Exacerbacions recurrents en una malaltia crònica en forma d'infeccions.

La primera aproximació diagnòstica requereix una adequada i exhaustiva anamnesi i exploració clínica, seguida de les exploracions complementàries pertinents segons la clínica que presenta el pacient.

L'afectació clínica juntament amb les troballes neuroradiològiques i les anomalies metabòliques en l'anàlisi poden orientar cap als estudis bioquímics de la CRM i/o estudis genètics específics.

És fonamental fer un estudi d'extensió per òrgans i aparells, d'acord a la història clínica del pacient i als seus antecedents familiars. En presència de fenotips clínics típics de malaltia mitocondrial s'haurien de realitzar estudis genètics dirigits a les mutacions i gens causals més freqüents, evitant així la realització d'un procés molt més invasiu com és una biòpsia muscular. Els panells genètics estan cobrant cada dia més importància per a l'estudi de malalties mitocondrials, tant en mutacions de l'ADNmt com de l'ADNn¹²⁴.

Taula 10. Diagnòstic de malalties mitocondrials

	Procediment diagnòstic	Què ens indica?
Història personal i familiar	Anamnesi de pacient i família	Pot mostrar un patró hereditari quan es posen de manifest "síntomes lleus" en familiars. Per exemple talla baixa, sordesa, migranyes...
Síntomes físics	Exploració física exhaustiva	Proves de força, resistència i neurològiques (reflexos, visió, parla, capacitats cognitives bàsiques i de desenvolupament)
Avaluació multisistèmica (depenent de la presentació interindividual)	1. Estudis d'electrofisiologia (EEG) 2. ECG, Holter, EcoCG 3. Proves d'audició 4. Anàlisi sanguínia 5. Tracte i trànsit GI 6. Examen oftalmològic	1. Monitorització d'activitat convulsiva 2. Detecció d'anomalies cardíques 3. Pèrdua auditiva 4. Perfil renal, hepàtic, tiroïdal, glucèmia, vitamina B12... 5. Dismotilitat intestinal i gastroesofàgica, vòmits cíclics 6. Ptos, músculs oculars, canvis retinians i atròfia òptica
Proves d'imatge	1. Espectroscòpia per RMN 2. RMN o TAC	1. Nivells de lactat, fosfocreatina i ATP 2. Cerca de lesions bilaterals o simètriques; atròfia, lesions corticals, leucoencefalopatia difosa
Tests bioquímics i enzimàtics	1. Nivells de lactat i piruvat 2. Creatina-cinasa sèrica 3. Nivells de carnitina sèrica 4. Amoni sanguini 5. Quantitat d'aminoàcids en plasma i/o orina	1. Indica alteracions en cadena respiratòria 2. Lleugerament elevada en malalties mitocondrials però habitualment elevada de manera més clara en casos de depleció d'ADNmt 3-5. Alteració de metabolisme mitocondrial
Biòpsia tissular (habitualment muscular)	1. Histoquímica 2. Immunohistoquímica 3. Bioquímica 4. Microscopi electrònic	1. Proliferaçió mitocondrial anormal i dèficits en cadena respiratòria 2. Presència o absència de determinades proteïnes 3. Activitat enzimàtica 4. Morfologia, nombre i estructura mitocondrial
Proves genètiques (de teixits més afectats)	1. Mutacions conegudes 2. Mutacions desconegudes o rares 3. Quantitat d'ADNmt	1-2. Cerca l'existència de mutacions puntuals, delecions i duplicacions

Estudi d'extensió de les malalties mitocondrials: Les proves a escollir depenen del quadre clínic i sempre havent descartat prèviament miocardiopaties i trastorns endocrins com diabetis o hipotiroidisme, entre d'altres^{124,125}.

❖ **Estudis bioquímics:**

- **Anàlisi de sang:** Bioquímica bàsica amb hematometria, funció hepàtica i renal,

enzims musculars (CK), gasos, ions, lactat, piruvat, cossos cetònics, amoni, aminoàcids, acilcarnitines. Segons valoració clínica es realitzaran estudis hormonals, sobretot tiroïdals, així com valoració de l'estat nutricional amb vitamines i oligoelements. L'acidosi làctica, que és utilitzada com a únic marcador de malaltia mitocondrial, ens orienta cap al diagnòstic encara que no és sensible ni específica.

- **Anàlisi d'orina:** Bioquímica bàsica amb aminoàcids i àcids orgànics.
- **Estudi de líquid cefalorraquidi (LCR):** Només en alguns casos concrets i en funció d'anàlisis prèvies. És freqüent la detecció d'àcid làctic elevat. També s'analitzen els nivells de glicina i/o folat en funció del quadre clínic del que se sospita.
- ❖ **Proves de neuroimatge:** Les anomalies de la RMN cerebral són rellevants a l'hora d'orientar el quadre clínic, si és possible convé realitzar-la amb espectroscòpia, que ens donarà informació del metabolisme cerebral. El tipus de lesions detectades, així com les zones cerebrals afectades ens poden orientar a determinades síndromes.
- ❖ **Estudis neurofisiològics:** Convé descartar defectes neurosensorials o afectació de nervis perifèrics, segons l'òrgan o òrgans afectats.
- ❖ **Estudis genètics:** Els estudis genètics poden realitzar-se en sang (limfòcits) o en altres teixits depenent del quadre clínic existent. S'estan introduint noves tècniques diagnòstiques basades en nous mètodes com els bioxips de DNA i seqüenciació mitjançant eines genòmiques d'última generació (Next-Generation Sequencing o NGS). La confirmació d'un diagnòstic genètic en la CRM segueix suposant un repte donat el gran nombre de gens implicats en la funció mitocondrial, a causa de la participació de dos genomes i per la heteroplàsmia de les mutacions en l'ADNmt.

Es proposa, si hi ha sospita d'una malaltia mitocondrial típica, estudiar en un primer temps les mutacions causals específiques en teixits no invasius com sang o orina. En cas de no detectar la mutació, caldria realitzar, en cèl·lules d'aquests teixits, la seqüenciació completa de l'ADNmt, per NGS. En casos més complexos i multisistèmics, la biòpsia muscular seria el següent pas cap al diagnòstic. A més es pot quantificar el contingut muscular d'ADNmt o determinar la presència en múscul de delecions múltiples en l'ADNmt. També cal tenir en compte que l'anàlisi de l'ADNmt d'un teixit, que no és el diana, pot conduir a obtenir seqüències completament normals en pacients heteroplàsmics per mutacions causants de malaltia. Si l'ADNmt no aporta resultats positius es pot contemplar la possibilitat d'analitzar l'ADN^{89,90,115}. Per tant, si fins aquí

no s'ha arribat al diagnòstic, es poden considerar estudis més complexos d'interpretar a nivell genòmic com ara WES (seqüenciació de exoma) o WGS (seqüenciació de genoma) per intentar detectar les mutacions causals, o estudis de aCGH per a detecció de reordenaments cromosòmics. La interpretació i anàlisi dels resultats requereix de grups especialitzats en genòmica i bioinformàtica. Aquests estudis poden, fins i tot, detectar un gran nombre de variants potencialment patogèniques o noves variants genètiques de significat incert que podrien requerir estudis funcionals bioquímics a nivell de recerca (proteòmica, metabolòmica, estudis cel·lulars i animals). A més, també es poden trobar variants no buscades en gens no relacionats amb la patologia clínica diana (per exemple, gens de susceptibilitat al càncer) el que complica el maneig clínic i la informació als pacients. Tot això fa que abans de la seva realització calgui realitzar un consell genètic adequat i es requereixi el consentiment informat dels pacients i/o la seva família en el cas de menors o adults tutelats.

- ❖ **Biòpsia muscular:** S'utilitza per a l'estudi histològic i de la CRM. No cal realitzar-la si es diposa d'un estudi genètic que ha identificat una mutació clarament patogènica.
 - **Estudis immunohistològics:** Permeten realitzar el diagnòstic diferencial amb altres miopaties o detectar si hi ha proliferació mitocondrial (fibres vermelles esquinçades (RRF, de l'anglès *ragged-red fibres*) per tricròmic de Gomori o fibres blaves esquinçades (BRF, de l'anglès *ragged-blue fibres*) per tinció de SDH i fibres COX negatives que no es tenyeixen per citocrom C oxidasa. Es poden realitzar estudis en microscòpia electrònica. Les RRF s'associen a defectes de l'ADNmt que condueixen a disminució de la síntesi de proteïnes per mutacions en els ARNT, delecions i depleció de l'ADNmt. La presència de fibres COX negatives es pot trobar amb mutacions puntuals en els gens mitocondrials o nuclears de la COX. No obstant això, una tinció normal no exclou un possible dèficit del complex IV.
 - **Estudis enzimàtics i/o del metabolisme oxidatiu als teixits:** La biòpsia muscular permet valorar l'activitat dels complexos de la CRM en un teixit post-mitòtic amb alt requeriment energètic. Aquests estudis també es poden realitzar en fibroblasts (tenint en compte que presenten un metabolisme menys oxidatiu i més glucolític) i en altres teixits afectats. Quan es detecta una deficiència, no es pot assegurar que aquesta sigui primària o secundària. D'altra banda, encara que les activitats de la CRM siguin normals no es pot descartar una malaltia mitocondrial.

- ❖ **Altres estudis complementaris:** Es poden valorar estudis de coenzim Q₁₀, cardiolipines, nucleòtids, o anàlisi d'ensamblatge dels complexos de la CRM.

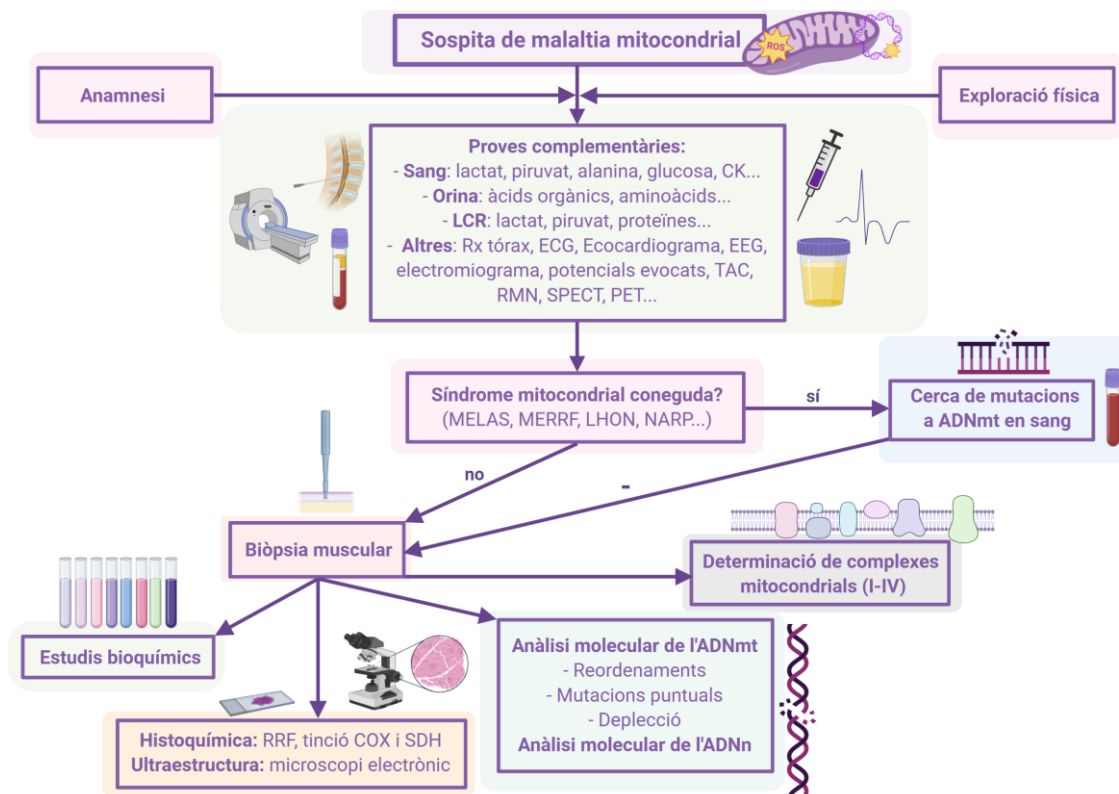


Figura 14. Algorisme diagnòstic per les malalties mitocondrials.
 (Adaptat de Nardin et al. 2001 i Chinnery et al. 2015^{84,126,127})

3.6. Tractament i pronòstic

Els tractaments de les malalties mitocondrials depenen dels fenotips clínics, dels òrgans afectats i de la valoració clínica periòdica. En nens petits i en malalties mitocondrials degudes a certes mutacions acostuma a haver-hi afectació multisistèmica. Donada la gran heterogeneïtat clínica, la complexitat bioquímica i genètica i la varietat en els mecanismes implicats en la fisiopatogènia, hi ha una sèrie de limitacions que dificulten l'aplicació eficaç de teràpies curatives, però, cada dia es van perfilant nous fàrmacs i estratègies que es poden aplicar a pacients amb malalties mitocondrials¹²⁴.

Actualment el tractament més habitual per a les malalties mitocondrials és el tractament simptomàtic i preventiu. Com a complement, s'aconsella l'optimització en la producció d'energia amb, per exemple, una nutrició adequada, un correcte ritme i quantitat de son, així com promoure l'activitat física moderada⁶³. També s'usa la suplementació amb nutricionalment de

vitamines i cofactors per tal de promoure una adequada funció mitocondrial; tot i que les metaanàlisis sobre aquesta pràctica no han provat l'eficàcia per cap d'aquestes substàncies^{91,128}. És cert, però, que hi ha incertesa sobre les concentracions terapèutiques exactes i els mecanismes d'acció concrets dels potencials agents terapèutics⁹².

Altres estratègies per a millorar la funció mitocondrial són reduir la pèrdua d'energia (prevenir infeccions, evitar excés d'exercici físic i l'estrès emocional, no exposar-se a temperatures extremes) i evitar toxines i alguns fàrmacs que inhibeixen la CRM augmentant el risc de toxicitat mitocondrial (alcohol, tabac, metformina, alguna antibiòtics, àcid valpròic, propofol, estatines, aspirina...)^{63,89,90,115}.

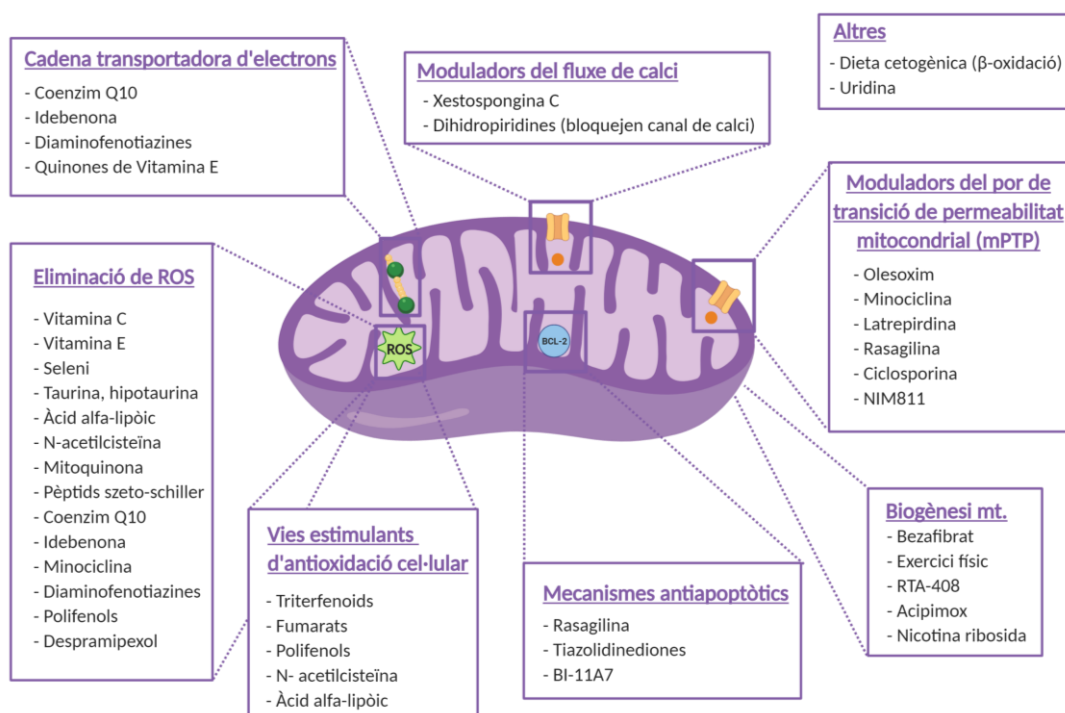


Figura 15. Compostos en desenvolupament, farmacèutics i nutricional, per millorar diversos aspectes de la funció mitocondrial de les principals vies afectades en la disfunció mitocondrial.

(Adaptat de Manji et al. 2012⁹²)

El fet, reconegut recentment, que l'estrès oxidatiu dins de el mitocondri és un segell distintiu de disfunció mitocondrial, ha estimulat el desenvolupament de teràpies antioxidants orientades a aquests orgànuls. Després de demostrar efectivitat en estudis preclínics i seguretat en assaigs clínics de fase 1 en humans, actualment s'estan cursant assaigs de fase 2 per a molècules antioxidants com MitoQ (mesbat d'ubiquinona, NCT02597023), el pèptid SS-31 (d-Arg-2'; 6'-dimetiltirosina-Lys-Phe-NH₂, NCT02245620), entre d'altres⁶². S'està investigant també en molècules que actuen en receptors activats per proliferació de peroxisomes (PPAR) com ara el

bezafibrat o d'altres també crucials per regular el metabolisme energètic¹²⁹.

Un altre principi actiu molt estès com a antioxidant és la N-acetilcisteïna que modula l'estrès oxidatiu, l'apoptosi, la funció mitocondrial i la neurogènesi. Hi ha altres antioxidants que s'utilitzen per a tractar malalties mitocondrials com podem veure a la figura 15 i a la taula 11. Un altre punt a aclarir i en el que s'està treballant actualment és en els efectes dels psicotròpics, en particular, el dels antipsicòtics que directament afecten la funció mitocondrial (per exemple inhibint el funcionament del complex I)¹⁰⁰. També s'està provant la teràpia de reemplaçament mitocondrial, com a sistema de prevenció, per poder evitar la transmissió de malalties mitocondrials de mares a fills⁶².

Principi actiu	Funció	Efectes secundaris
Suport a la CRM: - CoQ10 (reduit): ubiquinol - CoQ10 (oxidat): ubiquinona	transport d'energia entre CI i CIII, i CII i CIII	- pèrdua de gana, nàusees, diarrea a altes dosis
Suport al transportador d'electrons: - Niacina (B ₃) - Riboflavina (B ₂)	- precursor de NAD - precursors de FAD	- flushing - nàusea a altes dosis
Magatzem d'energia: - Monohidrat de creatina	tampó fosfat precursor de la fosfocreatina	- augment de la micció
Suport a l'oxidació dels àcids grassos: - (acetil-)L-carnitina - Biotina (B ₇)	transport d'àcids grassos de cadena llarga cofactor d'enzims carboxilasa	- femta poc consistent, olor a peix d'orina - cap
Cofactors d'enzims mitocondrials: - Tiamina (B ₁) - Àcid pantotènic (B ₅) - Piridoxina (B ₆) - Biotina (B ₇) - Àcid alfa-lipòic	- cofactor d'enzims del cicle de l'àcid cítric - precursor del coenzim A - cofactor de més de 100 enzims - cofactor d'enzims carboxilada - cofactor d'enzims del cicle de l'àcid cítric	- cap - diarrea a altes dosis - cefalea, parestèsies, nàusees - cap - cefalea, parestèsies, rash, rampes musculars
Antioxidants: - CoQ10 - L-carnitina - Vitamina E - Vitamina C	- objectiu: estrès oxidatiu de la CRM - recull restes d'àcids orgànics - protecció de membranes cel·lulars - protecció de metabolisme de ferro i coure	- hiporèxia, nàusees, diarrea a altes dosis - femta poc consistent, olor a peix a orina - sagnat a altes dosis - diarrea a altes dosis
Suport al metabolisme redox: - Metilcobalamina (B ₁₂) - Folat reduït (B ₉) - N-acetil-L-cisteïna (NAC) - Zinc	- suport a la metilació. als cicles del folat i a la producció de glutatió - suport a la metilació, als cicles del folat, precursor del glutatió - suport a la superòxid dismutasa	- hiperactivitat, insomni - cap - diarrea a dosis altes - supressió de l'absorció de ferro i coure
Suport al mtbl. de folats: - Àcid folínic/leucovorina càlcica (B ₉)	- col·labora en mantenir nivells òptims de folat al cervell	- hiperactivitat

En els últims anys han augmentat el nombre d'assajos clínics, alguns d'ells amb resultats esperançadors, que volen demostrar una millora de la simptomatologia de TEA usant tractaments que es proposen pels trastorns mitocondrials com ara la L-carnitina i la dieta cetogènica en nens sense aparent trastorn mitocondrial. Tots ells necessiten ser estudiats més extensament¹³¹⁻¹³³.





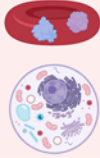


Manipulació d'ADN	Nucleases dirigides a les mitocondries		EXEMPLES	nucleases en anell de zinc nucleases-like d'efecte activador de la transcripció
	Manipulació d'ADN amb pèptids d'àcids nucleics			-
	Manipulació d'enzims d'ARNt			leucil tRNA sintetasa mitocondrial domini carboxi-terminal de la leucil tRNA sintetasa mitocondrial
	Transferència de gens via vectors d'adenovirus			AAV-ETHE1 (gen nuclear) AAV-ND4 (gen mitocondrial)
Noves vies en el subministrament de proteïnes	Subministrament sistèmic de proteïnes		EXEMPLES	transfusió de plaquetes o d'eritròcits encapsulats amb timidina fosforilasa
	Manipulació d'ADN amb pèptids d'àcids nucleics			factor A de transcripció dirigit mitocondrialment
Petites mol·lècules de fàrmacs	Manipulació d'ADNmt i d'ADNn		EX.	bezafibrat inhibidors PAPR AICAR rapamicina resveratrol ciclosporina A
Cèl·lules mare (CM)	Teràpia amb CM per a mutacions de gens nuclears		EXEMPLES	trasplantament de CM i medul·la òssia
	Modificació d'heteroplàsmia a CM			injeccions de bupivacaïna exercici

Figura 16. Visió general de nous enfocaments terapèutics per al tractament de trastorns mitocondrials. (Adaptat de Nightingale et al. 2016¹⁴⁰) [AICAR = ribonucleòtid 5-aminoimidazol-4-carboxamida; PAPR = receptor de poli-adenosina difosfat-ribosa polimerasa]

Existeixen altres treballs en la literatura que estudien el paper de molècules antioxidants i altres compostos que intervenen en processos metabòlics mitocondrials en el tractament d'altres trastorns psiquiàtrics com l'ESQ. Una revisió de 23 estudis que van incloure diferents antioxidants com el Ginkgo biloba, la N-acetilcisteïna, l'alopurinol, la deshidroepiandrosterona (DHEA), les vitamines C, i E o la selegilina¹³⁴, recull que alguns d'ells van millorar les puntuacions que mostraven els pacients amb ESQ en les escales de símptomes positius i negatius de la PANSS. Cal dir però, que van administrar-se tandes de tractament de curta durada, amb diferents dosificacions i amb una evidència feble i, per tant, de moment, poc aplicable a la pràctica clínica habitual. Altres noves dianes terapèutiques per l'ESQ, que tenen a veure amb el metabolisme energètic i altres processos que involucren el mitocondri, s'estan estudiant actualment. Per exemple, la dieta cetogènica, rica en greixos i baixa en carbohidrats, proporciona a l'organisme un combustible pels processos bioenergètics del cervell alternatiu a la glucosa i ha demostrat que pot millorar la funció neuronal reduint la toxicitat del glutamat, promovent la via d'inhibició gabaèrgica i atenuant la formació de ROS. Estudis recents mostren una millora de símptomes psiquiàtrics en l'ESQ, així com canvis en els paràmetres metabòlics i, per tant, una millora del risc cardiovascular¹³⁵. També hi ha estudis que reporten beneficis d'aquesta dieta en models de

ratolins amb TEA com millora de la sociabilització, de la comunicació o de comportaments repetitius^{136,137}. L'àcid alfa-lipòic, també amb propietats antioxidants, ha demostrat en alguns pacients amb ESQ, i com a coadjuvant al tractament amb antipsicòtics, millora d'alguns paràmetres metabòlics, així com també disminució de símptomes negatius i positius¹³⁸. Els carnitinoïdes que intervenen en mecanismes epigenètics regulant mecanismes d'oxidació i de citoprotecció de gens i vies de mitofàgia, també sembla que podrien tenir un paper en l'optimització de la plasticitat sinàptica i en la millora del dany neuronal, també en trastorns com el TEA i l'ESQ¹³⁹.

En l'actualitat no hi ha evidència suficient que recolzi l'ús cap dels compostos esmentats en aquest apartat per a tractar cap TN, sobretot en monoteràpia. Tot l'exposat en aquest apartat posa de manifest que en el camp de les teràpies mitocondrials i la possible relació amb la salut mental hi ha moltes llacunes i, per tant, és molt necessari seguir investigant per ampliar el coneixement en aquest camp¹⁴¹. Per altra banda, també és evident que s'estan duent a terme passos significatius per al tractament i prevenció de les malalties mitocondrials i aquests plantegen, també, nous reptes ètics i científics¹¹².

3.7. Malalties mitocondrials més rellevants

Algunes de les malalties mitocondrials més característiques i que impliquen l'**ADNmt** són¹¹⁵:

- ❖ **MELAS**: És l'encefalopatia mitocondrial més freqüent. Pot tenir el seu inici entre els 2 i els 40 anys, tot i que l'edat d'inici més habitual és al voltant dels deu anys. L'encefalopatia mitocondrial, episodis "*stroke-like*" i acidosi làctica són les manifestacions que li donen el nom. Però també pot manifestar-se, a més, amb intolerància a l'exercici, convulsions, demència, debilitat muscular, pèrdua auditiva, ceguesa, cefalees, dismotilitat gàstrica, polineuropatia, diabetis, insuficiència renal i estatura baixa. Bioquímicament, s'han detectat defectes als complexos III o IV, o en ambdós. La mutació més freqüent és la m.3243A>G que codifica RNAt^{Leu(UUR)} al gen *MT-TL1*¹⁴². Mutacions a altres gens com *MT-ND1*, *MT-ND5* i *MT-CO3* també poden portar a la mateixa malaltia.
- ❖ **MERRF**: Aquesta síndrome pot iniciar-se des de l'adolescència tardana fins a l'edat adulta. Clínicament es pot presentar amb epilèpsia, miopatia, sordesa, atàxia, retinopatia pigmentària, alteracions en la coordinació, demència i atrofia òptica. Al voltant del 80% de les persones afectades d'aquesta síndrome són portadores de la mutació m.8344A>G que codifica RNAt^{Lys(UUR)} al gen *MT-TK*. També s'han identificat altres mutacions en altres gens d'ARNt o en el gen *MT-ND5*.

- ❖ **Síndrome de Kearns-Sayre:** Generalment, té el seu inici abans dels 20 anys. S'expressa en forma d'oftalmoplegia externa progressiva crònica, retinitis pigmentària i una de les tres entitats següents: síndrome cerebelós, bloqueig cardíac o hiperproteïnorràquia. Altres símptomes, poden ser: miopatia, disfàgia, pèrdua auditiva i demència, entre d'altres. Es caracteritza per la presència de delecions o duplicacions simples a l'ADNmt.
- ❖ **NARP:** Aquesta síndrome té l'inici en la infantesa. Les persones afectades poden presentar retinitis pigmentosa amb pèrdua visual, falta de coordinació, atàxia, debilitat, demència, convulsions i retard del desenvolupament. És una malaltia progressiva per una mutació puntual en l'ADNmt: m. 8993 T >C i m. 8993 T >C, que afecten el gen de la subunitat 6 de l'ATPasa del complex V, *MT-ATP6*. Generalment, la mutació m.8993T>C acostuma a presentar un fenotip més lleu. Els afectats per NARP tenen entre un 70 i un 90% de molècules mutades, per tant, aquesta síndrome es presenta en heteroplàsmia. S'han descrit casos de mares asimptomàtiques que poden arribar a presentar fins un 70% de molècules mutades en sang. Si la mutació és molt abundant (superior al 90% detectada en sang i cervell) es produeix una encefalopatia infantil anomenada **Síndrome de Leigh**. En una mateixa família hi poden haver persones afectades per les dues malalties o, fins i tot, lliures de malaltia, dependent del grau d'heteroplàsmia.
- ❖ **Síndrome de Leigh:** Es tracta d'una encefalomiopatia necrosant subaguda amb inici a la infància. Sovint la mort es produeix dos anys després de l'inici dels símptomes, pel que és una de les malalties mitocondrials més severa. Es pot presentar en forma de vòmits, atàxia, hipotonia o espasticitat, convulsions, dificultats en l'alimentació i en la parla, pèrdua auditiva, nistagme, pèrdua visual, alteracions del moviment, neuropatia perifèrica, hiperventilació, i regressió motriu i intel·lectual. A la prova d'imatge és típic observar lesions cerebrals bilaterals i simètriques de necrosi amb astrocitosi i proliferació vascular a nuclis grisos i tronc cerebral. El gens mitocondrials implicats són *MT-ATP6*, *MT-ATP8*, *MT-ND5*, *MT-TL1* i *MT-TW*. Hi ha una trentena de gens nuclears que també es relacionen amb aquesta entitat clínica.
- ❖ **CPEO:** Oftalmoplegia externa progressiva crònica, amb inici a l'adolescència o primera etapa de joventut. Generalment, presenten una progressió lenta que es detecta perquè la mirada està limitada en totes direccions, donat que els moviments oculars són lents i associats a ptosis, i per la presència de debilitat muscular i fatiga. En casos esporàdics de PEO s'han descobert delecions o duplicacions simples a l'ADNmt, específicament al gen *MT-TL1*, el que permet diferenciar-los d'altres formes hereditàries causades per mutacions a l'ADNn que provoquen delecions múltiples a l'ADNmt.

❖ **LHON:** Neuropatia òptica hereditària de Leber. Aquesta síndrome és més freqüent en homes que en dones i es presenta al voltant dels 30 anys. Les característiques principals són la pèrdua visual, alteracions en la conducció cardíaca, espasticitat i distonia. Aquesta malaltia està causada per mutacions puntuals en l'ADNmt. Més del 90% es donen en les posicions m.11778 a *MT-ND4*, m.3460 a *MT-ND1* i m.14484 a *MT-ND6*. Cal tenir present que aquesta malaltia presenta una penetrància incompleta, és a dir, que no tots els individus amb aquestes mutacions desenvolupen la malaltia; per tant, altres factors genètics o epigenètics poden tenir un efecte en el desenvolupament de la mateixa.

❖ **Altres:**

- **AID:** Sordera neurosensorial no sindròmica induïda per aminoglicòsids. Implicació del gen *MT-RNR1*.
- **Miopatia infantil reversible:** Miopatia precoç i acidosi làctica. És deguda a una mutació homoplàsmica amb penetrància variable a l'ADNmt (m.14674T>C/G a *MT-TE*). Els mecanismes implicats podrien ser diversos: relatius als nivells de L-cisteïna ja que l'activitat de l'enzim cistationasa augmenta amb l'edat, factors nuclears, mecanismes compensadors a través del ARNt implicat i/o factors epigenètics o mecanismes implicats en la biogènesi mitocondrial.
- **Síndrome Aicardi Goutieres tipo 5 (AGS5):** Leucoencefalopatia, microangiopatia i calcificació de nuclis grisos. Presència d'interferó alfa a LCR. Retard mental, úlceres a pell i mucoses i artropatia. Delecions a ADNmt i implicació del gen nuclear *SAMDH1*.
- **Síndrome de Pearson:** S'inicia als pocs mesos de vida i el símptoma més evident és l'anèmia macrocítica refractària. També podem trobar-hi neutropènia i trombocitopènia (degut a vacuolització de precursors, hemosiderosi i sideroblastos a medul·la òssia), així com disfunció pancreàtica exocrina. Síndrome causada per delecions a ADNmt.

Cal tenir present que existeixen un gran nombre de malalties mitocondrials causades per alteracions a l'**ADNn**. Degut a què les rutes biològiques afectades són molt variables no és freqüent relacionar fàcilment genotip i fenotip. Tot i així, els símptomes comuns a la majoria són encefalopaties, miocardiopaties i miopaties més o menys específiques o en combinació entre ells i altres defectes d'òrgans i sistemes. Per exemple, l'encefalopatia mitocondrial neuro-GI, MNGIE. Els símptomes es presenten, habitualment, abans dels 20 anys però pot debutar més tard, fins als 55 anys. Consta d'alteracions GI, oftalmoplegia externa, ptosi, neuropatia visceral,

degeneració retiniana, neuropatia, estatura baixa, miopatia, pèrdua de coordinació, leucoencefalopatia i pèrdua d'audició. S'hereta de forma autosòmica recessiva i està causada per mutacions en el gen nuclear *TYMP*, que codifica per a una proteïna implicada en la fosforilació de la timidina. Això condueix a l'anul·lació completa de l'activitat enzimàtica, l'acumulació de timidina i deoxiuridina en els líquids i teixits biològics, així com a un desequilibri en la replicació i la reparació de l'ADNmt, que provoca múltiples delecions i en ocasions una depleció parcial. El diagnòstic diferencial inclou trastorns amb fenotips que es superposen com MNGIE i MELAS, MERRF o PEO.

3.8. Altres malalties amb disfunció mitocondrial.

Hi ha diverses malalties que, tot i que no es consideren malalties mitocondrials primàries, s'hi ha objectivat una disfunció mitocondrial que podria formar part de l'etiologia d'aquestes. En els últims anys, diversos trastorns s'han associat amb mutacions de gens nuclears responsables del manteniment i la funció de l'ADN mitocondrial i s'ha reconegut la possible contribució d'anomalies mitocondrials a malalties neurodegeneratives progressives com la malaltia de Parkinson i la malaltia d'Alzheimer⁸⁵. Estudis recents han suggerit un paper rellevant per a les mutacions en l'ADNmt en el desenvolupament d'una àmplia varietat de càncers. S'han estudiat càncers amb mutacions, supressions, inversions i alteracions en el nombre de còpies en l'ADNmt que duen a una disfunció mitocondrial podent explicar així l'alteració en la bioenergètica cel·lular en molts tipus de cèl·lules cancerígenes^{86,143}. També s'han observat alteracions en vies metabòliques d'aminoàcids, així com alteracions en l'ADNn en altres entitats clíniques com la miositis corporal d'inclusió i, fins i tot, l'obesitat i la resistència d'insulina^{63,144}. Entre aquestes malalties en què s'hi han demostrat anomalies en la funció mitocondrial hi trobem la Síndrome de Fatiga Crònica (SFC) per la qual cosa es creu que aquesta disfunció podria contribuir a la patogènia d'aquesta malaltia^{145,146}. En el següent apartat, es revisa amb més detall la SFC ja que és una patologia que s'ha estudiat en un dels treballs d'aquesta tesi.

3.8.1. Síndrome de Fatiga Crònica (SFC)

Aquesta síndrome és una malaltia multisistèmica que afecta a molts òrgans i sistemes i, per tant, amb simptomatologia molt diversa però que es caracteritza, principalment, per fatiga. Degut a la sensibilitat dels mitocondris als canvis cel·lulars i al seu paper com a centre de producció d'energia de la cèl·lula, es creu que petits canvis en la funció mitocondrial poden tenir un gran efecte en determinats pacients, provocant així simptomatologia compatible amb la SFC. Tot i així, no queda clar si els defectes es troben en el propi orgànul o en disregulacions en vies de

senyalització relacionades amb la funció mitocondrial, per exemple, la ruta de l'AMPK¹⁴⁵.

En quant a les evidències de la disfunció mitocondrial en la SFC, alguns estudis recullen una funció disminuïda de la CRM en pacients amb SFC si es comparen amb controls sans, essent aquesta disfunció major en moments d'estrès cel·lular amb alta demanda metabòlica¹⁴⁶. Alguns no només apunten a una disfunció mitocondrial, sinó que observen una correlació positiva d'aquesta amb la gravetat de la malaltia¹⁴⁷. Altres estudis aporten més evidències que impliquen a la disfunció mitocondrial com a causa de la simptomatologia de la SFC, així com també proposen noves dianes terapèutiques amb l'ús de suplementos dietètics, medicaments o mesures higiènicodietètiques en funció de la presència i/o el grau de disfunció mitocondrial de la persona que pateix SFC¹⁴⁸.

3.8.1.1. Prevalença

La prevalença s'estima entre 0'5% i 2'5% en població general. És una síndrome que afecta preferentment a adults joves i de mitjana edat, però s'ha descrit també en nens i ancians. Afecta més a les dones, generalment el doble que als homes¹⁴⁹.

3.8.1.2. Etiologia

S'han explorat moltes hipòtesis somàtiques i psicosocials sobre l'etiologia de la SFC. Es desconeix la seva causa però s'ha intentat associar, sense èxit, a agents infecciosos, sobretot virus, com el d'Epstein-Barr, retrovirus, virus de l'herpes tipus 6, enterovirus, Coxsackie B i altres, sense resultats concloents. També s'ha explorat la disfunció immune, vies neuroendocrines, la disfunció del propi sistema nerviós central i/o muscular, la capacitat per l'exercici, causes genètiques, trets de personalitat i processos psicològics¹⁴⁹. D'altra banda, les alteracions recollides en el sistema neuroendocrí i en el sistema nerviós central no són suficients per explicar els símptomes de la SFC¹⁵⁰. La hipòtesi més plausible actualment postula que la SFC estaria causada per interaccions més complexes entre tots els sistemes reguladors que implicarien el sistema nerviós central, el sistema immunitari i els sistemes de regulació hormonal i energètics^{150,151}. Així doncs, l'etiologia no és prou clara encara i es creu eminentment multifactorial¹⁴⁹.

3.8.1.3. Característiques clíniques

La síndrome de la fatiga crònica (SFC) és una entitat clínica caracteritzada per fatiga extrema que resulta invalidant en diferents graus, que perdura en el temps i que no s'explica per cap entitat ni malaltia subjacent. Es caracteritza per una fatiga intensa, a més d'altres símptomes cognitius, autonòmics, neuroendocrins, immunològics i musculoesquelètics de nova aparició i que no són

explicables per cap altre o altres entitats clíniques. Han de tenir una durada d'almenys sis mesos, no remetre amb el descans i empitjorar amb l'activitat física i/o mental, i amb una molt lenta recuperació i reducció de >50% de les activitats de la vida diària realitzades pel pacient¹⁵²⁻¹⁵⁴.

3.8.1.4. Comorbiditats

Alguns estudis indiquen una alta proporció de comorbiditats associades a la SFC, més del 80%¹⁵⁵. Són freqüents comorbiditats com fibromiàlgia, dolor miofascial, hipersensibilitat química múltiple, síndrome de Sjörgen, epicondilitis i altres alteracions neuromusculars, alteracions tiroïdals, hipovitaminosi D, endometriosis i alteracions psicopatològiques com distímia i altres alteracions afectives, atacs de pànic i agorafòbia així com trastorns de personalitat¹⁵⁵. La comorbiditat psiquiàtrica en pacients amb SFC al llarg de la vida pot arribar a un 68%¹⁵⁶.

3.8.1.5. Diagnòstic

Els criteris de Fukuda de 1994¹⁵² han estat els més usats i en els quals s'han basat la majoria de clínics¹⁵². També existeixen altres documents de consens com el canadenc de 2003 o, el més recent, els criteris revisats de consens internacional de 2011¹⁵³, amb canvi de nom de SFC per la denominació d'encefalitis miàlgica, que ofereixen una revisió sobre fisiopatologia, simptomatologia i tractament.

Taula 12. Criteris Internacionals de Fukuda per al diagnòstic de SFC

Criteri major:	Fatiga persistent o recurrent, inexplicada, que es presenta de nou, amb inici definit i que no és resultat d'esforços recents. No millora clarament amb el descans. Ocasionalment una reducció considerable dels nivells previs de l'activitat quotidiana (ocupacional, educacional, social o personal del / de la pacient)
A més ha de complir ≥ 4 dels següents símptomes que persisteixen o rapareixen durant ≥ 6 mesos consecutius i que no precedeixen a la fatiga. Cal excloure més malalties que cursin amb fatiga perllongada	
Criteris menors (ha de complir-ne 4 o més):	Afectació de la memòria recent o de la concentració
	Mal de coll
	Adenopaties cervicals o axil·lars doloroses
	Dolor muscular
	Poliartràlgies sense signes inflamatoris
	Son no reparador
	Cefalees amb noves característiques o intensitat
Fatiga després d'exercici que dura més de 24 hores	
Els/Les pacients que tinguin fatiga crònica no explicada però que no reuneixin els criteris de SFC es caracteritzarien com afectats/des de Fatiga crònica idiopàtica.	

Per al diagnòstic de SFC cal realitzar una història clínica exhaustiva, un examen físic minuciós, una exploració de l'estat mental i algunes proves complementàries que són necessàries a l'hora de detectar altres trastorns que també cursen amb fatiga severa. La SFC es diagnostica un cop s'han descartat altres patologies i la persona compleix els criteris diagnòstics¹⁴⁹.

3.8.1.6. Diagnòstic diferencial

Cal tenir present que la fatiga és un símptoma molt prevalent entre la població general. Es considera que aproximadament entre un 5 i un 20% de la població pot, en algun moment de la seva vida, presentar fatiga que es perllongui durant un mes¹⁵¹. Aquest símptoma sol estar en relació amb alguna malaltia o procés intercurrent i és important en primera instància enfocar el diagnòstic a descartar-ho^{149,152}. És important destacar que moltes persones afectades de SFC presenten també dolor generalitzat i compleixen els criteris diagnòstics de fibromiàlgia¹⁵⁷. És per aquest motiu que alguns investigadors consideren ambdues condicions clíniques com dos pols d'una mateixa entitat nosològica¹⁵⁷.

3.8.1.7. Tractament i pronòstic

Degut a què en el moment actual no es coneix l'etiologia de la SFC no és possible oferir un tractament curatiu. No obstant això, es poden proporcionar tractaments simptomàtics i de suport. Els objectius del tractament estan dirigits a reduir els graus de fatiga i dolor així com a millorar els nivells d'activitat, adaptació i qualitat de vida. Tanmateix, cal assenyalar que l'efectivitat global no és elevada^{149,158,159}. Hi ha diverses revisions sistemàtiques que han investigat l'efectivitat de diversos tractaments. La teràpia cognitiva conductual i la teràpia d'exercici físic progressiu controlat són les úniques intervencions que han recollit evidències d'aportar beneficis¹⁴⁹. El pronòstic de la recuperació funcional és, en general, dolent a curt termini, essent lleugerament millor el de llarg termini¹⁵⁹.

3.8.1.8. Mitocondri i SFC.

Els mitocondris són molts sensibles als canvis cel·lulars, principalment pel seu paper com a centre de producció d'energia de les cèl·lules; així doncs, petits canvis en la funció mitocondrial poden tenir un gran efecte en pacients i, per exemple, provocar fatiga severa¹⁴⁵, principal símptoma de la SFC.

Hi ha evidències que part de l'etiologia de la SFC tindria a veure amb una disfunció mitocondrial adquirida. Són alguns indicadors que exemplifiquen aquesta disfunció mitocondrial: la producció anormal d'adenosina trifosfat (ATP), així com la presència de dany mitocondrial que porta a un deteriorament de la via oxidativa de la fosforilació¹⁴⁵. Alguns estudis també han demostrat un augment del lactat basal en sang, així com una disminució de la producció d'ATP mitocondrial en pacients amb SFC en comparació amb els controls¹⁶⁰; i altres han demostrat una forta correlació entre el grau de disfunció mitocondrial i la gravetat de la malaltia¹⁴⁸, tot i que existeixen altres estudis que resulten contradictoris^{161,162}.

Aquestes dades han de ser interpretades amb precaució ja que les alteracions mitocondrials poden ser degudes a la desregulació d'altres vies de senyalització que, depenent de la part de la via que s'alteri, poden no tenir a veure amb el mitocondri pròpiament. Igual que en altres patologies i entitats clíniques, es requereixen de més estudis per determinar el paper exacte dels mitocondris en la SFC¹⁴⁵.

4. Mitocondri i TN

Com ja hem posat de manifest en anteriors apartats, les proteïnes mitocondrials estan codificades tant per l'ADNmt com per l'ADNn. Les variacions en ambdós genomes, així com la interacció entre ells, poden conduir a una alteració en la funció mitocondrial. Els factors genètics que intervenen en la regulació de la funció mitocondrial i, per tant, en la bioenergètica cel·lular són d'elevada complexitat; aquesta energia aportada pels processos mitocondrials tenen una forta implicació en la neuroplasticitat i en l'alliberament de neurotransmissors. Ambdós processos són vitals per mantenir una funció cerebral correcta. Això porta a pensar que una lleugera desregulació de la funció mitocondrial pot donar lloc a una àmplia gamma d'alteracions fenotípiques i podria contribuir a explicar com la disfunció mitocondrial pot està implicada en diversos TN⁹⁹.

Els mecanismes i vies exactes per les quals el mitocondri contribueix a la fisiopatologia cerebral, tant en la funció fisiològica com en la patològica, encara no es coneixen en profunditat. En alguns pacients, determinades mutacions genètiques en l'ADNmt poden causar directament símptomes neuropsiquiàtrics, però probablement representen la minoria de pacients amb trastorn mental^{66,117,163}. Per tant, és més probable la implicació dels SNPs de l'ADNmt i també de l'ADNn que codifiquen les proteïnes mitocondrials, els quals poden contribuir a augmentar risc de desenvolupar trastorns del neurodesenvolupament en alguns pacients. En aquest sentit, GWAS recents han identificat un gran nombre de SNPs que estan associats als principals trastorns psiquiàtrics. Cada al·lel comú confereix un risc molt baix, però la combinació de tots ells confereix susceptibilitat a l'hora patir TN^{86,117}. En el cas del TEA però, els estudi de GWAS són menys conclouents potser a causa de l'estudi de mostres petites i un menor efecte d'aquestes variants de risc comunes. Tot i així, s'ha estimat que els SNP expliquen almenys un 20-50% de la variància en el risc de patir TEA¹⁶⁴. Cal mencionar que en aquests estudis només s'ha contemplat la contribució dels SNPs nuclears i no dels SNPs mitocondrials.

A més, alteracions de les ROS, de la dinàmica i el trànsit mitocondrial, de l'homeòstasi del calci i de les vies de senyalització cel·lular porten a una disfunció mitocondrial i poden conduir, també, a manifestacions clíniques en els TN¹⁰⁰.

Les CNVs, que poden afectar a diversos gens ja que són duplicacions o delecions de regions concretes del genoma, són menys freqüents que els SNPs però confereixen un risc més elevat per a desenvolupar TEA, DI o ESQ.

Les mutacions puntuals rares que produeixen una alteració de la funció del gen, moltes de les

quals son *de novo*, també poden conferir un risc substancial per a l'ESQ, el TEA i la DI. Aquestes tres malalties comparteixen factors genètics de risc, entre els quals hi ha 15 CNVs recurrents. Avui sabem que determinades persones són portadores d'una CNV recurrent altament associada a l'ESQ (2-3% dels pacients), a la DI (20-25% de les persones afectades) i al trastorn de l'espectre autista (15-20% dels pacients)^{19,66,165}. És important destacar que s'ha trobat que la inactivació d'alguns gens es repeteix en alguns trastorns psiquiàtrics com TEA, DI, TDAH i ESQ⁶⁶.

4.1 Mitocondri i TEA

Cada cop es tenen més dades que reforcen la hipòtesi que alteracions en l'ADNmt poden ser un factor rellevant en l'etiologia del TEA. Diversos estudis demostren l'elevació de marcadors de disfunció mitocondrial (lactat, piruvat, carnitina i ubiquinona) en pacients amb TEA respecte a controls. Alguns d'aquests marcadors es va correlacionar amb la gravetat del trastorn⁹².

Nombrosos estudis bioquímics i metabòlics de pacients amb TEA també han observat disfunció mitocondrial. Així com estudis genòmics d'ADNn han identificat diverses CNVs heterozigòtiques i mutacions de pèrdua de funció (LOF, de l'anglès *loss of function*). Tot i que el risc acumulat per les mutacions CNVs i LOFs a l'ADNn és només del 20%. Si a aquest risc hi afegim variants del tipus SNP, el risc augmenta fins al 50%. Per tant, el TEA és un trastorn poligènic del que encara no se'n coneix gran part de factors etiopatogènics.

És important destacar que mutacions tipus LOF en pacients amb TEA es solapen amb anomalies metabòliques i cardíques. Trobem en la literatura un article amb una cohort de pacients amb TEA on es posa de manifest que moltes de les CNVs observades en aquests pacients inactiven gens relacionats amb la bioenergètica cel·lular. També s'ha comprovat que moltes de les mutacions LOF afecten a rutes de senyalització directament lligades a la funció mitocondrial, així com a gens involucrats en la regulació del calci, l'oxidació d'àcids grassos i al metabolisme mitocondrial d'aminoàcids de cadena ramificada. Per tant, defectes parcials en la funció mitocondrial poden ser un factor important en la fisiopatologia del TEA⁶⁶.

Així doncs, a partir de les evidències que indiquen que la disfunció mitocondrial és fonamental en l'etiologia del TEA, podem predir que variants en l'ADNmt, necessari per a la síntesi de gens claus per a la cadena de fosforilació oxidativa, poden contribuir al risc de patir TEA.

Estudis d'haplogrups han revelat que els haplogrups europeus I, J, K, X, T i U (que representen aproximadament un 55% dels llinatges europeus d'ADNmt) i els haplogrups de nadius asiàtics i americans A i M tenen significativament un increment de risc de TEA, amb una relació de

probabilitat, OR, des de 1.55 fins a 2.18⁶⁶. Aquestes troballes suggereixen que certs haplogroups d'ADNmt comporten una reducció en la capacitat bioenergètica mitocondrial, però segurament encara per sobre del llindar requerit pel cervell. Però quan es combina ADNn heterozigòtic amb mutacions genètiques d'ADNmt heteroplàsmic o s'està exposat a toxines mitocondrials de l'entorn, la funció mitocondrial cau per sota de les necessitats mínimes del cervell i això portaria a símptomes típics de TEA⁶⁶.

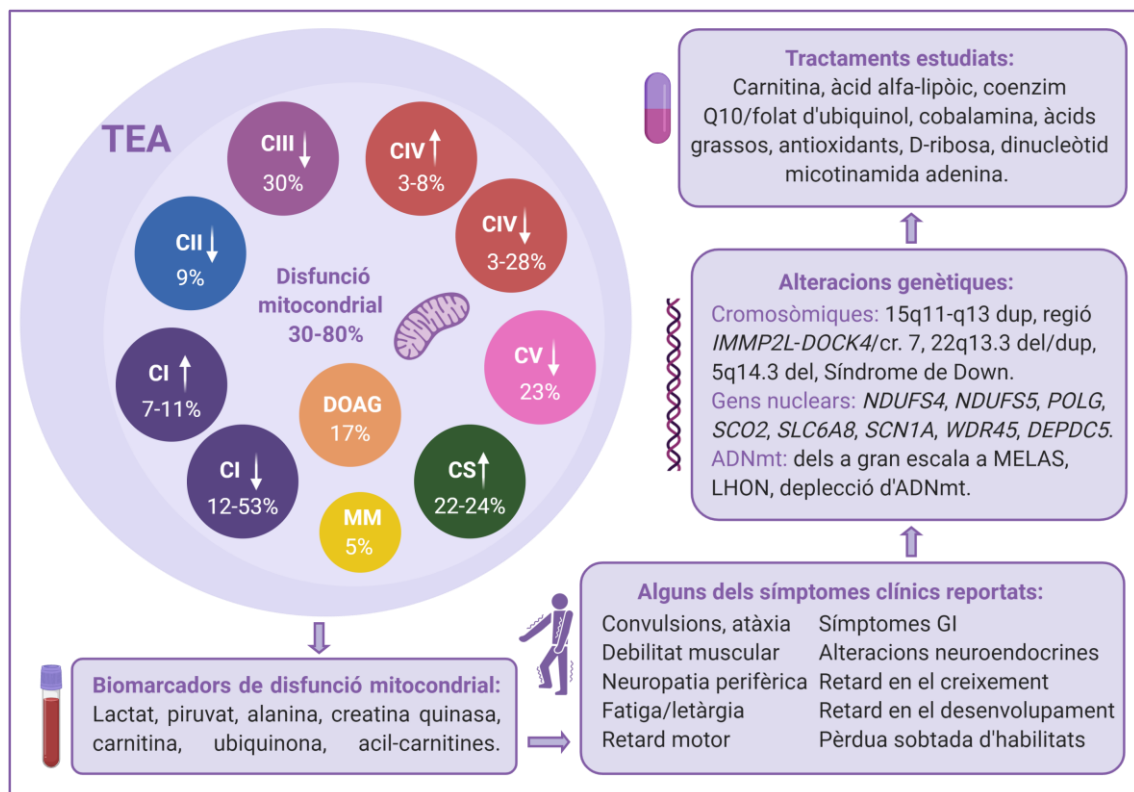


Figura 17. Aspectes més rellevants de disfunció mitocondrial en TEA. (Adaptat de Frye et al. 2020¹⁶⁶)

En el cercle es resumeixen alguns estudis que mostren disfunció mitocondrial identificades en població infantil. Els requadres sintetitzen els biomarcadors, les alteracions genètiques, els símptomes i els tractaments més estudiats fins al dia d'avui en disfunció mitocondrial associada a TEA. [MM=malaltia mitocondrial; CI=Complexe I de la CRM; CII=Complexe II de la CRM; CIII=Complexe III de la CRM; CIV=Complexe IV de la CRM; CV=Complexe V de la CRM; CS=Citrat sintasa; DOAG=Defecte en l'oxidació dels àcids grassos]

Una característica genètica que crida l'atenció i que és diana de moltes hipòtesis i investigacions és la diferència de prevalença entre sexes en el TEA. La proporció de persones afectades en funció del sexe és de 3 o 4 homes per cada dona¹¹. Aquest mateix patró apareix en l'aparició sobtada de ceguesa en la neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON) causada principalment per mutacions homoplàsmiques en l'ADNmt. Aproximadament el 90% de casos es produeixen per una mutació de l'ADNmt en algun dels tres punts ja descrits prèviament i la majoria es detecten a nivells homoplàsmics. La pèrdua de visió es dona en aproximadament el 50% de

portadors homes i en un 10% en portadores dones. El nombre de còpies d'ADNmt sembla que podria jugar algun paper en la penetrància, ja que s'ha observat que els individus simptomàtics tenen menys còpies d'ADNmt que els portadors asimptomàtics de la mateixa mutació¹²³. Aquesta protecció aparent que aporta pertànyer al sexe femení s'ha atribuït, entre d'altres hipòtesis, al receptor d'estrògens del mitocondri. L'estradiol activa el receptor d'estrògens mitocondrials que incrementa les defenses antioxidants d'aquest orgànu⁶⁶.

En estudis amb ratolins s'ha vist que els que presenten nivells d'heteroplàsmia, que duen a una inhibició dels gens relacionats amb la cadena de fosforilació oxidativa, manifesten una reducció d'activitat, hiperexcitabilitat i afectació greu en la memòria a llarg termini. En algunes mutacions s'ha comprovat una interferència a nivell de migració neuronal en el neurodesenvolupament. Això podria causar hiperexcitació que clínicament es podria traduir en hiperexcitabilitat a estímuls i en comportaments perseverants, ambdós associats a TEA. Així doncs, veiem que el grau d'heteroplàsmia pot generar gran variabilitat clínica. Per exemple, la mutació a l'ADNmt ARNt^{Leu(UUR)} m.3243A>G en un nivell d'heteroplàsmia de 20 al 30% s'ha relacionat amb TEA i amb diabetis tipus II; de 50 al 90% s'ha associat a MELAS i al voltant de 90% d'heteroplàsmia pot causar la mort del nen¹⁶⁷. S'ha vist que els fenotips de les malalties mitocondrials estan determinats, en gran mesura, per canvis en l'estat d'expressió gènica nuclear; essent aquest capaç de respondre i compensar, de manera limitada, les diferències en la capacitat bioenergètica mitocondrial.

També s'ha observat en estudis amb ratolins amb alteracions genètiques que codifiquen gens relacionats amb la cadena d'oxidació fosforilativa i altres funcions mitocondrials com, sota estrès induït, tenen respostes sorprenents pel que fa els nivells plasmàtics de corticosterona, glucosa i catecolamines, així com en marcadors inflamatoris i nivells de factors de transcripció hipocampals. Per tant, es pot postular que els esdeveniments estressants podrien desencadenar trastorns neuropsiquiàtrics en individus amb una funció mitocondrial compromesa⁶⁶.

4.2 Mitocondri i DI

L'etiologia de la DI és molt diversa, com ja hem revisat prèviament. Cada cop s'han fet més avenços en l'origen genètic d'aquest trastorn, que explicaria més del 50% de casos, i van des d'anomalies cromosòmiques numèriques i/o estructurals i variants de còpia submicroscòpica fins a anomalies de metilació i per defectes únics en determinats gens¹⁶⁸. Aquestes troballes estan bàsicament centrades en l'ADNn. Últimament però, el focus s'ha traslladat també a

l'ADNmt degut a l'elevada presència de trastorns del metabolisme i de símptomes clínics que es superposarien a la disfunció mitocondrial associada a la DI. Per exemple, s'han detectat errors en la CRM i en altres punts dels metabolisme mitocondrial en diversos trastorns que cursen amb DI entre els que destaquen la síndrome de Down, la síndrome de Rett i el TEA^{169,170}.

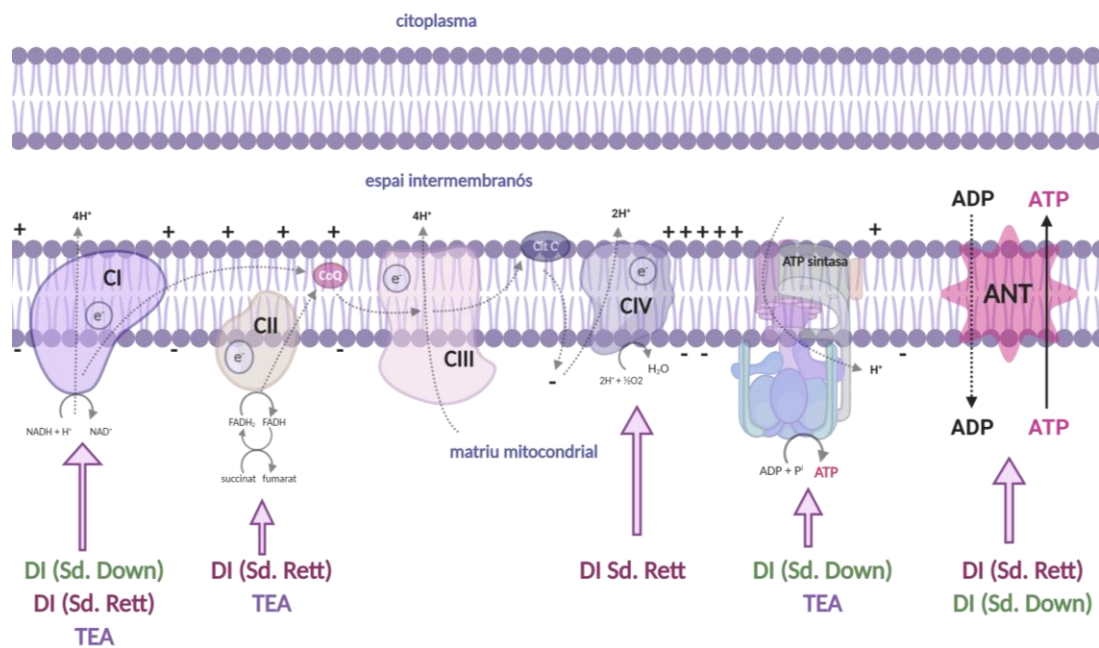


Figura 18. Alteració de complexos de la CRM en alguns TN. (Adaptat de Valenti et al. 2014¹⁶⁹)

4.3 Mitochondri i ESQ

Tot i que l'evidència científica de la capacitat mitocondrial en ESQ no és tan forta com en TEA o, fins i tot, en la DI, múltiples estudis mostren resultats que apunten en aquesta direcció. Per exemple, en cervells de persones amb ESQ s'ha identificat un increment de mutacions d'ADNmt⁶⁶. D'altra banda, en un model animal de la síndrome de deleció 22q11, que sovint s'associa a ESQ, els gens de la cadena mitocondrial de transport d'electrons estan alterats⁹². D'altra banda, es mostra l'augment de les proteïnes de les subunitats del complex I en el còrtex prefrontal de ratolins amb ESQ⁹². També s'han recollit dades sobre alteracions en proteïnes antiapoptòtiques en còrtex cerebral de pacients amb ESQ¹⁷¹ i s'han detectat polimorfismes en gens de l'ADNmt, concretament a *MT-ATP6*, que codifiquen subunitats proteïques vitals per a la cadena de fosforilació oxidativa i alguns estudis suggereixen que gens nuclears de risc per a ESQ com *DAOA* o *DISC1*, poden afectar la funció mitocondrial¹⁷².

S'han descrit alteracions mitocondrials en alguns components cel·lulars i en cèl·lules de pacients amb ESQ com les plaquetes, un augment de l'activitat del complex I; limfòcits activats, menor

densitat mitocondrial; i cèl·lules limfoblastoides amb menor funció mitocondrial⁹².

Diversos estudis cerebrals postmortem suggereixen que l'estructura o funció mitocondrial està alterada en l'ESQ. S'ha observat una disminució del volum mitocondrial en oligodendròcits, menys mitocondris en el cos estriat i una hiperplàsia dels mitocondris als botons presinàptics¹⁷³. Altres estudis mostren menys nivells d'ARNm i de proteïna de les subunitats complex I en l'escorça prefrontal i l'estriat, així com un augment en les zones corticals parieto-occipitals¹⁷². De totes maneres, queda per aclarir quins efectes pot tenir-hi la medicació antipsicòtica degut a la seva inherent toxicitat mitocondrial.

Hi ha prou evidència per pensar que en l'ESQ hi ha dèficits mitocondrials significatius que, tot i semblar tenir una magnitud limitada, poden dur a un desenvolupament cerebral anormal i a l'alteració de la plasticitat sinàptica i de la connectivitat neuronal¹⁷⁴.

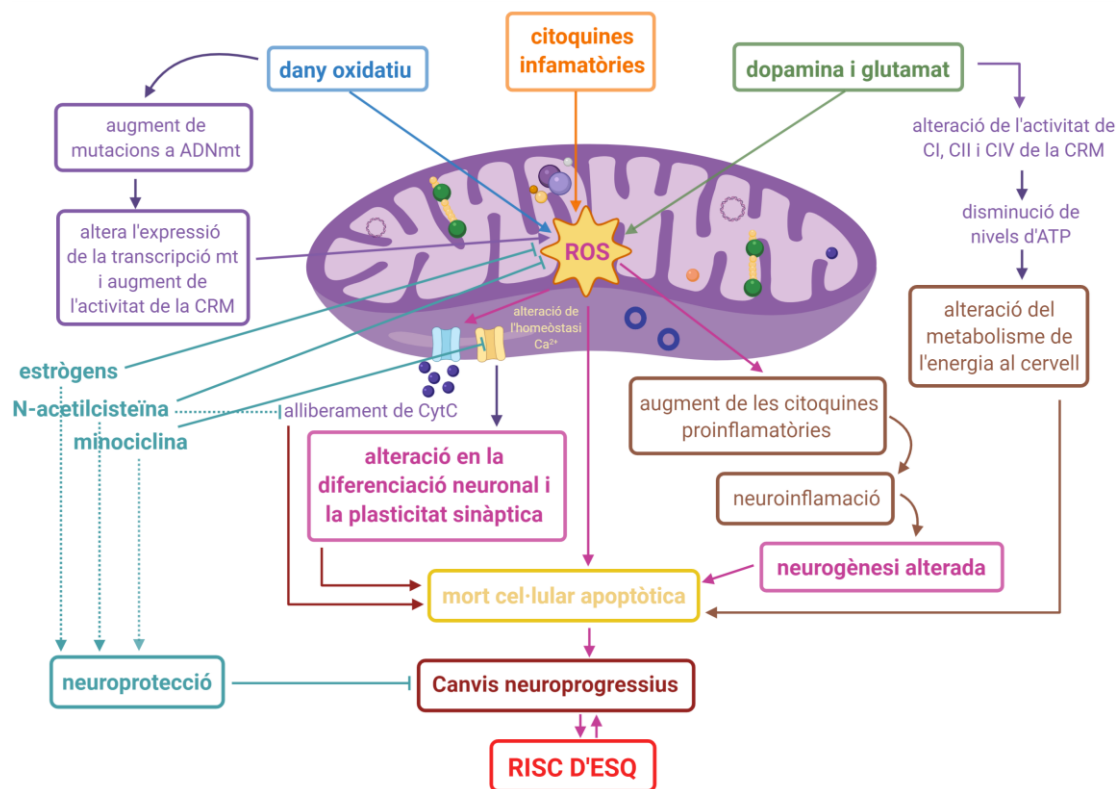


Figura 19. Síntesi dels mecanismes de disfunció mitocondrial que duu a canvis neuroprogressius o de neuroprotecció en ESQ. (Adaptat de Rajasekaran et al. 2015¹⁷⁵) [mt: mitocondrial; ROS: Espècies reactives d'oxigen; CytC: citocrom C]

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

.....

IV. HIPÒTESI

.....

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

IV. HIPÒTESI

D'acord amb el descrit en la introducció hi ha evidències de disfunció mitocondrial en els TN: el trastorn de l'espectre autista (TEA), la discapacitat intel·lectual (DI) i l'esquizofrènia (ESQ).

És per això que la hipòtesi principal del present treball és que en els TN (TEA, DI i ESQ) existeix una disfunció mitocondrial que està present en diversos teixits i òrgans i pot estar associada a alteracions en l'ADNmt.

I en aquest context, les hipòtesis operatives d'aquesta tesi doctoral són les següents:

- ❖ Les persones amb diagnòstic de TEA, DI o ESQ presenten major freqüència de CCAMMs que els individus control.
- ❖ Les persones amb diagnòstic de TEA, DI o ESQ presenten un número de còpies d'ADNmt menor que els individus control.
- ❖ Les persones amb diagnòstic de TEA, DI o ESQ presenten mutacions patogèniques en el seu ADNmt que no estan presents en individus control.
- ❖ Els nivells de lactat en sang en pacients amb diagnòstic d'ESQ són més elevats que en individus control durant la realització d'un exercici físic d'intensitat moderada.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

.....:

V. OBJECTIUS

.....:

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

V. OBJECTIUS

Els objectius que proposem per contrastar aquestes hipòtesis són:

- 1) Comparar la freqüència de CCAMMs entre persones amb diagnòstic de TEA, DI o ESQ, i individus control.
- 2) Comparar el número de còpies d'ADNmt entre persones amb diagnòstic de TEA, DI o ESQ, i individus control.
- 3) Analitzar la seqüència completa de l'ADNmt de pacients amb TEA, DI, ESQ i individus control per tal de cercar variants patogèniques.
- 4) Comparar els nivells de lactat en sang entre pacients amb diagnòstic d'ESQ i individus control abans, durant i en finalitzar un exercici físic d'intensitat moderada.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

VI. RESULTATS i TREBALLS PUBLICATS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

VI. RESULTATS I TREBALLS PUBLICATS

❖ **Publicació 1:**

Genetic and clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability.

Alba Valiente-Pallejà, Helena Torrell, Gerard Muntané, Maria José Cortés, Rafael Martínez-Leal, Nerea Abasolo, Yolanda Alonso, Elisabet Vilella, Lourdes Martorell.

Human Molecular Genetics. 2018;27(5):891-900.

DOI: 10.1093/hmg/ddy009

❖ **Antecedents:**

Determinades CCAMMs s'han descrit en persones amb TEA i/o DI. Aquest fet indica que la disfunció mitocondrial podria ser un mecanisme present en l'etiopatogènia d'aquests trastorns. Aquest estudi ha investigat la presència d'aquestes CCAMMs en un grup de pacients amb DI, alguns dels quals, a més, complien criteris diagnòstics de TEA (DI+TEA) i les ha comparat amb un grup control. En aquests grups també s'ha comparat el número de còpies d'ADNmt i en els dos grups de pacients s'ha analitzat la seqüència de l'ADNmt per identificar mutacions patogèniques.

❖ **Aportacions:**

Les persones amb DI i DI+TEA van mostrar una freqüència més alta d'algunes CCAMMs. Concretament: restrenyiment, edema, convulsions, alteracions de la visió, estrabisme i incontinència d'esfínters. També vam reportar un menor contingut d'ADNmt en els dos gens mitocondrials analitzats, *MT-ND1* i *MT-ND4*, en els dos grups de pacients respecte al grup control. Vam identificar 49 mutacions probablement patogèniques amb una heteroplàsmia superior al 60%; 8 mutacions amb canvi de sentit localitzades en gens proteics, 29 en els ARNr i 12 en ARNt. Un 28'6% de pacients amb DI+TEA i un 30'5% de pacients amb DI presentaven, al menys, una mutació probablement patogènica a l'ADNmt.

❖ **Aspectes a destacar:**

Els dos grups de pacients van presentar, de forma significativa, una freqüència més elevada de determinades CCAMMs i un menor número de còpies d'ADNmt en comparació al grup control. A més, es van detectar mutacions probablement patogèniques en l'ADNmt en un número significatiu de pacients. Aquests resultats aporten més evidències de disfunció mitocondrial en TEA i DI.

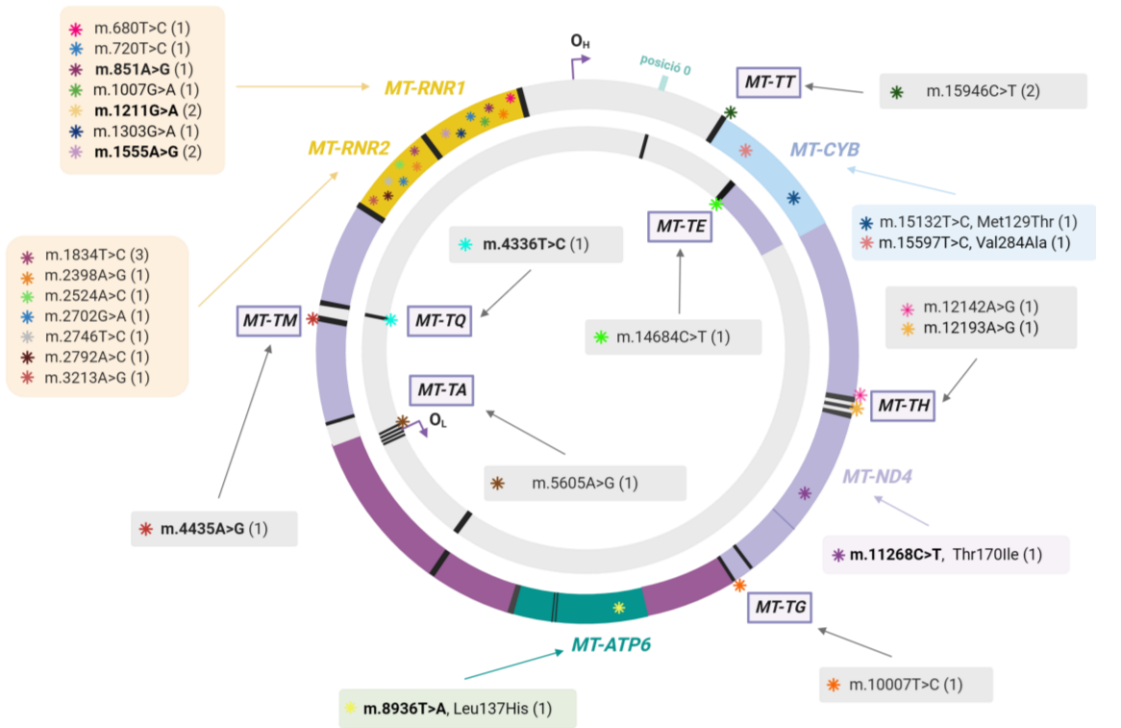


Figura 20: Variants identificades en TEA+DI al nostre estudi. (En negra, variants presents també en DI; en parèntesi, número de participants portadors de la variant).

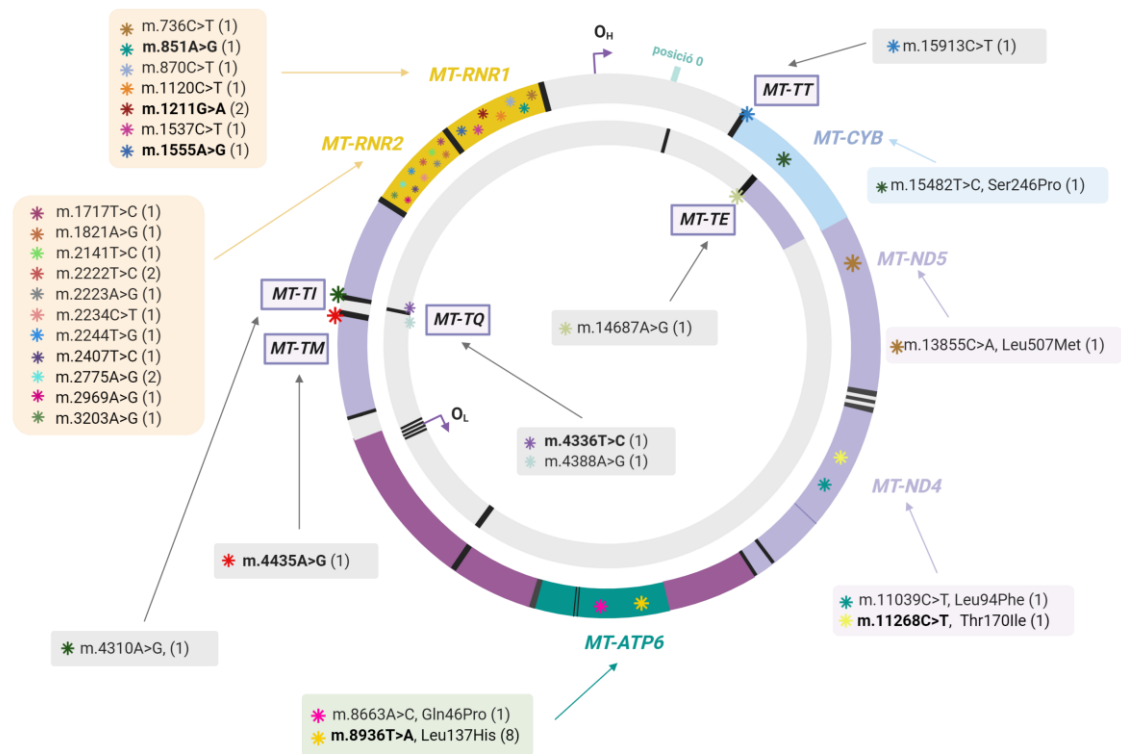


Figura 21: Variants identificades en DI al nostre estudi. (En negra variants presents també en TEA+DI; en parèntesi, número de participants portadors de la variant).



ORIGINAL ARTICLE

Genetic and clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability

Alba Valiente-Pallejà^{1,2,3,†}, Helena Torrell^{4,†}, Gerard Muntané^{1,5,†}, Maria J. Cortés^{2,3,6,7}, Rafael Martínez-Leal^{2,3,6,7}, Nerea Abasolo⁴, Yolanda Alonso^{1,2,3,7}, Elisabet Vilella^{1,2,3,7} and Lourdes Martorell^{1,2,3,7,*}

¹Research Department, Hospital Universitari Institut Pere Mata, E43206 Reus, Spain, ²Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), E43204 Reus, Catalonia, Spain, ³Centro de Investigación Biomédica en Red en Salud Mental (CIBERSAM), E43204 Reus, Catalonia, Spain, ⁴Center for Omic Sciences, 43204 Reus, Catalonia, Spain, ⁵Institute of Evolutionary Biology, Spanish National Research Council (CSIC), Universitat Pompeu Fabra, E08003 Barcelona, Catalonia, Spain, ⁶Intellectual Disability-Developmental Disorders Research Unit (UNIVIDD), Fundació Villablanca, E43204 Reus, Catalonia, Spain and ⁷Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili (URV), E43201 Reus, Catalonia, Spain

*To whom correspondence should be addressed at: Research Department, Hospital Universitari Institut Pere Mata, Ctra. de l'Institut Pere Mata, s/n, 43206 Reus, Catalonia, Spain. Tel: þ34 977338565; Fax: þ34 977319400; Email: martorell@peremata.com

Abstract

Clinical conditions commonly associated with mitochondrial disorders (CAMDs) are often present in autism spectrum disorders (ASD) and intellectual disability (ID). Therefore, the mitochondrial dysfunction hypothesis has been proposed as a transversal mechanism that may function in both disorders. Here, we investigated the presence of conditions associated with mitochondrial disorders and mitochondrial DNA (mtDNA) alterations in 122 subjects who presented ASD with ID (ASD group), 115 subjects who presented ID but not ASD (ID group) and 112 healthy controls (HC group). We assessed in the three study groups the presence of the clinical conditions through a questionnaire and the mtDNA content of two mitochondrial genes, *MT-ND1* and *MT-ND4*, by qPCR. The mtDNA sequences of 98 ASD and 95 ID subjects were obtained by mtDNA-targeted next generation sequencing and analysed through the MToolBox pipeline to identify mtDNA mutations. Subjects with ASD and ID showed higher frequencies of constipation, edema, seizures, vision alterations, strabismus and sphincter incontinence than HCs subjects. ASD and ID subjects showed significantly lower mtDNA content than HCs in both *MT-ND1* and *MT-ND4* genes. In addition, we identified 49 putative pathogenic variants with a heteroplasmy level higher than 60%: 8 missense, 29 rRNA and 12 tRNA variants. A total of 28.6% of ASD and 30.5% of ID subjects carried at least one putative pathogenic mtDNA mutation. The high frequency of CAMDs, the low mtDNA content and the presence of putative pathogenic mtDNA mutations observed in both ASD and ID subjects are evidence of mitochondrial dysfunction in ASD and ID.

[†]The first three authors have equally contributed to the work.

Received: November 3, 2017. Revised: December 21, 2017. Accepted: December 30, 2017

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Introduction

Autism spectrum disorders (ASDs) are a group of severe neurodevelopmental disorders with an onset in the early stages of development. People affected by ASD tend to suffer persistent deficits in social communication, social interaction and restricted or repetitive patterns of behavior, interests, or activities (1). The median worldwide prevalence of ASD is 1–2%, and a similar prevalence is reported in the dataset of adults only (2). Intellectual disability (ID) is characterized by both intellectual and adaptive functional deficits in conceptual, social and practical domains, affecting 2–3% of the population (3). The onset of ID occurs during the developmental period. Both ASD and ID are strongly associated and show a high comorbidity (2,4). In children, 18 to 70% of patients with ASD also present ID and up to 40% of subjects with ID also present ASD (5,6). In adulthood, approximately one-fifth of subjects with ASD are diagnosed with ID (7).

ASD also occurs with other frequent medical comorbidities, such as epilepsy, sensory abnormalities, motor deficits, sleep abnormalities, gastrointestinal disturbances, feeding and nutritional problems, metabolic syndrome and immune conditions (7–9). In fact, more than 70% of subjects with ASD have concurrent medical, developmental or psychiatric disorders (2). Interestingly, many of the above mentioned clinical characteristics are conditions that are commonly associated with mitochondrial disorders (CAMDs). Mitochondrial disorders comprise a collection of individual rare syndromes produced by defects in either the mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA that result in mitochondrial dysfunction. Impaired mitochondria affect most organ systems to different extents, producing a wide spectrum of phenotypes; however, little is known about the cascade of events involved in such diverse, rare syndromes (10,11). Interestingly, mitochondrial dysfunction has been described in both subjects with ASD (12,13) and ID (14) and has been suggested as a possible neurobiological subtype of ASD (15).

Mitochondria are key organelles required for energy production, and their proper function is therefore crucial for tissues with a high metabolic demand, such as the nervous system. Mitochondria have their own genome, known as mtDNA, which comprises a 16 569-bp, double-stranded, maternally inherited, circular molecule that contains the genetic information necessary for the synthesis of 13 essential polypeptides in the mitochondrial respiratory chain (16). Unlike nuclear DNA that is only present in two copies per cell, the mtDNA content varies, depending on the energy requirements. Each mitochondrion may present 2 to 10 mtDNA molecules, and each cell can contain several mitochondria (17). Interestingly, the mtDNA content is related to anthropometric indices (18) and has been proposed as a biomarker of mitochondrial dysfunction involved in conditions such as diabetes, obesity, cancer, HIV complications, aging (19) and autism (20).

The genetic architecture of ASD and ID is complex, with several types of genetic variants known to be associated with both conditions, although many of the genetic factors are unknown (3,4). Furthermore, despite the evidence of mitochondrial dysfunction in subjects with ASD and ID, the study of mtDNA has been neglected even it may contribute to the genetic bases of both conditions. Therefore, we tested the hypothesis that, in adulthood, CAMDs comorbidity is frequently present in ASD and ID compared with a control group. In addition, we investigated whether alterations in the mtDNA sequence were present in ASD and ID and whether the mtDNA content in ASD and ID cases differed from controls.

Results

CAMDs

We compared the frequency of CAMDs among the three groups (Table 1). Constipation, edema (referred to as venous insufficiency and other venous alterations), seizures, vision alterations, strabismus and sphincter incontinence were more frequent in the ASD group than in the HC group. All these conditions were also more frequent in the ID group than in the HC group. Other factors, such as temperature changes, diabetes, hypertension and cancer, were also more frequent in the ID group than in the HC group, but did not reach statistical significance. Conditions present in less than 5% of subjects that were not reported in the ASD and ID groups are: headache, migraine, diarrhea, abdominal pain, nausea, kinetosis, severe fatigue, fibromyalgia, dysautonomia, arthritis, muscular weakness, deafness, stroke, heart disease, hypercholesterolemia, kidney disease, hypoglycemia, and hypothyroidism.

mtDNA copy number

The mtDNA copy number, namely, the number of mtDNA molecules per white blood cell, differed among the three study groups (ASD, ID, and HC). Age, BMI and the number of cigarettes smoked per day were correlated with the mtDNA copy number; therefore, these factors were included as covariates in the general linear analysis comparing the mtDNA content between groups. The mtDNA copy number measured using either the *MT-ND1* or the *MT-ND4* genes was lower in the ASD and ID groups than in the HC group and was also significantly lower in the ID group than in the ASD group (Fig. 1). The deletion ratio was higher in both the ASD and ID groups than in the HC group, although significant differences were only present when the HC and ASD groups were compared.

Putative pathogenic mtDNA variants

Among the 193 sequenced subjects, MToolBox (21) identified 664 variants of clinical interest. After applying the selection criteria for pathogenicity prediction, we identified 57 (29.5%) subjects who carried 49 putative pathogenic variants, with a heteroplasmy level $\leq 60\%$. In the ASD group, 28 subjects carried 37 variants, whereas 29 subjects in the ID group carried 28 variants (Table 2). Notably, 11 variants were present in more than one subject and 12 subjects carried more than one putative pathogenic variant.

Non-synonymous variants

In the present study, eight non-synonymous variants fulfilled the cut-off prioritization criteria previously described as pathogenic. All were missense variants, none of them have been previously associated with a disease or health condition and, notably, three of them were not previously reported: m.8663A > C and m.8936T > A in the *MT-ATP6* gene and m.15597T > C in the *MT-CYB* gene.

rRNA variants

We identified 29 putative pathogenic rRNA variants based on the criterion of nucleotide variability ≤ 0.0097 and a heteroplasmy level higher than 60%. All variants, with the exception of m.2398A > G, have been previously reported. Interestingly, two of the 29 variants were reported to be associated with

Table 1. Percentage of subjects in the three study groups presenting conditions commonly associated with mitochondrial disorders (CAMDs)

Conditions	HC n % 112	ASD n % 122	ID n % 115	Statistics		
				Compared groups	χ^2	P
Specific conditions with frequency >5% in the study groups						
Constipation	17.0	73.8	57.4	HC vs. ASD	75.403	<0.001
				HC vs. ID	38.496	<0.001
				ASD vs. ID	7.060	0.008
Edema	3.6	15.6	27.8	HC vs. ASD	9.357	0.002
				HC vs. ID	24.478	<0.001
				ASD vs. ID	5.262	0.021
Seizures	0	63.9	42.6	HC vs. ASD	107.059	<0.001
				HC vs. ID	59.918	<0.001
				ASD vs. ID	10.820	0.001
Vision alterations	5.4	18.0	33.9	HC vs. ASD	8.762	0.003
				HC vs. ID	28.458	<0.001
				ASD vs. ID	7.810	0.005
Strabismus	1.8	10.7	13.0	HC vs. ASD	7.647	0.006
				HC vs. ID	10.268	0.001
				ASD vs. ID	0.328	0.567
Sphincters incontinence	0	66.4	31.3	HC vs. ASD	113.400	<0.001
				HC vs. ID	40.994	<0.001
				ASD vs. ID	29.160	<0.001
Other conditions grouped into organ systems						
Nervous system	15.2	100	100	HC vs. ASD	174.207	<0.001
				HC vs. ID	167.747	<0.001
				ASD vs. ID	—	—
Gastro-intestinal	4.5	5.7	1.7	HC vs. ASD	0.195	0.659
				HC vs. ID	0.646	0.422
				ASD vs. ID	1.612	0.204
Cardio-vascular	29.5	13.9	32.2	HC vs. ASD	5.287	0.021
				HC vs. ID	0.195	0.659
				ASD vs. ID	11.194	<0.001
Musculo-skeletal	2.7	0	0	HC vs. ASD	—	—
				HC vs. ID	—	—
				ASD vs. ID	—	—
Endocrine	12.5	8.2	17.4	HC vs. ASD	1.175	0.278
				HC vs. ID	0.071	0.790
				ASD vs. ID	4.527	<0.033

HC: healthy controls; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability.

Significant differences are indicated in boldface.

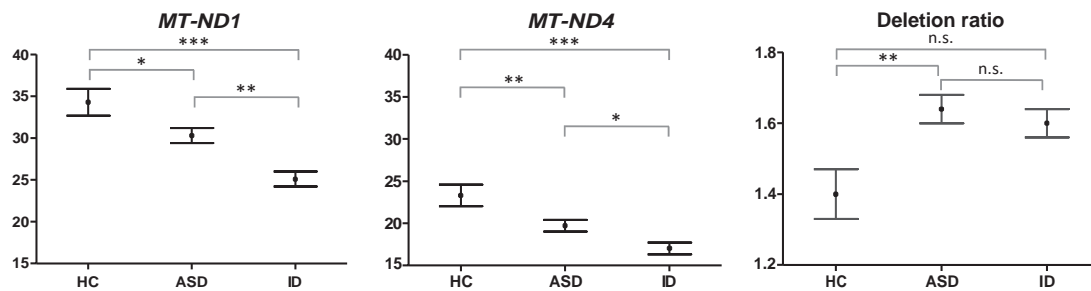


Figure 1. Estimated marginal means of the *MT-ND1* and *MT-ND4* genes and the deletion ratio in the three study groups. HC: healthy controls; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; n.s.: not significant; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

disease in MITOMAP: m.1537C > T was reported to be associated with maternally inherited or aminoglycoside-induced deafness, and the subject bearing this mutation actually suffered from this condition; and m.1555A > G was confirmed to be associated with deafness in MITOMAP, ClinVar and OMIM (<http://omim.org/entry/561000#0001>). However, only the oldest of the three subjects presenting the variant showed deafness (Table 3).

tRNA variants

We identified 12 putative pathogenic tRNA variants, four of them have been previously associated with several conditions; deafness, Alzheimer's disease, hypertension and visual loss were present in some study subjects, but mitochondrial myopathy and respiratory failure was not (Table 3).

Table 2. Putatively pathogenic variants present in the study sample

N	Variant	AA change	Freq.	dbSNP ID	Samples	Locus	Homo/ heteroplasmy	Disease score
Non-synonymous variants								
1	m.8663A>C	Q46P	0		ID074	<i>MT-ATP6</i>	0.79	0.889
2	m.8936T>A	L137H	0		A003, ID009, ID036, ID055, ID069, ID073, ID074, ID104, ID112		0.60–0.97	0.855
3	m.11039C>T	L94F	0		ID071	<i>MT-ND4</i>	0.99	0.702
4	m.11268C>T	T170I	0.0010		A095, ID015		1	0.739
5	m.13855C>A	L507M	0		ID070	<i>MT-ND5</i>	1	0.686
6	m.15132T>C	M129T	0.0002		A117	<i>MT-CYB</i>	1	0.821
7	m.15482T>C	S246P	0		ID038		1	0.559
8	m.15597T>C	V284A	0		A059		1	0.581
rRNA variants								
1	m.680T>C		0.0006		A099	<i>MT-RNR1</i>	1	
2	m.720T>C		0		A070		0.99	
3	m.736C>T		0		ID057		1	
4	m.851A>G		0	rs28502491	A092, ID011		0.96–1	
5	m.870C>T		0.0005		ID116		1	
6	m.1007G>A		0.0010	rs111033213	A051		0.99	
7	m.1120C>T		0.0005	rs727505171	ID007		1	
8	m.1211G>A		0.0010	rs397515725	A063, A095, ID015, ID042		1	
9	m.1303G>A		0.0023		A021		1	
10	m.1537C>T		0.0003		ID108		1	
11	m.1555A>G ^a		0.0032	rs267606617	A043, A054, ID018		0.99–1	
12	m.1717T>C ^a		0.0007		ID076	<i>MT-RNR2</i>	1	
13	m.1821A>G		0.0008		ID105		1	
14	m.1834T>C		0.0007		A078, A089, A156		1	
15	m.2141T>C		0.0031		ID112		1	
16	m.2222T>C		0		ID061, ID087		1	
17	m.2223A>G		0		ID038		1	
18	m.2234C>T		0		ID017		1	
19	m.2244T>G		0		ID011		1	
20	m.2398A>G		0		A068		1	
21	m.2407T>C		0		ID024		1	
22	m.2524A>C		0.0001		A096		1	
23	m.2702G>A		0.0020		A067		1	
24	m.2746T>C		0.0005	rs28663331	A090		1	
25	m.2775A>G		0		ID061, ID087		1	
26	m.2792A>C		0.0001		A057		1	
27	m.2969A>G		0.0002		ID065		1	
28	m.3203A>G		0.0009		ID055		1	
29	m.3213A>G ^a		0.0003		A098		1	
tRNA variants								
1	m.4310A>G		0.0008		ID085	<i>MT-TI</i>	1	
2	m.4336T>C		0.0220	rs41456348	A059, ID004	<i>MT-TQ</i>	0.98–1	0.4
3	m.4388A>G		0.0002	rs375986475	ID036	<i>MT-TQ</i>	1	
4	m.4435A>G ^a		0.0010		A079, ID037	<i>MT-TM</i>	0.95–1	0.35
5	m.5605A>G		0.0003		A152	<i>MT-TA</i>	1	
6	m.10007T>C		0.0010	rs201906571	A009	<i>MT-TG</i>	1	
7	m.12142A>G ^a		0.0001		A125	<i>MT-TH</i>	1	
8	m.12193A>G		0		A084		1	
9	m.14684C>T		0.0009		A003	<i>MT-TE</i>	1	
10	m.14687A>G		0.0098	rs200189658	ID112		1	0.65
11	m.15913C>T		0.0003		ID065	<i>MT-TT</i>	0.99	
12	m.15946C>T		0.0032	rs202014122	A014, A045		0.99–1	

N: nucleotide; AA: amino acid; Freq. frequency; dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism data base; A: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; MT: mitochondrial; CO1: cytochrome c oxidase subunit 1; ATP6: ATP synthase subunit 6; ND3: NADH dehydrogenase subunit 3; CYB: cytochrome b; RNR1: 12S ribosomal RNA; RNR2: 16S ribosomal RNA; TF ¼ tRNA-Phenylalanine; TI ¼ tRNA-Isoleucine; TQ ¼ tRNA-Glutamine; TM ¼ tRNA-Metionine; TA ¼ tRNA-Alanine; TD: tRNA-Aspartic acid; TG ¼ tRNA-Glycine; TH ¼ tRNA-Histidine; TE ¼ tRNA-Glutamic; TT ¼ tRNA-Threonine.

^aReported by Wang *et AL.* (36).

Frequency of the variants was retrieved from 8686 complete European human genomes present in HmtDB in July 2017 (44).

Table 3. Clinical characteristics reported to be associated with mtDNA variants present in the study sample

Variant	Locus	Heteroplasmy	Subjects	Age	Gender	Deafness	Migraine	AD/PD	Hypertension	Visual loss	MMRF
m.1537C>T	MT-RNR1	1	ID108	60	M	+	NE	—	—	—	—
m.1555A>G	MT-RNR1	1	ID018	33	M	—	NE	—	—	+	—
		1	A043	43	F	—	NE	—	—	—	—
		1	A054	54	F	+	NE	—	—	—	—
m.4336T>C	MT-TQ	0.98	A059	38	M	—	NE	—	+	—	—
		1	ID004	63	F	—	NE	+	—	—	—
m.4388A>G	MT-TQ	1	ID036	36	F	—	NE	—	+	—	—
m.4435A>G	MT-TM	1	ID037	40	F	—	NE	—	+	—	—
		0.96	A079	39	M	—	NE	—	+	—	—
m.14687A>G	MT-TE	1	ID112	21	M	—	NE	—	+	+	—

ID: intellectual disability; A: autism spectrum disorder; M: male; F: female; NE: not evaluable; AD: Alzheimer’s disease; PD: Parkinson’s disease; MMRF: Mitochondrial Myopathy and Respiratory Failure; MT: mitochondrial; RNR1: 12S ribosomal RNA; TQ: tRNA-Glutamine; TM: tRNA-Metionine; TE ¼ tRNA-Glutamic acid.

Plus (+) or minus (—) symbol indicates the presence or absence of the clinical characteristic in the study subject.

Reported clinical conditions with each variant are shaded: 1537 C > T, deafness (MITOMAP); 1555 A > G, maternally inherited or aminoglycoside-induced deafness (MITOMAP); 4336 T > C, AD and PD, hearing loss and migraine (MITOMAP), sensorineural deafness and migraine (ClinVar and OMIM); 4388 A > G, possible hypertension factor (MITOMAP); 4435 A > G, hypertension and modifying factor of Leber’s hereditary optic neuropathy phenotype (MITOMAP); 14687 A > G, MMRF (MITOMAP).

Other conditions not reported to be associated with the variants but present in the study subjects: epilepsy (ID108, A043, A054, A059, ID004, ID112); constipation (ID018, A043, A054, A059, ID036, ID037, ID112); cardiac disease (A059, ID004) and diabetes (ID112).

mtDNA variants of uncertain significance

In addition, we have identified other putative pathogenic variants with a heteroplasmy percentage ≤ 60% (Supplementary Material, Table S1). Furthermore, several variants were also present in subjects with ASD and ID. Among them, it is worth mentioning variants located in the MT-D-LOOP and MT-ORL non-previously reported or with low nucleotide variability (Supplementary Material, Table S2). Some variants have previously been reported to be associated with various conditions in MITOMAP (Supplementary Material, Table S3), although they did not fulfill the selection criteria for identification as putatively pathogenic using the MToolBox prioritization criteria.

Each ASD and ID subject was assigned to a European mitochondrial haplogroup (Supplementary Material, Table S4). The frequencies of the most common haplogroups in the two study groups, ASD and ID, did not differ from the reported frequencies in healthy subjects (data not shown) selected from a population-based sample in the same geographic region (22). Furthermore, putative pathogenic variants were not specific for a single haplotype, as we observed the following ratios of putative pathogenic variants within a haplogroup/number of total subjects within the same haplogroup: 23/91H, 3/18J, 2/12K, 2/5L, 2/4M, 2/3N, 7/16T, 13/32U, 2/10V and 1/6W.

Datasets of mtDNA sequences and clinical data from participants are available at the European Genome-phenome Archive (EGA, <https://ega-archive.org>) with the study reference EGAS00001002750.

Discussion

CAMDs

Few studies have been performed on the physical health of adults with ASD, although some medical comorbidities that are present in infancy persist into adulthood (9,23). Subjects with ID experience more extensive psychiatric and behavioral disorders and other medical conditions in addition to visual, dental and hearing problems (24). However, the percentages of comorbid conditions in ASD and ID studies vary, depending on the methodology of the study, and are often difficult to compare. Even among ASD studies, the results are difficult to compare due to

different percentages of ID among study subjects (7,25). In the present study, we identified constipation, edema, seizures, vision alterations, strabismus and sphincter incontinence as the most prevalent comorbid conditions present in both subjects with ASD and ID compared with HCs. Constipation, seizures and sphincter incontinence were also more prevalent in subjects with ASD than in subjects with ID, whereas edema and vision alterations were more prevalent in subjects with ID than in subjects with ASD. Notably, in our study subjects with ID were on average 12 years older than subjects with ASD, and, therefore, we cannot exclude the possibility that edema and vision alterations were more prevalent in subjects with ID because they were older. Moreover, ID was more severe in patients who fulfilled the criteria for ASD than in subjects who did not, and, therefore, the high percentage of subjects presenting constipation, seizures and sphincter incontinence may be associated with the severe ID rather than ASD.

mtDNA copy number

We analysed *MT-ND1* and *MT-ND4*, two of the seven mtDNA-encoded genes of complex I. Both subjects with ASD and ID presented lower *MT-ND1* and *MT-ND4* contents than HC subjects, indicating that the number of mtDNA copies was reduced in subjects with ASD and ID compared with that in HCs. Previous studies conducted in peripheral blood cells from children with ASD have reported an elevated mtDNA copy number compared with that in healthy children (26) and unaffected siblings (27). Notably, all these studies were conducted in children, whereas our study was conducted in adult subjects. The peripheral blood mtDNA content is associated with sex and age and is influenced by several variables, such as platelet and white blood cell counts and estrogesterone intake (28). Regarding age, the mtDNA content increases until the fifth decade of life and then declines in older subjects (28). In the present study, we compared the mtDNA content after correcting for covariates that correlate with the mtDNA content, and we conclusively identified lower mtDNA content in subjects with ASD and ID than in HCs. The low peripheral blood mtDNA content in ASD and ID suggests a transversal mitochondrial dysfunction that can affect several tissues.

Regarding the deletion ratio, which is directly related to the presence of the common deletion, we observed that patients with ASD exhibited significantly higher ratios than HCs. Therefore, the common deletion was more frequent in the ASD group than in the HC group. We included all the confounding factors in the analysis, and significant differences were only observed for the ASD group. In a study that included 10 children with ASD, deletions of the MT-ND4 gene were reported in five subjects, and the deletion ratio was higher in 2 of 10 children (29).

mtDNA variants

Mitochondrial function, structure and cell size are altered by mtDNA heteroplasmy (30). Since the disease manifests at the heteroplasmic threshold in the range of 0.60 to 0.95 for most pathogenic mutations (31), we selected putative pathogenic variants exhibiting heteroplasmy levels higher than 60%. The present study identified that 26.6% of ASD patients and 30.5% of ID subjects had a putative pathogenic mutation suggesting that part of the genetic risk factors involved in ASD and ID can be located in mtDNA. Mitochondrial dysfunction and mtDNA implications have been broadly proposed in the etiology of ASD, however, only a few studies have analysed the mtDNA sequence in subjects with ASD (32–35). Recently, Wang *et AL.* primarily compared the mtDNA sequence between children with ASD and their non-autistic siblings and identified that predicted pathogenic mutations conferred an increased risk of ASD. In addition, this risk was most pronounced in families with probands who exhibited a diminished intelligence quotient and/or impaired social behavior (36). The authors used whole-exome sequencing, unlike our study that performed mtDNA-targeted deep sequencing, and therefore, we obtained a higher mean deep coverage of 512X than the 141X coverage obtained in the previous study. Additionally, we analyse the mtDNA data using the MToolBox phylogeny-based prioritization workflow which uses the mtDNA sequences from 14 144 healthy individuals to select the variants that are more likely to be pathogenic (37). Most of the putative pathogenic variants we identified have not been previously been associated with ASD, with the exception of m.1555A > G, MT-RNR1; m.1717T > C, MT-RNR2; m.3213A > G, MT-RNR2; m.4435A > G, MT-TM and m.12142A > G, MT-TH that were identified by Wang *et AL.* Each variant was present in a unique family; however, high-confidence heteroplasmic data were not reported for all three members in four out of the five variants, and only 1717T > C, 4435A > G and 12142A > G were reported in ASD patients while no data were available for the other two variants. Regarding ID, our study is the first to analyse the entire mtDNA of subjects with ID using next generation sequencing via mtDNA-targeted deep sequencing. We reported a large number of putative pathogenic mtDNA variants; however, we could not confirm that all variants were implicated in ID or ASD because pathogenicity must be demonstrated by functional studies. In addition, high percentages of pathogenic mtDNA mutations have been described in the general population. Approximately one in 200 healthy subjects carries a pathogenic mtDNA variant; however, the heteroplasmy levels were less than 0.60 (38). Recently, the analyses of the 1000 Genomes Project have identified that 20% of subjects harbor heteroplasmy reported to be implicated in disease although positions with heteroplasmy levels larger than 0.60 showed a reduction in pathogenicity (39). The present study identified that one in four subjects with ASD or ID carry a pathogenic mtDNA variant with heteroplasmy > 0.60. Therefore, in addition to the known

nuclear genetic alterations involved in ASD and ID, we identified mtDNA variants that may contribute to the genetic architecture of both clinical conditions.

It is worth mentioning that six variants present in four subjects with ASD (4%) and six subjects with ID (6%) have previously been associated with clinical conditions; all variants were present in rRNA and tRNA genes and had heteroplasmy levels higher than 0.95. Some of the clinical conditions were present in the subjects, whereas others were not. For example, the m.4336T > C has been reported to be associated with Alzheimer's disease, and one of the two carriers, who was 63 years old, suffered from this condition. We cannot exclude the possibility that the other subject may develop the disease in the future, since at the time of the study this subject was 38 years old. Similarly, the m.1555A > G variant is associated with deafness, and the oldest subject of the three carriers was deaf, whereas the other two younger subjects were not. These two patients are predisposed to aminoglycoside-induced ototoxicity, and, therefore, aminoglycoside treatments must be avoided. Regarding tRNA variants, they are reported in MITOMAP as 'possibly benign' or 'likely benign' based on database frequencies, nature of the nucleotide change and conservation score. However, clinical history, heteroplasmy data or functional studies are not included in retrieving tRNA pathogenicity scores and, therefore, they should be further evaluated to discard pathogenicity.

Much additional work is needed to elucidate the role of putative pathogenic mtDNA mutations in mitochondrial function and to determine whether these variants are related to ID, ASD, and/or CAMDs. A limitation of the present study is that some of the rare rRNA and tRNA variants for which RNA disease scores are not yet available may be specific to our population and not related with clinical conditions. Finally, we studied ASD subjects with concurrent ID because our sample was obtained from institutionalized subjects who presented with low-functioning ASD. Therefore, our results should not be generalized to all subjects with ASD, although they may be generalized to subjects with ID.

In summary, our study identified 1) a high frequency of conditions commonly associated with mitochondrial disorders that occurred concomitantly with 2) low mtDNA content and 3) the presence putative pathogenic mtDNA mutations in subjects with ASD and ID. Based on these findings, subjects with ASD and ID may present mitochondrial dysfunction. Future research will elucidate whether the screening for mtDNA alterations in ASD and ID can be as appropriate as the screening for nuclear DNA alterations.

Materials and Methods

Study design

In this cross-sectional study, DNA samples and clinical data from adult Caucasian white subjects recruited at the Intellectual Disability and Developmental Disorders Research Unit of the Group Pere Mata in Reus (www.peremata.com, Catalonia, Spain) and from adult healthy controls were analysed. All participants were over 18 years old. Informed written consent was obtained from the relatives or other legal guardians of all institutionalized subjects and from healthy individuals. The Ethical Committee of Hospital Sant Joan de Reus approved the study.

Participants

The sample consisted of three groups: 122 subjects with a severe or profound intellectual disability who fulfilled the

diagnostic criteria for autism spectrum disorders (ASD), 115 subjects with a severe or profound ID who did not fulfill the diagnostic criteria for ASD, and 112 healthy controls (HCs) (Table 4). ASD and ID were diagnosed according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision (DSM-IV-TR) criteria. The ASD diagnosis was confirmed using the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) (40). The Childhood Autism Rating Scale (CARS) (41) was used to measure autism severity in the ASD group and to explore autism features in the ID group. Given the difficulty in diagnosing ASD in persons with a severe and profound intellectual disability, only patients showing both evaluations (DSM-IV-TR and ADI-R) positive were included in the ASD group.

Clinical data

ASD and ID

A trained psychiatrist reviewed the clinical record of each participant to collect sociodemographic, anthropometric, medication use, family history and neurodevelopment features. In conjunction with the referring physician of each participant, the psychiatrist completed a questionnaire focused on CAMDs, which are divided into the following categories: migraine headaches, peripheral neurovascular disorders, gastrointestinal dysmotility, neurological disorders, cardiac abnormalities, skeletal muscle disorders, endocrine disorders, and constitutional disorders. The same questionnaire has been used in previous studies to identify maternal inheritance in disorders with presumed

mitochondrial dysfunction (42–44) and the presence of clinical features associated with mitochondrial disorders among relatives of patients with schizophrenia (45). Some conditions present in the questionnaire, such as questions regarding headache, migraine or fatigue, could not be properly assessed because of the severity of the ID of the subjects.

HCs

The same psychiatrist who obtained data from subjects in the ASD and ID groups collected sociodemographic, anthropometric and family history data, and completed the CAMDs questionnaire for HCs. Participants who had no personal, first- or second-degree relatives with antecedents of severe mental disorders were selected for inclusion in the control group.

DNA extraction

Total DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells from fasting subjects using the Gentra[®] PureGene reagent (Qiagen, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions. DNA concentrations were quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain).

mtDNA-targeted next generation sequencing

The entire mtDNA was amplified using three pairs of mtDNA-specific primers that produced three overlapping PCR

Table 4. Characteristics of the sample

	HC N ¼ 112	ASD N ¼ 122	ID N ¼ 115	Compared groups	Statistics
Gender					
Male, N (%)	50 (44.6)	80 (65.5)	74 (64.3)	HC vs. ASD	$\chi^2/10.4$; $P=0.001$
Female, N (%)	62 (55.4)	42 (34.4)	41 (35.7)	HC vs. ID	$\chi^2/13.0$; $P=0.003$
				ASD vs. ID	$\chi^2/0.1$; $P=0.843$
Age in years (mean, SD)	42.4 (11.4)	40.7 (8.3)	52.1 (12.4)	HC vs. ASD	$t/1.3$; $P=0.194$
				HC vs. ID	$t/−6.1$; $P<0.001$
				ASD vs. ID	$t/−8.3$; $P<0.001$
BMI in kg/m ² (mean, SD)	24.1 (3.1)	25.1 (4.9)	27.3 (5.5)	HC vs. ASD	$t/−1.7$; $P=0.086$
				HC vs. ID	$t/−5.4$; $P<0.001$
				ASD vs. ID	$t/−3.3$; $P<0.001$
Tobacco consumption in c/d, (mean, SD)	3.2 (6.5)	0.2 (1.2)	0.8 (3.4)	HC vs. ASD	$t/4.9$; $P<0.001$
				HC vs. ID	$t/3.4$; $P=0.001$
				ASD vs. ID	$t/−2.1$; $P=0.041$
Chromosomal alterations, N (%)	–	37 (30.3)	10 (8.7)	ASD vs. ID	$\chi^2/17.7$; $P<0.001$
ID Severity					
Severe, N (%)	–	16 (13.1)	69 (60%)	ASD vs. ID	$\chi^2/55.3$; $P<0.001$
Profound, N (%)	–	106 (86.9)	46 (40%)		
CARS score (mean, SD)	–	42.6 (5.9)	21.8 (4.4)	ASD vs. ID	$t/28.9$; $P<0.001$
Treatment, N (%)					
Antipsychotic	–	66 (54.1)	64 (55.6)	ASD vs. ID	$\chi^2/0.1$; $P=0.810$
Anticholinergic	–	16 (13.1)	17 (14.8)		$\chi^2/0.1$; $P=0.711$
Benzodiazepines	–	72 (59.0)	61 (53.0)		$\chi^2/0.9$; $P=0.354$
Antidepressant	–	11 (9.0)	18 (15.7)		$\chi^2/2.4$; $P=0.119$
Antiepileptic	–	50 (41.0)	33 (28.7)		$\chi^2/3.9$; $P=0.047$
Mood stabilizers	–	57 (46.7)	49 (42.6)		$\chi^2/0.4$; $P=0.525$
Antihypertensive	–	2 (1.6)	13 (12.7)		$\chi^2/9.3$; $P=0.002$
Analgesics	–	15 (12.3)	21 (21.3)		$\chi^2/1.6$; $P=0.201$
Laxative	–	51 (41.8)	61 (53.0)		$\chi^2/3.0$; $P=0.083$
Antithyroid	–	2 (1.6)	4 (3.5)		$\chi^2/0.8$; $P=0.368$

HC: healthy controls; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; N: number of cases; BMI: body mass index; c/d: cigarettes smoked per day; CARS: Childhood Autism Rating Scale.

Significant differences are indicated in boldface.

fragments; A: 6928 base pairs (bp), positions 569–7497; B: 7050 bp, positions 5061–12 111; and C: 6867 bp, position 11 107–1405. Long-range PCR was performed using 10 ng of DNA with Expand Long Range dNTPack (Roche, Barcelona, Spain), and the PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions. Nineteen blood samples from the ASD group and 15 blood samples from the ID group were discarded, as they did not amplify any of the mtDNA fragments. Finally, the three PCR fragments from each individual were mixed in equimolar ratios, and each sample was prepared for sequencing in an Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM, Fisher Scientific, Madrid, Spain), according to the manufacturer's user guide. Seven multiplexed sequencing runs (32 samples per run) were performed on Ion 316 chips (Fisher Scientific, Madrid, Spain). After filtering, sequences from five subjects with ASD and five subjects with ID were discarded because of low-quality reads. We obtained an average of 60 000 high-quality reads from 98 subjects with ASD and 95 subjects with ID that were analysed using MToolBox (21) that assembles mtDNA starting from NGS data, assigns haplogroup and prioritizes mtDNA variants of clinical interest according to Santorsola *et AL.* (37) for non synonymous variants and Diroma *et AL.* (46) for rRNA and tRNA variants. Briefly, using 14 144 complete sequences from healthy individuals available in HmtDB (47), the process reports rare or private variants, the nucleotide variability, a disease score based on several predictors of pathogenicity for non-synonymous variants and an RNA pathogenicity prediction for rRNA and tRNA variants based on published data (37,46). Finally, information about the variants associated with clinical outcomes present in MITOMAP (www.mitomap.org), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), OMIM (<https://omim.org>) and dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) was obtained through MToolBox, together with data on homoplasmy and heteroplasmy (homoplasmy refers to a cell that has a uniform collection of mtDNA—either completely normal mtDNA or completely mutant mtDNA—and heteroplasmy refers to a cell with different proportions of normal and mutant mtDNA). Regarding heteroplasmy, we set the cut-off to 0.1, and therefore, variants with low levels of heteroplasmy (< 10%) were not reported. The mean coverage obtained was 512. Variants are reported according to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of the human mtDNA, GenBank sequence NC_012920 gi: 251831106.

Selection criteria for the pathogenicity prediction

Non-synonymous variants

We selected putative pathogenic non-synonymous variants that fulfilled the two cut-off prioritization criteria described by Santorsola *et AL.*, (37) diseases score > 0.4311 and nucleotide variability < 0.0026. The disease score is based on the weighted mean of the probabilities that an amino acid substitution may affect gene/protein function provided by the pathogenicity predictors SIFT, Polyphen-2, MutPred, SNPs&GO, PhD-SNP and PANTHER.

rRNA and tRNA variants

The RNA prediction score retrieved by MToolBox was based on published data, and the pathogenic range was established between 0.35 and 1 (46). Thus, variants that have not previously been associated with diseases have no RNA prediction score. Based on our results, we selected putative pathogenic rRNA or tRNA variants presenting an RNA prediction score ≤ 0.35 or a nucleotide variability ≤ 0.0097 .

Heteroplasmy level

For most of the described pathogenic mutations, the disease manifests when the heteroplasmic threshold ranges from 0.60 to 0.95, depending on the mutation and cell type (31). Therefore, we only considered variants that presented heteroplasmy levels higher than 60% as putatively pathogenic.

Quantification of the mtDNA copy number

We measured the mtDNA content in total DNA using quantitative real-time PCR (qPCR). Two mtDNA regions were selected as target regions: *MT-ND1* and *MT-ND4* genes. Nuclear *RPPH1* (corresponding to the RNase P enzyme), a single-copy nuclear gene, was selected as the reference gene. The mtDNA content was calculated for each sample and region using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (ΔCq $\frac{1}{4}$ Cq of the mitochondrial gene—Cq of the reference gene). The mtDNA content was calculated as the ratio between the number of copies of the mitochondrial genome and the number of copies of the nuclear genome (mtDNA/nDNA). *MT-ND1* is a rarely deleted region and *MT-ND4* is located in the major arc of mtDNA and deleted in 97% of all common deletions (17). Therefore, the *MT-ND1/MT-ND4* ratio indicates the deletion ratio. Details regarding qPCR reactions and quality control have been published previously (17,48).

Statistical analyses

The normality of the distributions of continuous variables was explored using the Kolmogorov-Smirnov normality test. Chi-square tests were used to compare the presence of CAMDs among the study groups. Spearman's correlation analysis was used to explore the correlation between the mtDNA content of the two studied mtDNA regions and age, body mass index (BMI) and smoking habits. A general linear model was used to identify whether the mtDNA content in the three study groups differed after adjusting for age, BMI and number of cigarettes smoked per day as covariates. Data were processed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY) and Prism, Version 5 (Graphpad, La Jolla, CA).

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We are grateful to the subjects who participated in the study, and we also acknowledge the technicians from the Biobanc-IISPV in Reus (<http://www.iispv.cat>) for managing the samples and the physicians who helped collect the data related to the CAMDs conditions.

Conflict of Interest STATEMENT. None declared.

Funding

Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Ministry of Science and Innovation in Spain [grant numbers PS09/01052 and PI12/01885 to L.M.] and FEDER. H.T. was the recipient of a FI-DGR, and G.M. was the recipient of a BP-DGR scholarship, both of which were from the Generalitat de Catalunya.

References

1. American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.
2. Lai, M.-C., Lombardo, M.V. and Baron-Cohen, S. (2014) Autism. *LANCET (London, ENGLAND)*, 383, 896–910.
3. Srouf, M. and Shevell, M. (2014) Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch. Dis. Child.*, 99, 386–389.
4. de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J.L. and Geschwind, D.H. (2016) Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *NAT. Med.*, 22, 345–361.
5. La Malfa, G., Lassi, S., Bertelli, M., Salvini, R. and Placidi, G.F. (2004) Autism and intellectual disability: a study of prevalence on a sample of the Italian population. *J. Intellect. DISABIL. Res.*, 48, 262–267.
6. Levy, S.E., Giarelli, E., Lee, L.-C., Schieve, L.A., Kirby, R.S., Cunniff, C., Nicholas, J., Reaven, J. and Rice, C.E. (2010) Autism spectrum disorder and co-occurring developmental, psychiatric, and medical conditions among children in multiple populations of the United States. *J. Dev. BEHAV. Pediatr.*, 31, 267–275.
7. Croen, L.A., Zerbo, O., Qian, Y., Massolo, M.L., Rich, S., Sidney, S. and Kripke, C. (2015) The health status of adults on the autism spectrum. *Autism*, 19, 814–823.
8. Geschwind, D.H. (2009) Advances in autism. *Ann. Rev. Med.*, 60, 367–380.
9. Nicolaidis, C., Kripke, C.C. and Raymaker, D. (2014) Primary care for adults on the autism spectrum. *Med. Clin. North Am.*, 98, 1169–1191.
10. Vafai, S.B. and Mootha, V.K. (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *NATURE*, 491, 374–383.
11. El-Hattab, A.W. and Scaglia, F. (2016) Mitochondrial cytopathies. *Cell CALCIUM*, 60, 199–206.
12. Frye, R.E. and Rossignol, D.A. (2011) Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders. *PEDIATR. Res.*, 69, 41R–7R.
13. Rossignol, D.A. and Frye, R.E. (2012) Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol. PSYCHIATRY*, 17, 290–314.
14. Valenti, D., de Bari, L., De Filippis, B., Henrion-Caude, A. and Vacca, R.A. (2014) Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: An overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci. BIOBEHAV. Rev.*, 46, 202–217.
15. Goh, S., Dong, Z., Zhang, Y., DiMauro, S. and Peterson, B.S. (2014) Mitochondrial dysfunction as a neurobiological subtype of autism spectrum disorder: evidence from brain imaging. *JAMA PSYCHIATRY*, 71, 665–671.
16. Verge, B., Alonso, Y., Valero, J., Miralles, C., Vilella, E. and Martorell, L. (2011) Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur. PSYCHIATRY*, 26, 45–56.
17. Torrell, H., Montana, E., Abasolo, N., Roig, B., Gaviria, A.M., Vilella, E. and Martorell, L. (2013) Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *Am. J. Med. Genet. B, NEUROPSYCHIATR. Genet.*, 162, 213–223.
18. Meng, S., Wu, S., Liang, L., Liang, G., Giovannucci, E., De Vivo, I. and Nan, H. (2016) Leukocyte mitochondrial DNA copy number, anthropometric indices, and weight change in US women. *OncOTARGET*, 7, 60676–60686.
19. Malik, A.N. and Czajka, A. (2013) Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*, 13, 481–492.
20. Golzio, C. and Katsanis, N. (2016) Mitochondrial Copy Number as a Biomarker for Autism? *PEDIATRICS*, 137, e20160049.
21. Calabrese, C., Simone, D., Diroma, M.A., Santorsola, M., Guttà, C., Gasparre, G., Picardi, E., Pesole, G. and Attimonelli, M. (2014) MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing. *BIOINFORMATICS*, 30, 3115–3117.
22. Mosquera-Miguel, A., Torrell, H., Abasolo, N., Arrojo, M., Paz, E., Ramos-Ríos, R., Agra, S., Páramo, M., Brenlla, J., Martínez, S. et AL. (2012) No evidence that major mtDNA European haplogroups confer risk to schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B, NeuroPSYCHIATR. Genet.*, 159B, 414–421.
23. Cashin, A., Buckley, T., Trollor, J.N. and Lennox, N. (2016) A scoping review of what is known of the physical health of adults with autism spectrum disorder. *J. Intellect. DISABIL.*, 10.1177/1744629516665242.
24. Brown, M., Jacobstein, D., Yoon, I.S., Anthony, B. and Bullock, K. (2016) Systemwide initiative documents robust health screening for adults with intellectual disability. *Intellect. Develop. DISABIL.*, 54, 354–365.
25. Jones, K.B., Cottle, K., Bakian, A., Farley, M., Bilder, D., Coon, H. and McMahon, W.M. (2016) A description of medical conditions in adults with autism spectrum disorder: A follow-up of the 1980s Utah/UCLA Autism Epidemiologic Study. *Autism*, 20, 551–561.
26. Chen, S., Li, Z., He, Y., Zhang, F., Li, H., Liao, Y., Wei, Z., Wan, G., Xiang, X., Hu, M. et AL. (2015) Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells is associated with childhood autism. *BMC PSYCHIATRY*, 15, 50.
27. Yoo, H.J., Park, M. and Kim, S.A. (2017) Difference in mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells between probands with autism spectrum disorders and their unaffected siblings. *World J. Biol. PSYCHIATRY*, 18, 151–156.
28. Knez, J., Winkelmanns, E., Plusquin, M., Thijs, L., Cauwenberghs, N., Gu, Y., Staessen, J.A., Nawrot, T.S. and Kuznetsova, T. (2015) Correlates of peripheral blood mitochondrial DNA content in a general population. *Am. J. Epidemiol.*, 183, kwv175.
29. Giulivi, C., Zhang, Y., Omanska-Klusek, A., Ross-Inta, C., Wong, S., Hertz-Picciotto, I., Tassone, F., Pessah I.N. (2010) Mitochondrial dysfunction in autism. *JAMA*, 304, 2389–2396.
30. Picard, M., Zhang, J., Hancock, S., Derbeneva, O., Golhar, R., Golik, P., O’Hearn, S., Levy, S., Potluri, P., Lvova, M. et AL. (2014) Progressive increase in mtDNA 3243A> G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc. NATL ACAD. Sci. USA*, 111, E4033–4042.
31. Smith, P.M., Lightowlers, R.N. (2011) Altering the balance between healthy and mutated mitochondrial DNA. *J. Inherit. MetABOL. Dis.*, 34, 309–313.
32. Napoli, E., Wong, S., Giulivi, C. (2013) Evidence of reactive oxygen species-mediated damage to mitochondrial DNA in children with typical autism. *Mol. Autism*, 4, 2.
33. Avdjieva-Tzavella, D., Mihailova, S., Lukanov, C., Naumova, E., Simeonov, E., Tincheva, R., Toncheva, D. (2012) Mitochondrial DNA mutations in two bulgarian children with autistic spectrum disorders. *BALKAN J. Med. Genet.*, 15, 47–54.
34. Pons, R., Andreu, A.L., Checcarelli, N., Vilà, M.R., Engelstad, K., Sue, C.M., Shungu, D., Haggerty, R., De Vivo, D.C., DiMauro, S. (2004) Mitochondrial DNA abnormalities and autistic spectrum disorders. *J. PEDIATR.*, 144, 81–85.

1. Patowary, A., Nesbitt, R., Archer, M., Bernier, R., Brkanac, Z. (2017) Next generation sequencing mitochondrial DNA analysis in autism spectrum disorder. *Autism Res.*, **10**, 1338–1343.
2. Wang, Y., Picard, M., Gu, Z., Girirajan, S. (2016) Genetic evidence for elevated pathogenicity of mitochondrial DNA heteroplasmy in autism spectrum disorder. *PLoS Genet.*, **12**, e1006391.
3. Santorsola, M., Calabrese, C., Girolimetti, G., Diroma, M.A., Gasparre, G., Attimonelli, M. (2016) A multi-parametric workflow for the prioritization of mitochondrial DNA variants of clinical interest. *Hum. Genet.*, **135**, 121–136.
4. Elliott, H.R., Samuels, D.C., Eden, J.A., Relton, C.L., Chinnery, P.F. (2008) Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am. J. Hum. Genet.*, **83**, 254–260.
5. Ye, K., Lu, J., Ma, F., Keinan, A., Gu, Z. (2014) Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc. NATLACAD. Sci. USA*, **111**, 10654–10659.
6. Lord, C., Rutter, M., Le Couteur, A. (1994) Autism diagnostic interview-revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.*, **24**, 659–685.
7. Schopler, E., Reichler, R.J., DeVellis, R.F., Daly, K. (1980) Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J. Autism Develop. Disord.*, **10**, 91–103.
8. Boles, R.G., Adams, K., Li, B.U.K. (2005) Maternal inheritance in cyclic vomiting syndrome. *Am. J. Med. Genet. PART A*, **133A**, 71–77.
9. Boles, R.G., Burnett, B.B., Gleditsch, K., Wong, S., Guedalia, A., Kaariainen, A., Eloed, J., Stern, A., Brumm, V. (2005) A high predisposition to depression and anxiety in mothers and other matrilineal relatives of children with presumed maternally inherited mitochondrial disorders. *Am. J. Med. Genet. PART B, NeuroPSYCHIATR. Genet.*, **137B**, 20–24.
10. Burnett, B.B., Gardner, A., Boles, R.G. (2005) Mitochondrial inheritance in depression, dysmotility and migraine? *J. Affect. Disord.*, **88**, 109–116.
11. Verge, B., Alonso, Y., Miralles, C., Valero, J., Vilella, E., Boles, R.G., Martorell, L. (2012) New evidence for the involvement of mitochondrial inheritance in schizophrenia: results from a cross-sectional study evaluating the risk of illness in relatives of schizophrenia patients. *J. Clin. PSYCHIATR.*, **73**, 684–690.
12. Diroma, M.A., Lubisco, P., Attimonelli, M. (2016) A comprehensive collection of annotations to interpret sequence variation in human mitochondrial transfer RNAs. *BMC BIOINFORMATICS*, **17**, 338.
13. Rubino, F., Piredda, R., Calabrese, F.M., Simone, D., Lang, M., Calabrese, C., Petruzzella, V., Tommaso-Ponzetta, M., Gasparre, G., Attimonelli, M. (2012) HmtDB, a genomic resource for mitochondrion-based human variability studies. *Nucleic Acids Res.*, **40**, D1150–D1159.
14. Torrell, H., Alonso, Y., Garrabou, G., Mulet, D., Catalán, M., Valiente-Pallejà, A., Carreno-Gago, L., García-Arumí, E., Montana, E., Vilella, E., Martorell, L. (2017) Mitochondrial dysfunction in a family with psychosis and chronic fatigue syndrome. *Mitochondrion*, **34**, 1–8.

MATERIAL SUPLEMENTARI PUBLICACIÓ 1

Supplementary Table 1. Putatively pathogenic variants with heteroplasmy $\leq 60\%$.

N	Variant	AA change	Samples	Locus	Homo/ Heteroplasmy	Disease score
Non-synonymous variants						
1	m.6790G>C	G296A	A112	<i>MT-CO1</i>	0.46	0.814
2	m.6795G>A	D298N	A112	<i>MT-CO1</i>	0.39	0.809
3	m.6799T>A	V299E	A112	<i>MT-CO1</i>	0.35	0.803
4	m.7332G>C	A477P	4 ASD, 4 ID A001, A051, A075, A155, ID075, ID082, ID088, ID100	<i>MT-CO1</i>	0.11-0.19	0.708
5	m.8926C>T	P134S	ID074	<i>MT-ATP6</i>	0.12	0.803
6	m.8929A>T	T135S	ID074	<i>MT-ATP6</i>	0.14	0.667
7	m.8936T>A	L137H	A003, ID002, ID007, ID008, ID009, ID013, ID014, ID015, ID017, ID020, ID022, ID036, ID037, ID038, ID055, ID069, ID073, ID074, ID104, ID112	<i>MT-ATP6</i>	0.13-0.97	0.855
8	m.9004C>A	L160M	ID073	<i>MT-ATP6</i>	0.12	0.634
9	m.9526C>G	A107G	ID070	<i>MT-CO3</i>	0.11	0.659
10	m.9529C>T	P108L	ID081, ID098	<i>MT-CO3</i>	0.10-0.12	0.774
11	m.10278C>A	P74T	A043	<i>MT-ND3</i>	0.14	0.782
12	m.12090T>A	I444N	A043, A107, ID002, ID004, ID007, ID008, ID011, ID014, ID018, ID020, ID050, ID118	<i>MT-ND4</i>	0.10-0.14	0.583
13	m.12337A>C	M1L	ID074	<i>MT-ND5</i>	0.25	0.444
14	m.12722T>C	L129P	A003	<i>MT-ND5</i>	0.11	0.881
15	m.14159C>G	R172P	ID081	<i>MT-ND6</i>	0.10	0.862
rRNA variants						
1	m.733T>C		A096	<i>MT-RNR1</i>	0.13	
2	m.962C>T		ID073	<i>MT-RNR1</i>	0.11	
3	m.2056G>A		ID087	<i>MT-RNR2</i>	0.35	
tRNA variants						
1	m.644A>G		ID021	<i>MT-TF</i>	0.4	
2	m.7532A>T		1 ID001	<i>MT-TD</i>	0.11	

N: number; AA: amino acid; A: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; MT: mitochondrial; CO1: cytochrome c oxidase subunit 1; ATP6: ATP synthase subunit 6; CO3: cytochrome c oxidase subunit 3; ND3: NADH dehydrogenase subunit 3; ND4: NADH dehydrogenase subunit 4; ND5: NADH dehydrogenase subunit 5; ND6: NADH dehydrogenase subunit 6; RNR1: 12S ribosomal RNA; RNR2: 16S ribosomal RNA; TF=tRNA-Phenylalanine; TD: tRNA-Aspartic acid.

❖ Publicació 2:

Increased blood lactate levels during exercise and mitochondrial DNA alterations converge on mitochondrial dysfunction in schizophrenia

Alba Valiente-Pallejà, Helena Torrell, Yolanda Alonso, Elisabet Vilella, Gerard Muntané, Lourdes Martorell

Schizophrenia Research. 2020:220:61-68.

DOI: 10.1016/j.schres.2020.03.070

❖ Antecedents:

Alguns pacients amb ESQ presenten alteracions en la funció mitocondrial. Un indicador de disfunció mitocondrial és l'augment dels nivells de lactat. Vam investigar els nivells de lactat en sang en repòs, durant la realització d'un exercici físic d'intensitat moderada i després de l'exercici en un grup de pacients amb ESQ i en un grup de persones control. En aquests dos grups també vam avaluar la presència de CCAMMs i vam analitzar l'ADNmt, tant el número de còpies d'aquesta molècula com la presència de variants potencialment patogèniques.

❖ Aportacions:

El grup de pacients amb ESQ van mostrar una freqüència més alta d'algunes CCAMMs, concretament les relacionades amb la funció intestinal, el sistema nerviós i el sistema cardiovascular. Els pacients també van presentar nivells més elevats de lactat durant l'exercici i menor contingut d'ADNmt. A més, vam identificar 13 variants en l'ADNmt probablement patogèniques en 11 pacients; els quals tenien un major increment del lactat durant l'exercici físic quan es comparaven amb les persones (tant pacients com controls) no portadores de cap mutació patogènica.

❖ Aspectes a destacar:

Aquest estudi suggereix que en l'ESQ hi ha una disfunció mitocondrial sistèmica. Els pacients amb ESQ presenten nivells de lactat significativament més elevats que les persones control quan realitzen un exercici físic d'intensitat moderada. Aquest fet suggereix que quan els requeriments energètics són elevats, els pacients amb ESQ tenen més dificultat d'obtenir energia a través de la cadena respiratòria mitocondrial. El menor número de còpies d'ADNmt i la presència de determinades variants en el genoma dels pacients suggereix que, part de la disfunció mitocondrial, està relacionada amb el genoma del mitocondri.

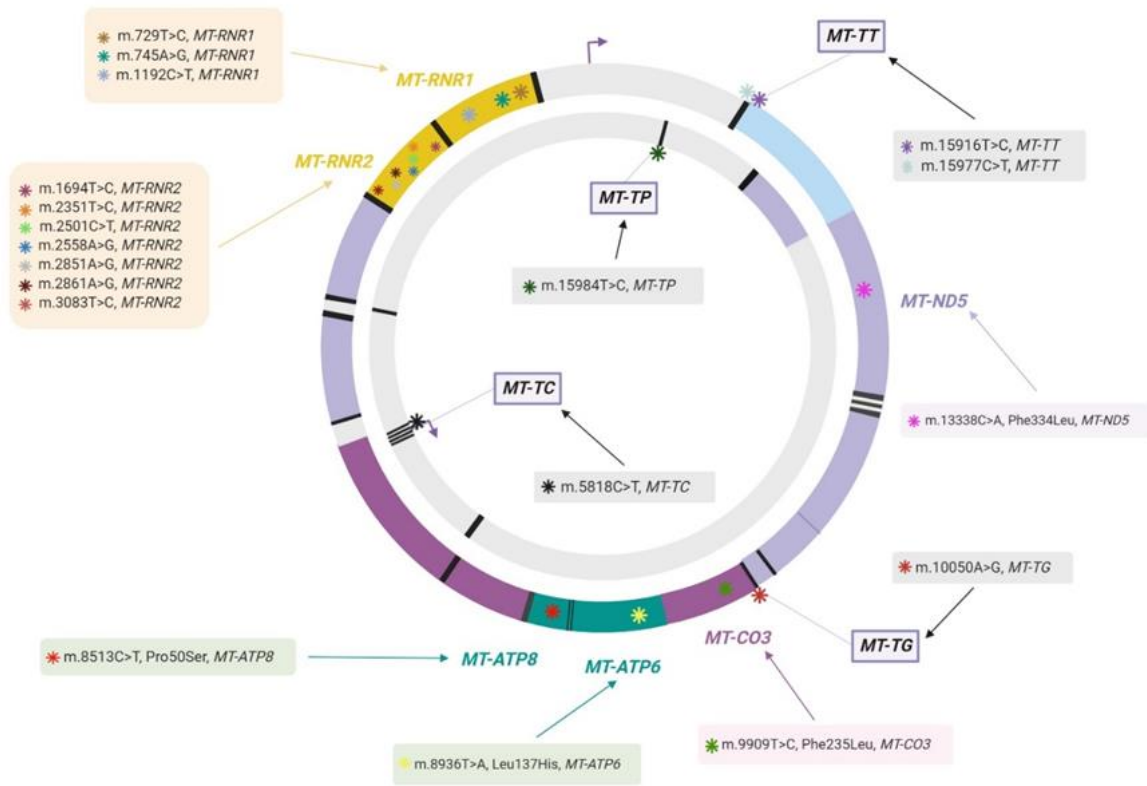


Figura 22: Variants identificades en ESQ al nostre estudi



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres



Increased blood lactate levels during exercise and mitochondrial DNA alterations converge on mitochondrial dysfunction in schizophrenia

Alba Valiente-Pallejà ^{a,b,c}, Helena Torrell ^d, Yolanda Alonso ^{a,b,c}, Elisabet Vilella ^{a,b,c}, Gerard Muntané ^{a,b,c,e,*}, Lourdes Martorell ^{a,b,c,*}

^a Research Department, Hospital Universitari Institut Pere Mata (HUIPM), Universitat Rovira i Virgili (URV), E43206 Reus, Catalonia, Spain

^b Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), E43204 Reus, Catalonia, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red en Salud Mental (CIBERSAM), E43204 Reus, Catalonia, Spain

^d Center for Omic Sciences (COS), Joint Unit Universitat Rovira i Virgili-EURECAT Technology Centre of Catalonia, Unique Scientific and Technical Infrastructures, Reus, Spain, 43204 Reus, Catalonia, Spain

^e Institute of Evolutionary Biology (IBE), Spanish National Research Council (CSIC), Universitat Pompeu Fabra (UPF), E08003 Barcelona, Catalonia, Spain

article info

Article history:

Received 23 July 2019

Received in revised form 13 March 2020

Accepted 29 March 2020

Available online 21 April 2020

Keywords:

Mitochondria

Schizophrenia

Lactate

Mitochondrial DNA

Comorbidity

abstract

Background: Mitochondrial dysfunction and an elevation of lactate are observed in patients with schizophrenia (SZ). However, it is unknown whether mitochondrial dysfunction is associated with the presence of mitochondrial DNA (mtDNA) alterations and comorbid clinical conditions. We aimed to identify systemic mitochondrial abnormalities in blood samples of patients with SZ that may have a high impact on the brain due to its high bioenergetic requirements.

Methods: Case/control study between 57 patients with SZ and 33 healthy controls (HCs). We measured lactate levels at baseline, during 15 min of exercise (at 5, 10 and 15 min) and at rest. We also evaluated the presence of clinical conditions associated with mitochondrial disorders (CAMDs), measured the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR, a subclinical inflammatory marker), and analyzed mtDNA variation and copy number.

Results: Linear models adjusting for covariates showed that patients with SZ exhibited higher elevation of lactate than HCs during exercise but not at baseline or at rest. In accordance, patients showed higher number of CAMDs and lower mtDNA copy number. Interestingly, CAMDs correlated with both lactate levels and mtDNA copy number, which in turn correlated with the NLR. Finally, we identified 13 putative pathogenic variants in the mtDNA of 11 participants with SZ not present in HCs, together with a lactate elevation during exercise that was significantly higher in these 11 carriers than in the noncarriers.

Conclusions: These results are consistent with systemic mitochondrial malfunctioning in SZ and pinpoint lactate metabolism and mtDNA as targets for potential therapeutic treatments.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia (SZ) is a spectrum disorder with a strong genetic load interacting with environmental factors involved in the disease onset and progression. Variations in the nuclear genome, both low-risk common single nucleotide variants (SNPs) and high-risk relatively rare copy number variants (CNVs), are involved in the disease, although the specific set of genetic factors remains unknown (Kirov et al., 2014; Ripke et al., 2014). Notably, the study of the mitochondrial DNA (mtDNA) in states of health and disease has been neglected compared to the efforts dedicated to the study of the nuclear genome, especially

in psychiatric disorders (Pesole et al., 2012; Wallace, 2017). Notwithstanding, several lines of evidence suggest a mitochondrial dysfunction in the etiopathology of SZ, including altered mitochondrial metabolism (Ben-Shachar, 2017; Holper et al., 2019; Ni et al., 2019; Rajasekaran et al., 2015; Rosenfeld et al., 2011), deficits in bioenergetic metabolites (Chouinard et al., 2017), and a reduction in mitochondrial number in several brain regions (Roberts, 2017). Consequently, mitochondrial abnormalities have been proposed to play a critical role in altered brain functioning in SZ (Konradi and Öngür, 2017; Pei and Wallace, 2018), in addition to other mitochondria-associated systemic abnormalities, such as inflammation, redox dysregulation and oxidative stress (Fournier et al., 2014; Kim et al., 2017; Kirkpatrick and Miller, 2013; Müller, 2018).

Mitochondria are cellular organelles that generate most cell energy through oxidative phosphorylation in the mitochondrial respiratory chain. These organelles contain their own genome, the mtDNA,

* Corresponding authors at: Research Department, Hospital Universitari Institut Pere Mata, Ctra. de l'Institut Pere Mata, s/n, 43206 Reus, Catalonia, Spain.

E-mail addresses: muntaneg@peremata.com (G. Muntané), martorell@peremata.com (L. Martorell).

consisting of a maternally inherited double circular DNA molecule of 16,569 base pairs (bp) that encodes the 37 genes necessary to synthesize 13 crucial polypeptides of the mitochondrial respiratory chain (Verge et al., 2011). Unlike nuclear DNA, mtDNA is present in multiple copies per cell, and mtDNA copy number has been associated with an array of phenotypes, including neuropsychiatric symptoms (Malik and Czajka, 2013). Altogether, N250 variants in mtDNA have been reported to cause mitochondrial disorders (Chinnery, 2014), while many others have been associated with different health conditions (Schon et al., 2012). Interestingly, patients with primary mitochondrial disorder have shown blood lactate elevation with a diagnostic sensitivity between 34 and 62% and a specificity between 83 and 100% (Parikh et al., 2015).

Lactate is constantly produced during normal metabolism and exercise in diverse cells under fully aerobic conditions; classically, it was considered a consequence of oxygen deficits. The lactate anion is transported between tissues (i.e., from skeletal muscle to heart) and between cells (i.e., from astrocytes to neurons) by several lactate shuttles and also between the cytosol and mitochondria (Brooks, 2018; Chen et al., 2016). An increase in lactate occurs because the flux through glycolysis overcomes the use of pyruvate in the mitochondria, and the lactate stress test, which measures increased lactate during physical exercise, has proven useful for evaluating oxidative metabolism in patients with mitochondrial disorders (Finsterer et al., 2000, 1998). Of note, increased lactate and decreased glutathione levels were the first abnormalities associated with energy generation in SZ reported 1934 (Looney and Childs, 1934).

The present study explored the presence of systemic mitochondrial abnormalities in SZ by assessing blood lactate levels during exercise, the occurrence of clinical conditions commonly associated with mitochondrial disorders (CAMDs), mtDNA variation and the mtDNA copy number.

1. Methods and materials

1.1. Study design, participants and ethical considerations

This cross-sectional study included 57 patients with SZ according to DSM-IV-TR criteria and 33 HCs without a personal or family history of psychotic or affective disorders in either first- or second-degree relatives. All participants provided written informed consent after fully understanding the benefits and risks of participation. The study was approved by the Hospital de Sant Joan Clinical Research Ethics Committee and was conducted according to the criteria set by the declaration of Helsinki. The exclusion criteria for participants (both patients and HCs) were the presence of diabetes mellitus, acquired immunodeficiency syndrome, cardiac abnormality or altered electrocardiogram, seizures, and renal or liver pathology that could alter lactate measures. Moreover, these individuals were not under pharmacological treatment consisting of valproic acid, glucocorticoids, anesthetics, salicylates, or oral contraceptives that could alter mitochondrial function. Participants were not consuming drugs such as cannabis, hallucinogens, cocaine, or opioids before or during the study, and they did not have alcohol abuse or dependence. They were evaluated with basic biochemistry and blood counts to exclude individuals with significant alterations. Because muscular exercise greatly influences the anaerobic threshold, only participants with moderate physical activity or no activity were accepted. Information on participants is shown in Table 1.

1.2. Clinical assessments

All participants were assessed with the Spanish adaptation of the Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry (SCAN) to confirm or exclude psychiatric diagnosis (Vazquez-Barquero et al., 1994). Additionally, the psychiatrist completed a previously used questionnaire focused on CAMDs through direct interview (Valiente-Pallejà

Table 1
 Descriptive characteristics of the sample.

	Normal values	SZ N = 57	HC N = 33	p
Epidemiological and biological data				
Sex, males, n (%)		44 (77%)	21 (64%)	0.166
Age, years		43.9 ± 12.3	39.8 ± 12.1	0.125
BMI, kg/m ²	18.5–24.9	27.8 ± 5.0	24.0 ± 3.7	b0.001
Systolic pressure, mm Hg	b120	125.6 ± 14.5	125.0 ± 16.7	0.858
Diastolic pressure, mm Hg	b80	76.7 ± 10.9	76.7 ± 11.6	0.997
Creatinine (mg/dl)	0.7–1.3	0.84 ± 0.21	0.79 ± 0.15	0.244
Creatinine kinase (IU/l)	25–170	113.9 ± 57.9	122.6 ± 65.5	0.545
AST (IU/l)	b32	22.4 ± 12.7	19.5 ± 6.0	0.214
ALT (IU/l)	b33	29.5 ± 25.8	19.3 ± 21.0	0.064
Total protein (g/dl)	6–8	6.7 ± 0.4	6.7 ± 0.3	0.793
Albumin (g/dl)	3.4–4.7	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.2	0.050
Hematocrit (%)	36–46	43.0 ± 3.7	42.0 ± 3.8	0.268
NLR	0.78–3.53	2.3 ± 1.1	1.7 ± 1.1	b0.001
PANSS score				
PANSS positive	b7	16.6 ± 6.9	–	
PANSS negative	b7	25.1 ± 5.8	–	
PANSS general	b16	27.4 ± 10.4	–	
PANSS total	b30	69.2 ± 18.8	–	
Illness progression				
Age at onset		19.9 ± 3.9	–	
Illness duration		23.9 ± 11.7	–	
Pharmacological treatment				
Benzodiazepines		28 (49%)	–	
Anticholinergics		12 (21%)	–	
Antidepressants		11 (19%)	–	
Mood stabilizers		19 (33%)	–	
Antipsychotics ^a , mg/day		416.0 ± 305.0	–	
Drug use				
Alcohol, standard drink/day		0.02 ± 0.13	0.64 ± 0.70	b0.001
Smoking, cigarettes/day		12.2 ± 11.5	1.7 ± 4.5	b0.001
Physical activity				
IPAQ-total ^b		3031 ± 3539	3003 ± 3030	0.970
MET-min/week				

SZ: schizophrenia; HC: healthy controls; M: male; F: female; N: number; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; NLR: neutrophil to lymphocyte ratio; PANSS: Positive and Negative Syndrome Scale; IPAQ: International Physical Activity Questionnaire; MET: metabolic equivalent of task.
 Data are presented as means ± SDs or numbers of subjects (%). Significant *p* values are shown in boldface.

^a Current antipsychotic medication is shown as equivalents to chlorpromazine doses.

^b IPAQ-total = 8 × (minutes of vigorous activity/day × 7 days/week) + 4 × (minutes of moderate activity/day × 7 days/week) + 3.3 × (minutes of activity/day × 7 days/week).

et al., 2018; Verge et al., 2012). CAMDs are grouped into the following categories: headaches, bowel function, soft tissues and fatigue, nervous system, ears and eyes, endocrine and heart and blood vessels (Table 2). Sociodemographic and anthropometric data, physical examination, medication and drug consumption data were also obtained. The exercise practices and habits of participants during the last week were obtained with the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) and were calculated as metabolic equivalent of task (MET)-min/week (Craig et al., 2003). MET is a physiological measure expressing the energy cost of physical activities and is defined as the ratio of the metabolic rate (related to energy consumption) during a specific physical activity to a reference metabolic rate. All patients were diagnosed with SZ using the Operational Checklist for Psychotic Disorders (OPCRIT) computer algorithm after administration of the SCAN. The severity of psychotic symptoms in patients with SZ was measured with the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) (Peralta and Cuesta, 1994).

1.3. mtDNA copy number quantification

Total DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells using Gentra® PureGene reagent (Qiagen, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's instructions and was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). We

Table 2
 Number of subjects presenting CAMDs.

CAMDs category	SZ N = 57	HCS N = 33	p
Headaches, n (%)	14 (25%)	5 (15%)	0.292
Bowel function, n (%)	28 (49%)	7 (21%)	0.009
Soft tissues and fatigue, n (%)	18 (32%)	6 (18%)	0.166
Nervous system, n (%)	15 (26%)	2 (6%)	0.024
Ears and eyes, n (%)	17 (30%)	8 (24%)	0.569
Endocrine, n (%)	6 (11%)	3 (9%)	1.000
Heart and blood vessels, n (%)	26 (46%)	7 (21%)	0.021
Number of conditions/individual, mean ± SD	3.5 ± 1.7	1.6 ± 1.3	b0.001

CAMDs: conditions associated with mitochondrial disorders; SZ: schizophrenia; HCS: healthy control. Significant p values are shown in boldface.

Conditions included in each CAMD category. Headaches: headaches, migraine; Bowel function: constipation, diarrhea, abdominal pain, nausea; Soft tissues and fatigue: kinetosis, severe fatigue, fibromyalgia, dysautonomia, arthritis, muscular weakness; Nervous system: intellectual disability, seizures, attention deficit hyperactivity disorder, learning disability, autism, anxiety disorder, bipolar disorder, depressive disorder and panic disorder; Ears and eyes: deafness, vision alterations; Endocrine: hypercholesterolemia, kidney disease, cancer, hypoglycemia, hypothyroidism, diabetes; Heart and blood vessels: heart disease, stroke, hypertension.

measured three mtDNA regions, the *MT-ND1* and *MT-ND4* genes and the *MT-7S* region, by qPCR in triplicate as previously described (Torrell et al., 2013; Valiente-Pallejà et al., 2018). *MT-ND1* is rarely deleted in mitochondrial disorders, *MT-ND4* is located in the major arc, where most mtDNA deletions characterized in humans are located, and *MT-7S* is a noncoding region located in the D-loop that contains essential elements for mtDNA replication and transcription (Torrell et al., 2013).

1.1. mtDNA-targeted next-generation sequencing and pathogenicity prediction of variants

Total DNA was used to amplify mtDNA in two fragments of 8338 and 8647 bp using previously described primers (Gunnarsdóttir et al., 2011), and the purified PCR products were mixed in equimolar ratios for the sequencing protocol using an Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM, Fisher Scientific, Madrid, Spain) according to the manufacturer's user guide. The obtained mtDNA sequences were analyzed using the MToolBox pipeline, using the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS, NC_012920) as a reference for human mtDNA (Calabrese et al., 2014). Further details of this multiparametric workflow for mtDNA variant prioritization have been previously described (Valiente-Pallejà et al., 2018). Briefly, this method aligns each sample-specific reconstructed contig against the related macrohaplogroup-specific consensus sequence to recognize, via a prioritization process, rare or private mitochondrial variants that deserve further clinical investigation. The prioritization process consists of several steps that exploit various annotation resources such as biological databases and pathogenicity prediction software. At the end of the process, this method reports the rare or private variants identified, the nucleotide variability, a disease score based on several predictors of pathogenicity and information about the variants associated with clinical outcomes present in public databases together with data on homoplasmy and heteroplasmy (Diroma et al., 2016; Santorsola et al., 2016). Homoplasmy refers to a cell that has a uniform collection of mtDNA—either completely normal mtDNA or completely mutant mtDNA—and heteroplasmy refers to a cell with different proportions of normal and mutant mtDNA. The mean ± standard deviation coverage obtained was 159.5 ± 178.9.

The selection criteria for the pathogenicity prediction of variants were as follows: nonsynonymous variants were selected based on a disease score N0.4311 and nucleotide variability b0.0026, while rRNA and tRNA variants with an RNA prediction score between 0.35 and 1 or nucleotide variability ≤0.0097 were selected as previously described (Diroma et al., 2016; Santorsola et al., 2016). The heteroplasmy level cutoff was set at 0.60, the threshold at what pathogenic mutations

usually manifest (Valiente-Pallejà et al., 2018). However, this threshold depends on the mutation type, cell type and tissue distribution and can vary between 60% and 90% (Nissanka and Moraes, 2020).

Datasets of mtDNA sequences and clinical data from participants are available at the European Genome-phenome Archive (EGA, <https://ega-archive.org>) with the study reference number EGAS00001003269.

1.2. Lactate stress test

Fasting participants underwent venipuncture with a BD Nexiva™ closed catheter system (BD Medical, Madrid, Spain) without a tourniquet prior to the initiation of cycling between 8:00 and 9:00 a.m. The first blood samples were collected for DNA analyses, blood counts, basic biochemistry, and basal lactate determination. Then, participants were asked to pedal for 15 min at a consistent power of 30 watts (W) and 60 rotations per min (rpm) on an electronically braked bicycle ergometer (Optibike, Ergoline, Madrid). Blood samples were collected at 5, 10, and 15 min after cycling began and at 15 min after stopping. Blood pressure and heart rate were monitored during all the exercise. Lactate levels were determined before cycling (baseline), during cycling (5, 10, and 15 min), and at rest (30 min) using a GEM® Premier™ 3000 Analyzer (Instrumentation Laboratory, New York, USA). The percent increase in lactate (%Δ lactate) at 5, 10, 15 and 30 min was calculated as follows: %Δ lactate = ((lactate at each time point - basal lactate) / (basal lactate)) × 100.

1.3. Statistical analyses

Data were processed using R Core Team (2013). Sample homogeneity was tested with analysis of variance (ANOVA) and χ^2 tests. Spearman correlations were used to explore the relationships among continuous variables and were visualized using the corrplot package. We conducted multiple linear regression analysis to identify differences between patients with SZ and HCs in lactate levels (0, 5, 10, 15, 30 min) and mtDNA copy number, including covariates. A general linear model was used to estimate marginal means, adjusted means controlled for covariates and lactate levels and mtDNA copy number. We did not correct for multiple comparisons because the analyses were exploratory in nature, and we considered statistical significance when $p < 0.05$.

2. Results

2.1. CAMDs

The frequencies of participants presenting CAMDs were higher in the SZ group than in the HC group when evaluating bowel function, nervous system and heart and blood vessels ($p = 0.009$, $p = 0.024$ and $p = 0.001$, respectively). In addition, the number of CAMDs present in each individual was significantly higher in patients with SZ than in HCs ($p < 0.001$) (Table 2).

2.2. mtDNA copy number

We evaluated whether the mtDNA copy number showed differences between SZ and HCs in a linear model including the following as covariates: age, sex, body mass index (BMI), number of cigarettes/day, units of alcohol/day, neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), number of CAMDs and physical activity performed over the last week before the blood extraction. The mtDNA copy number was higher in HCs than in SZ (*MT-7S*, $p < 0.001$; *MT-ND1*, $p = 0.002$; *MT-ND4*, $p = 0.011$) for all regions evaluated (Fig. 1).

The three mtDNA regions assessed showed high correlations among them: *MT-ND1* with *MT-7S* ($\rho = 0.94$, $p < 0.001$), *MT-ND1* with *MT-ND4* ($\rho = 0.85$, $p < 0.001$) and *MT-7S* with *MT-ND4* ($\rho = 0.85$, $p < 0.001$). In addition, the mtDNA copy number of the three mtDNA regions positively correlated with units of alcohol/day ($\rho < 0.3$, $p < 0.01$) and

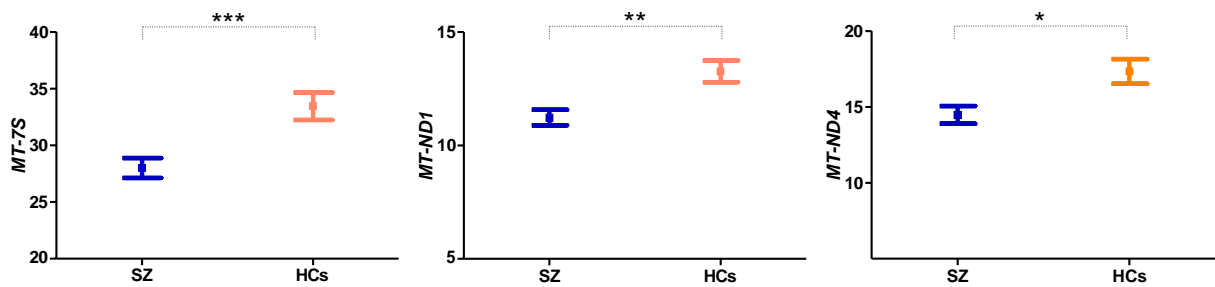


Fig. 1. Estimated marginal means of mtDNA copy number in our sample.

negatively with the number of cigarettes/day ($\rho = -0.35$, $p = 0.001$), number of CAMDs ($\rho = -0.2$, $p = 0.05$), BMI ($\rho = -0.2$, $p = 0.05$) and NLR ($\rho = -0.4$, $p = 0.001$). Only *MT-ND4* copy number negatively correlated with age ($\rho = -0.3$, $p = 0.05$), basal lactate ($\rho = -0.2$, $p = 0.05$) and the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) general ($\rho = -0.3$, $p = 0.05$) and total ($\rho = -0.3$, $p = 0.05$) scores. Conversely, no correlation was observed between mtDNA copy number and antipsychotic doses of chlorpromazine equivalents (Fig. 2). Regarding pharmacological medication, being under anticholinergic treatment was associated with a lower mtDNA copy number, but no significant effect was observed in the use of antidepressants, mood stabilizers or benzodiazepines (Supplementary Table S1). Overall, these results indicate that mtDNA copy number decreases with aging, weight gain, tobacco consumption, inflammatory

processes and anticholinergic use and increases with alcohol consumption.

1.1. mtDNA pathogenic mutations

By using the prioritization workflow of the MToolBox pipeline and applying the selection criteria, we identified 19 putative pathogenic variants with heteroplasmy levels $\geq 60\%$ (Supplementary Table S2 and Supplementary Fig. S1). Eleven patients with SZ (19.3%) carried at least one putative pathogenic mtDNA variant above the heteroplasmy threshold; four HCs (12.1%) also carried putative pathogenic variants (summarized in Supplementary Table S2). None of the 13 variants present in patients with SZ was found in HCs. Two variants carried by one HC and one

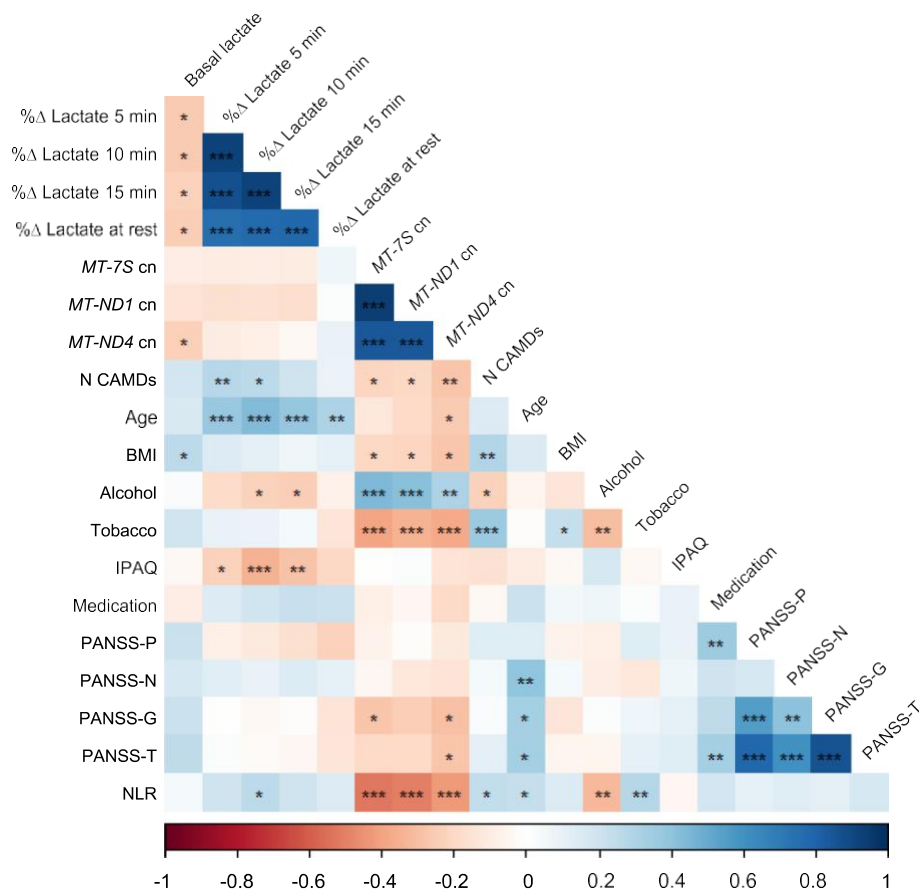


Fig. 2. Correlations between all the variables studied. Percentage of lactate increases ($\% \Delta$) at 5, 10, and 15 min and at rest. *MT-7S cn*, *MT-ND1 cn* and *MT-ND4 cn*: copy numbers of the *MT-7S*, *MT-ND1* and *MT-ND4* genes; N CAMDs: number of clinical conditions associated with mitochondrial disorders; BMI: body mass index; Alcohol: standard drink units/day; Tobacco: number of cigarettes/day; IPAQ: physical activity of the last seven days measured with the International Physical Activity Questionnaire; Medication: current medication in mg equivalent to chlorpromazine doses/day; PANSS-P: Positive and Negative Syndrome Scale, positive score; PANSS-N: PANSS, negative score; PANSS-G: PANSS, general score; PANSS-T: PANSS, total score; NLR: neutrophil to lymphocyte ratio. The strength and the direction of the correlation between each pair of variables are displayed by color intensity (red and blue for positive and negative correlations, respectively). Legend for Pearson's coefficients (ρ^2) is shown below the graph.

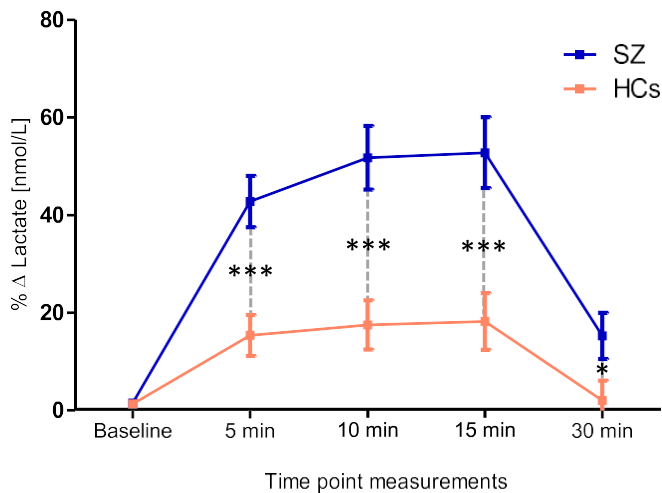


Fig. 3. Basal lactate levels and %Δ lactate in the study groups during the lactate stress test.

patient with SZ (m.745 A N G and m.1192C N T, respectively) are reported to confer increased sensitivity to ototoxic drugs or nonsyndromic deafness in the MITOMAP database. However, none of these individuals suffered from deafness at the time of the study. Finally, a specific mtDNA haplogroup was assigned to each participant (Supplementary Table S3), and 44%, 17%, 10%, 9% and 2% of participants belonged to common European haplogroups H, U, J, T and V, respectively. The distribution of mtDNA putative pathogenic variants did not differ between grouped haplogroups ($\chi^2 = 1.362, p = 0.968$), indicating that they were not overrepresented in a specific mtDNA lineage in our sample.

1.1. Lactate levels

To indirectly investigate the oxidative phosphorylation capacity in our sample, we measured venous lactate levels at baseline, during physical exercise (5 min, 10 min and 15 min) and at rest, 15 min after the exercise (30 min) and calculated the %Δ lactate from baseline. The %Δ lactate levels during the exercise and at rest were highly increased in patients with SZ compared to HCs but not at baseline (Fig. 3). Linear regression models at each time point of lactate determination confirmed that %Δ lactate levels were much higher in patients with SZ than in HCs at 5, 10, and 15 min and nearly at 30 min, despite the fact that

basal lactate levels were very similar between the two groups. We included the following covariates in the analyses: age, sex, BMI, the number of CAMDs, number of cigarettes/day, units of alcohol/day, physical activity performed last week, *MT-ND1* copy number and the presence of a putative pathogenic variant with heteroplasmy N0.60. Because the mtDNA copy number assessment was highly correlated among the three mtDNA regions, only the *MT-ND1* region was included in the analyses. The linear models were significant at 5, 10 and 15 min and, remarkably, in all these models, SZ diagnosis and age were significantly associated with the %Δ lactate (Table 3).

To assess whether the 13 mtDNA putative pathogenic variants present in the 11 patients had an impact on lactate levels, we compared %Δ lactate between the SZ carriers and the remaining individuals (both patients and HCs) who were noncarriers. In particular, the %Δ lactate was significantly higher in these 11 patients with SZ at 5 min ($p = 0.02$) and 10 min ($p = 0.01$) and almost significant at 15 min ($p = 0.06$) (Supplementary Fig. S2).

We also evaluated the relationship between lactate and the rest of the variables (Fig. 2). Basal lactate levels were positively correlated with BMI ($\rho = 0.27, p = 0.01$) and negatively correlated with %Δ lactate at 5 min ($\rho = -0.26, p = 0.02$), 10 min ($\rho = -0.26, p = 0.02$), 15 min ($\rho = -0.23, p = 0.03$) and 30 min ($\rho = -0.24, p = 0.03$). A negative correlation between basal lactate levels and *MT-ND4* copy number was observed ($\rho = -0.24, p = 0.03$). During exercise, %Δ lactate was positively correlated with age, the number of CAMDs and the NLR, showing that higher lactate levels were associated with the presence of comorbid clinical conditions and inflammation. In contrast, physical activity performed over the last week before performing the lactate stress test was negatively correlated with %Δ lactate, which indicates that the %Δ lactate in individuals who perform physical exercise is lower than in individuals who do not (Fig. 2). No relationships were observed between current antipsychotic medication and lactate levels at any time point (Fig. 2). Additionally, we did not identify significant differences in lactate levels between patients who were under anticholinergic, mood stabilizing or benzodiazepine treatment and those who were not (Supplementary Table S4).

2. Discussion

2.1. Elevated lactate during exercise in SZ

In the present study, we measured lactate levels as a biomarker of mitochondrial metabolic function at different time points during moderate physical exercise. Lactate formation and subsequent distribution

Table 3
 Linear models for predicting basal lactate and %Δ lactate during the lactate stress test.

	Basal lactate			%Δ lactate at 5 min			%Δ lactate at 10 min			%Δ lactate at 15 min			%Δ lactate at rest		
	Beta	t	p	Beta	t	p	Beta	t	p	Beta	t	p	Beta	t	p
	Adj.R ² = 0.093; F = 1.801 <i>p</i> = 0.069			Adj.R ² = 0.237; F = 3.425 <i>p</i> = 0.001			Adj.R ² = 0.281; F = 4.013 <i>p</i> b 0.001			Adj.R ² = 0.200; F = 2.887 <i>p</i> = 0.003			Adj.R ² = 0.049; F = 1.391 <i>p</i> = 0.196		
SZ	-0.103	-0.564	0.575	28.741	2.484	0.015	38.718	2.770	0.007	46.006	2.786	0.007	24.714	2.132	0.036
Sex	0.094	0.656	0.514	15.219	1.676	0.098	16.697	1.546	0.126	14.773	1.142	0.257	0.960	0.103	0.918
Age	0.007	1.473	0.145	0.773	2.558	0.013	1.143	3.160	0.002	1.167	2.696	0.009	0.584	1.894	0.062
BMI	0.039	3.041	0.003	-0.600	-0.732	0.467	-0.860	-0.858	0.394	-1.662	-1.424	0.159	-0.523	-0.624	0.535
NLR	-0.050	-0.854	0.396	3.599	0.978	0.331	6.917	1.503	0.137	7.818	1.451	0.151	3.817	1.004	0.319
IPAQ	0.000	0.722	0.472	-0.001	-0.927	0.357	-0.003	-2.092	0.040	-0.002	-1.131	0.262	0.000	-0.240	0.811
CAMDs	0.016	0.405	0.687	3.448	1.387	0.170	1.516	0.511	0.611	0.791	0.228	0.820	0.413	0.169	0.866
Tobacco	0.003	0.425	0.672	-0.441	-1.154	0.252	-0.419	-0.924	0.358	-0.768	-1.461	0.148	-0.804	-2.189	0.032
Alcohol	-0.012	-0.087	0.931	5.996	0.688	0.493	2.406	0.233	0.816	-2.385	-0.199	0.843	0.038	0.004	0.996
<i>MT-ND1</i> cn	-0.032	-1.242	0.218	0.478	0.297	0.767	1.789	0.930	0.355	1.904	0.839	0.404	1.777	1.129	0.263
mtDNA ppv	0.083	0.530	0.597	8.611	0.865	0.390	8.298	0.705	0.483	9.613	0.699	0.487	2.477	0.257	0.798

SZ: schizophrenia diagnosis; BMI: body mass index; NLR: neutrophil to lymphocyte ratio; IPAQ: physical activity in the last 7 days measured with the International Physical Activity Questionnaire; CAMDs: number of conditions associated with mitochondrial disorders; Tobacco: consumption measured as number of cigarettes/day; Alcohol: consumption as standard units of alcohol/day; *MT-ND1* cn: mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1 gene copy number; mtDNA ppv: having or not a putative pathogenic variant in the mitochondrial DNA with heteroplasmy $\geq 60\%$. Significant *p* values are shown in boldface.

throughout the body by the cell-to-cell lactate shuttles is the mechanism whereby different tissues and cell types coordinate intermediary metabolism depending on the energy demand (Goodwin et al., 2007). Here, patients with SZ showed higher lactate levels than HCs during exercise but not at baseline or after rest, suggesting that when energy requirements are increased, patients with SZ show poorer mitochondrial respiratory oxidative capacity, even though the involvement of other mitochondrial mechanisms related to oxygen supply, pyruvate dehydrogenase activity or the tricarboxylic acid cycle could not be discounted (Adeva-Andany et al., 2014). Recently, a central role of mitochondrial functions in SZ, especially oxidative stress, has been proposed based on a leukocyte proteomic approach that identified alterations in energy metabolism, immunity, oxidative stress and apoptosis in first-episode drug-naïve psychotic patients, in line with the results identified in our study (Jiang et al., 2019).

1.1. Lactate levels correlated with comorbid clinical conditions

Lactate levels were positively correlated with the number of CAMDs. This finding was in accordance with a systemic mitochondrial dysfunction, which was more pronounced in those subjects with more clinical comorbid conditions. The mitochondrial dysfunction has been associated with chronic systemic inflammation present in SZ (Morris and Berk, 2015) and, interestingly, we observed a positive correlation between Δ lactate and the NLR inflammatory marker, in accordance with this hypothesis. Increased brain lactate levels in SZ have been reported in the cerebrospinal fluid (Regenold et al., 2009) and in brain postmortem tissue (Sullivan et al., 2019) and in vivo by magnetic resonance spectroscopy (Rowland et al., 2016). In the brain, lactate utilization at synapses is supposedly impaired in SZ, ultimately triggering cognitive and negative symptoms (Sullivan et al., 2018). In fact, a mechanism based on lactate production in astrocytes and its transport to neurons (i.e., the “astrocyte-neuron lactate shuttle”) has been deemed a pathophysiological substrate in SZ (Sullivan et al., 2018). This idea was mainly proposed because the disturbance of this bioenergetic coupling in rodents disrupts synaptic transmission, resulting in impaired working memory performance and long-term memory formation (Sullivan et al., 2018). Dysfunctional synapses and bioenergetic deficits can be primary or secondary causes of SZ, and psychotic symptoms may be the result of a mild bioenergetic brain defect (Pei and Wallace, 2018; Wallace, 2017). We propose that the high levels of blood lactate in SZ that we observed during exercise might parallel altered energy metabolism occurring in the brain.

1.2. High number of CAMDs in patients with SZ

Previous clinical studies have revealed that up to 50–70% of patients affected by a mitochondrial disorder caused by a mtDNA mutation show evidence of, or will develop, a psychiatric disorder; however, little attention has been paid to the specific psychiatric manifestations of mitochondrial disorders (Rosebush et al., 2017). From the opposite point of view, patients with SZ frequently suffer from several CAMDs, such as epilepsy, gastrointestinal symptoms, metabolic disturbances and cardiovascular diseases (Kritharides et al., 2017; Schoepf et al., 2014; Virtanen et al., 2017). The present study confirmed that a high number of patients with SZ presented alterations, with the most frequently observed comorbidities in the digestive, nervous and cardiovascular systems. Indeed, patients with SZ presented twice the number of CAMDs compared to HCs, which is in accordance with the hypothesis that some patients with psychiatric illnesses have undiagnosed mitochondrial disorders (Rosebush et al., 2017). Overall, these results put forward that mitochondrial dysfunction may be an underlying mechanism involved in both the brain abnormalities and the other comorbidities reported in SZ (Gonçalves et al., 2014; Rajasekaran et al., 2015; Rosebush et al., 2017).

1.3. Low mtDNA copy number is a hallmark of SZ

In our study, we revealed significantly lower mtDNA content in blood samples of patients with SZ than HCs, thus confirming previous results in first-episode antipsychotic-naïve patients (Z. Li et al., 2016b). Reduced mtDNA copy number has been observed with aging, use of clozapine, risperidone and psychosis severity in patients with psychotic disorders (Kumar et al., 2018) and with poorer outcomes in cognitive performance, physical strength and self-rated health (Mengel-From et al., 2014). Our results reinforce the hypothesis that low mtDNA copy number may be a pathophysiological hallmark of SZ, as described in other neurodevelopmental disorders (Valiente-Pallejà et al., 2018). Moreover, we identified significant correlations between mtDNA copy number and lifestyle habits, such as smoking and alcohol use. The results in tobacco use were in accordance with a recent study demonstrating that smoking reduces the mtDNA copy number in blood (Wu et al., 2019). We also show that the convergence of clinical conditions in distinct organs, and with inflammation as well, is correlated with low mtDNA copy number in the blood, indicating that these two features are likely associated. In this field, mtDNA has been demonstrated to be crucial in the underlying mechanism involved in the uncontrolled inflammation present in many chronic diseases (Zhong et al., 2018). Finally, high scores in the general psychopathology scale of the PANNS were associated with low mtDNA copy number, suggesting a correlation with disease severity. Regarding psychotropic medication, clozapine and risperidone have been demonstrated to reduce the mtDNA copy number (Kumar et al., 2018); however, we did not identify any correlation between chlorpromazine equivalents and mtDNA copy number, suggesting that antipsychotic medication may not have a direct relationship with mtDNA copy number in our sample. Similarly, being treated with antidepressants, mood stabilizers and benzodiazepines seems to be unrelated to mtDNA copy number. However, the effects of anticholinergic treatment, which have been revealed to have protective effects against anoxia via mitochondria (Wang et al., 2017), need to be further studied, as we identified lower mtDNA copy numbers in patients taking anticholinergics.

1.4. Putative mtDNA pathogenic variants are associated with increased lactate levels

Although some studies have examined the role of the mtDNA sequence in SZ, it was not properly investigated in depth until the development of next-generation sequencing analyses, which allow the determination of the heteroplasmy levels. We selected putative pathogenic variants with heteroplasmy levels above 0.60 given that for most pathogenic mutations, the disease manifests at the heteroplasmic threshold in the range of 0.60–0.95 (Nissanka and Moraes, 2020). We found a slightly higher number of mtDNA putative pathogenic mutations in SZ (19.2%) than in HC (12.1%) individuals. Only one variant, m.9909 T N C, corresponding to the amino acid change Phe235Leu at the *MT-CO3* gene, present in a patient with SZ has been previously associated with psychiatric disorders. In the Human Mitochondrial Genome Database (<https://www.hmtddb.uniba.it/>) (Rubino et al., 2012), 17 out of 85 sequenced patients with a psychiatric disorder (SZ, schizoaffective disorder or bipolar disorder), all of Italian origin, showed a nucleotide change at this position (Bertolin et al., 2011), reinforcing its involvement in psychiatric disorders. Research in this field is scarce, and the results are inconsistent. Some authors demonstrated that common mtDNA variants modified the risk of developing several complex traits, including SZ (Hudson et al., 2014), although recent studies have excluded the roles of common mtDNA variations (Gonçalves et al., 2018) and heteroplasmy (H. Li et al., 2016a) in SZ. We added evidence of the involvement of these genetic factors, meriting additional studies to confirm its pathogenicity, especially m.9909 T N C. In addition, the fact that blood lactate levels were increased in the SZ carriers of

putative mtDNA mutations compared to the rest is in accordance with mtDNA sequence variants implicated in the mild bioenergetic brain defect.

It is worth mentioning that we determined a heteroplasmy level cutoff of 0.60; however, it cannot be ruled out that mtDNA variants at lower levels in blood may present high heteroplasmy levels in the brain.

1.1. Limitations

Some limitations of this study must be noted. First, our sample is based on patients with a long evolution of SZ instead of unmedicated antipsychotic-naïve patients. Thus, we could only exclude the possibility that distinct medications and doses influenced lactate levels but not the presence of medication per se. Second, we evaluated mtDNA and lactate variations in blood samples, even though brain tissue is the target for SZ symptoms. However, we selected blood samples in the context of systemic rather than organ-specific mitochondrial dysfunction. Although no differences in physical activity were observed between patients with SZ and HCs, patients could have deficits in fitness or muscle tone, especially because of the lack of exercise throughout disease evolution. This issue could explain, at least in part, the differences in % Δ lactate. Third, several factors may alter the accuracy of the mtDNA copy number including the presence of mitochondrial sequences in the nuclear genome, the use of inappropriate nuclear primers, dilution bias and template preparation (Malik and Czajka, 2013), which we have already considered in this study. Finally, although the mtDNA variants were not overrepresented in a single haplogroup, some may be specific to our population, and the results may not be generalizable until further studies with larger samples of other populations are conducted.

1.2. Conclusions

In summary, this study describes higher lactate levels during exercise and the presence of higher a number of CAMDs together with a lower mtDNA copy number in patients with SZ. Additionally, during exercise, lactate levels were greater in patients with SZ who were carriers of a putative mtDNA pathogenic mutation than in the remaining participants. Finally, lactate levels and the mtDNA copy number were correlated with the number of CAMDs and the NLR inflammatory biomarker. Together, our results are consistent with a systemic mitochondrial dysfunction in SZ and target lactate metabolism and mtDNA for potential therapeutic treatments.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.03.070>.

Declaration of competing interest

The authors have no conflicts of interest to report, financial or otherwise.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and healthy controls who participated in this study. We also acknowledge David Mulet and Elena Montaña for the management of the participants, the technicians from the Biobanc-IISPV in Reus (<http://www.iispv.cat>) for sample management, and Dr. Josep Ma Simó from the Laboratori de Referència de Catalunya (www.lrc.es) for his help in the lactate determination.

Contributors

LM, EV, YA and GM designed the study and wrote the protocol. AV-P, HT, YA and EV obtained the clinical, biochemical and genetic data. GM analyzed the mtDNA sequences using the MToolBox and conducted the statistical analyses. AV-P wrote the first draft of the manuscript and managed the literature searches. All the authors contributed to and approved the final version of the manuscript.

Funding sources

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Ministry of Science and Innovation in Spain (grant numbers P509/01052, P112/01885, P118/00514 and FEDER to L.M.). HT was the recipient of an FI-DGR, and GM was the recipient of a BP-DGR scholarship; both are from the Generalitat de Catalunya.

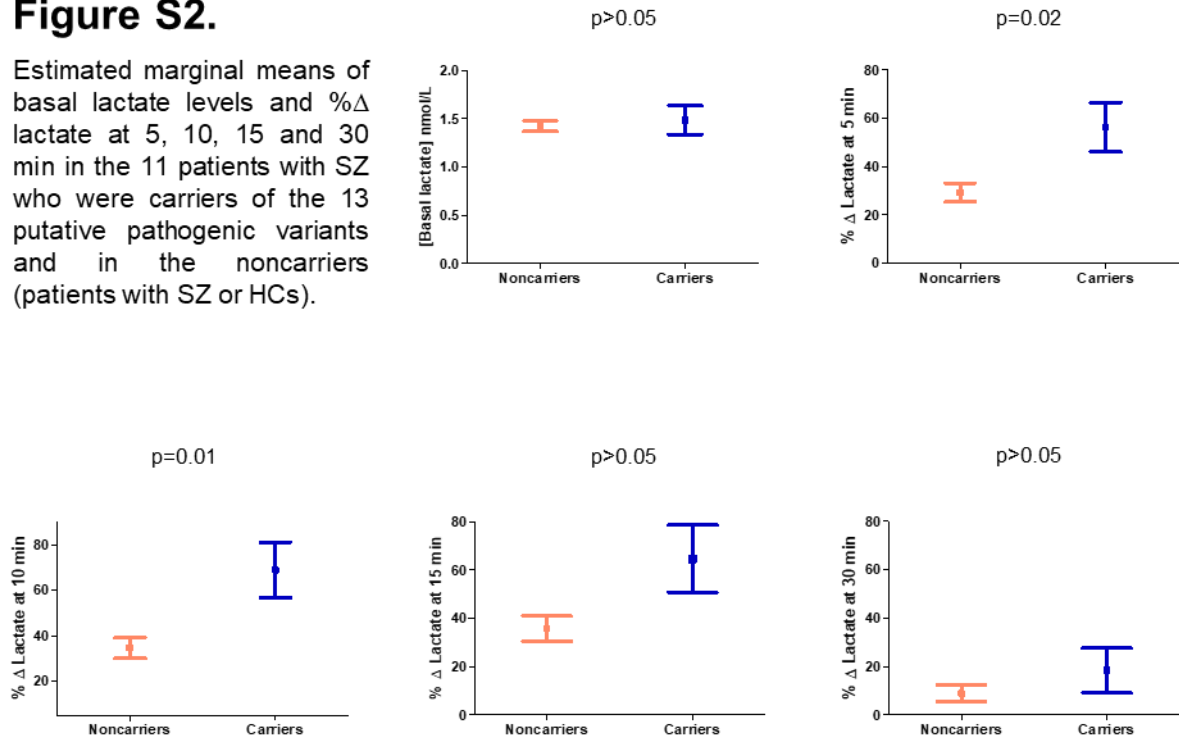
References

- Adeva-Andany, M., López-Ojén, M., Funcasta-Calderón, R., et al., 2014. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* 17, 76–100.
- Ben-Shachar, D., 2017. Mitochondrial multifaceted dysfunction in schizophrenia; complex I as a possible pathological target. *Schizophr. Res.* 187, 3–10.
- Bertolin, C., Magri, C., Barlati, S., et al., 2011. Analysis of complete mitochondrial genomes of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *J. Hum. Genet.* 56, 869–872.
- Brooks, G.A., 2018. The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metab.* 27, 757–785.
- Calabrese, C., Simone, D., Diroma, M.A., et al., 2014. MToolBox: a highly automated pipeline for heteroplasmy annotation and prioritization analysis of human mitochondrial variants in high-throughput sequencing. *Bioinformatics* 30, 3115–3117.
- Chen, Y.J., Mahieu, N.G., Huang, X., et al., 2016. Lactate metabolism is associated with mammalian mitochondria. *Nat. Chem. Biol.* 12, 937–943. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2172>.
- Chinnery, P.F., 2014. Mitochondrial disorders overview. E. In: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., et al. (Eds.), *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Chouinard, V.A., Kim, S.Y., Valeri, L., et al., 2017. Brain bioenergetics and redox state measured by ³¹P magnetic resonance spectroscopy in unaffected siblings of patients with psychotic disorders. *Schizophr. Res.* 187, 11–16.
- Craig, C.L., Marshall, A.L., Sjöström, M., et al., 2003. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 1381–1395.
- Diroma, M.A., Lubisco, P., Attimonelli, M., 2016. A comprehensive collection of annotations to interpret sequence variation in human mitochondrial transfer RNAs. *BMC Bioinforma.* 17, 338.
- Finsterer, J., Shorny, S., Capek, J., et al., 1998. Lactate stress test in the diagnosis of mitochondrial myopathy. *J. Neurol. Sci.* 159, 176–180.
- Finsterer, J., Obermann, I., Milvay, E., 2000. Diagnostic yield of the lactate stress test in 160 patients with suspected respiratory chain disorder. *Metab. Brain Dis.* 15, 163–171.
- Fournier, M., Ferrari, C., Baumann, P.S., et al., 2014. Impaired metabolic reactivity to oxidative stress in early psychosis patients. *Schizophr. Bull.* 40, 973–983.
- Gonçalves, V.F., Andreatza, A.C., Kennedy, J.L., 2014. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: an evolutionary perspective. *Hum. Genet.* 134, 13–21.
- Gonçalves, V.F., Giamberardino, S.N., Crowley, J.J., et al., 2018. Examining the role of common and rare mitochondrial variants in schizophrenia. *PLoS One* 13, e0191153.
- Goodwin, M.L., Harris, J.E., Hernández, A., et al., 2007. Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. *J. Diabetes Sci. Technol.* 1, 558–569.
- Gunnarsdóttir, E.D., Nandineni, M.R., Li, M., et al., 2011. Larger mitochondrial DNA than Y-chromosome differences between matrilineal and patrilineal groups from Sumatra. *Nat. Commun.* 2, 228.
- Holper, L., Ben-Shachar, D., Mann, J., 2019. Multivariate meta-analyses of mitochondrial complex I and IV in major depressive disorder, bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer disease, and Parkinson disease. *Neuropsychopharmacology* 44, 837–849.
- Hudson, G., Gomez-Duran, A., Wilson, I.J., et al., 2014. Recent mitochondrial DNA mutations increase the risk of developing common late-onset human diseases. *PLoS Genet.* 10, e1004369.
- Jiang, J., Peng, C., Sun, L., et al., 2019. Leukocyte proteomic profiling in first-episode schizophrenia patients: does oxidative stress play central roles in the pathophysiology network of schizophrenia? *Antioxid. Redox Signal.* 2019, 7805 ars.
- Kim, S.Y., Cohen, B.M., Chen, X., et al., 2017. Redox dysregulation in schizophrenia revealed by in vivo NAD⁺/NADH measurement. *Schizophr. Bull.* 43, 197–204.
- Kirkpatrick, B., Miller, B.J., 2013. Inflammation and schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 39, 1174–1179.
- Kirov, G., Rees, E., Walters, J.T.R., et al., 2014. The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biol. Psychiatry* 75, 378–385.
- Konradi, C., Öngür, D., 2017. Role of mitochondria and energy metabolism in schizophrenia and psychotic disorders. *Schizophr. Res.* 187, 1–2.
- Kritharides, L., Chow, V., Lambert, T.J., 2017. Cardiovascular disease in patients with schizophrenia. *Med. J. Aust.* 206, 91–95.
- Kumar, P., Efstathiopoulos, P., Millischer, V., et al., 2018. Mitochondrial DNA copy number is associated with psychosis severity and anti-psychotic treatment. *Sci. Rep.* 8, 12743.
- Li, H., Bi, R., Fan, Y., et al., 2016a. mtDNA heteroplasmy in monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Mol. Neurobiol.* 54, 4343–4352.
- Li, Z., Hu, M., Zong, X., et al., 2016b. Association of telomere length and mitochondrial DNA copy number with risperidone treatment response in first-episode antipsychotic-naïve schizophrenia. *Sci. Rep.* 5, 18553.
- Looney, J.M., Childs, H.M., 1934. The lactic acid and glutathione content of the blood of schizophrenic patients. *J. Clin. Invest.* 13, 963–968.
- Malik, A.N., Czajka, A., 2013. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* 13, 481–492.
- Mengel-From, J., Thinggaard, M., Dalgård, C., et al., 2014. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum. Genet.* 1149–1159.
- Morris, G., Berk, M., 2015. The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC Med.* 13, 68.
- Müller, N., 2018. Inflammation in schizophrenia: pathogenetic aspects and therapeutic considerations. *Schizophr. Bull.* 44, 973–982.
- Ni, P., Noh, H., Park, G.H., et al., 2019. iPSC-derived homogeneous populations of developing schizophrenia cortical interneurons have compromised mitochondrial function. *Mol. Psychiatry* <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0423-3>.
- Nissanka, N., Moraes, C.T., 2020. Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO Rep.* e49612.

- Parikh, S., Goldstein, A., Koenig, M.K., et al., 2015. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the mitochondrial medicine society. *Genet. Med.* 17, 689–701.
- Pei, L., Wallace, D.C., 2018. Mitochondrial etiology of neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 83, 722–730.
- Peralta, V., Cuesta, M.J., 1994. Psychometric properties of the positive and negative syndrome scale (PANSS) in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 53, 31–40.
- Pesole, G., Allen, J.F., Lane, N., et al., 2012. The neglected genome. *EMBO Rep.* 13, 473–474.
- R core team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <http://www.R-project.org/>.
- Rajasekaran, A., Venkatasubramanian, G., Berk, M., et al., 2015. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 48, 10–21.
- Regenold, W.T., Phatak, P., Marano, C.M., et al., 2009. Elevated cerebrospinal fluid lactate concentrations in patients with bipolar disorder and schizophrenia: implications for the mitochondrial dysfunction hypothesis. *Biol. Psychiatry* 65, 489–494.
- Ripke, S., Neale, B.M., Corvin, A., et al., 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421–427.
- Roberts, R.C., 2017. Postmortem studies on mitochondria in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 187, 17–25.
- Rosebush, P.I., Anglin, R.E., Rasmussen, S., et al., 2017. Mental illness in patients with inherited mitochondrial disorders. *Schizophr. Res.* 187, 33–37.
- Rosenfeld, M., Brenner-Lavie, H., Ari, S.G.B., et al., 2011. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 69, 980–988.
- Rowland, L.M., Pradhan, S., Korenic, S., et al., 2016. Elevated brain lactate in schizophrenia: a 7T magnetic resonance spectroscopy study. *Transl. Psychiatry* 6, e967.
- Rubino, F., Piredda, R., Calabrese, F.M., et al., 2012. HmtDB, a genomic resource for mitochondrion-based human variability studies. *Nucleic Acids Res.* 40, D1150–D1159.
- Santorsola, M., Calabrese, C., Girolimetti, G., et al., 2016. A multi-parametric workflow for the prioritization of mitochondrial DNA variants of clinical interest. *Hum. Genet.* 135, 121–136.
- Schoepf, D., Uppal, H., Potluri, R., et al., 2014. Physical comorbidity and its relevance on mortality in schizophrenia: a naturalistic 12-year follow-up in general hospital admissions. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 264, 3–28.
- Schon, E.A., DiMauro, S., Hirano, M., 2012. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* 13, 878–890.
- Sullivan, C.R., O'Donovan, S.M., McCullumsmith, R.E., et al., 2018. Defects in bioenergetic coupling in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 83, 739–750.
- Sullivan, C.R., Mielnik, C.A., Funk, A., et al., 2019. Measurement of lactate levels in post-mortem brain, iPSCs, and animal models of schizophrenia. *Sci. Rep.* 9, 5087.
- Torrell, H., Montaña, E., Abasolo, N., et al., 2013. Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr.* 162B, 213–223.
- Valiente-Pallejà, A., Torrell, H., Muntané, G., et al., 2018. Genetic and clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Hum. Mol. Genet.* 27, 891–900.
- Vazquez-Barquero, J.L., Gaité, L., Artal Simon, J., et al., 1994. Development and verification of the Spanish version of the "scanning system" psychiatric interview ("questionnaires for clinical evaluation in neuropsychiatry"). *Actas Luso Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines* 22, 109–120.
- Verge, B., Alonso, Y., Valero, J., et al., 2011. Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur. Psychiatry* 26, 45–56.
- Verge, B., Alonso, Y., Miralles, C., et al., 2012. New evidence for the involvement of mitochondrial inheritance in schizophrenia: results from a cross-sectional study evaluating the risk of illness in relatives of schizophrenia patients. *J. Clin. Psychiatry* 73, 684–690.
- Virtanen, T., Eskelinen, S., Sailas, E., et al., 2017. Dyspepsia and constipation in patients with schizophrenia spectrum disorders. *Nord. J. Psychiatry* 71, 48–54.
- Wallace, D.C., 2017. A mitochondrial etiology of neuropsychiatric disorders. *JAMA Psychiatry* 74, 863–864.
- Wang, Z., Lin, D., Zhang, L., et al., 2017. Penehyclidine hydrochloride prevents anoxia/reoxygenation injury and induces H9c2 cardiomyocyte apoptosis via a mitochondrial pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 797, 115–123.
- Wu, S., Li, X., Meng, S., et al., 2019. Fruit and vegetable consumption, cigarette smoke, and leukocyte mitochondrial DNA copy number. *Am. J. Clin. Nutr.* 109, 424–432.
- Zhong, Z., Liang, S., Sanchez-Lopez, E., et al., 2018. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 560, 198–203.

Figure S2.

Estimated marginal means of basal lactate levels and % Δ lactate at 5, 10, 15 and 30 min in the 11 patients with SZ who were carriers of the 13 putative pathogenic variants and in the noncarriers (patients with SZ or HCs).



Supplementary Table S1: Estimated marginal means in mtDNA copy number depending on pharmacological treatments.

	<i>MT-7S</i>			<i>MT-ND1</i>			<i>MT-ND4</i>		
Anticholinergics	R ² =.138; F=2.377; p=. .027			R ² =.175; F=2.224; p=. .010			R ² =.122; F=2.1; p=. .039		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=12)	24.3 ± 1.4	6.571	.014	9.6 ± .6	7.321	.010	11.8 ± 1.1	5.534	.023
No (N=45)	28.4 ± .7			11.5 ± .3			14.7 ± .6		
Antidepressants	R ² =.074; F=1.471; p=.189			R ² =.014; F=1.084; p=.394			R ² =.117; F=1.762; p=.104		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=11)	28.3 ± 1.7	.262	.611	11.8 ± .7	.891	.350	15.9 ± 1.3	2.334	.134
No (N=46)	27.3 ± .8			10.9 ± .3			13.7 ± .6		
Mood stabilizers	R ² =.069; F=1.434; p=.204			R ² =-.003; F=.982; p=.468			R ² =.098; F=1.626; p=.138		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=19)	27.4 ± 1.2	.005	.946	10.9 ± .5	.124	.726	13.2 ± .9	1.390	.245
No (N=38)	27.5 ± .9			11.2 ± .4			14.5 ± .6		
Benzodiazepines	R ² =.071; F=1.452; p=.196			R ² =-.002; F=.987; p=.464			R ² =.084; F=1.529; p=.169		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=28)	27.8 ± 1.0	.134	.716	11.2 ± .5	.162	.689	13.6 ± .8	.714	.403
No (N=29)	27.2 ± 1.0			10.9 ± .5			14.6 ± .8		

EMM: estimated marginal means; SE: standard error; Significant p values are shown in boldface.

Supplementary Table S2. Putative pathogenic variants present in the study sample.

N	Position	AA change	Freq.	dbSNP ID	Samples	Locus	Homo/heteroplasmy	Disease/RNA score
<i>Nonsynonymous variants</i>								
1	m.8513 C>T	P50S	.0003	-	HC021	MT-ATP8	1	.756
2	m.8936 T>A	L137H	.0001	-	SZ029	MT-ATP6	.80	.855
3	m.9909 T>C	F235L	.0014	rs28690056	SZ042	MT-CO3	1	.720
4	m.13338 C>A	F334L	.0001	-	HC006	MT-ND5	1	.722
<i>rRNA variants</i>								
1	m.729 T>C		.0001	-	SZ028		1	
2	m.745 A>G		.0012	-	HC015	MT-RNR1	1	
3	m.1192 C>T		.0012	-	SZ035		1	
4	m.1694 T>C		.0019	rs201873294	SZ056		1	
5	m.2351 T>C		.0003	-	HC016		1	
6	m.2501 C>T		.0007	-	SZ059		.99	
7	m.2558 A>G		.0020	-	SZ039	MT-RNR2	1	
8	m.2851 A>G		.0024	-	SZ036		1	
9	m.2861 A>G		.0005	-	SZ043		1	
10	m.3083 T>C		.0007	-	SZ042		1	
<i>tRNA variants</i>								
1	m.5818 C>T		.0003	-	HC021	MT-TC	1	
2	m.10050 A>G		.0005	-	HC021	MT-TG	.99	
3	m.15916 T>C		.0005	-	SZ035	MT-TT	1	
4	m.15977 C>T		.0003	-	SZ055	MT-TP	1	
5	m.15984 T>C		.0001	-	SZ025	MT-TP	.98	

N: number; AA: amino acid; Freq.: frequency of the variant in the European population; dbSNP ID: Single Nucleotide Polymorphism database identifier; SZ: schizophrenia; HC: healthy control; MT: mitochondrial; ATP6: ATP synthase subunit 6; ATP8: ATP synthase subunit 8; CO3: cytochrome c oxidase subunit 3; ND5: NADH dehydrogenase subunit 5; RNR1: 12S ribosomal RNA; RNR2: 16S ribosomal RNA; TC: tRNA-cysteine; TG: tRNA-glycine; TP: tRNA-proline; TT: tRNA-threonine.

The frequency of the variants was retrieved from 14,582 complete European human genomes present in HmtDB in July 2019 (www.hmtdb.uniba.it).

Supplementary Table S3. Haplogroups present in the study sample.

ID	Haplogrup		
C101	H1e1a	P015	T1a1
C105	T2c2	P016	H6a1b2
C106	U5a1	P018	H1j
C107	U1a1	P019	U5b3
C108	T2b6a	P020	W6a
C109	H2a5a1	P021	H1i
C110	V1a	P022	K1a+T195C!
C113	J1c3e1	P023	H1e
C114	U2d	P024	H27
C115	U4a1b	P025	U2d
C116	R0a4	P026	K1a4a1
C117	H2a2a	P027	T2b
C119	J1c3	P028	H3
C120	H5a1	P029	H1c
C121	H1	P031	V
C123	H1j1	P032	H1e5
C125	H1	P033	H1j1
C126	J2b1a1	P034	U6a1a1
C127	H1ba	P035	U6a1
C128	HV0+T195C!	P036	H5a1c1a
C129	K1a4a1e	P037	H1a3a
C130	I1a1b	P038	H56
C131	K1a4a1	P039	H13a1a
C132	K1a+T195C!	P040	J1c8
C133	U5b2b	P041	J2b1a1
C135	H4a1a2	P042	K1a4a1
C136	H4a1a1a	P043	H3b+G16129A!
C137	H3q	P044	U5b1g
C138	J1c2e	P045	K1a+T195C!
C139	HV0a	P046	R24
C140	K2b1a1	P047	K1a
P001	U6a1a1	P049	H1
P002	U4a1	P050	H3ap
P004	U5a1b1e	P052	H13a1a1
P005	T2b3b	P053	J1c2e
P006	N3	P054	J1c2e
P007	U2d	P055	T1a1
P008	K1a1b1	P056	H1e1a
P009	T1a1	P058	H1
P010	H5a1	P059	H1at
P011	U5b1	P062	H3at1
P012	H1j1	P064	T2c2
P013	H1bx	P065	H56
P014	K1a+T195C!	P066	A2

Supplementary Table S4: Estimated marginal means in lactate values depending on pharmacological treatments.

	Basal lactate			%Δ lactate at 5 min			%Δ lactate at 10 min			%Δ lactate at 15 min			%Δ lactate at 30 min		
Anticholinergics	R ² =0.078; F=1.6; p=n.s.			R ² =0.151; F=2.3; p< 0.05			R ² =0.182; F=2.5; p< 0.05			R ² =0.090; F=1.7; p=n.s.			R ² =0.058; F=1.4; p=n.s.		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=12)	1.6 ± 0.2	0.3	n.s.	48.4 ± 11.5	0.3	n.s.	59.3 ± 13.7	0.4	n.s.	57.9 ± 15.8	0.1	n.s.	17.3 ± 11.0	0	n.s.
No (N=45)	1.5 ± 0.1			41.2 ± 5.6			50.0 ± 6.8			51.2 ± 8.1			14.7 ± 5.3		
Antidepressants	R ² =0.085; F=1.7; p=n.s.			R ² =0.147; F=2.27; p< 0.05			R ² =0.182; F=2.6; p< 0.05			R ² =0.118; F=1.9; p=0.09			R ² =0.057; F=1.4; p=n.s.		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=11)	1.6 ± 0.2	0.7	n.s.	45.4 ± 12.4	0.1	n.s.	65.2 ± 15.3	0.9	n.s.	73.0 ± 17.8	1.5	n.s.	15.4 ± 5.3	0	n.s.
No (N=46)	1.5 ± 0.1			42.1 ± 5.6			48.7 ± 6.6			48.0 ± 7.8			14.4 ± 11.9		
Mood stabilizers	R ² =0.083; F=1.6; p=n.s.			R ² =0.147; F=2.2; p< 0.05			R ² =0.176; F=2.4; p< 0.05			R ² =0.116; F=1.9; p=n.s.			R ² =0.059; F=1.4; p=n.s.		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=19)	1.6 ± 0.1	0.6	n.s.	40.5 ± 8.6	0.1	n.s.	50.2 ± 10.8	0	n.s.	40.0 ± 12.6	1.4	n.s.	13.4 ± 8.4	0.1	n.s.
No (N=38)	1.5 ± 0.1			43.8 ± 6.0			52.4 ± 7.4			58.7 ± 8.5			16.2 ± 5.9		
Benzodiazepines	R ² =0.087; F=1.7; p=n.s.			R ² =0.157; F=2.3; p< 0.05			R ² =0.194; F=2.6; p< 0.05			R ² =0.108; F=1.8; p=n.s.			R ² =0.086; F=1.6; p=n.s.		
	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p	EMM ± SE	F	p
Yes (N=28)	1.6 ± 0.1	0.8	n.s.	38.7 ± 7.1	0.6	n.s.	45.3 ± 8.5	1.1	n.s.	45.4 ± 10.0	1.0	n.s.	9.6 ± 6.6	1.4	n.s.
No (N=29)	1.4 ± 0.1			46.6 ± 6.9			57.8 ± 8.4			59.7 ± 9.8			20.7 ± 6.5		

EMM: estimated marginal means; SE: standard error. Significant p values are shown in boldface.

Age, sex, BMI, *MT-ND1* copy number, number of cigarettes/day, having or not a putative pathogenic variant in the mtDNA and physical activity of the last three days were included as covariates in the general linear analysis when comparing lactate values between participants with and without pharmacological treatment.

❖ **Publicació 3:**

High frequency of clinical conditions commonly associated with mitochondrial disorders in schizophrenia.

Yolanda Alonso, Alba Valiente-Pallejà, Begoña Verge, Elisabet Vilella, Lourdes Martorell.

Acta Neuropsychiatrica. 2020. 32(5):265-269.

DOI: 10.1017/neu.2020.16

❖ **Antecedents:**

Els pacients amb diagnòstic d'ESQ presenten altres característiques clíniques comòrbides, algunes de les quals estan relacionades amb alteracions mitocondrials. En aquest estudi hem investigat la freqüència de CCAMMs en un grup de pacients amb ESQ i en un grup de persones control.

❖ **Aportacions:**

Les persones amb ESQ van presentar una major freqüència de fatiga severa, convulsions, restrenyiment i diabetis que les persones del grup control. La major presència d'aquestes CCAMMs en els pacients no va mostrar, aparentment, cap associació al tractament farmacològic en la mostra que hem analitzat.

❖ **Aspectes a destacar:**

La major freqüència de fatiga, convulsions, restrenyiment i diabetis en persones amb ESQ que en controls suggereix que la disfunció mitocondrial sistèmica podria ser un dels mecanismes implicats en l'etiopatogènia de l'ESQ.

Short Communication

Cite this article: Alonso Y, Valiente-Pallejà A, Verge B, Vilella E, and Martorell L. (2020) High frequency of clinical conditions commonly associated with mitochondrial disorders in schizophrenia. *Acta Neuropsychiatrica* 1–5. doi: [10.1017/neu.2020.16](https://doi.org/10.1017/neu.2020.16)

Received: 15 October 2019

Revised: 1 April 2020

Accepted: 9 April 2020

Key words:



schizophrenia; mitochondrial diseases; comorbidity; fatigue; seizures

Author for correspondence:

Lourdes Martorell,

Email: martorell@peremata.com

High frequency of clinical conditions commonly associated with mitochondrial disorders in schizophrenia

Yolanda Alonso^{1,2}, Alba Valiente-Pallejà^{1,2} , Begoña Verge^{1,2}, Elisabet Vilella^{1,2} and Lourdes Martorell^{1,2} 

¹University Hospital Institut Pere Mata, Health Research Institute Pere Virgili (IISPV), Rovira i Virgili University (URV), Reus, Spain and ²Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Madrid, Spain

Abstract

Objective: It has been hypothesised that neuropsychiatric symptoms, including psychosis, can be the result of a milder brain bioenergetic defect produced by mitochondrial dysfunction; however, mitochondrial dysfunction can be present in other organs or systems. The aim of the study was to investigate whether clinical conditions associated with mitochondrial disorders (CAMDs) were frequently present in schizophrenia. **Methods:** A previously used questionnaire regarding the CAMDs was administered to patients and controls in a direct interview with a trained psychiatrist. The frequencies of CAMDs in 164 patients with schizophrenia were compared to those in 156 age- and sex-matched controls. **Results:** Severe fatigue, seizures, constipation and diabetes were significantly more frequent in patients with schizophrenia than in control subjects and apparently not related to pharmacological treatment. **Conclusion:** The results of the present study suggest that multi-systemic mitochondrial dysfunction may be an underlying mechanism involved in schizophrenia.

Significant outcomes

- Clinical conditions associated with mitochondrial disorders are frequent in schizophrenia.
- Schizophrenia patients presented high levels of severe fatigue.
- Seizures, severe fatigue and diabetes were frequent in a significant number of subjects with a schizophrenia diagnosis.

Limitations

- The present study was conducted with a relatively small number of cases.
- The possibility of bias due to confounding effects and unmeasured confounders cannot be dismissed.
- These results need replication in a larger group of patients with more specific diagnostic tests.

Introduction

Schizophrenia is a chronic and severe mental disorder affecting approximately 1% of the world-wide population and is characterised by symptoms that include delusions, hallucinations, trouble with thinking and concentration and lack of motivation. Evidence suggests that it is a complex disease, with genetic and environmental factors acting together in a complex process to bring about schizophrenia (Davis *et al.*, 2016). However, the underlying causal mechanisms remain unknown, and, at present, schizophrenia is diagnosed based on a codified nosology of symptoms (American Psychiatric Association, 2013). Research has pointed out a number of pathophysiological mechanisms. For example, several lines of evidence suggest mitochondrial dysfunction in schizophrenia, including deficits in complex I, deficits in bioenergetic metabolism and a reduced number of mitochondria in post-mortem brain samples; for a review, see Konradi and Öngür (2017) and Roberts (2017). Mitochondria are the primary source of energy, and given that the brain has very high metabolic requirements, it is highly sensitive to mitochondrial dysfunction. Interestingly, a new coherent theory for neuropsychiatric disorders suggests that psychiatric symptoms may be the result of a milder bioenergetic defect produced by mitochondrial dysfunction (Wallace, 2017). Remarkably, psychiatric symptoms were reported to be present in subjects who were later diagnosed with a mitochondrial



Table 1. Characteristics of the participants

	SCH, <i>n</i> = 164	HC, <i>n</i> = 156	Statistics
Male sex, <i>n</i> (%)	98 (59.8)	94 (60.3)	$\chi^2 = 0.01; p = 0.93$
Age in years, <i>m</i> \pm SD	42.8 \pm 12.0	43.3 \pm 12.5	$t = 0.52; p = 0.70$
BMI in kg/m ² , <i>m</i> \pm SD	27.9 \pm 5.1	24.5 \pm 3.1	$t = -8.33; p < 0.001$
Pharmacological treatment			
Antipsychotics*, <i>m</i> \pm SD	520 \pm 360	–	–
Antidepressants, <i>n</i> (%)	40 (24.4)	–	–
Benzodiazepines, <i>n</i> (%)	78 (47.7)	–	–
Anticholinergics, <i>n</i> (%)	44 (26.8)	–	–
Mood stabilisers, <i>n</i> (%)	41 (25.0)	–	–
Substance use			
Tobacco, <i>n</i> (%)	111 (67.7)	48 (30.8)	$\chi^2 = 43.58; p < 0.001$
Alcohol, <i>n</i> (%)	52 (31.7)	50 (32.0)	$\chi^2 = 0.00; p = 0.95$
Cannabis, <i>n</i> (%)	36 (21.9)	0	–
Number of CAMDs, <i>m</i> \pm SD	4.0 \pm 3.1	2.7 \pm 2.3	$T = -4.21; p < 0.001$

SCH, patients with schizophrenia; HC, healthy controls; *n*, number of cases; *m*, mean; SD, standard deviation; BMI, body mass index; CAMDs, conditions associated with mitochondrial disorders.

*Antipsychotic drug doses converted into chlorpromazine equivalents in mg/day.

disorder (Rosebush *et al.*, 2017). Mitochondrial disorders are a clinically heterogeneous group of disorders that arise as a result of dysfunction of the mitochondrial respiratory chain. They can be caused by the mutation of genes encoded by either nuclear DNA or mitochondrial DNA (mtDNA). While some mitochondrial disorders affect only a single organ, many involve multiple organ systems and often present with prominent neurologic and myopathic features (Chinnery, 2014). Recently, we reported that specific conditions commonly associated with mitochondrial disorders (CAMDs) are more frequent in individuals with autism spectrum disorder and intellectual disability than in control subjects (Valiente-Pallejà *et al.*, 2018). To date, however, no study has examined the presence of CAMDs in patients with schizophrenia, which is the objective of this study.

Material and methods

This is a cross-sectional study conducted in adult patients with schizophrenia and healthy controls. All participants were over 18 years old. Informed written consent was obtained from participants after a complete description of the study was provided in accordance with the revised Helsinki Declaration. Ethical approval was obtained from the local ethics committee.

Participants

The sample consisted of 164 unrelated patients with schizophrenia (Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., Text Revision) criteria) who visited the Hospital Universitari Institut Pere Mata in Reus, Catalonia, Spain, and 156 control subjects from the same geographical region, all of Caucasian origin. The exclusion criteria were as follows: for patients, drug abuse, and for control subjects, drug abuse and personal or first-degree familial antecedents of affective or psychotic disorders. The characteristics of the study subjects are presented in Table 1.

Clinical assessments

Both groups of subjects completed, via a direct interview with a trained psychiatrist, a previously used questionnaire regarding the CAMDs that covers the following categories: headache, bowel function, soft tissues and fatigue, the nervous system, ears and eyes, the endocrine system and the heart and blood vessels (Verge *et al.*, 2012; Valiente-Pallejà *et al.*, 2018).

Data analyses

Chi-square tests were used to compare the presence of CAMDs between patients with schizophrenia and control subjects. Characteristics of participants were compared by chi-square test or *t* test depending on the nature of the variable. We used the Mann-Whitney *U* non-parametric test to identify whether the body mass index (BMI) differed between individuals with and without diabetes, as the number of individuals presenting diabetes was ≤ 12 . The significance level was set at $p < 0.05$. Data were processed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

Results

The present study found that severe fatigue, seizures, diabetes and constipation were significantly more frequent in patients with schizophrenia than in control subjects. The frequencies of the CAMDs and comparisons between the two groups are shown in Table 2. When the sample was stratified by gender, severe fatigue and constipation were more frequent among the male patients, but only severe fatigue was more frequent in the female patients compared to the male and female controls, respectively. No control subjects presented severe fatigue; however, it was present in 6% and 18% of the male and female patients, respectively.

Table 2 shows that seizures were more frequent in patients with schizophrenia, especially in male patients, than in control

Table 2. Comparison of the CAMDs frequencies between patients with schizophrenia and controls

CAMD	Males			Females			Total		
	SCH, n = 98	HC, n = 94	p	SCH, n = 66	HC, n = 62	p	SCH, n = 164	HC, n = 156	p
Persistent headache	10 (10.2)	8 (8.5)	0.439	16 (24.2)	25 (40.3)	0.039	26 (15.9)	33 (21.2)	0.141
Migraine	6 (6.1)	4 (4.2)	0.400	6 (9.0)	11 (17.7)	0.119	12 (7.3)	15 (9.6)	0.295
Constipation	24 (24.4)	3 (3.2)	<0.001	17 (25.7)	16 (25.8)	0.577	41 (25.0)	19 (12.2)	0.002
Diarrhoea	5 (5.1)	4 (4.2)	0.526	5 (7.6)	1 (1.6)	0.119	10 (6.1)	5 (3.2)	0.169
Motion sickness	9 (9.1)	6 (6.4)	0.326	8 (12.1)	11 (17.7)	0.260	17 (10.4)	17 (10.9)	0.510
Severe fatigue	6 (6.1)	0	0.016	12 (18.2)	0	<0.001	18 (11.0)	0	<0.001
Seizures	4 (4.0)	0	0.066	2 (3.0)	0	0.264	6 (3.7)	0	0.017
Muscle weakness	7 (7.1)	13 (13.8)	0.100	9 (13.6)	10 (16.1)	0.441	16 (9.8)	23 (14.7)	0.117
Hearing problems	4 (4.0)	14 (14.9)	0.009	5 (7.6)	4 (6.5)	0.540	9 (5.5)	18 (11.5)	0.040
Strabismus	5 (5.1)	3 (3.2)	0.384	4 (6.0)	0	0.070	9 (5.5)	3 (9.8)	0.082
Diabetes	6 (6.1)	1 (1.0)	0.066	6 (9.0)	2 (3.2)	0.158	12 (7.3)	3 (1.9)	0.020
Hypertension	5 (5.1)	10 (10.6)	0.123	8 (12.1)	4 (6.5)	0.214	13 (8.0)	14 (9.0)	0.446
Hyperlipidaemia	17 (17.3)	20 (21.3)	0.306	17 (25.7)	14 (22.6)	0.416	34 (20.7)	34 (21.8)	0.462

CAMDs, conditions associated with mitochondrial disorders; SCH, patients with schizophrenia; HC, healthy controls; n, number of cases. The CAMDs data are shown as the number of subjects, n, and (%). Conditions with a significantly higher frequency in patients with schizophrenia than in control subjects are noted in boldface.

individuals. Four of the six patients with seizures experienced onset in childhood and the other two in early adulthood. Regarding the patients with seizures in early childhood, two presented absence seizures continuing to this day and the other two had generalised seizures. Regarding these last two patients, one had been treated with antiepileptic drugs until the age of 18, suggesting that this remission in adulthood was compatible with a diagnosis of childhood epilepsy, while the seizures in the other patient continued into adulthood. Regarding the two patients with seizure onset in adulthood, in one of them, the first seizures coincided with a cranioencephalic trauma at the age of 18 and was ongoing. The other patient presented some generalised seizure episodes that coincided with the introduction of clozapine treatment; however, with antiepileptic usage, the seizures stopped. Remarkably, three of these six patients with seizures presented their first psychotic symptoms between the age of 13 and 16 after being diagnosed with generalised seizures, and another patient presented initial psychotic symptoms at the age of 8, while absence seizures first appeared at 9.

Table 2 also shows that diabetes was more frequently present in patients with schizophrenia than in control individuals. The diabetes cases among both patients and controls were all type 2 diabetes. We investigated whether diabetes status was associated with BMI and found that in the patient group, BMI was higher in those who presented with diabetes than in those who did not, with the difference reaching marginal significance (32.5 ± 7.3 and 27.4 ± 5.1 , respectively, $p = 0.059$). This situation was not observed in the control group, where the mean BMI was almost the same in subjects presenting with and without diabetes (24.6 ± 1.2 and 24.5 ± 3.2 , respectively, $p = 0.821$). However, in the combined sample, diabetes status was significantly associated with BMI, with higher mean values in individuals with diabetes (30.4 ± 7.1 and 25.2 ± 4.0 , $p = 0.026$).

It is noteworthy that the total number of CAMDs was higher in patients with schizophrenia than in healthy controls (4.0 ± 3.1 and 2.7 ± 2.3 , respectively, $p < 0.001$). Moreover, no significant differences were observed in the antipsychotic treatment

(in equivalent doses of chlorpromazine) between subjects presenting and non-presenting, respectively, the following CAMDs: constipation (574 ± 398 and 486 ± 364 , $p = 0.22$), severe fatigue (523 ± 370 and 520 ± 382 , $p = 0.99$), seizures (630 ± 369 and 515 ± 380 , $p = 0.31$), and diabetes (684 ± 425 and 499 ± 368 , $p = 0.11$). In addition, the number of patients taking antidepressants, benzodiazepines, mood stabilisers or anticholinergics was not different between those presenting and non-presenting these conditions.

Discussion

Schizophrenia is frequently associated with other common medical conditions, including cardiovascular diseases, metabolic disorders, substance use disorders, infectious diseases and neurologic disorders (Nasrallah, 2005). These comorbidities may be related to the fact that people with a schizophrenia diagnosis die 15–20 years earlier than individuals from the general population (Crump *et al.*, 2013; Laursen *et al.*, 2014). The present study was focused on the analysis of CAMDs and identified that constipation, severe fatigue, seizures and diabetes were more frequently present in patients with schizophrenia than in healthy controls. Research in these fields is scarce; however, in a recent study, the prevalence of constipation in schizophrenia was reported to be 31%, which is higher than the 25% prevalence reported in our study (Virtanen *et al.*, 2017). Constipation is a frequent gastrointestinal manifestation of mitochondrial disorders and has been related to gastrointestinal dysmotility due to respiratory chain defects (Finsterer & Frank, 2017). Moreover, antipsychotic-related constipation is a common and serious adverse effect, especially for people receiving clozapine but also for patients receiving other antipsychotic drugs (De Hert *et al.*, 2011). Constipation was first described with typical antipsychotics mainly in association with the use of anticholinergic agents, and currently, the suggested mechanism whereby it occurs is gastrointestinal hypomotility. Specifically, this has been proposed for clozapine, as it is a multireceptorial atypical

antipsychotic that has a high affinity for muscarinic cholinergic receptors, acting as an antagonistic agent (Every-Palmer & Newton-Howes, 2017). Remarkably, in addition to clozapine, most other antipsychotics inhibited muscarinic receptors in a mouse model (Obara *et al.*, 2019). Nevertheless, the specific mechanism and the prevalence of antipsychotic-related constipation are poorly understood (Every-Palmer *et al.*, 2019).

Regarding severe fatigue, we identified that 6% of the male patients and 18% of the female patients exhibited this condition, while no control subjects reported symptoms related to severe fatigue, which may be in accordance with the clinically significant levels of fatigue previously reported in 60% of patients with schizophrenia (Waters *et al.*, 2013). We have previously reported the presence of severe fatigue in 7% of the mothers and 1% of the fathers of patients with schizophrenia in a study, suggesting mitochondrial inheritance in schizophrenia (Verge *et al.*, 2012) and, more recently, mtDNA depletion in a three-member family with psychosis and chronic fatigue syndrome (Torrell *et al.*, 2017). Fatigue is a common symptom of many clinical conditions or treatment side effects that range in severity from mild to incapacitating; however, it can also be a natural result of lifestyle factors, such as lack of exercise or poor diet (Rosenthal *et al.*, 2008). There are several metabolic pathways, most of which are located in the mitochondria, that are critical for brain and muscular functions affecting mental functions, such as cognitive and psychological processes, and physical activity. The brain, unlike muscle, is always highly metabolically active, as it consumes approximately 3.5 ml O₂ per minute and 100 g of tissue, while resting muscle consumes only 1 ml O₂ per minute and 100 g of tissue (Tardy *et al.*, 2020). Therefore, the capacity for oxygen consumption of the brain may be a mechanism explaining why we identified that patients with schizophrenia present severe fatigue but not muscle weakness.

As with chronic fatigue, seizures were not present in any control subject but were significantly present in patients. Seizures are the most common central nervous system abnormalities present in mitochondrial disorders, and mitochondrial dysfunction has been proposed as the underlying common mechanism between epilepsy and schizophrenia (Pieczenik & Neustadt, 2007). The complex relationship between epilepsy and psychotic disorders has been pointed out. Some studies reported that individuals with schizophrenia have a two- to threefold increased risk of developing epilepsy, with an incidence rate of 7 per 1000 person-years (Agrawal & Mula, 2019). Therefore, patients with schizophrenia are more likely than healthy individuals to have epilepsy, and strong evidence of clustering of the association between epilepsy and psychosis within families has been reported. Psychosis is present in 2–7% of people with epilepsy (Maguire *et al.*, 2018), and patients with epilepsy have an almost eightfold increased risk of psychosis. The prevalence of psychosis is higher in temporal lobe epilepsy (Hüfner *et al.*, 2015), with a prevalence range between 10% and 15% (Maguire *et al.*, 2018). Interestingly, antipsychotics, particularly clozapine, decrease the seizure threshold, and this should be taken into account in medication plans in order to prevent seizures in predisposed patients (Hüfner *et al.*, 2015). However, some antiepileptic medications may worsen psychosis (Maguire *et al.*, 2018). The relationship between epilepsy and psychosis is multifaceted and probably related to a wide range of different mechanisms. It can be highlighted, for example, that neuroimaging studies in schizophrenia have shown abnormalities in brain networks overlapping those involved in temporal lobe epilepsy, particularly in the amygdala and the hippocampus (Agrawal & Mula, 2019).

Regarding type 2 diabetes, this is known to be two- to threefold more common in individuals with schizophrenia than in the general population, though it is the most common metabolic disease in the world today. Interestingly, it is also the most frequently described endocrine disturbance in mitochondrial diseases (Chow *et al.*, 2017); and because of the central role mitochondria play in β cells by sensing glucose and mediating the suppression of insulin secretion, it has been recently proposed that both mitochondrial structure and dysfunction are directly involved in the pathogenesis of type 2 diabetes by contributing to β -cell functioning (Las *et al.*, 2020). Mitochondrial dysfunction has also been noted in diabetic cardiomyopathy as a result of obesity-induced insulin resistance and type 2 diabetes (Makrecka-Kuka *et al.*, 2019). High BMI scores were observed in the patients with schizophrenia who participated in the present study, which may be related to poor diet, sedentary lifestyle, low socioeconomic status and antipsychotic medication. Antipsychotic medication directly affects insulin sensitivity and indirectly causes weight gain (Suvisaari *et al.*, 2016). However, it is important to highlight that the underlying characteristics of the disease, particularly the negative symptoms, may also contribute to metabolic alterations. In fact, an increased prevalence of metabolic syndrome has been observed in first episode and drug-naïve psychosis, suggesting that pleiotropic factors contributing to both schizophrenia and metabolic alterations may be involved (Castillo *et al.*, 2016).

Some of the conditions investigated are well known to present gender differences in prevalence in the general population, that is, headache, migraine and constipation are more frequent in females, and hypertension is more frequent in males, similar to the gender differences observed in the present study. It is also worth mentioning that the higher presence of constipation, severe fatigue, diabetes and seizures in patients with schizophrenia may be related to antipsychotic treatment. Therefore, we evaluated whether psychopharmacological treatment had an association with the presence of the CAMDs that we identified more frequently in patients than in healthy controls. No significant differences were observed in the antipsychotic doses between subjects presenting and non-presenting the conditions. Similarly, we did not observe that patients taking antidepressants, benzodiazepines, mood stabilisers or anticholinergics exhibited more CAMDs than patients not taking each of these pharmacological treatments. Finally, other conditions, such as hypertension and hypercholesterolaemia, that may be related to antipsychotic treatment were not more frequent in patients with schizophrenia than in the control subjects in the present study. Therefore, even though we cannot rule out that pharmacological treatment is involved in the development of medical comorbidities in schizophrenia, our results suggest that the high presence of severe fatigue, seizures, constipation and diabetes in patients with schizophrenia is not associated with pharmacological treatment.

Several factors may contribute to the high comorbidity of many physical and mental conditions in schizophrenia, including the severity of schizophrenia itself, lack of physical activity, diet, substance use and antipsychotic treatment. On the other hand, several molecular mechanisms other than mitochondrial dysfunction may be responsible for the comorbidities observed in schizophrenia, including gut microbiota, disturbed prenatal renin-angiotensin system function, abnormalities in maternofetal endocrine exchange or prenatal undernutrition-related epigenetic regulation of gene expression (Dieset *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2018). These biological pathways interact with each other and with a variety of environmental risk factors and may be involved in neurotransmitter,

inflammatory, endothelial and hormonal abnormalities that are present in schizophrenia. All these disease mechanisms may also converge in mitochondria and are consistent with the increasingly prevalent view that schizophrenia is a systemic disorder (Dieset *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2018).

In summary, we identified specific CAMDs with a high frequency in patients with schizophrenia, supporting the hypothesis that multi-systemic mitochondrial dysfunction may be an underlying mechanism involved in schizophrenia and CAMDs. This should be investigated in future studies, in addition to whether mitochondrial disorders are underdiagnosed in patients with schizophrenia, as has been suggested.

Acknowledgements. We express gratitude to the individuals who dedicated their time to participate in the study.

Author contributions. LM designed, planned and supervised the study. YA and EV were responsible for collecting data from patients and controls, respectively. YA, AV-P and BV directly interviewed the participants. YA and AV-P performed the statistical analyses and wrote the first draft. All authors revised the final version and approved it for submission.

Financial support. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (grants PI12/01885 and PI18/00514) and co-financed by European Regional Development Funds from the European Commission.

Conflict of interest. None.

Ethical standards. The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki declaration of 1975, as revised in 2008.

References

- American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th Edition). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Agrawal N and Mula M (2019) Treatment of psychoses in patients with epilepsy: An update. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* 9, 2045125319862968.
- Castillo RI, Rojo LE, Henriquez-Henriquez M, Silva H, Maturana A, Villar MJ, Fuentes M and Gaspar PA (2016) From molecules to the clinic: Linking schizophrenia and metabolic syndrome through sphingolipids metabolism. *Frontiers in Neuroscience* 10, 488. eCollection 2016.
- Chinnery PF (2014) Mitochondrial disorders overview. In Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K and Amemiya A (eds.), *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington [updated 4 Aug. 2014]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/>
- Chow J, Rahman J, Achenmann JC, Dattani MT and Rahman S (2017) Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nature Reviews. Endocrinology* 13, 92–104.
- Crump C, Winkley MA, Sundquist K and Sundquist J (2013) Comorbidities and mortality in persons with schizophrenia: A Swedish national cohort study. *American Journal of Psychiatry* 170, 324–333.
- Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O, McEwen S, Debnath M, McGrath J, Maes M, Amminger P, McGorry PD, Pantelis C and Berk M (2016) A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 65, 185–194.
- De Hert M, Hudyana H, Dockx L, Bernagie C, Sweers K, Tack J, Leucht S and Peuskens J (2011) Second-generation antipsychotics and constipation: A review of the literature. *European Psychiatry* 26, 34–44.
- Dieset I, Andreassen OA and Haukvik UK (2016) Somatic comorbidity in schizophrenia: some possible biological mechanisms across the life span. *Schizophrenia Bulletin* 42, 1316–1319.
- Every-Palmer S, Newton-Howes G and Clarke MJ (2017) Pharmacological treatment for antipsychotic-related constipation. *The Cochrane Database of Systematic Review* 1, CD011128.
- Every-Palmer S, Inns SJ, Grant E and Ellis PM (2019). Effects of clozapine on the gut: Cross-sectional study of delayed gastric emptying and small and large intestinal dysmotility. *CNS Drugs* 33, 81–91.
- Finsterer J and Frank M (2017) Gastrointestinal manifestations of mitochondrial disorders: A systematic review. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 10, 142–154.
- Hüfner K, Frajo-Apor B and Hofer A (2015) Neurology issues in schizophrenia. *Current Psychiatry Reports* 17, 32.
- Konradi C and Öngür D (2017) Role of mitochondria and energy metabolism in schizophrenia and psychotic disorders. *Schizophrenia Research* 187, 1–2.
- Las G, Oliveira MF and Shirihai OS (2020) Emerging roles of β -cell mitochondria in type-2-diabetes. *Molecular Aspects of Medicine* 71, 100843.
- Laursen TM, Nordentoft M and Mortensen PB (2014) Excess early mortality in schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology* 10, 425–48.
- Maguire M, Singh J and Marson A (2018) Epilepsy and psychosis: A practical approach. *Practical Neurology* 18, 106–114.
- Makrecka-Kuka M, Liepinsh E, Murray AJ, Lemieux H, Dambrova M, Tepp K, Puurand M, Käämbre T, Han WH, de Goede P, O'Brien KA, Turan B, Tuncay E, Olgar Y, Rolo AP, Palmeira CM, Boardman NT, Wüst RCI and Larsen TS (2019) Altered mitochondrial metabolism in the insulin-resistant heart. *Acta Physiologica* 16, e13430.
- Nasrallah HA (2005) An overview of common medical comorbidities in patients with schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry* 66, 3–4.
- Nguyen TT, Kosciolk T, Eyler LT, Knight R and Jeste DV (2018) Overview and systematic review of studies of microbiome in schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research* 99, 50–61.
- Obara K, Horiguchi S, Shimada T, Ikarashi T, Yamaki F, Matsuo K, Yoshio T and Tanaka Y (2019) Characterization of binding of antipsychotics to muscarinic receptors using mouse cerebral cortex. *Journal of Pharmacological Sciences* 140, 197–200.
- Piecznik SR and Neustadt J (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and Molecular Pathology* 83, 84–92.
- Roberts RC (2017) Postmortem studies on mitochondria in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 187, 17–25.
- Rosebush PI, Anglin RE, Rasmussen S and Mazurek MF (2017) Mental illness in patients with inherited mitochondrial disorders. *Schizophrenia Research* 187, 33–37.
- Rosenthal TC, Majeroni BA, Pretorius R and Malik K (2008) Fatigue: An overview. *American Family Physician* 78, 1173–1179.
- Suvisaari J, Keinänen J, Eskelinen S and Mantere O (2016) Diabetes and schizophrenia. *Current Diabetes Reports* 16, 1–10.
- Tardy AL, Pouteau E, Marquez D, Yilmaz C and Scholey A (2020) Vitamins and minerals for energy, fatigue and cognition: A narrative review of the biochemical and clinical evidence. *Nutrients* 12, pii:E228.
- Torrell H, Alonso Y, Garrabou G, Mulet D, Catalán M, Valiente-Pallejà A, Carreño-Gago L, García-Arumí E, Montaña E, Vilella E and Martorell L (2017) Mitochondrial dysfunction in a family with psychosis and chronic fatigue syndrome. *Mitochondrion* 34, 1–8.
- Valiente-Pallejà A, Torrell H, Muntané G, Cortés MJ, Martínez-Leal R, Abasolo N, Alonso Y, Vilella E and Martorell L (2018) Genetic and clinical evidence of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Human Molecular Genetics* 27, 891–900.
- Verge B, Alonso Y, Miralles C, Valero J, Vilella E, Boles RG, Martorell L (2012) New Evidence for the Involvement of Mitochondrial Inheritance in Schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry* 73, 684–690.
- Virtanen T, Eskelinen S, Säilä E and Suvisaari J (2017) Dyspepsia and constipation in patients with schizophrenia spectrum disorders. *Nordic Journal of Psychiatry* 71, 48–54.
- Wallace DC (2017) A Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders. *JAMA Psychiatry* 74, 863–864.
- Waters F, Naik N and Rock D (2013) Sleep, fatigue, and functional health in psychotic patients. *Schizophrenia Research and Treatment* 2013, 425826.

❖ **Publicació 4:**

Mitochondrial dysfunction in a family with psychosis and chronic fatigue syndrome

Helena Torrell, Yolanda Alonso, Glòria Garrabou, David Mulet, Marc Catalán, Alba Valiente-Pallejà, Lidia Carreño-Gago, Elena García-Arumí, Elena Montaña, Elisabet Vilella, Lourdes Martorell.

Mitochondrion. 2017;34:1-8.

DOI: 10.1016/j.mito.2016.10.007

❖ **Antecedents:**

S'ha proposat que la disfunció mitocondrial està implicada en l'etiologia de la SFC i també en l'ESQ. Aquest treball presenta els resultats d'un estudi clínic, genètic i bioquímic en tres membres d'una família amb aparent herència materna de diverses afectacions. Les tres persones estudiades eren una dona amb síndrome de fatiga crònica, la filla gran amb síndrome de fatiga crònica i la filla petita amb ESQ i símptomes compatibles amb la síndrome de fatiga crònica.

❖ **Aportacions:**

Les tres membres de la família van mostrar un augment en els nivells de lactat durant la realització d'un exercici físic d'intensitat moderada, un augment de la massa mitocondrial, un menor contingut d'ADNmt, una menor activitat enzimàtica mitocondrial, així com una menor capacitat de consum d'oxigen; respecte a un grup de dones control. No es va detectar cap mutació ni en el genoma mitocondrial ni en gens nuclears relacionats amb la depleció de l'ADNmt que es van analitzar.

❖ **Aspectes a destacar:**

Aquests resultats suggereixen que les tres membres d'aquesta família presenten una disfunció mitocondrial caracteritzada per l'alteració de diversos biomarcadors. Tanmateix, aquesta disfunció no es va poder associar a la presència de mutacions en l'ADNmt o en els gens analitzats de l'ADNn.

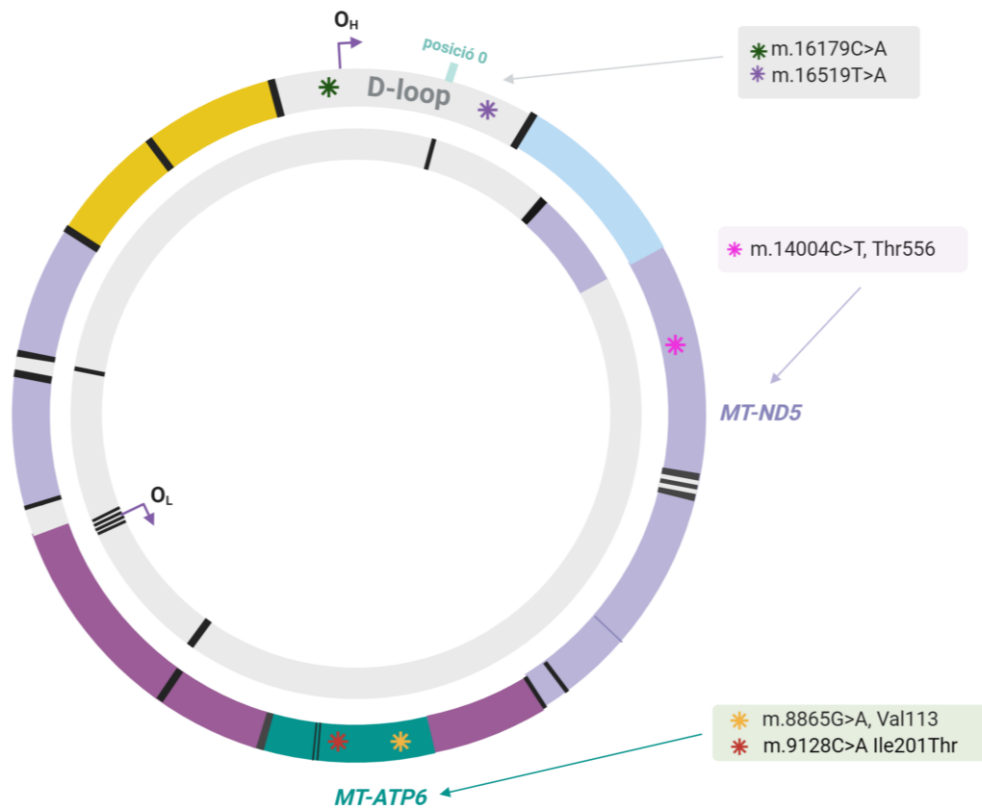


Figura 23: Variants identificades en ESQ i SFC al nostre estudi



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito



Mitochondrial dysfunction in a family with psychosis and chronic fatigue syndrome

Helena Torrell ^{a,1}, Yolanda Alonso ^b, Glòria Garrabou ^c, David Mulet ^b, Marc Catalán ^c, Alba Valiente-Pallejà ^b, Lidia Carreño-Gago ^d, Elena García-Arumí ^d, Elena Montaña ^a, Elisabet Vilella ^a, Lourdes Martorell ^{b,*},¹

^a Centre for Omic Sciences, Centre Tecnològic de Nutrició i Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Catalonia, Spain

^b Hospital Universitari Institut Pere Mata, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Reus, Catalonia, Spain

^c Muscle Research and Mitochondrial Function Laboratory, Cellex-IDIBAPS, Faculty of Medicine-Universitat de Barcelona, Internal Medicine Service-Hospital Clínic de Barcelona, Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Catalonia, Spain

^d Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Disorders, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Catalonia, Spain

article info

Article history:

Received 11 December 2015

Received in revised form 7 July 2016

Accepted 26 October 2016

Available online 28 October 2016

Keywords:

Chronic fatigue syndrome

Schizophrenia

Mitochondrial DNA

mtDNA

Mitochondrial respiratory chain complexes

mtDNA depletion

abstract

Mitochondrial impairment is hypothesized to be involved in chronic fatigue syndrome (CFS) and schizophrenia. We performed a clinical, genetic and functional mitochondrial study in a family consisting of a female presenting schizophrenia in addition to CFS symptoms and her mother and older sister, both presenting with CFS. The three family members showed higher blood lactate levels, higher mitochondrial mass, lower mtDNA content and over- all lower mitochondrial enzymatic activities and lower oxygen consumption capacities than healthy women. This family presented mtDNA depletion; however, no mutation was identified neither in the mtDNA nor in the nuclear genes related with mtDNA depletion, even though C16179A and T16519A variants should be further studied.

© 2016 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic fatigue syndrome (CFS) is a complex illness with an estimated prevalence of 0.8% (Johnston et al., 2013). Diagnosis consists of a list

of symptoms that are often, but not always, present and that occur with varying degrees of severity. For a CFS diagnosis, a patient might self-report persistent or relapsing fatigue for at least six consecutive months or longer not caused by another medical condition and four or more of the following symptoms: post-exertional malaise, impaired memory or concentration, unrefreshing sleep, muscle pain, multi-joint pain without redness or swelling, tender cervical or axillary lymph nodes, sore throat or headache (Fukuda et al., 1994). Alterations in immune, gastro-intestinal, genitourinary and autonomic function may be associated with this syndrome. Although the causes and pathophysiology of CFS and the effectiveness of the few currently available treatments remain unknown, the central nervous system is most likely involved (Holgate et al., 2011).

Schizophrenia is also a complex illness with a prevalence of approximately 0.30–0.66% (McGrath et al., 2008). Schizophrenia is characterized by delusions, hallucinations, disorganized speech and behavior, and other symptoms that cause social or occupational dysfunction. Cognitive deficits and negative symptoms as social withdrawal, loss of motivation and initiative, self-neglect, emotional blunting, and paucity of speech are frequently present. Medical illness is highly prevalent in schizophrenia patients, and the mortality rates from medical illnesses are elevated in comparison to the general population for a number of disease categories, including infectious, respiratory, endocrine, gastrointestinal, and cardiovascular diseases (Leucht et al., 2007). The etiology

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; C10orf2, chromosome 10 open reading frame 2; CI, mitochondrial complex one; CII, mitochondrial complex two; CIII, mitochondrial complex three; CIV, mitochondrial complex four; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; Cellox, global endogenous substrate consumption; CFS, chronic fatigue syndrome; CPK, creatine phosphokinase; CS, citrate synthase; DGUOK, deoxyguanosine kinase; DNA, deoxyribonucleic acid; DSM-IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; G3Pox, glyceraldehyde 3-phosphate oxidation; GMox, glutamate malate oxidation; GUSB, glucuronidase beta; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IPAQ, International Physical Activity Questionnaire; MPV17, Mpv17 mitochondrial inner membrane protein; MRC, mitochondrial respiratory chain; MRI, magnetic resonance imaging; mtDNA, mitochondrial DNA; MT-ND1, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1; MT-ND4, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4; nDNA, nuclear DNA; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PGM, personal genome machine; PMox, pyruvate malate oxidation; POLG, polymerase (DNA directed), gamma; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RNA, ribonucleic acid; RNase P, ribonuclease P; RPPH1, ribonuclease P RNA component HI; RRM2B, ribonucleotide reductase M2 B; SCAN, Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean; Sox, succinate oxidation; SPECT, single-photon emission computed tomography; TK2, thymidine kinase 2, mitochondrial; YWHAZ, tyrosine3-monooxygenase.

* Corresponding author at: Unitat de Psiquiatria, C/Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain.

E-mail address: lourdes.martorell@urv.cat (L. Martorell).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2016.10.007>

1567-7249/© 2016 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

of schizophrenia is poorly understood; however the heritability has been estimated at 0.8 reflecting high genetic influence that interacts with environmental factors such as early life adversity, growing up in an urban environment, minority group position and cannabis use (van Os et al., 2010).

Mitochondria are key organelles necessary for energy production, and their proper function is therefore crucial for tissues with high metabolic demand, such as the nervous system and skeletal and cardiac muscles. Interestingly, mitochondria have their own genome, mitochondrial DNA (mtDNA), a 16,569-bp, double-strand, circular molecule that contains the genetic information necessary for the synthesis of 13 essential polypeptides of the mitochondrial respiratory chain (Verge et al., 2011). Mitochondrial dysfunction and mtDNA alterations have been hypothesized to be involved in both CFS (Myhill et al., 2013; Myhill et al., 2009; Vecchiet et al., 1996; Zhang et al., 1995) and schizophrenia (Anglin et al., 2012; Ben-Shachar, 2002; Sequeira et al., 2012; Torrell et al., 2013; Verge et al., 2011).

Here, we present a three-member family consisting of a proband presenting schizophrenia and symptoms compatible with CFS and her mother and older sister who present CFS, among multiple other conditions. We hypothesized that mitochondrial dysfunction and mtDNA alterations are present in this family as an underlying mechanism involved in both CFS and schizophrenia.

1. Case report

Ms. Z is a 29-year-old woman who fulfills the DSM-IV criteria for schizophrenia. When she was 7 years old, she began presenting prejudice and paranoid delusional thoughts, behavioral disorder, and irritability, symptoms that were recurrently present until the date of this study. At age 8, she began ambulatory psychiatric treatment, and at 18, she was admitted for the first of five psychiatric hospitalizations. The patient's antipsychotic drug treatment resulted in significant side effects and was changed several times, always with a partial response. Ms. Z has a history of asthma, multiple allergies (penicillin, pollen, and mites), and food intolerances (lactose, legumes, and gluten). She used to swim regularly until she was 21 when she presented post-exertion fatigue, muscle stiffness, and pain, with a slow recovery after exercise. At the age of 23, Ms. Z presented an episode of ocular and vaginal mucosa dryness, difficulty in swallowing, respiratory distress, muscle cramps, generalized arthralgia, intense asthenia, persistent constipation, sickness, pollakiuria, sleep disturbances, and loss of memory. She was then examined in the Internal Medicine and Neurological Department at the hospital of Vall d'Hebron. Her electromyography activity, creatine phosphokinase (CPK), lactate, pyruvate, and electroneurogram were normal; therefore, muscle biopsy was not conducted. The electroencephalogram, magnetic resonance imaging (MRI), and polysomnography results were also normal. Brain perfusion single-photon emission computed tomography (SPECT) resulted in less uptake in the frontal left-side zone, with light extension to the right, suggesting a degenerative process or bilateral frontal atrophy. At 25 years old, she continued showing extreme asthenia, sickness, mucosa dryness, and cognitive problems, and extensive blood tests were performed, including an immunologic study that revealed antibodies against the zoster and Epstein-Barr viruses and a low percentage of T4, T8, and suppressor T8 lymphocytes. Although the electrocardiogram was normal, she presented presyncopal symptoms in the tilt test. Neurologic examination did not identify any acute focalities; however, she presented a moderate degree of dysexecutive syndrome, mild melokinetic apraxia, and some anomie. At the age of 28 years, a neuropsychological study identified a moderate cognitive deficit, with signs of cortico-subcortical dysfunction with frontal predominance. At the time of this study, she was an outpatient under pharmacological treatment consisting of 300 mg/day of clozapine and regularly attended the Institut Pere Mata day center facility for medical follow-up and rehabilitation work.

Ms. Z's mother is a 56-year-old woman who fulfills the Fukuda criteria for CFS and has a wide medical history. She was diagnosed with severe cervical dysplasia at 42 and Hashimoto thyroiditis at 47. The next year, she presented with loss of memory and sleep disturbances as well as sensibility and strength alterations, with a general slowdown; indeed, she presented slowing electroencephalographic activity. Multiple complementary tests, including muscular biopsy, electromyography, and routine blood tests, were within the normal ranges, whereas her viral serology and lymphocyte typing were not. She presented antibodies against Epstein-Barr, herpes simplex, varicella-zoster, cytomegalovirus, and *Mycoplasma pneumoniae* as well as a low percentage of T4, T8, and suppressor and cytotoxic T8 lymphocytes. MRI did not identify significant alterations; however, SPECT showed hypo-uptake areas in the left posterior frontal region that were suggestive of a neurodegenerative process. Cognitive tests revealed a mild cognitive impairment. After repetitive episodes, spanning over more than 10 years, of loss of consciousness and normal echocardiogram and Holter electrocardiography, a diagnosis of vasovagal syncope was made. Ms. Z's mother has multiple allergies (cereals, bees, wasps, and nickel) and several long-developing food intolerances, with sensitization to gluten, producing recurrent symptoms of weight loss, abdominal pain, and asthenia. She is also described as having Sjögren syndrome.

Ms. Z's sister is a 32-year-old woman who began to experience increased fatigue and generalized pain coinciding with a stress period at the age of 23 when she was diagnosed of CFS according to the Fukuda criteria. She was also diagnosed with fibromyalgia at 27 years and has multiple allergies and food intolerances.

Supplementary text 1 reports information regarding Ms. Z's father, maternal grandmother and maternal uncles and aunts.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

We studied Ms. Z, Ms. Z's mother, and Ms. Z's sister and a control group of 18 healthy women aged 23 to 71 years old with no personal or familial antecedents of psychiatric symptoms or fatigue. Approval for this study was obtained from the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Reus. All participants except Ms. Z understood the purpose of the study in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki of 1975 (revised 1983) and provided written informed consent after full explanation of the benefits and risks of participation. Because Ms. Z is incapacitated, her mother provided consent for her participation in the study. The three case members and the control women did not present diabetes mellitus, acquired immunodeficiency syndrome, cardiac ischemia, seizures, or liver pathology that could alter their lactate values. Similarly, these individuals were not under pharmacological treatment consisting of valproic acid, glucocorticoids, anesthetics, salicylates, and oral contraceptives, which could alter mitochondrial function. The participants were not consuming drugs (tobacco, alcohol, cannabis, hallucinogens, cocaine, and opioids) before or at the time of the study, with the exception of a control individual who smoked approximately 5 cigarettes per day. Physical exploration did not identify any significant alterations.

2.2. Interviews and questionnaires

The three participants and the control group completed a structured clinical interview by a psychiatrist to provide clinical, socio-demographic and drug consumption data. A psychopathological examination was performed by the Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry (SCAN) (Vazquez-Barquero et al., 1994). The diagnosis of schizophrenia was based on the DSM-IV criteria, and the diagnosis of CFS was based on the Fukuda criteria. Because muscular exercise greatly influences the anaerobic threshold and is related to mitochondrial function, only physically moderate or non-trained women as close to the three participants

as possible were accepted as controls. The exercise practices and habits of all the participants were obtained by the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) (Craig et al., 2003).

1.1. Blood collection and biochemical analyses during the lactate stress test

The fasting participants underwent venipuncture with the BD Nexiva™ closed catheter system (BD Medical, Madrid, Spain) without a tourniquet prior to the initiation of cycling at 8:00 a.m. The first blood samples were then collected for DNA and RNA analyses, blood counts, basic biochemistry, and basal lactate determination. After this, the subjects were asked to pedal for 15 min at a consistent power of 30 W and 60 rpm on an electronically braked bicycle ergometer (Optibike, Ergoline, Bitz, Germany). The blood pressure and heart rate were monitored, and blood samples were drawn at 5, 10, and 15 min after cycling began and also at 15 min after finishing the exercise. The lactate levels were determined in each sample before cycling (0 min), during cycling (5, 10, and 15 min), and after rest (30 min) using a GEM® Premier™ 3000 Analyzer (IL, New York, US).

1.2. qPCR for mtDNA copy number quantification

Total DNA was extracted from leukocytes using the Gentra® PureGene Cell kit (Qiagen, Barcelona, Spain) and quantified by spectrophotometry (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). For qPCR, we measured three mtDNA regions as target genes, the *MT-ND1* and *MT-ND4* genes and the 7S region located in the D-loop, and *RPPH1* (corresponding to RNase P) as a single-copy nuclear reference gene, as previously described (Torrell et al., 2013). The mtDNA content was obtained as the ratio of the mitochondrial genome (number of copies) to the nuclear genome (number of copies) (mtDNA/nDNA). This ratio was then normalized to the activity of citrate synthase (CS), which is commonly used as a quantitative enzyme marker for the presence of intact mitochondria. The ratio (mtDNA/nDNA)/CS enzymatic activity has been described as an indicator of the number of mtDNA copies per mitochondrial content and has recently been reported as an indicator of mtDNA depletion, which is established when 70% of the mtDNA copies have been eliminated (Navarro-Sastre et al., 2012).

1.3. RT-qPCR for mtDNA gene expression analyses

RNA was isolated with the PAXgene™ Blood RNA kit (Qiagen, Barcelona, Spain) from whole blood collected in PAXgene® tubes (Qiagen, Barcelona, Spain). Total RNA (500 ng) was retro-transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, Madrid, Spain). Sixteen mtDNA transcripts (the 7S region, 13 corresponding to polypeptides, and 2 corresponding to ribosomal genes) were quantified by validated TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Madrid, Spain) as previously described (Torrell et al., 2013). The geometric mean of three nuclear transcripts (*HPRT1*, *GUSB* and *YWHAZ* genes), which we previously identified as the most suitable in blood samples for schizophrenia and control subjects (data not shown), was used as a reference for normalization. The values were then normalized to the CS activity.

1.4. Next-generation sequencing (NGS)

1.4.1. NGS of mtDNA

mtDNA was amplified in two fragments of 8338 and 8647 bp using previously described primers (Gunnarsdóttir et al., 2011). Long-range PCR was performed using 10 ng of DNA with Expand Long Range dNTPack (Roche, Barcelona, Spain), and the PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Barcelona, Spain) following the manufacturer's instructions. Lastly, the two PCR fragments from each individual were mixed in equimolar ratios for the sequencing protocol using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)

according to the manufacturer's user guide. Sequencing was performed with the Ion PGM200 Sequencing Kit (Life Technologies, Madrid Spain) on an Ion 314 chip. The sequencing data were analyzed and processed with the Ion Torrent Variant Calling plugin based on SAMtools (Li et al., 2009), IGV software (Robinson et al., 2011; Thorvaldsdóttir et al., 2013), the HaploGrep algorithm (Kloss-Brandstätter et al., 2011), Phylotree for global human mtDNA variation (van Oven and Kayser, 2009), and information provided by Mitomap (Ruiz-Pesini et al., 2007) (www.mitomap.org). We used the human revised Cambridge sequence NC_012920 as the reference template to detect individual genetic variants in the studied patients (Andrews et al., 1999).

1.4.2. NGS of nuclear genes

The entire coding region of nuclear genes that had been related with mtDNA depletion syndrome (El-Hattab and Scaglia, 2013) (*POLG*, *C10orf2*, *RRM2B*, *MPV17* and *TK2*) was PCR enriched using GeneRead DNAseq Custom Panel (Qiagen, Barcelona, Spain). The pool of PCR products was followed by DNA libraries preparation and massive parallel sequencing by MiSeq (Illumina Inc., Cambridge, UK). Sequence alignment, variant calling and annotation were performed by MiSeq Control Software (MCS), MiSeq Reporter (Illumina Inc., Cambridge, UK) and GeneRead SeqVariant Analysis software (Qiagen, Barcelona, Spain).

1.5. Mitochondrial respiratory chain (MRC) measurements

Both the MRC enzymatic and oxidative activities were measured in PBMCs isolated using a Ficoll density gradient from 20 ml of venous blood collected in EDTA-vacutainer tubes. The mitochondrial complex I (CI), complex II (CII), complex CIII (CIII), complex IV (CIV), and citrate-synthase (CS) enzymatic activity were measured spectrophotometrically following the national standardized methodology based on the procedures of Medja et al. (Medja et al., 2009). In addition, the oxidative activities of specific MRC complexes were measured with polarography using a Clark oxygen electrode as has been described (Chretien et al., 1994). In particular, the oxygen consumption rate was determined via pyruvate malate oxidation (PMox) and glutamate malate oxidation (GMox) for complex I, succinate oxidation (Sox) for complex II, and glyceraldehyde 3-phosphate oxidation (G3Pox) for complex III in permeabilized cells. However, the first determination was performed with intact cells as indicative of the global endogenous substrate consumption (Cellox). All enzymatic and oxidative activities were normalized to the CS activity to express each activity per mitochondrion. The total protein concentration was measured using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) following the manufacturer's protocol and used as a loading control parameter in order to normalize enzymatic or oxidative activities.

1.6. Statistical analyses

The mean and either SD or SEM were calculated using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0 (IBM Corp, Armonk, NY). The boxplots were generated with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

2. Results

The epidemiological and clinical data, blood count, basic biochemistry, and physical activity of the three participants and the control women are given in Table 1.

2.1. Clinical study

The proband presented with a diagnosis of schizophrenia according to the DSM-IV criteria and therefore could not be diagnosed with CFS; however, she did present symptoms compatible with this syndrome. Her mother and older sister presented with a diagnosis of CFS, but no

Table 1
 Clinical and epidemiological data of the three family members and healthy control women.

	Ms. Z (SCH patient)	Ms. Z's sister (CFS patient)	Ms. Z's mother (CFS patient)	Healthy women (mean ± SD)
Epidemiological data				
Age (y)	29	32	56	37 (±10)
BMI (kg/m ²)	19.92	23.14	20.28	21.97 (±2.19)
Blood test levels				
Biochemistry				
Creatinine (mg/dl)	0.73	0.69	0.75	0.65 (±0.12)
Creatinine kinase (IU/l)	69	59	66	74 (±34)
Total bilirubin (mg/dl)	0.52	0.30	0.61	0.51 (±0.21)
AST (IU/l)	20	13	18	17 (±2)
ALT (IU/l)	15	10	14	12 (±3)
Total protein (g/dl)	6.8	6.6	6.4	6.9 (±0.3)
Albumin (g/dl)	4.7	4.4	4.5	4.5 (±0.2)
Hematology				
Red cells (cells/μl)	4.1	4.5	4.5	4.4 (±0.3)
Hemoglobin (g/dl)	12.5	13.2	12.8	12.9 (±0.9)
Hematocrit (%)	37.3	39.6	39.4	38.5 (±2.6)
Leukocytes (cells/μl)	4.95 × 10 ³	6.78 × 10 ³	7.01 × 10 ³	5.97 × 10 ³ (±2.21 × 10 ³)
Platelets (cells/μl)	190 × 10 ³	211 × 10 ³	208 × 10 ³	233 × 10 ³ (±42 × 10 ³)
Clinical disease data				
Age at onset of symptoms (y)	7	23	48	–
Age at diagnosis (y)	18	30	49	–
Current percentage of disability	77	–	41	–
Current medication	Clozapine 300 mg/day	–	–	–
International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)				
IPAQ-total ^a (MET min/w)	396	66	693	2298 (±1589)
Vigorous (min/w)	0	0	0	51 (±68)
Moderate (min/w)	0	0	0	98 (±192)
Time spent walking (min/d)	20	20	30	60 (±50)
Time spent sitting (min/d)	540	600	300	450 (±110)

SD, standard deviation; y, years; BMI, body mass index; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; MET, multiples of the resting metabolic rate; min, minutes; w, week; d, day.

^a IPAQ-total (MET-minutes/week) = Vigorous (8 × minutes of vigorous activity/day × days per week) + Moderate (4 × minutes of moderate activity/day × days) + Walking (3.3 × minutes of activity/day × days per week).

mental disorder was revealed by the SCAN interview. Regardless, depression symptoms related to CFS were present in both the mother and the sister. Ms. Z's mother presented a depressive mood and weeping for two years, loss of self-confidence and self-esteem, social dysfunction, worries of catastrophes and death, and ideas of suicide and self-injury in the SCAN interview as remarkable items at the moment of exploration. Ms. Z's sister's SCAN results reflected that she had previously presented a lack of concentration and energy, depressive mood and weeping, loss of self-esteem, punctual anxiety and phobia, and concern and worries. However, these symptoms remitted after a brief psychological intervention, and pharmacological treatment was not required.

1.1. Lactate stress test

Panel A of Fig. 1 outlines the lactate levels of the three family members with respect to the controls. It is important to note that Ms. Z's mother was not able to complete the exercise on the bicycle ergometer and finished pedaling after 10 min rather than 15 min. Remarkably, she was not able to pedal at 60 rpm, and her speed was near 40 rpm. The stress test revealed that the schizophrenic patient exhibited baseline lactate levels within the first interquartile range of the controls, whereas the sister and mother were near the median; however, within 5 min of starting the exercise, the lactate levels of all three soared above the third

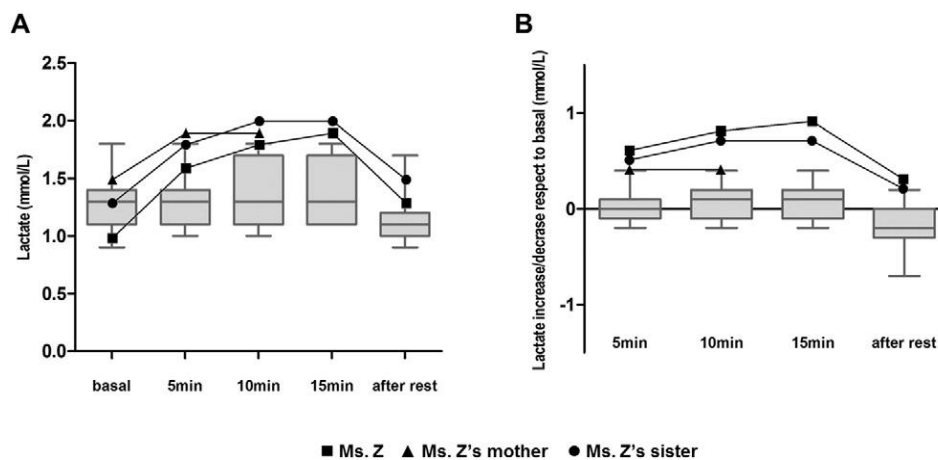


Fig. 1. Lactate levels and alterations during the stress test. Panel A shows the lactate concentration during the lactate stress test, and Panel B shows the increase or decrease in lactate with respect to the respective basal value. In both panels, the three family members are shown with symbols (square, triangle, and dot) connected by lines; the control women are shown in boxplots.

quartile obtained with the controls. Within 10 min of starting the exercise, the lactate values of the three family members were above of those of the controls. Because basal lactate levels can differ among individuals, we measured the changes in lactate concentration with respect to their respective baseline values and found that the relative lactate values in the three family members were higher than those of the controls at 5, 10, and 15 min and after rest, as shown in panel B of Fig. 1.

1.1. Analysis of mtDNA

According to the mtDNA content, the three family members exhibited a similar and low number of mtDNA copies, ranging in the lower quartile of the controls for all three analyzed mtDNA regions (Fig. 2, panel A). In addition, panel B of Fig. 2 shows that these individuals also presented a low (mtDNA/nDNA)/CS ratio, which was under the first quartile range of the controls, indicating mtDNA depletion degree of $74 \pm 2\%$ (mean \pm SEM).

We did not observe any remarkable mtDNA gene expression pattern in the three women that differed from the controls, as indicated in Supplementary Fig. 1A. However, when these values were normalized to the mitochondrial mass, the three women showed a global reduction in expression of $63\% \pm 1\%$ (mean \pm SEM) (Supplementary Fig. 1B).

The Ion PGM massive parallel sequencing of mtDNA revealed the same 12 highly confident and homoplasmic variants among the three women. Seven of these variants were haplogroup determining (leading

to H1 haplogroup), whereas the other five (G8865A, T9128C, C14004T, C16179A and T16519A) were not. They did not correspond to any of the mutations previously associated with mitochondrial diseases and were reported in Mitomap. Supplementary text 2 reports information regarding the variants. The potential effect of missense variants was predicted by PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2013).

The analyses of the nuclear genes *POLG*, *C10orf2*, *DGUOK*, *RRM2B*, *MPV17* and *TK2* did not reveal any reported variant associated with mtDNA depletion.

1.2. Mitochondrial respiratory function

It is important to note that all three family members showed higher CS enzymatic activities compared to the healthy subjects ($325\% \pm 100$ increase), indicating an increased number of total mitochondria in PBMCs (data not shown).

The MRC CI, CII, CIII and CIV enzymatic activities related to CS of the three women were within or below the first quartile range of the controls, suggesting a similar reduction in mitochondrial function of $62 \pm 13\%$ (mean family value for MRC complexes \pm SEM) when compared to the healthy women (arbitrarily assigned as 100%; Fig. 3, Panel A).

According to the mitochondrial oxidative activities related to CS, the endogenous cell oxygen consumption (Cellox), CI-stimulated oxygen consumption (GMox and PMox), and CIII-stimulated oxygen consumption (G3Pox) of the PBMCs of the three family members were within or below the first quartile range of controls (arbitrarily assigned as 100%; Fig. 3, Panel B), suggesting a reduction in function of $66\% \pm 7\%$ (mean

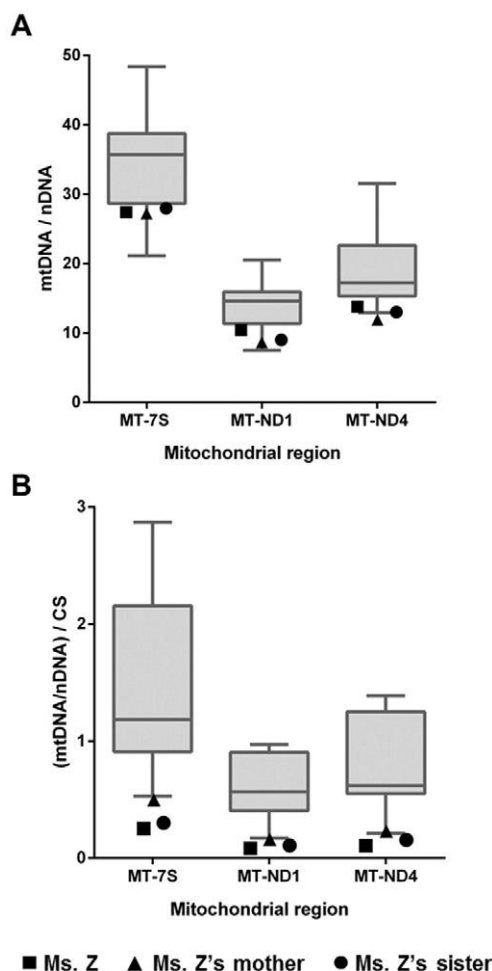


Fig. 2. mtDNA content. Panel A indicates the mtDNA content expressed as the ratio of mtDNA/nDNA for the three mtDNA regions analyzed. Panel B represents the mtDNA content related to the mitochondrial mass as the ratio of (mtDNA/nDNA)/CS for the three mtDNA regions assessed. The boxplots show the values of the control women, and the symbols (square, triangle, and dot) represent each family member.

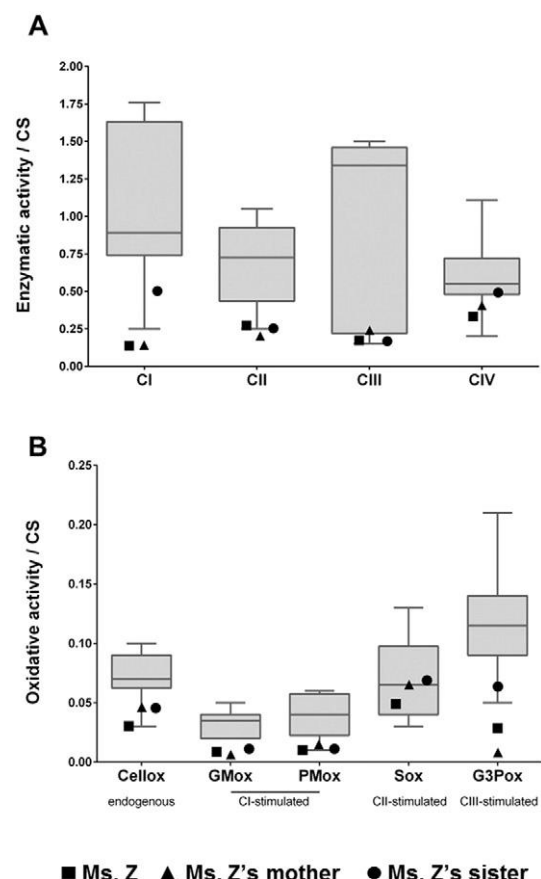


Fig. 3. Mitochondrial respiratory chain function. Panel A shows the CI, CII, CIII and CIV enzymatic activities related to CS. Panel B indicates the different endogenous or stimulated oxygen consumption related to CS. The boxplots represent the values of the control women in both panels, and the symbols (square, triangle, and dot) represent each family member.

family value \pm SEM). Consequently, the capacity of the PBMCs from the three women to consume oxygen was impaired. Interestingly, the CII-stimulated oxidative (Sox) activity was within the normal range.

1. Discussion

The goal of this work was to identify whether mitochondrial genetic and functional alterations could be an underlying mechanism in this family presenting CFS and schizophrenia, besides other medical and neurological conditions, by studying distinct mitochondrial parameters.

We observed that the three women displayed basal lactate levels within the normal range of the controls when resting; however, these values dramatically increased after 5 min of exercise. Moderate exercise has been shown to increase lactate levels in some patients with primary (Finsterer et al., 1998) or secondary (Garrabou et al., 2006) mitochondrial disorders. This lactate acidosis is caused by defective oxidative metabolism with a reactive change from the aerobic to anaerobic phosphorylation of ADP, and our results indicate that the three women may exhibit defective oxidative metabolism when the energy requirements are increased. Interestingly, in a cardiopulmonary stress test performed in CFS and control subjects, the CFS patients reached the anaerobic threshold at a much lower oxygen consumption than the controls, implying an increase in blood lactate levels, accompanied by decreased ATP levels and preserved CI and CII activities (Vermeulen et al., 2010). Similarly, in a case-control study of physical fitness in schizophrenia, the anaerobic threshold was lower in patients than controls (Ostermann et al., 2012). Although blood lactate levels during moderate exercise have not been studied in either CFS or schizophrenia, elevated lactate levels have been described in the ventricular areas of CFS patients (Shungu et al., 2012) and also in the cerebrospinal fluid of schizophrenia patients when compared to control subjects (Regenold et al., 2009).

According to the mtDNA copy number, the three family members had a low number of mtDNA copies compared to the healthy control group. Moreover, when the mtDNA copy numbers were expressed according to the mitochondrial mass by referring to the CS activity, the three women clearly showed mtDNA depletion. There is only one study to date that has assessed the mtDNA copy number in PBMCs from CFS patients, reporting a similar mtDNA copy number in patients compared to control subjects (Castro-Marrero et al., 2013). However, as the methodology in that study was different from ours in the present study, the data cannot be compared. The impossibility of comparing mtDNA copy number data between studies has already been reported, as have several issues that can significantly alter the accuracy of mtDNA/nDNA values (Malik and Czajka, 2013). Accordingly, we ensured accuracy in the mtDNA copy number measurement. We determined three mtDNA gene regions instead of only one and selected a single-copy nuclear reference gene; the mtDNA primers were located in regions only found in mtDNA but not in nDNA, and serial dilutions were performed to assure that dilution bias was not affecting the mtDNA/nDNA values. Thus far, no study has evaluated the mtDNA copy number in PBMCs from schizophrenia patients, and no differences have been reported in post-mortem brain tissue (Sabunciyan et al., 2007; Torrell et al., 2013).

Although these patients presented a variety of symptoms that can be associated with mitochondrial disorders (e.g., gastrointestinal problems, muscle weakness, sleep disturbances, food allergies), we did not identify any nucleotide substitution, insertion, or deletion either in the mtDNA or in the nuclear genes *POLG*, *C10orf2*, *DGUOK*, *RRM2B*, *MPV17* and *TK2*. Nonetheless, the presence of a mutation in other nuclear genes involved in mtDNA replication cannot be ruled out, as the family members clearly showed mtDNA depletion. Similarly, the mtDNA gene expression of mitochondrial proteins or ribosomal RNAs in this family was within the range of that of the controls, though expression was clearly reduced compared to the controls when the data were normalized to the mitochondrial mass. Regarding the non-haplogroup variants,

for those corresponding to codon positions, they very likely do not have an impact in the phenotype as they do not produce an amino acid change (MT-ATP6, G8865A Val113; MT-ND5, C14004T, Thr556) or the amino acid change is considered benign by PolyPhen-2 (MT-ATP6, T9128C, Ile201Thr). For those located in non-coding positions, C16179A and T16519A are rare variants with a frequency in 30,589 human mtDNA sequences present in GenBank of 0.01% and with unknown role. Therefore, further studies are needed to identify whether they are implicated in mtDNA replication or transcription.

Moreover, the mitochondrial respiratory chain function appeared to be impaired in concordance to previous reports (Burbaeva et al., 2011; Toker and Agam, 2015). According to the enzymatic activities, there was a partial reduction in the functioning of every complex in comparison to the control women. No data on the blood samples of CFS patients have yet been published, and only one study analyzed specific mitochondrial complex enzymatic activities in muscle, with no differences when compared to controls (Smits et al., 2011). However, increased complex I activity has been reported in platelets from schizophrenia patients, and this complex I activity was later positively correlated with the severity of positive psychotic symptoms (Ben-Shachar et al., 1999; Dror et al., 2002), although diminished mitochondrial respiratory chain enzymatic activity has been also reported (Burbaeva et al., 2011; Toker and Agam, 2015). Interestingly, decreased CIII enzymatic activity has been associated with exercise intolerance (Massie et al., 2010; Mousson et al., 1995), and the same relationship was identified in all three family members of the present study. It has been reported that decreased CI and CIII enzymatic activities can cause an accumulation of free electrons, which produce reactive oxygen species (Andreazza, 2012). Evidence of increased oxidative stress has also been reported in CFS patients (Castro-Marrero et al., 2013; Shungu et al., 2012), and it has been hypothesized that oxidative stress can play a role in the etiopathophysiology of CFS (Meeus et al., 2013; Shungu et al., 2012) and also of schizophrenia (Andreazza, 2012; Bitanirwe and Woo, 2011; Do et al., 2009; Prabakaran et al., 2004). Furthermore, even though the initial response to oxidative stress is an increase in mtDNA copy number, the prolonged accumulation of reactive oxygen species is thought to lead to mtDNA depletion (Malik and Czajka, 2013). Additionally, antipsychotic treatment has been proposed to enhance MRC CI deficiency and increase oxidative stress in schizophrenic patients, leading to the manifestation of extrapyramidal disorders, particularly for the classic neuroleptics (Casademont et al., 2007).

The oxidative activity of mitochondrial respiratory chain results correlated with those found in the enzymatic activity tests: the endogenous oxidative capacity and single CI-stimulated and CIII-stimulated oxidative activities were decreased compared to the controls. According to previous reports, these impairments could lead to a decrease in ATP production and may explain the increased blood lactate level observed during moderate exercise. Although stimulated oxidative capacity via polarography has not been reported in CFS, a low efficiency of oxidative phosphorylation via ATP production measurements in the PBMCs of CFS patients has been described (Myhill et al., 2009), and these results were later replicated and correlated with the severity of the illness (Booth et al., 2012). Furthermore, one study reported low CI-stimulated oxidative activity in lymphoblastoids from schizophrenic patients when compared to controls (Rosenfeld et al., 2011).

It is important to note that the CS enzymatic activities in the three patients were higher than those detected in the control subjects, indicating an increase in mitochondrial mass. However, these findings are not in accordance with those described in CFS because no differences have been found in PBMC CS activity when comparing CFS patients to control subjects (Castro-Marrero et al., 2013; Vermeulen et al., 2010). Additionally, no changes in CS activity have been reported in several brain regions in relation to schizophrenia (Bubber et al., 2011; Maurer et al., 2001), though this has not been studied in PBMCs. An increase in mitochondrial mass can be explained by overstimulated mitochondrial biogenesis, a process that is regulated by several conditions, for

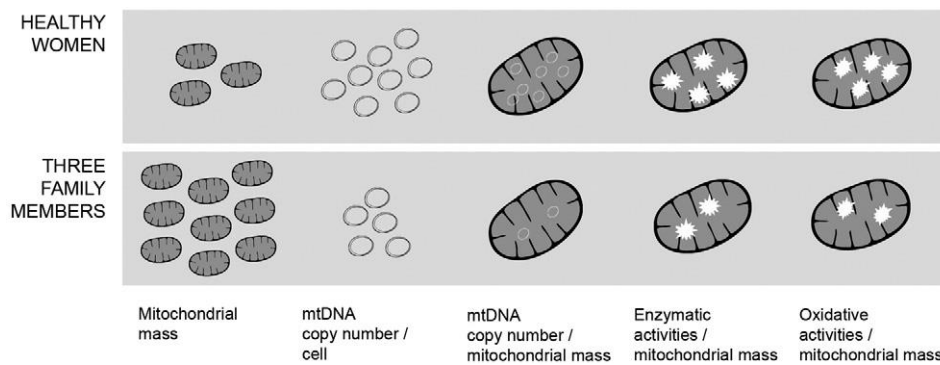


Fig. 4. Hypothetical scenario. Schematic representation of the main results obtained in the three family members and healthy women according to mitochondrial mass, mtDNA content and mitochondrial respiratory chain functioning.

example, energy demand, nutrient availability, exercise performance, hormone signaling, caloric restriction, and circadian rhythm (Ventura-Clapier et al., 2008). We hypothesized that, although the three patients showed high CS activity, they also showed a low mtDNA content and likely deficits in energy production that may activate mitochondrial biogenesis, as shown in Fig. 4. This clinical feature of increased mitochondrial biogenesis has been reported for primary mitochondrial diseases (Wu et al., 2014) as an up-regulatory homeostatic mechanism devoted to preserve mitochondrial function of tissues highly dependent on oxidative phosphorylation and ATP production as muscle tissue and central nervous system, the target tissue where SCF and psychosis are manifested. The mild phenotype of the three family members compared to subjects affected by primary mitochondrial diseases may be explained by increased ratios of mtDNA transcription, though this is merely speculative.

According to the overall results, the three family members presented blood biochemical features similar to those described in muscle in encephalomyopathic mitochondrial depletion syndrome. This syndrome is characterized by specific muscle alterations: increased blood lactate levels, decreased muscle mtDNA copy number, combined deficiency of respiratory complexes I, III, and IV, with normal complex II activity and increased number of mitochondria (El-Hattab and Scaglia, 2013). Although this syndrome appears in childhood, a mild form of adult mitochondrial depletion syndrome has been theorized and proposed to be considered in adults with severe tiredness, exercise intolerance, and a family history mitochondrial disorder (Finsterer et al., 2013), similar to the observations in the three family members of the present study.

It has been described that psychotic symptoms may be a feature of a mitochondrial disorder. Ms. Z exhibited the following features that should alert a psychiatrist to consider a mitochondrial disorder: 1) abnormal neurologic investigations, 2) past medical history of multiple medical problems affecting several organs, 3) significant family medical history, and 4) treatment resistance or worsening clinical status with psychotropic medications (Anglin et al., 2012).

We should mention some limitations of the study. First, regarding physical activity, lack of physical activity, or even exercise intolerance, is usual in both CFS and schizophrenia and may play a role in the dysfunctional mitochondrial phenotype present in the family members. Unfortunately, it is difficult to elucidate whether lifestyle is a consequence of the disease and therefore influencing the results of the study. Second, regarding pharmacological treatment, except for the proband, who was being treated with clozapine, the three family members were not under pharmacological treatment at the time of the study. However, the daily clozapine dose was 300 mg/day, and it has been described that patients with similar doses of clozapine do not present significant statistical differences in mitochondrial oxidative and enzymatic activities when compared to non-treated subjects (Casademont et al., 2007). Nevertheless, we cannot discard the

fact that any present or past effect of external agents may have caused mitochondrial toxicity.

1. Conclusions

We found that the three family members presenting CFS accompanied in one subject with psychotic symptoms, showed similar features: blood lactate levels that dramatically increased after 5 min of exercise, mitochondrial mass increased by $325\% \pm 100$, mtDNA depleted by $74\% \pm 2$, RNA expression reduced by $63\% \pm 1$, and MRC oxygen consumption capacities and enzymatic activities that were $66\% \pm 1$ and $62\% \pm 13$ lower, respectively, than expected. However, no nucleotide substitution, insertion, or deletion was identified in the mitochondrial genomes of these women neither in the nuclear genes *POLG*, *C10orf2*, *DGUOK*, *RRM2B*, *MPV17* and *TK2*, which may have explained the decreased mtDNA content and consequent mitochondrial dysfunction, even though C16179A and T16519A variants should be further studied. Therefore, other genes must be responsible for the mitochondrial DNA depletion and consequent mitochondrial dysfunction observed in this family. The observed mitochondrial dysfunction that may be associated with both illnesses or, at least, with the fatigue symptoms they all presented. Finally, we propose the suitability of the lactate stress test as a non-invasive, easy, and affordable procedure to identify mitochondrial impairment in patients presenting symptoms of chronic fatigue.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.mito.2016.10.007>.

Acknowledgments

The authors would like to thank the family members and control women who kindly participated in the study. We also acknowledge the technicians from the Biobanc-IISPV (www.iispv.cat) for sample management and Dr. Josep Ma Simó from the Laboratori de Referència de Catalunya (www.lrc.es) for his help in the lactate determination.

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Grants PS09/01052, PI12/01885 and PI12/02149.

References

- Adzhubei, I., Jordan, D.M., Sunyaev, S.R., 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.] Chapter 7, Unit7.20.
- Andreazza, A.C., 2012. Combining redox-proteomics and epigenomics to explain the involvement of oxidative stress in psychiatric disorders. *Mol. BioSyst.* 8, 2503.
- Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., Howell, N., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23, 147.
- Anglin, R.E., Tarnopolsky, M.A., Mazurek, M.F., Rosebush, P.I., 2012. The psychiatric presentation of mitochondrial disorders in adults. *J. Neuropsychiatr. Clin. Neurosci.* 24, 394–409.

- Ben-Shachar, D., 2002. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J. Neurochem.* 83, 1241–1251.
- Ben-Shachar, D., Zuk, R., Gazawi, H., Reshef, A., Sheinkman, A., Klein, E., 1999. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2, 245–253.
- Bitanirwirwe, B.K.Y., Woo, T.-U.W., 2011. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 878–893.
- Booth, N.E., Myhill, S., McLaren-Howard, J., 2012. Mitochondrial dysfunction and the pathophysiology of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *Int. J. Clin. Exp. Med.* 5, 208–220.
- Bubber, P., Hartounian, V., Gibson, G.E., Blass, J.P., 2011. Abnormalities in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the brains of schizophrenia patients. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, 254–260.
- Burbaeva, G.S., Boksha, I.S., Kaleda, V.G., Barkhatova, A.N., Turishcheva, M.S., Omel'chenko, M.A., Tereshkina, E.B., Savushkina, O.K., Starodubtseva, L.I., Prokhorova, T.A., Vorob'eva, E.A., 2011. Glutamine synthetase-like protein, glutamate dehydrogenase, and cytochrome c-oxidase in platelets of patients with the first episode psychosis in the course of treatment. *Zh. Nevropatol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova* 111, 61–66.
- Casademont, J., Garrabou, G., Miro, O., Lopez, S., Pons, A., Bernardo, M., Cardellach, F., 2007. Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* 27, 284–288.
- Castro-Marrero, J., Cordero, M.D., Sáez-Francas, N., Jimenez-Gutierrez, C., Aguilar-Montilla, F.J., Aliste, L., Alegre-Martín, J., 2013. Could mitochondrial dysfunction be a differentiating marker between chronic fatigue syndrome and fibromyalgia? *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1855–1860.
- Chretien, D., Rustin, P., Bourgeron, T., Rötig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clin. Chim. Acta* 228, 53–70.
- Craig, C.L., Marshall, A.L., Sjöström, M., Bauman, A.E., Booth, M.L., Ainsworth, B.E., Pratt, M., Ekelund, U., Yngve, A., Sallis, J.F., Oja, P., 2003. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 1381–1395.
- Do, K.Q., Cabungcal, J.H., Frank, A., Steullet, P., Cuenod, M., 2009. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 220–230.
- Dror, N., Klein, E., Karry, R., Sheinkman, A., Kirsh, Z., Mazor, M., Tzukerman, M., Ben-Shachar, D., 2002. State-dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7, 995–1001.
- El-Hattab, A.W., Scaglia, F., 2013. Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics* 10, 186–198.
- Finsterer, J., Shorny, S., Capek, J., Cerny-Zacharias, C., Pelzl, B., Messner, R., Bittner, R.E., Mamoli, B., 1998. Lactate stress test in the diagnosis of mitochondrial myopathy. *J. Neurol. Sci.* 159, 176–180.
- Finsterer, J., Kovacs, G., Ahting, U., 2013. Adult mitochondrial DNA depletion syndrome with mild manifestations. *Neurol. Int.* 5, 28–30.
- Fukuda, K., Straus, S.E., Hickie, I., Sharpe, M.C., Dobbins, J.G., Komaroff, A., 1994. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. *Ann. Intern. Med.* 121, 953–959.
- Garrabou, G., Sanjurjo, E., Miró, O., Martínez, E., Infante, A.B., López, S., Cardellach, F., Gatell, J.M., Casademont, J., 2006. Noninvasive diagnosis of mitochondrial dysfunction in HAAAT-related hyperlactatemia. *Clin. Infect. Dis.* 42, 584–585.
- Gunnarsdóttir, E.D., Nandinini, M.R., Li, M., Myles, S., Gil, D., Pakendorf, B., Stoneking, M., 2011. Larger mitochondrial DNA than Y-chromosome differences between matrilineal and patrilineal groups from Sumatra. *Nat. Commun.* 2, 228.
- Holgate, S.T., Komaroff, A.L., Mangan, D., Wessely, S., 2011. Chronic fatigue syndrome: understanding a complex illness. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 539–544.
- Johnston, S., Breen, E.W., Staines, D., Marshall-Gradinsnik, S., 2013. The prevalence of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a meta-analysis. *Clin. Epidemiol.* 5, 105–110.
- Kloss-Brandstätter, A., Pacher, D., Schönherr, S., Weissensteiner, H., Binna, R., Specht, G., Kronenberg, F., 2011. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum. Mutat.* 32, 25–32.
- Leucht, S., Burkard, T., Henderson, J., Maj, M., Sartorius, N., 2007. Physical illness and schizophrenia: a review of the literature. *Acta Psychiatr. Scand.* 116, 317–333.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Malik, A.N., Czajka, A., 2013. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* 13, 481–492.
- Massie, R., Wong, L.-J.C., Milone, M., 2010. Exercise intolerance due to cytochrome *b* mutation. *Muscle Nerve* 42, 136–140.
- Maurer, I., Zierz, S., Moller, H., 2001. Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 48, 125–136.
- McGrath, J., Saha, S., Chant, D., Welham, J., 2008. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol. Rev.* 30, 67–76.
- Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson, de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., Lombès, A., 2009. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9, 331–339.
- Meeus, M., Nijs, J., Hermans, L., Goubert, D., Calders, P., 2013. The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 1081–1089.
- Mousson, B., Collombet, J.M., Dumoulin, R., Carrier, H., Flocard, F., Bouzidi, M., Godinot, C., Maire, I., Mathieu, M., Quard, S., 1995. An abnormal exercise test response revealing a respiratory chain complex III deficiency. *Acta Neurol. Scand.* 91, 488–493.
- Myhill, S., Booth, N.E., McLaren-Howard, J., 2009. Chronic fatigue syndrome and mitochondrial dysfunction. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2, 1–16.
- Myhill, S., Booth, N.E., McLaren-Howard, J., 2013. Targeting mitochondrial dysfunction in the treatment of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) – a clinical audit. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 6, 1–15.
- Navarro-Sastre, A., Tort, F., Garcia-Villoria, J., Pons, M.R., Nascimento, A., Colomer, J., Campistol, J., Yoldi, M.E., López-Gallardo, E., Montoya, J., Unceta, M., Martínez, M.J., Briones, P., Ribes, A., 2012. Mitochondrial DNA depletion syndrome: new descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients. *Mol. Genet. Metab.* 107, 409–415.
- Ostermann, S., Herbsleb, M., Schulz, S., Donath, L., Berger, S., Eisenträger, D., Siebert, T., Müller, H.-J., Puta, C., Voss, A., Gabriel, H.W., Koch, K., Bar, K.-J., 2012. Exercise reveals the interrelation of physical fitness, inflammatory response, psychopathology, and autonomic function in patients with schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 39, 1139–1149.
- Prabakaran, S., Swatton, J.E., Ryan, M.M., Huffaker, S.J., Huang, J.T., Griffin, J.L., Wayland, M., Freeman, T., Dudbridge, F., Lilley, K.S., Karp, N.A., Hester, S., Tkachev, D., Mimmack, M.L., Yolken, R.H., Webster, M.J., Torrey, E.F., Bahn, S., 2004. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol. Psychiatry* 9 (643), 684–697.
- Regenold, W.T., Phatak, P., Marano, C.M., Sasso, A., Conley, R.R., Kling, M.A., 2009. Elevated cerebrospinal fluid lactate concentrations in patients with bipolar disorder and schizophrenia: implications for the mitochondrial dysfunction hypothesis. *Biol. Psychiatry* 65, 489–494.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26.
- Rosenfeld, M., Brenner-Lavie, H., Ari, S.G.-B., Kavushansky, A., Ben-Shachar, D., 2011. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 69, 980–988.
- Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., Wallace, D.C., 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 35, D823–D828.
- Sabuncian, S., Kirches, E., Krause, G., Bogerts, B., Mawrin, C., Llenos, I.C., Weis, S., 2007. Quantification of total mitochondrial DNA and mitochondrial common deletion in the frontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *J. Neural Transm.* 114, 665–674 (Vienna).
- Sequeira, A., Martin, M.V., Rollins, B., Moon, E.A., Bunney, W.E., Macciardi, F., Lupoli, S., Smith, E.N., Kelsoe, J., Mangan, C.N., van Oven, M., Baldi, P., Wallace, D.C., Vawter, M.P., 2012. Mitochondrial mutations and polymorphisms in psychiatric disorders. *Front. Genet.* 3, 103.
- Shungu, D.C., Weiduschat, N., Murrough, J.W., Mao, X., Pillemer, S., Dyke, J.P., Medow, M.S., Natelson, B.H., Stewart, J.M., Mathew, S.J., 2012. Increased ventricular lactate in chronic fatigue syndrome. III. Relationships to cortical glutathione and clinical symptoms implicate oxidative stress in disorder pathophysiology. *NMR Biomed.* 25, 1073–1087.
- Smits, B., van den Heuvel, L., Knoop, H., Küsters, B., Janssen, A., Borm, G., Bleijenberg, G., Rodenburg, R., van Engelen, B., 2011. Mitochondrial enzymes discriminate between mitochondrial disorders and chronic fatigue syndrome. *Mitochondrion* 11, 735–738.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., Mesirov, J.P., 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* 14, 178–192.
- Toker, L., Agam, G., 2015. Mitochondrial dysfunction in psychiatric morbidity: current evidence and therapeutic prospects. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 2441–2447.
- Torrell, H., Montaña, E., Abasolo, N., Roig, B., Gaviria, A.M., Vilella, E., Martorell, L., 2013. Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 162B, 213–223.
- van Os, J., Kenis, G., Rutten, B.P.F., 2010. The environment and schizophrenia. *Nature* 468, 203–212.
- van Oven, M., Kayser, M., 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.* 30, E386–E394.
- Vazquez-Barquero, J.L., Gaité, L., Artal Simon, J., Arenal, A., Herrera Castanedo, S., Diez Manrique, J.F., Cuesta Nunez, M.J., Higuera, A., 1994. Development and verification of the Spanish version of the “scanning system” psychiatric interview (“Questionnaires for clinical evaluation in neuropsychiatry”). *Actas Luso Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines* 22, 109–120.
- Vecchiet, L., Montanari, G., Pizzigallo, E., Iezzi, S., de Bigontina, P., Dragani, L., Vecchiet, J., Giamberardino, M.A., 1996. Sensory characterization of somatic parietal tissues in humans with chronic fatigue syndrome. *Neurosci. Lett.* 208, 117–120.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc. Res.* 79, 208–217.
- Verge, B., Alonso, Y., Valero, J., Miralles, C., Vilella, E., Martorell, L., 2011. Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur. Psychiatry* 26, 45–56.
- Vermeulen, R.C.W., Kurk, R.M., Visser, F.C., Sluiter, W., Scholte, H.R., 2010. Patients with chronic fatigue syndrome performed worse than controls in a controlled repeated exercise study despite a normal oxidative phosphorylation capacity. *J. Transl. Med.* 8, 93.
- Wu, Y.-T., Wu, S.-B., Wei, Y.-H., 2014. Metabolic reprogramming of human cells in response to oxidative stress: implications in the pathophysiology and therapy of mitochondrial diseases. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5510–5526.
- Zhang, C., Baumer, A., Mackay, I.R., Linnane, A.W., Nagley, P., 1995. Unusual pattern of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of an adult human with chronic fatigue syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 4, 751–754.

MATERIAL SUPLEMENTARI PUBLICACIÓ 4:

- Supplementary text 1:

Information regarding the family

Ms. Z's father is 57 years old and has no relationship with his ex-wife and daughters. However, Ms. Z's mother stated that he suffered from alcohol dependence, with uncontrolled impulses and certain personality traits of aggressiveness, which had not been treated by any specialist prior to their divorce. No other somatic or psychiatric information was available for him or other paternal relatives. Ms. Z's maternal grandmother is 87 years old and has also been affected by several somatic processes, including hepatitis, irritable colon syndrome, Sjögren syndrome, carotid aneurysm, and tendon and articular pathology that could be related to CFS. Last year, she developed dementia of unknown etiology, with a rapid functional decline. Finally, Ms. Z's maternal uncles and aunts (a total of 13) have different degrees of tendinitis, hypothyroidism, intestinal disorders, memory disturbances and fatigue, though they have not been diagnosed with any specific disease, with the exception of a maternal aunt who has been reported to suffer from an unspecified psychotic disorder.

- Supplementary text 2:

Information regarding the mtDNA variants present in the three family members:

Variant	Locus	Codon	Amino acid change	Frequency in GenBank	PolyPhen-2 score
G8865A	MT-ATP6	113	Val-Val	110/30179	-
T9128C	MT-ATP6	201	Ile-Thr	59/30181	0 (benign)
C14004T	MT-ND5	556	Thr-Thr	7/30182	-
C16179A	MT-HV1	-	-	5/30170	-
T16519A	Control region	-	-	3/30096	-

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

VII. DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

VII. DISCUSSIO

La implicació mitocondrial en la etiopatogènia dels TN estudiats, ESQ, TEA i DI, ha estat àmpliament proposada i també s'ha recollit evidència de la implicació d'aquest orgànul en altres trastorns psiquiàtrics com TDAH o TB, entre d'altres^{65,66,116,163}. Tot i així, hi ha escassos estudis que demostrin la seva implicació directa en la clínica d'aquests i, en alguns casos, els diversos resultats publicats són difícils de comparar entre ells a causa de les diferències metodològiques o de les diferències en la mostra recollida o el teixit estudiat. Els estudis que formen part d'aquest treball han tingut per objectiu aportar més dades del paper del mitocondri en els TN estudiats.

El mitocondri té un rol central en diversos processos i activitats rellevants relacionades amb la condició humana com, per exemple, l'envelliment^{100,176} o l'exercici físic^{177,178} i també en processos patològics com poden ser el càncer, les malalties cardiovasculars, l'obesitat, la diabetis, la infertilitat i en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i el Parkinson, entre d'altres¹⁷⁹⁻¹⁸⁵.

Degut a la manca de conclusions que expliquin de manera holística l'etiologia de moltes malalties i, més concretament, dels trastorns mentals, en els últims anys també s'ha posat el focus en la importància no només de les estructures anatòmiques sinó del funcionament cel·lular i, especialment, en el del metabolisme energètic i per tant, en el mitocondri⁶⁶. A més, el cervell és un dels teixits del cos humà amb un nombre més elevat de mitocondris que, entre molts d'altres, generen radicals lliures i ROS; metabòlits propis de les reaccions mitocondrials que són claus per explicar alguns processos vitals tant fisiològics com patològics¹⁸⁶. Degut als seus requeriments energètics, el mitocondri és el primer orgànul que notarà les conseqüències en cas d'una possible disfunció del mateix, veient limitat l'abastiment energètic fisiològic que podria traduir-se clínicament amb simptomatologia neurològica i/o psiquiàtrica. Concretament en aquest àmbit de la neuropsiquiatria, s'ha demostrat que l'alteració de la funció mitocondrial pot afectar a processos cel·lulars clau, alterant també el funcionament sinàptic i contribuint als canvis atròfics que porten al deteriorament cognitiu habitual en l'evolució d'algunes malalties psiquiàtriques¹⁰⁷. Així doncs, la capacitat de modular la funció mitocondrial podria tenir un paper important, no només en la regulació de les sinapsis, sinó també en la resistència cel·lular dels circuits neuronals que intervenen en la regulació de funcions cerebrals complexes d'ordre superior com, per exemple, la cognició, però també processos relacionats amb aquesta com l'afecte, la percepció i el comportament. És per tot això, que els mecanismes bioenergètics, l'ADNmt i la interacció d'aquest amb l'ADNn estan esdevenint factors crucials per a entendre l'etiopatogènia i, per extensió, alguns símptomes comuns a molts dels trastorns neuropsiquiàtrics coneguts.

Tot i poder afirmar que l'etiopatogènia dels trastorns psiquiàtrics és multifactorial i poligènica i

que els factors implicats actuen de manera sumatòria, el que sabem fins ara és incomplet i imprecís¹⁸⁷. S'ha demostrat que molts trastorns psiquiàtrics comparteixen el mateix substrat biològic alhora que comparteixen diverses variants genètiques de risc; això evidència que els seus límits diagnòstics categorials actuals no reflecteixen diferents processos patològics subjacents, almenys a nivell genètic. Aquesta naturalesa profundament interconnectada de molts trastorns psiquiàtrics posa de manifest la necessitat de replantejar-nos límits diagnòstics, així com de seguir redefinint la taxonomia psiquiàtrica¹⁸⁸. Per exemple, variants de risc es superposen en ESQ, TDM, TDAH i en TB, cosa que reforça la possible naturalesa espectral d'aquests trastorns i contrasta amb la clara diferenciació categorial de l'actualitat. Aquest mateix patró es repeteix en altres trastorns psiquiàtrics, com TEA i DI, entre d'altres. Aquest nou enfoc espectral en la psiquiatria, tant el bioenergètic com el genètic, portaria no només a reduir l'heterogeneïtat diagnòstica, sinó també a optimitzar el diagnòstic i el tractament dels trastorns psiquiàtrics¹⁸⁸.

❖ Condicions Clíiques Associades a Malalties Mitocondrials (CCAMMs)

En general, les persones amb un diagnòstic de trastorn mental presenten pitjor salut física i major mortalitat que les que no estan afectades per aquests trastorns, especialment aquelles que pateixen trastorns mentals severos com el TEA o l'ESQ^{189,190}. Els nostres resultats van en la mateixa línia i assenyalen que les persones amb TEA, DI i ESQ presenten pitjor salut donat que presenten un augment de signes, símptomes i quadres clínics típics de les malalties mitocondrials.

En persones amb DI s'han recollit, coincidint amb les nostres dades, un major nombre de característiques comòrbides, entre les que destaquen les alteracions visuals, dentals i auditives, així com un major nombre de malalties psiquiàtriques^{41,191}. Cal destacar però, que el nombre d'estudis en aquesta població és molt menor si el comparem amb la literatura publicada de comorbiditats amb TEA. Tot i així, els percentatges de condicions comòrbides tant de DI com de TEA són molt variables en funció de la metodologia emprada en cada estudi i de la població seleccionada i sovint es fa difícil de comparar-les. També són escassos els estudis que han avaluat la presència de CCAMMs en ESQ. No obstant, hi ha alguns treballs que demostren una pitjor condició física i de salut general en aquest trastorn¹⁹². De fet, una dada rellevant, és que els pacients amb ESQ presenten una mortalitat prematura d'uns 15-20 anys abans respecte la població general^{193,194}. En la literatura també es recull una major prevalença d'algunes CCAMMs: epilèpsia¹⁹⁵, simptomatologia GI¹⁹⁶, factors de risc metabòlic i cardiovascular¹⁹⁷, hipertensió i

cardiopatia isquèmica¹⁹⁸, així com també altres malalties neurològiques, metabòliques, infeccioses i trastorns per abús de substàncies¹⁹⁹. En línia amb aquests treballs, el nostre estudi també va identificar que les persones amb ESQ presentaven amb major freqüència algunes CCAMMs respecte a les persones control. Concretament, van ser més freqüents restrenyiment, fatiga severa, convulsions i diabetis. En el nostre treball amb DI i TEA, i en la mateixa línia que la literatura revisada, vam identificar restrenyiment, edema, convulsions, alteracions de la visió, estrabisme i incontinència d'esfínters com a condicions comòrbides més freqüents presents en persones amb DI i DI i TEA respecte a població control. El restrenyiment, les convulsions i la incontinència d'esfínters van ser més freqüents en persones diagnosticades de DI amb TEA que en subjectes amb DI sense TEA; mentre que la presència d'edema en extremitats i les alteracions de la visió eren més freqüents en subjectes amb DI sense TEA que en subjectes amb DI amb TEA. Cal destacar que les persones amb DI sense TEA del nostre treball presentaven 12 anys més de mitjana respecte a les del grup de TEA+DI, podent explicar així algunes de les diferències que es van posar de manifest entre aquests dos grups. També cal destacar que la DI va ser més severa en pacients amb TEA que en aquells que només presentaven DI i que van presentar xifres majors de restrenyiment, convulsions i incontinència d'esfínters a major severitat de la DI, també d'acord amb la literatura. Les persones amb TEA, amb o sense DI comòrbida, també presenten major risc de morbiditat múltiple, tant en termes de salut física com mental²⁰⁰. Estudis recents no només recolzen aquest fet, sinó que, a més, indiquen que la major morbiditat en TEA va augmentant amb l'edat²⁰¹. La nostra mostra és de població adulta i això podria explicar, entre altres factors, les xifres més elevades de simptomatologia comòrbida. Hi ha nombrosos treballs que recullen diverses comorbiditats en TEA, com trastorns de la son, epilèpsia, disfunció GI, trastorns motors, alteracions en el metabolisme i comorbiditats psiquiàtriques^{202,203}. Les persones amb TEA també presenten alteracions immunològiques²⁰². Si bé la majoria de dades recollides al respecte són de població infantil, s'entén que aquestes alteracions persistiran fins a l'edat adulta, i així ho demostren els escassos treballs en aquest sentit que apareixen en la literatura²⁰³⁻²⁰⁵. Existeixen algunes dades en cohorts d'adults amb TEA que apunten a una major freqüència de condicions mèdiques associades, major número d'hospitalitzacions al llarg de la vida, així com més intervencions quirúrgiques. Aquestes xifres són majors en dones i en persones amb obesitat²⁰⁶. S'ha identificat, també, en població adulta amb TEA una major prevalença de malalties i de factors de risc cardiovascular (sobrepès o obesitat, diabetis i hiperlipidèmia); així com alteracions motores, hipotiroïdisme, trastorns neurològics, malalties immunològiques, alteracions de la son, GI i trastorns psiquiàtrics²⁰¹.

Les **convulsions** són el símptoma neurològic més freqüent en les malalties mitocondrials i s'està

aprofundint en identificar mecanismes etiològics comuns en ambdues patologies²⁰⁷. La literatura estableix que la presència d'epilèpsia en TEA és d'entre un 22% i un 38%^{206,208} comparat amb un 2'2% en població general hospitalitzada²⁰⁹. S'han identificat com a factors de risc d'epilèpsia en TEA: tenir 13 anys o més, tenir un CI baix, unes habilitats de llenguatge escasses, història de regressió en el desenvolupament i símptomes de TEA sever²¹⁰, alguns d'ells ja assenyalats en la nostra població. S'ha suggerit que aquesta associació podria explicar-se per un o diversos factors causals comuns, és a dir, que l'epilèpsia i el TEA estiguin causats per alteracions compartides a nivell cerebral²¹⁰. S'han detectat alteracions genètiques comunes en TEA i epilèpsia, per exemple, duplicacions del locus 15q11-13 o la CNV 15q13²¹¹. També s'han identificat altres CNVs en gens relacionats prèviament amb epilèpsia en persones amb TEA²¹²⁻²¹⁴. La prevalència de convulsions en els pacients del nostre estudi són un 63'9% en TEA+DI i un 42'6% en DI sense TEA; més altes que la descrita en altres estudis que és d'un 35'9% en TEA+DI i 16'5% en TEA sense DI²⁰¹; però cal tenir en compte que la nostra mostra, a diferència de les descrites, està formada per població adulta i amb una DI severa o profunda. Les convulsions també eren presents en un 3'7% dels pacients amb ESQ de la nostra mostra. Alguns estudis apunten que les persones amb ESQ tenen de dues a tres vegades més risc de patir epilèpsia²¹⁵, mentre que la presència de símptomes psicòtics en persones que pateixen epilèpsia és d'entre un 2 i un 7%¹⁹⁵. Aquestes xifres coincideixen amb les identificades en la nostra mostra.

En relació als **trastorns GI**, l'estudi de Jones²⁰⁶ recull que un 59% dels pacients amb TEA pateixen algun trastorn GI. Són freqüents el restrenyiment, així com colitis i duodenitis, que podrien estar relacionades amb una alteració de l'epiteli intestinal que s'ha observat en pacients amb TEA²¹⁶. L'estudi de Kang, amb una cohort de 164 nens amb TEA, reporta un 49% dels participants amb una o més molèsties GI cròniques, un 22% amb diarrea i un 26% amb restrenyiment, un 13% amb inflor abdominal i/o gasos i un 10% amb vòmits o problemes de reflux GI. És important destacar que la disfunció GI es va associar de manera significativa amb trastorns de la son i amb intoleràncies alimentàries en infants amb TEA²¹⁷. El restrenyiment és el símptoma GI que més freqüent en el nostre estudi essent d'un 73'8% en TEA+DI i un 57'4% en DI sense TEA. Altres estudis recullen xifres més baixes d'un 26'6% en TEA+DI i d'un 7'6% en TEA sense DI²⁰¹. Aquestes xifres podrien ser més elevades en el nostre estudi no només per l'edat i característiques de la mostra, sinó també pel fet que es tracta de persones institucionalitzades i, en alguns casos, amb limitacions de l'activitat física. El restrenyiment també és una manifestació GI freqüent amb persones amb ESQ i s'ha relacionat amb la dismotilitat GI deguda a alteracions en la cadena respiratòria mitocondrial²¹⁸, tot i que hi hauria altres factors que podrien contribuir-hi, per exemple, la medicació antipsicòtica²¹⁹. Tot i així, la prevalença i els mecanismes que expliquen

aquesta relació no estan clars encara²²⁰. Algunes dades de restrenyiment en persones amb ESQ indiquen que aquesta és present en un del 31%¹⁹⁶, un valor superior al del nostre estudi que és del 25% però igualment major que en població control.

Pel que fa a la **fatiga severa** vam identificar que era present en un 11% dels pacients amb ESQ; un percentatge superior al de la població control i, sobretot, en el grup de sexe femení (un 18% en dones i un 6% en homes). Tot i així, el percentatge va ser menor que en un estudi previ que es va fixar en el 60%²²¹. Un estudi anterior del nostre grup de recerca, que suggereix una herència mitocondrial de l'ESQ, va reportar fatiga severa en un 7% de les mares i en un 1% dels pares de persones amb ESQ²²². En els pacient amb DI i en els de TEA i DI de la nostra mostra, la fatiga no va poder ser valorada degut a les dificultats comunicatives dels pacients, així com a l'existència de menys signes objectius que puguin ser identificats per les persones que en tenen cura.

També hi ha treballs que han estudiat alguns factors que formen part dels ítems que inclou la **síndrome metabòlica**. Les xifres d'obesitat en TEA es troben lleugerament per sobre de la població general^{223,224} i això podria tenir a veure, entre altres factors, amb el menor exercici físic que es pressuposa que duen a terme nens i adolescents amb TEA. Contràriament, altres estudis recullen valors de pes en població TEA significativament per sota de la població general²²³. En el nostre estudi les persones amb DI tenien un IMC significativament per sobre de l'IMC de les persones control mentre que el grup de persones amb TEA+DI tenien un IMC lleugerament superior respecte als controls. Aquest resultats podrien explicar-se per una menor realització d'exercici, així com uns pitjors hàbits d'alimentació, però de nou, els resultats tornen a ser de difícil comparació per les característiques de la nostra mostra. Les nostres dades també van mostrar una major freqüència d'HTA i diabetis mellitus (DM), especialment en el grup de DI sense TEA, però no arribant a ser valors estadísticament significatius. Curiosament, a l'agrupar tots els trastorns endocrinològics (DM i tiroïdals, bàsicament) el grup amb DI tenia valors per sobre del grup control i del grup de TEA, presentant aquest últim valors inferiors als grup control. La literatura ens diu que la DM és la més freqüent en les malalties mitocondrials²²⁵ i trobem que és de 2 a 3 vegades més freqüent en persones amb ESQ que en població general²²⁵. En el nostre estudi, les persones amb ESQ presenten DM2 en un 7'3% dels casos en comparació amb la població control que és d'un 1'9%. També vam observar un IMC més alt en les persones amb ESQ, que pot estar relacionat amb altres factors com hàbits de dieta menys saludables, un estil de vida sedentari, un pitjor estat socioeconòmic, així com amb l'ús de medicació antipsicòtica; que afectaria directament la sensibilitat a la insulina causant indirectament un augment de pes²²⁶. És important destacar que vam estudiar la possible associació de la medicació amb aquests resultats, sense poder identificar diferències estadísticament significatives en la

presència de diabetis entre els pacients que prenen medicació i els que no en prenen, tampoc vam detectar diferències en funció de la dosi. Aquests resultats estarien en línia amb alguns estudis en pacients amb simptomatologia psicòtica no tractada amb fàrmacs en els quals s'ha observat una major prevalença de síndrome metabòlic²²⁷. Hem d'afegir a aquestes troballes que la hipertensió i la hipercolesterolèmia, que podrien dependre també de l'ús de medicació, no van ser més freqüents en pacients amb ESQ que en població general. Així, tot i que no podem descartar la influència de la medicació en els resultats del nostre estudi, la major prevalença de restrenyiment, fatiga severa, convulsions i diabetis en els pacients amb ESQ no es pot associar únicament al tractament farmacològic.

Respecte a les **alteracions relacionades amb el son** en TEA la prevalença difereix segons l'estudi. En alguns, es troba al voltant del 80% d'infants amb TEA²²⁸⁻²³¹ i al voltant del 41%²⁰⁶ o del 20%²³² en altres. Tot i així, en tots els treballs publicats fins a la data mostren xifres superiors que en població general. Sembla ser que les alteracions relacionades amb el son són directament proporcionals a la severitat dels símptomes de TEA^{233,234} i això posa de manifest que la severitat és el predictor més potent de problemes en el son; així doncs, menys hores de son per nit, parasomnies i/o trastorns de respiració durant la son prediuen una major severitat de TEA^{234,235}. En el nostre treball no vam recollir l'insomni i les alteracions de la son en les dades inicials, però és rellevant destacar que més d'un terç dels pacients de l'estudi precisaven d'una medicació considerada hipnòtica cosa que reforçaria els resultats d'altres treballs.

Altres CCAMMs presents en persones amb TEA i DI són les **alteracions en els òrgans dels sentits**. En el nostre estudi, el grup de pacients amb TEA+DI presentaven un major percentatge d'alteracions en la visió (18%) i estrabisme (10'7%) respecte als controls (5'4% i 1'8%), però xifres menors respecte el grup de DI sense TEA (33'9% i 13%, respectivament). En un estudi de tota la població adulta amb TEA a Escòcia²³⁶, amb un 29'4% amb DI, mostra que en un 14'1% presentaven sordesa o pèrdua d'oïda i un 12'1% ceguesa o pèrdua de visió, xifres superiors a població control i similars a les del nostre estudi. Ambdues comorbiditats eren superiors en el grup de dones que en el d'homes amb TEA. Aquesta diferència entre sexes no és una dada aïllada. Moltes de les condicions comòrbides són més freqüentment diagnosticades en dones que en homes; però en tots dos sexes tenen un risc més elevat que la població general²³². Curiosament en l'estudi amb pacients amb ESQ l'estrabisme i les alteracions auditives van ser més freqüents en els controls, sense significació estadística.

Les alteracions socials i de comunicació inherents a alguns TN poden disminuir l'accés a l'assistència sanitària o dificultar el diagnòstic i/o la prevenció per la dificultat que presenten alguns pacients d'identificar com explicar els símptomes que pateixen. L'aïllament i la falta

d'espais adaptats pot ser una barrera a l'hora de fer activitat física i l'extremada sensibilitat d'algunes persones amb TEA a la textura, temperatura, color i/o olor dels aliments pot condicionar el tipus de dieta. Hi ha estudis que revelen que els nens que pateixen TN no realitzen nivells adequats d'activitat física de forma diària²³⁷. També cal tenir en compte l'ús de medicacions psiquiàtriques que poden contribuir a la síndrome metabòlica i a altres efectes secundaris, a més de l'envelliment accelerat per una vulnerabilitat biològica pròpia d'aquests trastorns, com s'ha demostrat en la síndrome de Down o en la de l'X fràgil²³⁸. En la nostra mostra de TEA i DI no només són persones de mitjana edat, sinó que són persones institucionalitzades i la majoria sota tractament farmacològic, de gravetat clínica severa i amb alteracions a nivell del sistema locomotor.

En el cas de TEA i DI, la majoria d'estudis es duen a terme en població infantil; la nostra mostra està formada per pacients adults, cosa que, tot i aportar informació en un camp de la investigació no molt desenvolupat fins ara, també fa que els resultats siguin difícilment comparables. Considerem necessaris la realització de més estudis en població adulta, així com augmentar la mostra de l'estudi present, per tal de reforçar els resultats obtinguts. A més, la nostra mostra està formada per pacients de llarga evolució de les tres patologies que estudiem, ESQ, TEA i DI. En el cas de la DI s'hi afegeix que els pacients la presenten en grau sever i profund. El perfil clínic i la gravetat dels trastorns que estudiem fa necessari tenir en compte que la funció mitocondrial pot estar influïda pel fet que han usat medicació diversa i a diferents dosis durant molt temps. Tot i així, la influència de la medicació psicotròpa en la funció mitocondrial està estudiada majoritàriament en models animals i els resultats són inconcloents.²³⁹⁻²⁴¹

En resum, hem identificat una major freqüència de CCAMMs en alguns TN com TEA, DI i ESQ. Resulta, doncs, imprescindible que en el moment que hi ha la sospita o es diagnostica un d'aquests trastorns es valori la simptomatologia física acompanyant amb una exhaustiva anamnesi i exploració física, així com també es descartin de manera proactiva diagnòstics psiquiàtrics comòrbids. La major freqüència de CCAMMs en els TN estudiats recolza la idea que la disfunció mitocondrial podria ser un mecanisme etiològic subjacent en aquestes malalties. Per això és important tenir en compte la identificació de CCAMMs en les malalties psiquiàtriques i viceversa ja que podria significar, no només entendre millor les dues entitats clíniques, sinó també arribar abans a un diagnòstic molecular en alguns casos.¹¹⁷ A més, en un futur podria plantejar noves dianes terapèutiques^{242,243}, encara que es requereixen molts més estudis en aquesta direcció per a confirmar-ho. Podem afirmar, doncs, que els pacients amb TEA, DI i ESQ del nostre estudi mostren un gran ventall de simptomatologia comòrbida. Aquesta es superposa, en gran mesura, amb les CCAMMs i recolza la hipòtesi que, aquests TN, podrien compartir vies

etiològiques comunes relatives al metabolisme mitocondrial.

❖ Contingut d'ADNmt

En les últimes dècades s'han identificat variacions en el contingut d'ADNmt en diferents condicions humanes, tant fisiològiques com patològiques, i es vol demostrar la seva rellevància en la salut, mental i física, de les persones. En el nostre estudi, els pacients van mostrar menor contingut d'ADNmt que els control.

En un estudi realitzat en població general s'ha comprovat que en sang perifèrica el contingut d'ADNmt pateix variacions segons el sexe i l'edat²⁴⁴. En quant a l'edat, el contingut d'ADNmt va augmentant lleugerament fins a la cinquena dècada de la vida i, a partir d'aquí, va disminuint de manera progressiva. El contingut d'ADNmt en sang perifèrica s'ha associat amb el sexe i l'edat i està influït per diverses variables com el recompte de cèl·lules de la sèrie blanca, el ràtio plaquetes/leucòcits, amb la presa d'estrògens i progesterona^{244,245} així com amb metabòlits circulants relacionats amb el metabolisme lipídic i marcadors inflamatoris²⁴⁶. És per això, entre d'altres, que el contingut d'ADNmt està començant a ser considerat com a potencial biomarcador associat a l'estrès oxidatiu i la inflamació²⁴⁶. S'ha investigat també com a possible biomarcador d'infertilitat tant masculina com femenina, així com a possible predictor de viabilitat de l'embrió, cal dir, però, que amb resultats contradictoris^{247,248,249}. El contingut d'ADNmt també s'ha associat a la lactància materna, de manera que a més durada del període d'alletament, més contingut d'ADNmt²⁵⁰. Per tant, el contingut d'ADNmt podria ser també, un biomarcador de salut global en les persones. Concordant, doncs, amb els resultats obtinguts en el nostre treball ja que els pacients presenten una pitjor salut global i valors més baixos en el contingut d'ADNmt.

En l'àmbit de les malalties neuropsiquiàtriques també s'han reportat alteracions en el número de còpies de l'ADNmt. En persones amb TB, la majoria d'estudis assenyalen un menor contingut d'ADNmt en sang^{251,252}, tot i que n'hi ha que recullen un major contingut²⁵³ o no troben diferències²⁵⁴. Aquestes diferències es poden atribuir a múltiples variables com ara les característiques clíniques acompanyants, tant psicopatològiques com físiques, l'ètnia i/o haplogrup, la medicació, etc. Fins i tot, aquestes diferències s'han posat de manifest en diferents fases del mateix trastorn^{255,256}. En un treball amb persones que van morir per suïcidi es va recollir un major nombre de còpies d'ADNmt en sang, essent encara més elevat en homes i ancians²⁵⁷. Contràriament, el contingut d'ADNmt en cervell va ser menor respecte a controls. Podem pensar que el teixit sanguini podria estar afavorint l'augment del número de còpies com a maniobra compensatòria per revertir l'estat de patologia. En el cervell, essent un teixit estable i amb molt menys recanvi que el sanguini, aquest reajustament arribaria molt més tard, en el cas que es

donés. En el nostre estudi només s'ha estudiat en contingut d'ADN mitocondrial en sang.

En el mateix sentit, es va recollir un major contingut d'ADNmt en sang perifèrica en dos estudis amb pacients amb TDM^{258,259} i en persones amb episodis estressants en la infància, psicopatologia diversa i abús de substàncies²⁶⁰. Això podria significar un mecanisme compensatori realitzat pel mitocondri per tal de donar resposta a les situacions estressants i així poder contribuir a revertir-les. En la mateixa direcció que un altre dut a terme amb una població ambulatoria en pacients amb diagnòstics de depressió i ansietat²⁶¹. En models animals com els ratolins, s'ha observat que l'estrès augmenta el número de còpies d'ADNmt i els valors es poden recuperar si desapareix l'estímul estressant²⁵⁸, fet que fa pensar que el número de còpies d'ADNmt podria ser un marcador de recuperació i/o de pronòstic.

Tots aquests resultats, per tant, suggereixen que el número de còpies d'ADNmt presenta una elevada variabilitat i pot ser molt sensible tant a factors de l'entorn com a factors intrínsecs de l'individu, així com, almenys parcialment, revertible. Aquestes diferències en la variabilitat del contingut d'ADNmt poden ser explicades, entre molts d'altres factors, perquè el número de còpies d'ADNmt depèn també de l'etapa evolutiva de la malaltia i, possiblement, del tractament utilitzat, a més de la possible variabilitat en la tècnica emprada per a mesurar-lo. Una altra explicació que es planteja d'aquestes dades és que els esdeveniments vitals estressants afectin al número de còpies d'ADNmt i això augmenta el risc de patir simptomatologia depressiva. Aquest augment del número de còpies en l'ADNmt podria tenir com a objectiu afavorir i reforçar els processos bioenergètics mitocondrials per ajudar a superar l'estat de malaltia, per després, un cop superat l'estat patològic, tornar-se a normalitzar; tenint en compte però, que aquesta normalització de les xifres de l'ADNmt en sang podria ser lenta i diferent en cada teixit. No podem comparar aquests resultats amb el nostre estudi ja que no vam realitzar un seguiment longitudinal de cap dels pacients de la nostra mostra.

El nostre estudi va reportar un menor contingut d'ADNmt en persones amb TEA+DI respecte a controls. Altres treballs, duts a terme en cèl·lules sanguínies perifèriques de nens amb TEA, van mostrar un major número de còpies d'ADNmt que en nens sans²⁶² i que els seus germans neurotípics²⁶³. Aquests resultats són contraris a les troballes del nostre estudi, però cal tenir en compte que aquests estudis van ser realitzats en nens, mentre que la nostra mostra està formada per persones adultes i amb DI severa o profunda, pel que no són comparables. També cal destacar que en una mostra de nens amb paràlisi cerebral es va detectar un menor número de còpies d'ADNmt²⁶⁴. Com a hipòtesi, podríem pensar que en edat infantil augmenta el número de còpies per tal d'intentar compensar les alteracions bioenergètiques i/o l'estat de malaltia; i que, potser en l'edat adulta, es podria revertir per l'esgotament de la maniobra compensatòria per

diversos motius; per exemple, la gravetat del trastorn (les persones del nostre estudi són persones d'elevada gravetat de DI), l'aparició d'algun trastorn comòrbid (TEA i DI) o d'altres. Xifres encara menors es van recollir en la mostra de DI sense TEA i aquests sí que van ser concordants amb l'escassa literatura que existeix pel que fa a número de còpies d'ADNmt en DI. Trobem dos treballs que també mostren un menor contingut d'ADNmt en DI. Un en sang i cervell d'adults afectats de la Síndrome de l'X fràgil²⁶⁵ i l'altre en cervell d'adults amb diagnòstic de Síndrome de Down i demència tipus Alzheimer²⁶⁶, a més, les xifres anaven disminuint amb l'edat. El nostre estudi va comparar el contingut d'ADNmt després de corregir-lo per diverses covariables, com edat, IMC i número de cigarrets, que s'hi correlacionaven i, tot i així, vam reportar un menor contingut d'ADNmt en persones amb TEA i DI respecte a persones controls; també en les persones amb DI sense TEA. Aquest menor número de còpies d'ADNmt en TEA i DI suggereix una disfunció mitocondrial transversal que podria afectar diferents teixits, tot i que no ho hem estudiat.

Un estudi recent, va comparar 23 nens amb TEA, 11 dels quals presentaven regressió en el neurodesenvolupament (RND) i 9 nens control. Els nens amb TEA van demostrar, també, un menor nombre de còpies de *MT-ND1*, *MT-ND4*, dos dels gens estudiats en el nostre treball, així com també *MT-CYTB* comparat amb controls. Els nens amb TEA i RND van demostrar encara un menor número de còpies i una pitjor funció mitocondrial que els nens amb TEA sense RND, suggerint que els individus que no presenten RND serien més capaços de regular l'estrès oxidatiu reduint així el dany a l'ADNmt²⁶⁷. Un altre estudi mostrava que nens amb malaltia mitocondrial diagnosticada, que prèviament havien presentat una infecció intercurrent, va precipitar una RND en un 72% de casos²⁶⁸. En una revisió d'aquest mateix any, Frye proposa la RND en pacients amb TEA com l'element distintiu de la disfunció mitocondrial¹⁶⁶ basant-se, entre d'altres, en un estudi que va mostrar que la majoria de nens amb TEA i malaltia mitocondrial van desenvolupar els primers símptomes de TEA després de patir una RND ràpida i sobtada associada a febre²⁶⁹. Això concorda amb diferents estudis in vitro que demostren una pitjor funció del mitocondri en resposta a l'estrès fisiològic¹⁶⁶. Així doncs, els mitocondris tenen també un paper clau en la resposta fisiològica a l'estrès mitjançant interaccions dinàmiques amb vies neuroendocrines, metabòliques i inflamatòries que estan associades a l'estrès. Cal apuntar també que, tant en treballs amb models animals com clínics, s'ha demostrat que l'estrès crònic genera alteracions desadaptatives en els mitocondris afavorint l'envelliment i els processos patològics, així com alteracions en l'ADNmt i en la funció mitocondrial, conferint, d'aquesta manera, un augment del risc de malalties que inclouen els trastorns psiquiàtrics. En qualsevol cas, encara es necessiten més estudis que aclareixin com els mitocondris contribueixen als circuits neuronals que regulen

comportaments específics, la vulnerabilitat i la resistència a l'exposició a l'estrès⁹⁸. En alguns dels pacients del nostre estudi amb DI i TEA+DI estava recollida en la seva història clínica RND en la infància, tanmateix vam decidir no discriminar-los degut a què era un número petit i en algunes històries clíniques mancava informació de la infància. No vam recollir tampoc dades d'estrès crònic ni d'esdeveniments vitals estressants, que podrien ser un element a tenir en compte en futurs treballs del nostre grup, tot i que hi ha treballs que afirmen que conviure amb un trastorn mental ja, per si sol, és una font d'estrès important.

Si ens fixem en la ràtio de deleció (rati $MT-ND1/MT-ND4$) vam observar que el grup amb TEA+DI mostrava una major ràtio que les persones control. Existeix un estudi amb deu nens amb TEA on cinc d'ells presenten més contingut d'ADNmt que els controls que també van reportar una ràtio de deleció més elevada en dos d'aquests deu nens²⁷⁰. És interessant destacar que el contingut va ser menor en els pacients que presentaven comòrbidament DI, així com més gravetat de la clínica de la paràlisi cerebral (com quadriplegia o major simptomatologia motora), cosa que també és concordant amb les nostres troballes. Cal indicar que hi ha pocs estudis que analitzin la disfunció mitocondrial en DI i, encara menys, que recullin la variació del contingut d'ADNmt.

Les diferències entre els pacients i els controls pel que fa al contingut d'ADNmt podrien ser explicades, també, per un major estrès oxidatiu i/o per l'eliminació inadequada de productes nocius pel bon funcionament cel·lular⁴⁸. Aquest augment de l'estrès oxidatiu i, per tant, de les ROS, de manera crònica porta a una disfunció mitocondrial i això pot arribar a afavorir la replicació de l'ADNmt. Com ja hem suggerit anteriorment, aquest augment de l'ADNmt en infants o en etapes primerenques d'alguns trastorns podria representar un mecanisme compensatori per incrementar el número de còpies d'ADNmt salvatge i així mantenir els nivells normals de transcripció d'aquest. Aquestes anomalies en l'ADNmt poden ser resultat d'alteracions genètiques per defectes en la replicació o reparació de l'ADNmt o per dany oxidatiu produït pels radicals lliures en les bases nitrogenades de l'ADN²⁷⁰.

Pel que fa als pacients amb **ESQ** també vam identificar un menor contingut d'ADNmt en pacients respecte controls, de la mateixa manera que en TEA i DI. Els nostres resultats concorden amb els d'altres autors, també en sang perifèrica de pacients amb ESQ que identifiquen un menor número de còpies d'ADNmt respecte controls sans^{172,271,272}. En la literatura, podem trobar una publicació en pacients amb un primer episodi psicòtic que no han estat tractats prèviament amb medicació i que també mostren un menor contingut d'ADNmt²⁷²; també d'altres en teixit cerebral que van en la mateixa direcció d'un menor contingut d'ADNmt^{273,274}. Tanmateix, també trobem estudis que, contràriament, objectiven un major número de còpies d'ADNmt en pacients amb ESQ comparat amb persones control en teixit cerebral²⁷³ en sang perifèrica²⁷⁵. En aquest estudi

anterior, cal destacar però, que el contingut d'ADNmt en pacients en una fase aguda de l'ESQ va ser similar als pacients control. Els autors suggereixen que aquestes xifres poden atribuir-se, en la mateixa línia que altres estudis recents²⁷⁶, al fet que alguns tractaments antipsicòtics poden tenir un efecte terapèutic útil reduint l'estrès oxidatiu. També es suggereix que l'increment d'ADNmt pot precedir la disfunció mitocondrial com una resposta adaptativa i, per tant, també en ESQ, podria ser considerat com un biomarcador de resposta al tractament i de pronòstic.

En quant a la pacient estudiada amb ESQ i simptomatologia característica de SFC també presentà un menor nombre de còpies d'ADNmt, així com les seves dues familiars amb SFC sense ESQ²⁷¹. Altres estudis duts a terme amb pacients amb SFC sense ESQ no presenten una variació de l'ADNmt en pacients respecte controls, però sí altres alteracions del funcionament mitocondrial com alteració de la producció d'ATP en el CV o alteracions en l'expressió enzimàtica de la CRM^{155,277}. Cal dir que els estudis en aquest sentit són escassos i amb una mostra petita.

Així doncs, per tot això, recentment el contingut d'ADNmt s'ha proposat també com a un índex de salut que correlaciona amb l'estat d'ànim i l'estrès vital mantingut amb la funció mitocondrial²⁷⁸, suggerint que aquest paràmetre podria variar en funció d'estats emocionals, vinculant directament l'estrès psicològic amb la quantitat d'ADNmt. Un menor nombre de còpies en l'ADNmt s'ha associat amb un pitjor estat de salut relacionat amb el rendiment cognitiu, la força física i l'autopercepció de salut, especialment en edats avançades²⁷⁹. El nostre estudi va revelar un menor contingut d'ADNmt en pacients amb ESQ respecte a controls, reforçant així resultats previs en pacients amb primer episodi psicòtic sense tractament antipsicòtic previ²⁷².

Cal tenir en compte la limitació que és el fet que en els nostres estudis es van usar mostres de sang per analitzar la funció mitocondrial i per seqüenciar l'ADNmt, mentre que analitzar teixit cerebral, com en altres estudis, és més específic, tot i que, impossible d'accedir-hi a no ser que siguin estudis postmortem. L'ús de mostres de sang per a dur a terme l'estudi és perquè és molt menys invasiu per les persones i, lògicament, més factible a l'hora de mesurar l'ADNmt en leucòcits. Es va quantificar l'ADNmt només de tres regions (*MT-ND1*, *MT-ND4* i *MT-7S*) i encara que són regions representatives de l'ADNmt no permet generalitzar els resultats a altres regions de l'ADNmt.

Així doncs, es podria entendre el número de còpies d'ADNmt com un índex sensible d'estrès oxidatiu cel·lular, inflamació i disfunció mitocondrial; de la mateixa manera que s'ha reportat que el tractament amb antipsicòtics té un impacte en la cadena respiratòria mitocondrial^{272,280,281}. Hi ha pocs estudis publicats que avaluïn aquesta hipòtesi^{272,280,281}. Variacions en el número de còpies d'ADNmt depenen de la fase de la malaltia, el tractament

farmacològic i dels factors ambientals. S'ha reportat un menor contingut d'ADNmt en relació amb l'edat, l'ús de clozapina, de risperidona i la severitat de la psicosi en pacients amb trastorn psicòtic²⁸². Hi ha altres medicacions, usades com a tractament de trastorns mentals o d'epilèpsia, per exemple l'àcid valpròic que poden afectar el metabolisme mitocondrial. Es va comprovar en una línia cel·lular d'hepatoma com, a part d'alterar el metabolisme dels àcids grassos mitocondrials, la funció de la CRM i la producció de ROS, també va augmentar el número de còpies de l'ADNmt, possiblement com a conseqüència del deteriorament de la pròpia funció mitocondrial²⁸³. En resum, les dades donen suport a l'augment del número de còpies d'ADNmt com a forma de restaurar la funció mitocondrial, tot i que el nivell d'evidència és feble. Així mateix, aquest augment podria ser un mecanisme compensatori en les fases inicials de la malaltia però amb l'edat i en estats crònics aquest mecanisme s'esgotaria podent donar lloc a un descens del mateix. Sí que s'ha pogut comprovar que l'exercici físic i el treball de resistència poden augmentar la massa mitocondrial. Per tant, no es pot perdre de vista com a probable diana terapèutica en un futur proper¹²¹.

S'ha descrit que la mitoquina ADNmt-ccf (de l'anglès *circulant cell-free*) circula per la sang com a senyalitzador cel·lular i es troba en nivells baixos en individus sans i, en canvi, és abundant en processos inflamatoris, estrès i dany o mort cel·lular⁹⁸. Aquesta molècula podria esdevenir una altra mesura per conèixer el grau de disfuncionalitat del mitocondri i, fins i tot, per predir mortalitat en pacients crítics, però també ha de ser molt més estudiada. En els nostres estudis, tot i que els hem dut a terme en sang perifèrica no hem tingut en compte l'ADNmt-ccf, ja que vam aïllar l'ADNmt a partir de leucòcits, però és una molècula a considerar en estudis futurs. En aquest mateix sentit, un altre paràmetre que també pot tenir interès clínic en el futur és l'índex de salut mitocondrial, desenvolupat per Picard i el seu equip (2018), que integra les mesures de massa mitocondrial (quantitat de mitocondris o el seu volum), així com de l'activitat enzimàtica mitocondrial com a indicador de la funcionalitat d'aquests orgànuls²⁷⁸. En la seva mostra l'índex de salut mitocondrial va ser menor en els individus amb valors més alts d'estrès percebut i més elevat en els estats d'ànims positius. Amb més estudis que confirmessin aquests resultats, aquest índex podria esdevenir, en un futur no gaire llunyà, una mesura de la capacitat funcional mitocondrial. En qualsevol cas, donada l'elevada variabilitat del paràmetre, així com a la influència multifactorial, es necessiten més estudis per poder donar una major validesa a aquest índex com a marcador de resposta a tractament, de pronòstic i/o de gravetat en els TN que hem estudiat. Com a conclusió, els resultats dels nostres estudis ens permeten concloure que el número de còpies d'ADNmt es troba disminuït en TEA, DI i ESQ afegint més evidències a la hipòtesi de la implicació mitocondrial en l'etiopatogènia d'aquestes malalties.

❖ Mutacions patogèniques en l'ADNmt

La funció mitocondrial, la mida i l'estructura cel·lular estan condicionades, entre d'altres factors, pels valors d'heteroplàsmia de l'ADNmt¹⁶⁷. Es considera que la malaltia es manifesta en un rang heteroplàsmic del 60% al 95% per a les mutacions patogèniques, donat que aquest és el rang observat per a la majoria de malalties²⁸⁴. A més, el fenotip pot variar notablement entre pacients amb la mateixa mutació en l'ADNmt i nivells aparentment similars d'heteroplàsmia donat que hi ha altres factors que hi estan implicats¹²¹. Per aquest motiu, en l'estudi del genoma mitocondrial dels pacients que han participat en els nostres estudis es van seleccionar com variants probablement patogèniques aquelles que, a partir de diversos índex de patogenicitat, es presentaven amb uns nivells d'heteroplàsmia superiors al 60%. Cal indicar però, que se'n van detectar d'altres amb menors nivells d'heteroplàsmia.

En el cas particular del **TEA**, tot i que és coneguda la seva elevada taxa d'heretabilitat (d'entre un 80% i un 90%²⁸⁵), els estudis empírics continuen demostrant que només d'una petita part d'infants amb TEA se'n coneix l'etiologia genètica. A més, estudis demostren que el 69% de germans de pacients amb TEA, que presenten una alteració genètica, presenten mutacions diferents i habitualment de novo^{214,286}. A més, en l'etiologia d'aquest trastorn, segurament els factors genètics, estan relacionats en molts casos amb interaccions ambientals que podrien afectar a la informació genètica. Només un 25% dels nens amb TEA i malaltia mitocondrial coneguda tenen una mutació genètica que explica *per se* l'alteració d'aquest òrganul¹⁶⁶. Si pensem que una de les principals troballes en nens amb TEA és la disfunció mitocondrial, i tenint en compte l'elevada vulnerabilitat d'aquests òrganuls als factors ambientals, els mitocondris podrien ser, potencialment, uns mediadors clau en les interaccions ambientals i genètiques del TEA¹⁶⁶. En la nostra mostra, un 26'6% de pacients amb TEA i un 30'5% dels pacients amb DI van presentar mutacions probablement patogèniques que suggereixen que part dels factors de risc genètics implicats en TEA i/o DI podrien estar localitzats a l'ADNmt. Tant la disfunció mitocondrial com alteracions en l'ADNmt han estat extensament proposades en l'etiologia de TEA. Tot i així, només uns pocs estudis han analitzat les seqüències d'ADNmt en persones amb TEA²⁸⁷⁻²⁹⁰. Un estudi²⁹¹ que va comparar la seqüència d'ADNmt de nens amb TEA amb els seus germans neurotípics va identificar un major nombre de mutacions probablement patogèniques en nens amb TEA, proposant que aquestes conferien un augment del risc de TEA. Cal destacar que aquest risc va ser major en famílies amb nens que mostraven una disminució del CI i/o dificultats del comportament social²⁹¹ i que, per tant, aquestes mutacions podrien conferir una major gravetat i, en conseqüència, un pitjor pronòstic. Els autors van inferir la seqüència de l'ADNmt utilitzant dades obtingudes per seqüenciació de l'exoma, a diferència del nostre estudi en què es va

realitzar una seqüenciació dirigida a l'ADNmt i, per tant, es va obtenir una major cobertura mitjana respecte l'altre estudi. A més, es van analitzar les dades de l'ADNmt utilitzant l'MToolBox, una eina bioinformàtica que utilitza, entre d'altres, dades que conté informació de seqüències d'ADNmt de 14.144 individus sans per així poder discernir les variants amb més probabilitat de ser patogèniques²⁹². La majoria de variants probablement patogèniques que vam identificar no havien estat associades prèviament amb TEA, a excepció de m.1555A>G a *MT-RNR1*; m.1717T>C a *MT-RNR2*; m.3213A>G a *MT-RNR2*; m.4435A>G a *MT-TM* i m.12142A>G a *MT-TH* que també van ser identificades per Wang et al., que van identificar cada variant en una única família amb TEA i només van informar de dades d'heteroplàsmia en les variants m.1717T>C, m.4435A>G i m.12142A>G. La mutació m.1555A>G també va ser identificada en una dona que patia hipoacúsia des dels 20 anys, estatura baixa, osteoporosi, HTA i cefalees recurrents; totes elles característiques fenotípiques típiques de les malalties mitocondrials. Als seus dos fills també se'ls va detectar sordesa i, a partir d'aquí, es va sospitar de transmissió materna identificant-se la mutació mitocondrial en tots tres i es va suggerir aquesta variant no només com a causant d'hipoacúsia, sinó també de síndrome mitocondrial multiorgànic²⁹³. En aquest treball hi manca més informació d'altres possibles CCAMMs, tant de la pacient com de la resta de familiars, així com del grau d'heteroplàsmia i del número de còpies d'ADNmt ja que això també podria estar relacionat amb els fenotips de cada individu²⁹⁴. Tot i així, és un bon exemple de com una variant en l'ADNmt pot estar associada a diferents CCAMMs.

Pel que fa a la **DI**, el nostre estudi és el primer a analitzar la totalitat de l'ADNmt de persones amb DI usant la seqüenciació de nova generació. Es van reportar un extens nombre de mutacions d'ADNmt probablement patogèniques, però tot i així no es pot afirmar que les variants identificades estiguin implicades en DI ja que la patogenicitat hauria de ser demostrada en estudis funcionals. A més, es coneix que un nombre elevat de mutacions en l'ADNmt han estat descrites en població general. Aproximadament una de cada 200 persones sanes és portadora d'una variant d'ADNmt, cal dir però, que amb nivells d'heteroplàsmia menors del 60%¹¹⁴. En el mateix sentit i més recentment, en les anàlisis del projecte dels 1000 genomes s'ha identificat que el 20% dels subjectes sans són portadors de mutacions heteroplàsmiques implicades en malalties, tot i que en heteroplàsmies superiors al 60% van mostrar un augment de la patogenicitat²⁹⁵. El grau d'heteroplàsmia d'una variant pot arribar a ser molt rellevant i causar un gran ventall de símptomes clínics, des dels més lleus a, fins i tot, la mort. Així, per exemple, trobem que la variant de l'ADNmt m.3243A>G tRNA^{Leu} (UUR) pot causar trastorns neuropsiquiàtrics, malalties cardíaques i musculars o trastorns metabòlics, tot depenent del percentatge d'heteroplàsmia d'aquesta. Per exemple, del 10% al 30% d'heteroplàsmia poden

presentar DM1 o DM2 o TEA; del 50 al 90% malalties neurològiques, cardíaques i musculars; i un 100% d'heteroplàsmia provoca letalitat pediàtrica⁶⁶.

El nostre estudi va identificar que una de cada quatre persones amb TEA o DI són portadores d'una variant d'ADNmt possiblement patogènica amb una heteroplàsmia superior al 60%. Per tant, a part de les alteracions prèviament identificades en l'ADNn en persones amb TEA i DI, vam identificar variants en l'ADNmt que podrien contribuir a l'arquitectura genètica d'ambdues malalties. És rellevant mencionar que sis variants presents en quatre persones amb TEA (4%) i en sis subjectes amb DI (6%) han estat prèviament associades a CCAMMs; totes aquestes variants van ser presents en gens d'ARNr i ARNt i van mostrar uns nivells d'heteroplàsmia superiors al 95%. Algunes de les CCAMMs van ser presents en els pacients, mentre que altres no. Per exemple, m.4336T>C va ser identificada prèviament associada a la malaltia d'Alzheimer, i un dels dos portadors del nostre estudi, des dels 63 anys, patia també aquesta malaltia. No podem excloure la possibilitat que l'altra persona portadora d'aquesta mutació, que en el moment de l'estudi tenia 38 anys, pugui desenvolupar la mateixa malaltia en un futur. De la mateixa manera, la variant m.1555A>G està associada amb sordesa, i la persona més gran dels tres portadors d'aquesta variant presentava sordesa, mentre que els altres dos portadors, més joves, no ho eren. Aquests dos pacients, pel fet de portar aquesta mutació, estan predisposats a patir una ototoxicitat induïda per antibiòtics de la família dels aminoglicòsids i, per tant, vam informar als seus facultatius que aquest tipus de tractament s'havia d'evitar en aquestes persones. Pel que fa a variants en els ARNt, a MITOMAP estan recollits com a "possiblement benignes" o com a "probablement benignes" basant-se en freqüències de bases de dades existents, en funció de la naturalesa del canvi de nucleòtids i puntuació de conservació. Malgrat això, la història clínica i dades d'heteroplàsmia o d'estudis funcionals no estan inclosos en les puntuacions de patogènica de l'ARNt; per tant, s'haurien de contemplar futures avaluacions més extenses per descartar, de manera més precisa, la patogènica de cada variant identificada.

Aprofundir i seguir estudiant en aquest camp és necessari per aclarir el rol de les mutacions d'ADNmt, possiblement patogèniques, en la disfunció mitocondrial i per determinar si aquestes variants estan relacionades amb DI, amb TEA i/o amb les CCAMMs.

Una limitació de l'estudi és que algunes de les variants d'ARNr i d'ARNt poden ser endèmiques de la nostra població i no tenir relació amb les condicions clíniques descrites. Una altra és que els pacients amb TEA de la nostra mostra també pateixen DI i es troben institucionalitzats per una marcada afectació de la funcionalitat. Per tant, els nostres resultats no s'haurien de generalitzar a totes les persones afectes d'aquests trastorns pel moment ja que són específics de pacients amb TEA i DI associada o de pacients amb DI severa o profunda.

Pel que fa a l'ESQ trobem que la majoria d'estudis genètics publicats fins al moment es centren en el ADNn, però cal destacar que el genoma mitocondrial és especialment sensible a l'estrès oxidatiu i tendeix a acumular mutacions somàtiques amb l'edat, particularment en regions d'alta demanda d'energia com podria ser el cervell. Estudis recents confirmen un increment significatiu de mutacions en l'ADNmt no-sinònimes identificades en persones amb ESQ²⁹⁶. És ben conegut que acumulacions d'SNPs, cada un d'ells amb un efecte moderat, poden combinar-se per causar una subtil inestabilitat mitocondrial contribuint així a l'etiologia dels trastorns neuropsiquiàtrics¹¹². Diversos polimorfismes genètics localitzats en gens de l'ADNmt que codifiquen proteïnes mitocondrials també s'han implicat en ESQ.¹⁷⁵ En aquesta direcció, en el nostre estudi vam identificar tretze mutacions probablement patogèniques en l'ADNmt de pacients amb ESQ versus sis del grup de persones control; a nivell de percentatges un 19'2% de la mostra amb ESQ presentava alguna mutació probablement patogènica enfront a un 12'2% dels controls. Com ja hem comentat, només es van seleccionar les variants amb més d'un 60% d'heteroplàsmia ja que per a la majoria de mutacions, la malaltia es manifesta en el llindar heteroplàsmic de 60 al 95%²⁹⁷. Cap de les suposades variants patogèniques ha estat prèviament associada a cap condició clínica, excepte dues variants (m.745A>G i m.1192C>T) que segons es recull a MITOMAP duen a un augment de la sensibilitat als medicaments ototòxics o a la sordesa no-sindròmica. A més, no s'han identificat cap de les variants en ESQ ni en cap altre trastorn psicòtic, excepte en m.9909T>C Phe235Leu a *MT-CO3*, que s'havia recollit associació prèvia a altres malalties psiquiàtriques segons la Human Mitochondrial Genome Database (HmtDB)²⁹⁸. En un treball es recull que 17 dels 85 pacients seqüenciats amb ESQ, trastorn esquizoafectiu o TB (tots d'origen italià) tenien un canvi de nucleòtid diferent de T en la seqüència de referència de la posició 9909²⁹⁹, el que suggereix que aquesta variant pot estar involucrada en ESQ, tot i que s'haurien de dur a terme estudis per confirmar-ne la patogenicitat. Recentment, també s'ha investigat en ESQ la implicació de variacions en l'ADNmt comunes³⁰⁰ i el paper potencial de l'heteroplàsmia³⁰¹, i cap dels mecanismes genètics estava implicat en el risc de malaltia, tot i que un estudi anterior va demostrar que les variants d'ADNmt comunes van modificar el risc de desenvolupar diversos trets complexos, incloent ESQ³⁰². Malgrat que la investigació en aquest camp és escassa i els resultats són inconsistents, hem identificat algunes variants presents en ESQ, especialment la m.9909T>C, que podrien tenir alguna implicació en l'etiopatogènia de la malaltia. Una revisió recent identifica diverses variants d'ADNmt que es van associar amb un inici tardà de la malaltia. Això dona suport a la hipòtesi que les mateixes variants genètiques d'ADNmt contribueixen al risc de desenvolupar diverses malalties complexes i amb elevada prevalença, entre elles ESQ³⁰². Malauradament, cap de les variants d'aquest estudi coincideix amb les variants identificades en el nostre treball.

En l'estudi en la família en què un membre presenta ESQ i símptomes compatibles amb la SFC i els altres SFC no es va identificar cap mutació ni en l'ADNmt ni en gens nuclears relacionats amb la depleció de l'ADNmt. Aquestes dades no ens permeten descartar, però, la presència d'una mutació en altres gens nuclears no estudiats implicats en la replicació de l'ADNmt, cosa que seria possible si ens fixem en què el contingut d'ADNmt està clarament alterat. En quant a l'ADNmt, es van identificar dues variants de l'ADNmt sinònimes (m.8865G>A i m.14004C>T) i una considerada benigna (m.9128T>C). Les altres dues variants identificades (m.16179C>A i m.16519T>A) són variants que ja apareixen prèviament a la base de dades GeneBank amb una freqüència molt baixa, del 0'01% i sense paper conegut, per la qual cosa seria necessari estudiar-les amb més profunditat en futurs estudis. Tot i la clara disfunció mitocondrial que presentaven les tres dones de la família no vam ser capaces d'identificar quina o quines alteracions genètiques la produïen. Ara hauríem d'analitzar-ho amb tècniques actuals així com analitzar gens identificats recentment. És important destacar que aquestes tècniques cada vegada són menys costoses i més accessibles, millorant notablement el rendiment diagnòstic. En trobem un exemple recent en un grup de pacients amb malalties neuromusculars que no tenien diagnòstic genètic conegut en què s'apliquen tècniques de seqüenciació de nova generació amb un panell de gens extens arribant a identificar mutacions patogèniques en quasi la meitat de les persones estudiades³⁰³.

Hi ha evidència que canvis subtils en la bioenergètica mitocondrial poden produir canvis en l'expressió gènica d'ADNn, així com defectes de comportament, aprenentatge i/o memòria recollits en ratolins heteroplàsmics per mutacions diverses en l'ADNmt. Aquests presenten, també, una hiperresposta a l'estrès modulada per diferents neurotransmissors i canvis hormonals i bioquímics complexos. També s'ha vist que ratolins amb un defecte parcial en l'exportació mitocondrial cerebral d'adenosina trifosfat al citoplasma pateixen un seguit de canvis a nivell neuronal podent arribar a crear un desequilibri cortical d'inhibició de l'excitació característica associada amb TEA, ESQ, epilèpsia i TB⁶⁶.

Així doncs, podríem incorporar una nova òptica que deixés de banda l'estudi dels TN des de la perspectiva de la patologia anatòmica específica del cervell i de la genètica nuclear per començar a investigar-los, a més, en termes de bioenergètica sistèmica i genètica també mitocondrial. Sabent que les mutacions en l'ADNmt són suficients per provocar símptomes típics dels TN però al mateix temps assumint que no en són l'única causa.

❖ Nivells de lactat durant l'exercici físic

En la literatura trobem estudis moleculars realitzats en cervell postmortem de persones amb ESQ, estudis de neuroimatge funcional i treballs amb enzims mitocondrials^{304,305} que donen

suport a la hipòtesi que alteracions en el metabolisme energètic i, per tant, en el mitocondri estan implicats en la patofisiologia de l'ESQ^{174,306,307}. Hi ha estudis que també recullen alteracions en el subministrament i en el metabolisme de lactat en pacients amb ESQ³⁰⁸⁻³¹³. Per tant, el lactat i les vies bioenergètiques relacionades requereixen una investigació més profunda en trastorns on es veu implicada la cognició, inclosa l'ESQ³⁰⁹. És per aquest motiu que en la nostra mostra de pacients amb ESQ es van realitzar determinacions de lactat en sang com a marcador de la funció mitocondrial.

És destacable que encara que només hi ha un estudi, s'ha observat un augment dels nivells de lactat també en líquid cefalorraquidi en persones amb ESQ^{171,312} la qual cosa reforça la presència de disfunció mitocondrial en aquesta malaltia³¹⁴. S'han recollit també dades de cervells de persones amb ESQ on s'hi observen nivells elevats de lactat i uns valors més baixos de pH³¹⁵. Aquest treball exposa evidències que suggereixen que un pH baix s'associa a nivells alts del lactat en cervell de models animals amb trastorns psiquiàtrics, cosa que suggereix que canvis en el pH i el lactat formen part de la fisiopatologia d'alguns trastorns mentals greus. L'evidència acumulada suggereix que aquests canvis en el pH i en els nivells de lactat en TN no són deguts a artefactes pel processament del teixit cerebral postmortem o degut a l'ús de medicació; aquest estudi mostra també un increment de lactat en còrtex prefrontal de persones amb ESQ³⁰⁹.

A més, els nivells de lactat han demostrat correlacionar positivament amb els símptomes neurològics de l'ESQ¹⁷⁵. També s'ha suggerit que aquestes alteracions en la bioenergètica cerebral contribueixen a un empitjorament de la simptomatologia cognitiva de la malaltia, així com també de la funcionalitat³¹⁰. Futurs estudis en aquest sentit podrien arribar a canviar el pronòstic de la malaltia, tenint en compte la rellevància dels símptomes cognitius i negatius, i en com aquests interfereixen en la funcionalitat del pacient¹⁰⁷. Cal destacar però, que treballs amb un discret número de participants amb risc de desenvolupar psicosi, que es coneixen com Estats Mentals d'Alt Risc (EMARs), no medicats, han demostrat menors nivells de lactat respecte a persones controls¹⁰⁹ o no s'hi han objectivat diferències³¹⁶; en aquest últim és interessant apuntar que majors nivells de lactat en sang es van relacionar amb una major severitat dels símptomes prodròmics.

En el nostre estudi amb 57 pacients amb ESQ, els nivells de lactat en sang eren superiors que en el grup control durant la realització d'un exercici físic d'intensitat moderada³¹⁷. Si ho analitzem per estadis de l'exercici, les diferències entre pacients i controls eren estadísticament significatives en les tres determinacions després d'iniciar l'exercici, que és quan el mitocondri hauria de funcionar de manera més efectiva. Això mostraria una pitjor funció del metabolisme mitocondrial en pacients amb ESQ. De la mateixa manera, en l'estudi d'ESQ i SFC²⁷¹ les tres dones

avaluades mostraven un increment dels nivells de lactat respecte les dones controls durant els tres temps estudiats després d'iniciar l'exercici. En SFC també s'ha reportat un augment del nivell de lactat en la zona ventricular del cervell d'aquestes persones³¹⁸. Altres estudis ja recullen un increment en els nivells de lactat durant la realització d'un exercici moderat, tant en malalties mitocondrials primàries¹⁰⁵ com secundàries²⁸⁰. També s'han recollit canvis en l'exercici en pacients amb SFC com assoliment del llindar anaeròbic amb consum d'oxigen molt inferior als controls, així com un augment dels nivells de lactat en sang amb uns nivells d'ATP menors¹⁶⁰. Un estudi va detectar un llindar anaeròbic menor en pacients amb ESQ que en controls durant l'exercici³¹⁹; tot i així, no tenim coneixement de determinacions de lactat en sang durant l'exercici ni en ESQ ni en SFC, fet que fa difícil poder comparar aquestes dades.

També hem analitzat els nivells de lactat en funció de la presència de mutacions patogèniques, independentment de si formaven part del grup de pacients o del grup control. És oportú destacar que els nivells de lactat tendeixen a ser més elevats en persones que presenten mutacions patogèniques, i es podria deduir que les persones amb mutacions patogèniques en l'ADNmt tenen disminuïda la funció mitocondrial. D'altra banda, tampoc podem descartar que variants de l'ADNmt amb una heteroplàsmia menor al 60% puguin tenir una heteroplàsmia més elevada en cervell i tenir un paper, també, en l'etiopatogènia de la malaltia. Això ens porta a pensar que tenir una mutació probablement patògena a l'ADNmt pot provocar una disfunció al mitocondri amb afectació metabòlica, tot i que la persona no presenti símptomes clínics identificables. Seria interessant poder comprovar la presència i el grau d'heteroplàsmia d'aquestes mutacions en teixit cerebral per tal d'aprofundir en aquesta hipòtesi.

L'efecte que els tractaments antipsicòtics, utilitzats per un gran nombre de pacients amb ESQ, tenen sobre la cadena respiratòria mitocondrial ha estat estudiat en diferents treballs^{107,320,321}. Sembla que, principalment, alteren l'activitat del CI de la CRM, així com la producció d'ATP i la dissipació del potencial de membrana mitocondrial³²². Tot i així, també s'han descrit alteracions metabòliques en pacients amb ESQ que mai han estat tractats amb antipsicòtics suggerint que la disfunció metabòlica és un factor inherent en l'ESQ¹⁰⁷. En aquesta línia, estudis en ratolins tampoc han trobat alteracions en els nivells de lactat després de nou mesos en tractament amb antipsicòtics³⁰⁹. Fins i tot, s'han descrit efectes beneficiosos de l'ús d'antipsicòtics, per exemple, normalitzant l'expressió gènica de gens mitocondrials que habitualment es troben disminuïts en ESQ³²². En el nostre estudi vam considerar el tractament com un possible factor de confusió, però després de les anàlisis no vam detectar cap correlació entre les dosis d'antipsicòtics i els nivells de lactat; fet ja reportat abans per altres grups³²³. L'augment de lactat en individus tractats amb antipsicòtics podria ser transitori al principi del tractament i després es podria estabilitzar amb

el pas del temps per mecanismes cel·lulars compensatoris. Podria ser que les persones amb disfunció mitocondrial prèvia tinguessin més dificultats per fer ús d'aquests mecanismes compensatoris fent que aquests nivells elevats de lactat es mantinguessin en el temps. Una altra possibilitat és, també, que l'augment de lactat en sang sigui dosi dependent o que depengui de la molècula antipsicòtica usada.

Els diversos resultats que aporta la literatura, juntament amb els derivats d'aquest treball, que mostren un augment dels nivells de lactat en ESQ durant la realització d'un exercici d'intensitat moderada, es poden interpretar com un reflex de disfunció mitocondrial que desemboca en alteracions bioenergètiques que poden no donar l'abast a la demanda energètica necessària en processos clau com la neurotransmissió i la plasticitat sinàptica. Aquests mecanismes alterats a la vegada poden contribuir en afavorir alteracions cognitives, així com al deteriorament en el funcionament general i, per tant, en l'evolució i el pronòstic del trastorn. És important destacar que aquests resultats podrien tenir una repercussió clínica utilitzant-se com a marcadors de disfunció mitocondrial en malalties psiquiàtriques com ESQ, TEA o DI. Pensem no només en poder-los utilitzar com a marcadors diagnòstics, sinó també com a marcadors d'evolució i pronòstic o, fins i tot, de resposta al tractament. Cal remarcar que, tot i que al nostre grup de recerca no li va ser possible analitzar els nivells de lactat als pacients amb TEA i amb DI, la literatura demostra també anomalies en metabòlits mitocondrials en aquests pacients³²⁴⁻³²⁹. Alguns d'aquests estudis també mostren un augment dels nivells de lactat en pacients en TEA i DI, essent aquest metabòlit un substrat essencial per les reaccions d'oxidació per produir energia pel cervell³³⁰.

Així doncs, si bé la major part del risc genètic d'ESQ està associat a la biologia de la sinapsi, algunes variants de risc genètic impliquen l'ADNmt i determinats metabòlits, com per exemple el lactat, també poden contribuir a la patogènesi de l'ESQ i d'altres TN³⁰⁹. El nostre estudi aporta més dades en aquesta direcció.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

.....

VIII. CONCLUSIONS

.....

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

VIII. CONCLUSIONS

❖ **Condicions Clíniques Associades a Malalties Mitocondrials (CCAMMs)**

- 1) Les persones amb diagnòstic de DI, així com les persones amb DI i TEA, presenten major freqüència de determinades CCAMMs en comparació a persones control, concretament restrenyiment, edema, convulsions, alteracions de la visió, estrabisme i incontinència d'esfínters.
- 2) Les persones amb ESQ presenten més freqüència de determinades CCAMMs respecte a població control, concretament fatiga, convulsions i diabetis.

❖ **Contingut d'ADNmt**

- 3) Les persones amb diagnòstic de DI, DI i TEA, i ESQ presenten menor contingut d'ADNmt en leucòcits que a la població control.
- 4) Les persones amb SFC de la família estudiada presenten menor contingut d'ADNmt en leucòcits que a la població control.

❖ **Mutacions patogèniques en l'ADNmt**

- 5) Les persones amb diagnòstic de DI, DI i TEA, i ESQ presenten un conjunt de mutacions presumiblement patogèniques en l'ADNmt, que no estan presents en persones control.

❖ **Nivells de lactat durant l'exercici**

- 6) Els nivells de lactat en sang durant la realització d'exercici físic d'intensitat moderada són més elevats en pacients amb diagnòstic d'ESQ i en les persones amb SFC de la família estudiada que en controls.
- 7) Els nivells de lactat en sang durant la realització d'un exercici físic d'intensitat moderada són més elevats en les persones que són portadores d'una mutació probablement patogènica en l'ADNmt, que en les persones no portadores de cap mutació, independentment del diagnòstic.

❖ **Altres:**

- 8) Les tres membres de la família estudiada, dues amb diagnòstic de SFC i una amb diagnòstic d'ESQ i símptomes compatibles amb la SFC, van mostrar també altres signes de disfunció mitocondrial: i) menor massa mitocondrial, ii) menor activitat enzimàtica i iii) menor consum d'oxigen, que les dones control que van participar en l'estudi.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

IX. PERSPECTIVES de FUTUR

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

IX. PERSPECTIVES DE FUTUR

Aquest treball de tesi doctoral suggereix que el mitocondri pot tenir un paper clau en l'etiopatogènia d'alguns TN, concretament en el TEA, la DI i l'ESQ, que són els diagnòstics que hem estudiat. Tot i així, queden molts àmbits per analitzar i comprendre, per la qual cosa creiem que és necessari continuar aprofundint en aquest camp.

Calen un major nombre d'estudis, amb una mostra molt més àmplia, per tal d'identificar acuradament les mutacions en l'ADNmt que intervenen en l'etiologia dels TN. En aquest sentit també cal analitzar mostres de persones sense aquests diagnòstics per descartar possibles variants específiques de la nostra població. També seria interessant, posar el focus específicament en l'ADNn que es relaciona directa o indirectament amb la funció mitocondrial.

Creiem necessari explorar sempre les CCAMMs revisades en les diferents entitats clíniques estudiades així com en altres TN, en especial sempre que es sospiti una possible alteració mitocondrial. Degut a la possibilitat de què apareguin en etapes més avançades, cal reavaluar aquestes CCAMMs en diferents etapes vitals, així com en diferents estadis del trastorn.

Cal ampliar aquestes hipòtesis a altres patologies mentals greus i freqüents com el TB. Però també tenir en compte patologies mentals no considerades tan greus, però igualment invalidants i amb elevada freqüència de CCAMMs com, per exemple, la distímia o determinats trastorns de personalitat.

Per esbrinar si l'ADNmt està implicat directament en l'etiopatogènia dels TN també cal considerar i estendre l'anàlisi de l'ADNmt a altres teixits, especialment el cerebral.

Una altra línia d'investigació poc explorada són els estudis per comprovar quin efecte té una suplementació nutracèutica sobre la funció mitocondrial per a ser valorat com a coadjuvant en el tractament habitual en un futur i la possible interacció amb la medicació antipsicòtica. A més de l'anàlisi dels diferents tractaments farmacològics sobre la funció mitocondrial.

D'altra banda, ja es coneixen tractaments que milloren el funcionament mitocondrial que, com a coadjuvants al tractament psiquiàtric, podrien millorar la simptomatologia i, per tant, el pronòstic i la qualitat de vida de les persones amb trastorn mental. Si es demostrés la implicació mitocondrial en aquests trastorns neuropsiquiàtrics, aquest òrganul podria ser una nova diana terapèutica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

X. BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

X. BIBLIOGRAFIA

1. Van den Bergh, B. R. H. *et al.* Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2017). doi:10.1016/j.neubiorev.2017.07.003
2. Monk, C., Lugo-Candelas, C. & Trumpff, C. Prenatal Developmental Origins of Future Psychopathology: Mechanisms and Pathways. *Annu. Rev. Clin. Psychol* **15**, 16–17 (2019).
3. Weinberger, D. R. Future of Days Past: Neurodevelopment and Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **43**, 1164–1168 (2017).
4. Lewis, D. L. P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 409–32 (2002).
5. Jaaro-peled, H. *et al.* Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through Neuregulin-1–ErbB4 and DISC1. **32**, 485–495 (2010).
6. Murray, R. M., Bhavsar, V., Tripoli, G. & Howes, O. 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. *Schizophr. Bull.* **43**, 1190–1196 (2017).
7. Kim, Y. *et al.* Mitochondria, Metabolism, and Redox Mechanisms in Psychiatric Disorders. *Antioxidants Redox Signal.* **31**, 275–317 (2019).
8. Insel, T. R. Rethinking schizophrenia. *Nature* **468**, 187–193 (2010).
9. Virginia A. Sadock, B. J. S. and P. R. Kaplan and Sadock's *Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences and Clinical Psychiatry*. (Wolters kluwer editorial, 2015).
10. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. (American Psychiatric Publishing, 2013).
11. Lai, M., Lombardo, M. V & Baron-cohen, S. Autism. *Lancet* **383**, 896–910 (2014).
12. Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G. & Veenstra-vanderweele, J. Autism spectrum disorder. *Lancet* **6736**, 1–13 (2018).
14. Elsabbagh, M. *et al.* Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Res.* **5**, 160–179 (2012).
15. Baxter, A. J. *et al.* The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol. Med.* **45**, 601–613 (2015).

16. Yoon, S. H., Choi, J., Lee, W. J. & Do, J. T. Genetic and Epigenetic Etiology Underlying Autism Spectrum Disorder. *J. Clin. Med.* **9**, 966 (2020).
17. Klein, M., Donkelaar, M. Van, Verhoef, E. & Franke, B. Imaging genetics in neurodevelopmental psychopathology. 485–537 (2017). doi:10.1002/ajmg.b.32542
18. Donovan, M. C. O. & Owen, M. J. The implications of the shared genetics of psychiatric disorders. **22**, (2016).
19. Geschwind D., S. M. Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine. *Lancet Neurol.* **14**, 1109–1120 (2015).
20. de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J. L. & Geschwind, D. H. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nat. Med.* **22**, 345–61 (2016).
21. Lord, C. *et al.* Autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **6**, (2020).
22. Lai, M.-C., Lombardo, M. V, Chakrabarti, B. & Baron-Cohen, S. Subgrouping the autism ‘spectrum’: reflections on DSM-5. *PLoS Biol.* **11**, e1001544 (2013).
23. Lai, M. C. & Baron-Cohen, S. Identifying the lost generation of adults with autism spectrum conditions. *The Lancet Psychiatry* **2**, 1013–1027 (2015).
24. Miodovnik, A., Harstad, E., Sideridis, G. & Huntington, N. Timing of the diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Pediatrics* **136**, e830–e837 (2015).
25. Kawa, R. *et al.* European studies on prevalence and risk of autism spectrum disorders according to immigrant status-a review. *Eur. J. Public Health* **27**, 101–110 (2017).
26. Harrington, J. W. & Allen, K. *The Clinician’s Guide to Autism.* **35**, (2018).
27. Joshi, G. *et al.* Psychiatric comorbidity and functioning in a clinically referred population of adults with autism spectrum disorders: A comparative study. *J. Autism Dev. Disord.* **43**, 1314–1325 (2013).
28. Purugganan, O. Intellectual Disabilities. *Pediatr. Rev.* **39**, 299–309 (2018).
29. Rubin, I.L., Merrick, J., Greydanus, D.E., Patel, D.R. *Health Care for People with Intellectual and Developmental Disabilities across the Lifespan.* (Springer, 2016).
30. Maulik, P. K., Mascarenhas, M. N., Mathers, C. D., Dua, T. & Saxena, S. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Res. Dev. Disabil.* **32**,

- 419–436 (2011).
31. Fletcher R, Barnhill J, C. S. *Clinical Usefulness of the Diagnostic Manual-Intellectual Disability for Mental Disorders in Persons With Intellectual Disability: Results From a Brief Field Survey*. (2017).
 32. Wieczorek, D. Autosomal dominant intellectual disability. 318–322 (2018). doi:10.1007/s11825-018-0206-2
 33. Jamra, R. Genetics of autosomal recessive intellectual disability. 323–327 (2018). doi:10.1007/s11825-018-0209-z
 34. Parker, S. E. *et al.* Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* **88**, 1008–1016 (2010).
 35. Hersh, J. H. *et al.* Clinical report-health supervision for children with fragile X syndrome. *Pediatrics* **127**, 994–1006 (2011).
 36. Bertelli, M. O., Munir, K., Harris, J. & Salvador-Carulla, L. “Intellectual developmental disorders”: reflections on the international consensus document for redefining “mental retardation-intellectual disability” in ICD-11. *Adv. Ment. Heal. Intellect. Disabil.* **10**, 36–58 (2016).
 37. Chiurazzi, P. & Pirozzi, F. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability. *F1000Research* **5**, 1–16 (2016).
 38. Vasudevan, P. & Suri, M. A clinical approach to developmental delay. **17**, 558–561 (2017).
 39. Gilissen, C. *et al.* Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* **511**, 344–347 (2014).
 40. Folch-Mas, A. *et al.* Nuevas consideraciones sobre la salud de las personas con trastornos del desarrollo intelectual. *Salud Publica Mex.* **59**, 454–461 (2017).
 41. Folch, A. *et al.* Health indicators in intellectual developmental disorders: The key findings of the POMONA-ESP project. *J. Appl. Res. Intellect. Disabil.* **32**, 23–34 (2019).
 42. René S. Kahn, Iris E. Sommer, Robin M. Murray, A. M.-L., Daniel R. Weinberger, Tyrone D. Cannon, Michael O’Donovan, C. U. C. & John M. Kane, Jim van Os, and T. R. I. Schizophrenia. *Nat Rev Dis Prim.* **12**, 1–23 (2015).
 43. Charlson, F. J. *et al.* Global epidemiology and burden of schizophrenia: Findings from the

- global burden of disease study 2016. *Schizophr. Bull.* **44**, 1195–1203 (2018).
44. Hjorthøj, C., Stürup, A. E., Mcgrath, J. J. & Nordentoft, M. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia : a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry* **0366**, 1–7 (2017).
 45. Owen, M. J., Sawa, A. & Mortensen, P. B. Schizophrenia. *Lancet* **388**, 86–97 (2016).
 46. Hilker, R. *et al.* Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. *Biol. Psychiatry* **83**, 492–498 (2018).
 47. Peay, H. L. Genetic Risk Assessment in Psychiatry. *Perspect. Med.* 1–12 (2019). doi:10.1101/cshperspect.a036616
 48. Ripke, S. *et al.* Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421–7 (2014).
 49. Kirov, G. *et al.* The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biol. Psychiatry* **75**, 378–85 (2014).
 50. Pardiñas, A. F. *et al.* Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nat. Genet.* (2018). doi:10.1038/s41588-018-0059-2
 51. Walsh, T. *et al.* Rare Structural Variants Disrupt Multiple Genes in Neurodevelopmental Pathways in Schizophrenia. **539**, (2014).
 52. Lieberman J., F. M. Psychotic Disorders. *N. Engl. J. Med.* **379**, 270–80 (2018).
 53. Salgado-Pineda, P. *et al.* Sensitivity and specificity of hypoactivations and failure of de-activation in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **201**, 224–230 (2018).
 54. Martorell, L. *et al.* Genetics and genetic counseling in psychiatry: Results from an opinion survey of professionals and users. *Mol. Genet. Genomic Med.* **7**, 1–11 (2019).
 55. Rodrigues-Amorim, D. *et al.* Schizophrenia: A review of potential biomarkers. *J. Psychiatr. Res.* **93**, 37–49 (2017).
 56. Perkovic, M. N. *et al.* Theranostic biomarkers for schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–38 (2017).
 57. Firth, J. *et al.* The Lancet Psychiatry Commission: a blueprint for protecting physical health in people with mental illness. *The Lancet Psychiatry* **6**, 675–712 (2019).

58. Vafai, S. B. & Mootha, V. K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **491**, 374–83 (2012).
59. Margulis, L. *Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animals Cells on the Precambrian Earth*. (1970).
60. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., R. & K. *Molecular Biology of the Cell*. (Routledge, 2002).
61. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M. & Scott, M. P., Zipursky, S. L., Darnell, J. *Biología celular y molecular*. (2005).
62. Picard, M., Wallace, D. C. & Burrelle, Y. The Rise of Mitochondria in Medicine. *Mitochondrion* **30**, 105–116 (2016).
63. Gorman, G. S. *et al.* Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 1–23 (2016).
64. Levy, R. M. R. *Mitochondrial Diseases. Anesthesia and uncommon diseases* doi:10.1016/B978-1-4160-2212-1.50017-2
65. Wallace, D. C. A mitochondrial etiology of neuropsychiatric disorders. *JAMA Psychiatry* **74**, 863–864 (2017).
66. Pei, L. & Wallace, D. C. Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders. *Biol. Psychiatry* **83**, 722–730 (2018).
67. Murphy, M. P. & Hartley, R. C. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat. Publ. Gr.* (2018). doi:10.1038/nrd.2018.174
68. Luo, S. *et al.* Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *PNAS* **115**, 13039–13044 (2018).
69. HumanMitoReport < MITOMAP < Foswiki. Available at: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/HumanMitoReport>. (Accessed: 27th March 2020)
70. Longley, M. J., Nguyen, D., Kunkel, T. A. & Copeland, W. C. The Fidelity of Human DNA Polymerase γ with and without Exonucleolytic Proofreading and the p55 Accessory Subunit. *J. Biol. Chem.* **276**, 38555–38562 (2001).
71. Priyanka, S. & Harini, S. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells* **8**, 100 (2019).

72. Zhang, R., Wang, Y., Ye, K., Picard, M. & Gu, Z. Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics* **18**, 1–14 (2017).
73. Park, C. B. & Larsson, N.-G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* **193**, 809–818 (2011).
74. Rebolledo-jaramillo, B., Su, M. S., Stoler, N., Mcelhoe, J. A. & Dickins, B. Maternal age effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. **111**, 15474–15479 (2014).
75. Fuku, N. *et al.* Mitochondrial Haplogroup N9a Confers Resistance against Type 2 Diabetes in Asians. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 407–415 (2007).
76. Crispim, D. *et al.* The European-specific mitochondrial cluster J/T could confer an increased risk of insulin-resistance and type 2 diabetes: An analysis of the m.4216T > C and m.4917A > G variants. *Ann. Hum. Genet.* **70**, 488–495 (2006).
77. Darvishi, K., Sharma, S., Bhat, A. K., Rai, E. & Bamezai, R. N. K. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. **249**, 249–255 (2007).
78. Fang, H. *et al.* Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer* **10**, (2010).
79. Hongzhi Sun, X. W. (eds. . *Mitochondrial DNA and Diseases*. (Springer Singapore, 2017).
80. Bussard, K. M. & Siracusa, L. D. Understanding Mitochondrial Polymorphisms in Cancer. 6051–6060 (2017). doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1939
81. Rollins, B. *et al.* Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One* **4**, (2009).
82. Sequeira, A. *et al.* Mitochondrial mutations and polymorphisms in psychiatric disorders. *Front. Genet.* **3**, 1–16 (2012).
83. El-Hattab, A. W. & Scaglia, F. Mitochondrial cytopathies. *Cell Calcium* **60**, 199–206 (2016).
84. Chinnery, P. F. Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Mol. Med.* **7**, 1503–1512 (2015).
85. Schapira, A. H. V. Mitochondrial diseases. *Lancet* **379**, 1825–1834 (2012).
86. Wallace, D. C. Mitochondrial genetic medicine. *Nat. Genet.* **1**, (2018).

87. Hirano, M. *et al.* Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus-embedded mtDNA pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14894–14899 (1997).
88. Thalmann, O., Hebler, J., Poinar, H. N., Pääbo, S. & Vigilant, L. Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: A cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Mol. Ecol.* **13**, 321–335 (2004).
89. Andreu A, C. Y. P. M. ; G. S. M. ; M. J. Enfermedades mitocondriales. *Protoc. diagnóstico y Trat. las enfermedades mitocondriales.*
90. Jesús Eiris Puñal, Carmen Gómez Lado, Manuel Oscar Blanco Barca, M. C.-G. Enfermedades mitocondriales. *Protoc. Asoc. española pediatría.* 8 (2008). doi:10.1002/0470093978.ch6
91. Ahmed, S., Craven, L., Russell, O., Turnbull, D. & Vincent, A. Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathies. *Ann. Med.* **45**, 4–16 (2013).
92. Manji, H. *et al.* Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 293–307 (2012).
93. Hoffmann, A. & Spengler, D. The Mitochondrion as Potential Interface in Early-Life Stress Brain Programming. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 1–19 (2018).
94. Meyer, T. & Wirtz, P. Mechanisms of mitochondrial redox signaling in psychosocial stress - responsive systems. New insights into an old story. *Antioxidants Redox Signal. Redox Signal.* 1–39 (2017). doi:10.1089/ars.2017.7186
95. Picard, M. *et al.* An energetic view of stress: Focus on mitochondria. 72–85 (2018). doi:10.1016/j.yfrne.2018.01.001.An
96. Picard, M; McEwen, B. Psychological Stress and Mitochondria: A Conceptual Framework. *Psychosom. Med.* **80**, 126–140 (2019).
97. Picard, M; McEwen, B. Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review. *Psychosom. Med.* **80**, 141–153 (2018).
98. Daniels, T. E., Olsen, E. M. & Tyrka, A. R. Stress and Psychiatric Disorders: The Role of Mitochondria. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **16**, 165–186 (2020).
99. Andreatza, A. C. & Nierenberg, A. A. Mitochondrial Dysfunction : At the Core of Psychiatric Disorders ? *Biol. Psychiatry* **83**, 718–719 (2018).

100. Anglin, R. Mitochondrial Dysfunction in Psychiatric Illness. *Can. J. Psychiatry*. **61**, 444–5 (2016).
101. Gladden, L. B. 200th Anniversary of lactate research in muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **36**, 109–115 (2008).
102. Kamel, K. S., Oh, M. S. & Halperin, M. L. L-lactic acidosis: pathophysiology, classification, and causes; emphasis on biochemical and metabolic basis. *Kidney Int.* 1–14 (2019). doi:10.1016/j.kint.2019.08.023
103. Adeva-andany, M., López-ojén, M., Funcasta-calderón, R. & Ameneiros-rodríguez, E. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* **17**, 76–100 (2014).
104. Brooks, G. A. Review The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab.* **27**, 757–785 (2018).
105. Finsterer, J. *et al.* Lactate stress test in the diagnosis of mitochondrial myopathy. *J. Neurol. Sci.* **159**, 176–180 (1998).
106. Ferguson, B. S. *et al.* Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *European Journal of Applied Physiology* **0**, (Springer Berlin Heidelberg, 2018).
107. Sullivan, C. R., O'Donovan, S. M., McCullumsmith, R. E. & Ramsey, A. Defects in Bioenergetic Coupling in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **83**, 739–750 (2018).
108. Dogan, A. E., Yuksel, C., Du, F., Chouinard, V. A. & Öngür, D. Brain lactate and pH in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review of findings from magnetic resonance studies. *Neuropsychopharmacology* **43**, 1681–1690 (2018).
109. Onozato, M. *et al.* Serum d- and l-lactate, pyruvate and glucose levels in individuals with at-risk mental state and correlations with clinical symptoms. *Early Interv. Psychiatry* 1–8 (2019). doi:10.1111/eip.12866
110. Looney, J. M. & Childs, H. M. The lactic acid and glutathione content of the blood of schizophrenic patients. *J. Clin. Invest.* **13**, 963–8 (1934).
111. Bansal, Y. & Kuhad, A. Mitochondrial Dysfunction in Depression. *Curr. Neuropharmacol.* **14**, 610–618 (2016).
112. Konradi, C. & Öngür, D. Role of mitochondria and energy metabolism in schizophrenia and

- psychotic disorders. *Schizophr. Res.* **187**, 1–2 (2017).
113. Nass, S; Nass, M. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. *J Cell Biol* **Dec;19**, 613–629 (1963).
 114. Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. A., Relton, C. L. & Chinnery, P. F. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 254–260 (2008).
 115. Crawley, K. Mitochondrial Disease. Information Booklet for Medical Practitioners. *Dis. Mol. Med.* **1**, 51 (2014).
 116. Anglin, R. E., Garside, S. L., Tarnopolsky, M. A., Mazurek, M. F. & Rosebush, P. I. The psychiatric manifestations of mitochondrial disorders: A case and review of the literature. *J. Clin. Psychiatry* **73**, 506–512 (2012).
 117. Rosebush, P. I., Anglin, R. E., Rasmussen, S. & Mazurek, M. F. Mental illness in patients with inherited mitochondrial disorders. *Schizophr. Res.* (2017). doi:10.1016/j.schres.2017.05.010
 118. Inczedy-farkas, G. *et al.* Psychiatric symptoms of patients with primary mitochondrial DNA disorders. *Behav. Brain Funct.* **8:9**, 1–9 (2012).
 119. Dieset, I., Andreassen, O. A. & Haukvik, U. K. Somatic Comorbidity in Schizophrenia: Some Possible Biological Mechanisms Across the Life Span. *Schizophr. Bull.* **42**, 1316–1319 (2016).
 120. Nguyen, T. T., Kosciolk, T., Eyler, L. T., Knight, R. & Jeste, D. V. Overview and systematic review of studies of microbiome in schizophrenia and bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* **99**, 50–61 (2018).
 121. Russell, O. M., Gorman, G. S., Lightowlers, R. N. & Turnbull, D. M. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell* **181**, 168–188 (2020).
 122. Stenton, S. L. & Prokisch, H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine* **56**, 102784 (2020).
 123. Poulton, J., Finsterer, J. & Yu-Wai-Man, P. Genetic Counselling for Maternally Inherited Mitochondrial Disorders. *Mol. Diagnosis Ther.* 1–11 (2017). doi:10.1007/s40291-017-0279-7
 124. Alcalde, C; Aldámiz-Echevarría, L; Andrade, F; Arranz, J. A; Arrieta, F; Artuch, R. *et al.*

Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos de metabolismo. AECOM (Asociación Española para el estudio de errores congénitos del metabolismo) (2018).

125. Parikh, S. *et al.* Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genet. Med.* **17**, 689–701 (2015).
126. Chinnery, P. F., Howell, N., Andrews, R. M. & Turnbull, D. M. Clinical mitochondrial genetics. *J. Med. Genet.* **36**, 425–436 (1999).
127. Nardin, R. A. & Johns, D. R. Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve* **24**, 170–191 (2001).
128. Pfeffer, G., Majamaa, K., Dm, T., Thorburn, D. & Pf, C. Treatment for mitochondrial disorders (Review). (2012).
129. Nierenberg, A. A. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha as a Novel Target for Bipolar Disorder and Other Neuropsychiatric Disorders. *Biol. Psychiatry* **83**, 761–769 (2018).
130. Niyazov, D. M., Kahler, S. G. & Frye, R. E. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Mol. Syndromol.* **7**, 122–137 (2016).
131. Fahmy, S. F., El-Hamamsy, M. H., Zaki, O. K. & Badary, O. A. L-Carnitine supplementation improves the behavioral symptoms in autistic children. *Res. Autism Spectr. Disord.* **7**, 159–166 (2013).
132. Goin-Kochel, R. P. *et al.* Side Effects and Behavioral Outcomes Following High-Dose Carnitine Supplementation Among Young Males With Autism Spectrum Disorder: A Pilot Study. *Glob. Pediatr. Heal.* **6**, 2333794X1983069 (2019).
133. Adams, J. B. *et al.* Effect of a vitamin/mineral supplement on children and adults with autism. *BMC Pediatr.* **11**, (2011).
134. Magalhães, P. V. S., Dean, O., Andrezza, A. C., Berk, M. & Kapczinski, F. Antioxidant treatments for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, (2016).
135. Sarnyai, Z., Kraeuter, A. K. & Palmer, C. M. Ketogenic diet for schizophrenia: Clinical implication. *Curr. Opin. Psychiatry* **32**, 394–401 (2019).
136. Bostock, E. C. S., Kirkby, K. C. & Taylor, B. V. M. The current status of the ketogenic diet in

- psychiatry. *Front. Psychiatry* **8**, 1–10 (2017).
137. Cheng, N., Rho, J. M. & Masino, S. A. Metabolic dysfunction underlying autism spectrum disorder and potential treatment approaches. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 1–12 (2017).
 138. Salehi, B. *et al.* Insights on the use of α -lipoic acid for therapeutic purposes. *Biomolecules* **9**, 1–25 (2019).
 139. Moos, W. H. *et al.* Epigenetic Treatment of Neuropsychiatric Disorders: Autism and Schizophrenia. *Drug Dev. Res.* **77**, 53–72 (2016).
 140. Nightingale, H., Pfeffer, G., Bargiela, D., Horvath, R. & Chinnery, P. F. Emerging therapies for mitochondrial disorders. *Brain* **139**, 1633–1648 (2016).
 141. Ben-Shachar, D. & Ene, H. M. Mitochondrial Targeted Therapies: Where Do We Stand in Mental Disorders? *Biol. Psychiatry* **83**, 770–779 (2018).
 142. El-hattab, A. W., Adesina, A. M., Jones, J. & Scaglia, F. MELAS syndrome : Clinical manifestations , pathogenesis , and treatment options. *Mol. Genet. Metab.* **116**, 4–12 (2015).
 143. van Gisbergen, M. W. *et al.* How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **764**, 16–30 (2015).
 144. Pietiläinen, K. H. *et al.* Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: Pathways behind acquired obesity. *PLoS Med.* **5**, 0472–0483 (2008).
 145. Tomas, C. & Newton, J. Metabolic abnormalities in chronic fatigue syndrome / myalgic encephalomyelitis : a mini-review. 1–7 (2018).
 146. Tomas, C. *et al.* Cellular bioenergetics is impaired in patients with chronic fatigue syndrome. *PLoS One* **12**, 1–15 (2017).
 147. Norman E Booth, Sarah Myhill & John McLaren-Howard. Mitochondrial dysfunction and the pathophysiology of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **5**, 208–220 (2012).
 148. Myhill, Sarah; Booth, Norman E; McLaren-howard, J. Chronic fatigue syndrome and mitochondrial dysfunction. *Int J Clin Exp Med* (2009).
 149. Prins, J. B., Meer, J. W. M. Van Der & Bleijenberg, G. Review Chronic fatigue syndrome. **367**, (2006).

150. Cleare, A. J. The HPA axis and the genesis of chronic fatigue syndrome. **15**, (2004).
151. Chaudhuri, A. & Behan, P. O. Fatigue in neurological disorders. **363**, 978–988 (2004).
152. Fukuda, K., Straus, S. E., Hickie, I., Sharpe, M. C. & Psych, M. R. C. The Chronic Fatigue Syndrome : A Comprehensive Approach to Its Definition and Study. (1994).
153. Carruthers, B. M. *et al.* Myalgic encephalomyelitis : International Consensus Criteria. *J. Intern. Med.* **270**, 327–338 (2011).
154. Barsky, A. J. & Borus, J. F. Functional Somatic Syndromes. (2017).
155. Castro-Marrero, J. *et al.* Comorbidity in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Psychosomatics* **58**, 533–543 (2017).
156. Natelson, B. H., Lin, J. S., Lange, G., Khan, S. & Unger, E. R. The Effect of Comorbid Medical and Psychiatric Diagnoses on Chronic Fatigue Syndrome. *Ann. Med.* **0**, 000 (2019).
157. Borchers, A. T. & Gershwin, M. E. Fibromyalgia: A Critical and Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **49**, 100–151 (2015).
158. Whiting, P. *et al.* Interventions for the Treatment and Management of Chronic Fatigue Syndrome. A Systematic Review. *Jama* **286**, 1360–1369 (2001).
159. Straus, S. E. Pharmacotherapy of Chronic Fatigue Syndrome. *Jama* **292**, 1234 (2004).
160. Vermeulen, R. C. W., Kurk, R. M., Visser, F. C., Sluiter, W. & Scholte, H. R. Patients with chronic fatigue syndrome performed worse than controls in a controlled repeated exercise study despite a normal oxidative phosphorylation capacity. *J. Transl. Med.* **8**, 93 (2010).
161. Barnes, P. R. J., Taylor, D. J., Kemp, G. I. & Radda, G. K. Skeletal muscle bioenergetics in the chronic fatigue syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **56**, 679–683 (1993).
162. Jammes, Y., Steinberg, J. G., Mambrini, O., Brégeon, F. & Delliaux, S. Chronic fatigue syndrome: Assessment of increased oxidative stress and altered muscle excitability in response to incremental exercise. *J. Intern. Med.* **257**, 299–310 (2005).
163. Anglin, R. E. S., Mazurek, M. F., Tarnopolsky, M. A. & Rosebush, P. I. The mitochondrial genome and psychiatric illness. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **159 B**, 749–759 (2012).
164. Torrico, B. *et al.* Lack of Replication of Previous Autism Spectrum Disorder GWAS Hits in

- European Populations. 1–10 (2016). doi:10.1002/aur.1662
165. Cruz, A. C. P., Ferrasa, A., Muotri, A. R. & Herai, R. H. Frequency and association of mitochondrial genetic variants with neurological disorders. *Mitochondrion* **46**, 345–360 (2019).
 166. Frye, R. E. Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder: Unique Abnormalities and Targeted Treatments. *Semin. Pediatr. Neurol.* 100829 (2020). doi:10.1016/j.spen.2020.100829
 167. Picard, M. *et al.* Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E4033–42 (2014).
 168. van Karnebeek, C. D. M. & Stockler, S. Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability: a systematic literature review. *Mol. Genet. Metab.* **105**, 368–81 (2012).
 169. Valenti, D., de Bari, L., De Filippis, B., Henrion-Caude, A. & Vacca, R. A. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: An overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **46**, 202–217 (2014).
 170. Izzo, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction in down syndrome: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Mol. Med.* **24**, 2 (2018).
 171. Regenold, W. T. *et al.* Mitochondrial detachment of hexokinase 1 in mood and psychotic disorders: Implications for brain energy metabolism and neurotrophic signaling. *J. Psychiatr. Res.* **46**, 95–104 (2012).
 172. Hjelm, B. E. *et al.* Evidence of Mitochondrial Dysfunction within the Complex Genetic Etiology of Schizophrenia. *Mol. Neuropsychiatry* **1**, 201–219 (2015).
 173. Horváth, S. & Mirnics, K. Schizophrenia as a disorder of molecular pathways. *Biol. Psychiatry* **77**, 22–28 (2015).
 174. Bergman, O. & Ben-Shachar, D. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) Deficits in Schizophrenia: Possible Interactions with Cellular Processes. *Can. J. Psychiatry.* **61**, 457–69 (2016).
 175. Rajasekaran, A., Venkatasubramanian, G., Berk, M. & Debnath, M. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. *Neurosci.*

- Biobehav. Rev.* **48**, 10–21 (2015).
176. Bradshaw, P., Bradshaw & C., P. Cytoplasmic and Mitochondrial NADPH-Coupled Redox Systems in the Regulation of Aging. *Nutrients* **11**, 504 (2019).
 177. Zheng, J. *et al.* Physical Exercise and Its Protective Effects on Diabetic Cardiomyopathy: What Is the Evidence? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, (2018).
 178. Kanungo S., Morton J., Neelakantan M. , Ching K., Saeedian J., G. A. Mitochondrial disorders. *Ann. Transl. Med.* **6**, 475 (2018).
 179. Roushandeh, A. M., Kuwahara, Y. & Roudkenar, M. H. Mitochondrial transplantation as a potential and novel master key for treatment of various incurable diseases. *Cytotechnology* **9**, (2019).
 180. Kuwahara, Y. *et al.* The Involvement of Mitochondrial Membrane Potential in Cross-Resistance Between Radiation and Docetaxel. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **96**, 556–565 (2016).
 181. Sai, M. *et al.* SIRT1 Activation by Resveratrol Alleviates Cardiac Dysfunction via Mitochondrial Regulation in Diabetic Cardiomyopathy Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–15 (2017).
 182. McCully, J. D., Levitsky, S., del Nido, P. J. & Cowan, D. B. Mitochondrial transplantation for therapeutic use. *Clin. Transl. Med.* **5**, (2016).
 183. Xuemin, W., Keming, C., Ying, W. & Shanping, S. Functional changes in rat-liver mitochondria during the early phase of burn injury. *Burns* **12**, 461–464 (1986).
 184. Zhang, C., Montooth, K. L. & Calvi, B. R. Incompatibility between mitochondrial and nuclear genomes during oogenesis results in ovarian failure and embryonic lethality. *Development* **144**, 2490–2503 (2017).
 185. Altinok, O. *et al.* Malate–aspartate shuttle promotes l-lactate oxidation in mitochondria. *J. Cell. Physiol.* **235**, 2569–2581 (2020).
 186. Onyango, I. G., Shaharyar, M. K. & Bennet Jr, J. P. Mitochondria in the pathophysiology of Alzheimer s and Parkinson s diseases. *Front. Biosci.* **22**, 854–872 (2016).
 187. Sullivan, P. F. & Geschwind, D. H. Review Defining the Genetic , Genomic , Cellular , and Diagnostic Architectures of Psychiatric Disorders. *Cell* **177**, 162–183 (2019).
 188. The Brainstorm Consortium. Analysis of shared heritability in common disorders of the

- brain. *Science* (80-.). **360**, 1–40 (2018).
189. WHO Guidelines 2010. *Management of physical health conditions in adults with severe mental disorders*. (World Health Organization, 2010).
 190. Liu, N. H. *et al.* Excess mortality in persons with severe mental disorders: a multilevel intervention framework and priorities for clinical practice, policy and research agendas. *World Psychiatry* **16**, 30–40 (2017).
 191. Brown, M., Jacobstein, D., Yoon, I. S., Anthony, B. & Bullock, K. Systemwide initiative documents robust health screening for adults with intellectual disability. *Intellect. Dev. Disabil.* **54**, 354–365 (2016).
 192. Green, S. *et al.* Implementing guidelines on physical health in the acute mental health setting: A quality improvement approach. *Int. J. Ment. Health Syst.* **12**, 1–9 (2018).
 193. Crump, C., Winkleby, M. A., Sundquist, K. & Sundquist, J. Comorbidities and Mortality in Persons With Schizophrenia: A Swedish National Cohort Study. *Am. J. Psychiatry* **170**, 324–333 (2013).
 194. Laursen, T. M., Nordentoft, M. & Mortensen, P. B. Excess early mortality in schizophrenia. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **10**, 425–48 (2014).
 195. Maguire, M., Singh, J. & Marson, A. Epilepsy and psychosis: A practical approach. *Pract. Neurol.* **18**, 106–114 (2018).
 196. Virtanen, T., Eskelinen, S., Sailas, E. & Suvisaari, J. Dyspepsia and constipation in patients with schizophrenia spectrum disorders. *Nord. J. Psychiatry* **71**, 48–54 (2017).
 197. Storch Jakobsen, A. *et al.* Associations between clinical and psychosocial factors and metabolic and cardiovascular risk factors in overweight patients with schizophrenia spectrum disorders – Baseline and two-years findings from the CHANGE trial. *Schizophr. Res.* (2018). doi:10.1016/j.schres.2018.02.047
 198. Gur, S. *et al.* Mortality, morbidity and medical resources utilization of patients with schizophrenia: A case-control community-based study. *Psychiatry Res.* **260**, 177–181 (2018).
 199. Nasrallah, H. A. An overview of common medical comorbidities in patients with schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry* **66**, 3–4 (2005).
 200. Sharpe, R. A., Curry, W., Brown, R. & Shankar, R. A public health approach to reducing

- health inequalities among adults with autism. *Br. J. Gen. Pract.* **69**, 534–535 (2019).
201. Bishop-Fitzpatrick, L. & Rubenstein, E. The physical and mental health of middle aged and older adults on the autism spectrum and the impact of intellectual disability. *Res. Autism Spectr. Disord.* **63**, 34–41 (2019).
202. Xue Ming, Brimacombe, M., Chaaban, J., Zimmerman-Bier, B. & Wagner, G. C. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J. Child Neurol.* **23**, 6–13 (2008).
203. Nicolaidis, C., Kripke, C. C. & Raymaker, D. Primary care for adults on the autism spectrum. *Med. Clin. North Am.* **98**, 1169–91 (2014).
204. Cashin, A., Buckley, T., Trollor, J. N. & Lennox, N. A scoping review of what is known of the physical health of adults with autism spectrum disorder. *J. Intellect. Disabil.* 1744629516665242 (2016). doi:10.1177/1744629516665242
205. Howlin P., M. P. Adults With Autism Spectrum Disorders. **57**, 275–283 (2012).
206. Jones, K. B. *et al.* A description of medical conditions in adults with autism spectrum disorder: A follow-up of the 1980s Utah/UCLA Autism Epidemiologic Study. *Autism* (2015). doi:10.1177/1362361315594798
207. Pieczenik, S. R. & Neustadt, J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp. Mol. Pathol.* **83**, 84–92 (2007).
208. Bolton, P. F. *et al.* Epilepsy in autism: Features and correlates. *Br. J. Psychiatry* **198**, 289–294 (2011).
209. Kohane, I. S. *et al.* The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders. *PLoS One* **7**, e33224 (2012).
210. Viscidi, E. W. *et al.* Clinical characteristics of children with autism spectrum disorder and co-occurring epilepsy. *PLoS One* **8**, e67797 (2013).
211. Canitano, R. Epilepsy in autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 61–66 (2007). doi:10.1016/j.rasd.2013.12.012
212. Neale B *et al.* Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* **485**, 242–245 (2013).
213. Roak, B. J. O. *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* **485**, 246–250 (2012).
214. Sanders, S., Murtha, M. & Gupta, A. De novo mutations revealed by whole exome

- sequencing are strongly associated with autism. *Nature* **485**, 237–241 (2012).
215. Niruj Agrawal and Marco Mula. Treatment of psychoses in patients with epilepsy: an update. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **9**: 1-10, (2019).
 216. Mannion, A. & Leader, G. Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Rev. J. Autism Dev. Disord.* **1**, 11–17 (2013).
 217. Kang, V., Wagner, G. C. & Ming, X. Gastrointestinal Dysfunction in Children With Autism Spectrum Disorders. *Autism Res.* (2014). doi:10.1002/aur.1386
 218. Finsterer, J. & Frank, M. Gastrointestinal manifestations of mitochondrial disorders: A systematic review. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* **10**, 142–154 (2017).
 219. De Hert, M. *et al.* Second-generation antipsychotics and constipation: A review of the literature. *Eur. Psychiatry* **26**, 34–44 (2011).
 220. Every-Palmer, S., Inns, S. J., Grant, E. & Ellis, P. M. Effects of Clozapine on the Gut: Cross-Sectional Study of Delayed Gastric Emptying and Small and Large Intestinal Dysmotility. *CNS Drugs* **33**, 81–91 (2019).
 221. Waters, F., Naik, N. & Rock, D. Sleep, fatigue, and functional health in psychotic patients. *Schizophr. Res. Treatment* **2013**, 425826 (2013).
 222. Verge, B. *et al.* New Evidence for the Involvement of Mitochondrial Inheritance in Schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry* **73**, 684–690 (2012).
 223. Fryar, C. D., Gu, Q. & Ogden, C. L. Anthropometric reference data for children and adults: United States, 2007-2010 - National Center for Health Statistics. *Vital Heal. Stat.* **11**, 2007–2010 (2012).
 224. Must A, Phillips SM, Curtin C, Anderson SE, Maslin M, Lividini K, B. L. Comparison of sedentary behaviors between children with autism spectrum disorders and typically developing children. *Autism* **18**, 376–84 (2014).
 225. Chow, J., Rahman, J., Achermann, J. C., Dattani, M. T. & Rahman, S. Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nature Reviews Endocrinology* **13**, 92–104 (2017).
 226. Suvisaari, J., Keinänen, J., Eskelinen, S. & Mantere, O. Diabetes and Schizophrenia. *Curr. Diab. Rep.* **16**, 1–10 (2016).
 227. Castillo, R. I. *et al.* From molecules to the clinic: Linking schizophrenia and metabolic syndrome through sphingolipids metabolism. *Frontiers in Neuroscience* **10**, (2016).

228. Øyane, N. M. F. & Bjørvatn, B. Sleep disturbances in adolescents and young adults with autism and Asperger syndrome. *Autism* **9**, 83–94 (2005).
229. Tani, P. *et al.* Insomnia is a frequent finding in adults with Asperger syndrome. *BMC Psychiatry* **3**, 1–10 (2003).
230. Accardo, J. a. & Malow, B. a. Sleep, epilepsy, and autism. *Epilepsy Behav.* **47**, 202–206 (2014).
231. Mannion, A., Brahm, M. & Leader, G. Comorbid Psychopathology in Autism Spectrum Disorder. *Rev. J. Autism Dev. Disord.* **1**, 124–134 (2014).
232. Croen, L. A. *et al.* The health status of adults on the autism spectrum. *Autism* **19**, 814–23 (2015).
233. Hollway, J. A. & Aman, M. G. Sleep correlates of pervasive developmental disorders: A review of the literature. *Res. Dev. Disabil.* **32**, 1399–1421 (2011).
234. Calhoun, S. L. *et al.* No relationship between neurocognitive functioning and mild sleep disordered breathing in a community sample of children. *J. Clin. Sleep Med.* **5**, 228–234 (2009).
235. Richdale, A. L. & Schreck, K. a. Sleep problems in autism spectrum disorders: prevalence, nature, & possible biopsychosocial aetiologies. *Sleep Med. Rev.* **13**, 403–11 (2009).
236. Rydzewska, E. *et al.* Prevalence of long-term health conditions in adults with autism: Observational study of a whole country population. *BMJ Open* **8**, 1–11 (2018).
237. Case, L., Ross, S. & Yun, J. Physical activity guideline compliance among a national sample of children with various developmental disabilities. *Disabil. Health J.* 100881 (2019). doi:10.1016/j.dhjo.2019.100881
238. Wise, E. Aging in Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* (2019). doi:10.1016/j.jagp.2019.12.001
239. Rodrigues, T. *et al.* Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis - Potentially implicated mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 136–142 (2002).
240. Chen, G. *et al.* The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J. Neurochem.* **72**, 879–882 (1999).
241. Matlib, M., Shing-woong, L., Depover, A. & Schwartz, A. A specific inhibitory action of

- certain benzothiazepines and benzodiazepines on the sodium-calcium exchange process of heart and brain mitochondria. *Eur. J. Pharmacol.* **89**, 327–328 (1983).
242. Kasote, D. M., Hegde, M. V. & Katyare, S. S. Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: Cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy. *BioFactors* **39**, 392–406 (2013).
243. Habtemariam, S. Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: Addressing brain injury, cerebral ischemia, cognition deficit, anxiety, and depression. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, (2019).
244. Knez, J. *et al.* Correlates of Peripheral Blood Mitochondrial DNA Content in a General Population. *Am. J. Epidemiol.* **183**, 138–146 (2016).
245. Shim, H. B., Arshad, O., Gadawska, I., Côté, H. C. F. & Hsieh, A. Y. Y. Platelet mtDNA content and leukocyte count influence whole blood mtDNA content. *Mitochondrion* **52**, 108–114 (2020).
246. Knez, J. *et al.* Peripheral blood mitochondrial DNA content in relation to circulating metabolites and inflammatory markers: A population study. *PLoS One* **12**, 1–13 (2017).
247. Cecchino, G. N. & Garcia-Velasco, J. A. Mitochondrial DNA copy number as a predictor of embryo viability. *Fertil. Steril.* **111**, 205–211 (2019).
248. Haotian Wu, Alexandra M Huffman, Brian W Whitcomb, Srinivaari Josyulaa, Suzanne Labrie, Ellen Tougias, Tayyab Rahil, Cynthia K Sites, and J. R. P. Sperm mitochondrial DNA measures and semen parameters among men undergoing fertility treatment. *Reprod Biomed Online* **38**, 66–75 (2019).
249. Otten, A. B. C. & Smeets, H. J. M. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing. *Hum. Reprod. Update* **21**, 671–689 (2015).
250. Cosemans, C. *et al.* Breastfeeding predicts blood mitochondrial DNA content in adolescents. *Sci. Rep.* **10**, 1–9 (2020).
251. Wang, D. *et al.* Differential mitochondrial DNA copy number in three mood states of bipolar disorder. *BMC Psychiatry* **18**, 149 (2018).
252. Yamaki, N. *et al.* Mitochondrial DNA copy number of peripheral blood in bipolar disorder: The present study and a meta-analysis. *Psychiatry Res.* **269**, 115–117 (2018).
253. Fries, G. R. *et al.* Accelerated epigenetic aging and mitochondrial DNA copy number in

- bipolar disorder. *Transl. Psychiatry* **7**, (2017).
254. Scaini, G. *et al.* Perturbations in the apoptotic pathway and mitochondrial network dynamics in peripheral blood mononuclear cells from bipolar disorder patients. *Transl. Psychiatry* **7**, e1111 (2017).
255. Bai, Y. M. *et al.* Comparison of pro-inflammatory cytokines among patients with bipolar disorder and unipolar depression and normal controls. *Bipolar Disord.* **17**, 269–277 (2015).
256. Morris, G. *et al.* A model of the mitochondrial basis of bipolar disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **74**, 1–20 (2017).
257. Otsuka, I. *et al.* Aberrant telomere length and mitochondrial DNA copy number in suicide completers. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
258. Cai, N. *et al.* Molecular signatures of major depression. *Curr. Biol.* **25**, 1146–1156 (2015).
259. Chung, J. K., Lee, S. Y., Park, M., Joo, E. J. & Kim, S. A. Investigation of mitochondrial DNA copy number in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res.* **282**, 112616 (2019).
260. Tyrka, A. R. *et al.* Alterations of Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length with Early Adversity and Psychopathology. *Biol. Psychiatry* **79**, 78–86 (2016).
261. Wang, X. *et al.* Association of mitochondrial DNA in peripheral blood with depression, anxiety and stress- and adjustment disorders in primary health care patients. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **27**, 751–758 (2017).
262. Chen, S. *et al.* Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells is associated with childhood autism. *BMC Psychiatry* **15**, 50 (2015).
263. Yoo, H. J., Park, M. & Kim, S. A. Difference in mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells between probands with autism spectrum disorders and their unaffected siblings. *World J. Biol. Psychiatry* **18**, 151–156 (2017).
264. Lu, B. *et al.* Clinica Chimica Acta Decreased mitochondrial DNA copy number in children with cerebral palsy quanti fi ed by droplet digital PCR. *Clin. Chim. Acta* **503**, 122–127 (2020).
265. Alvarez-mora, M. I. *et al.* Fragile X-associated tremor / ataxia syndrome : Regional decrease of mitochondrial DNA copy number relates to clinical manifestations. *Genes*,

- brain Behav.* 1–8 (2019). doi:10.1111/gbb.12565
266. Pinar E. Coskun, Joanne Wyrembak, Olga Derbereva, Goar Melkonian, Eric Doranc, Ira T. Lott, Elizabeth Head, Carl W. Cotmand, and D. C. W. Systemic Mitochondrial Dysfunction and the Etiology of Alzheimer’s Disease and Down Syndrome Dementia. *J Alzheimers Dis.* **20**, 1–32 (2010).
267. Singh, K. *et al.* Developmental regression and mitochondrial function in children with autism. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **7**, 683–694 (2020).
268. Edmonds, J. L. *et al.* The otolaryngological manifestations of mitochondrial disease and the risk of neurodegeneration with infection. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **128**, 355–362 (2002).
269. Shoffner, J. *et al.* Fever plus mitochondrial disease could be risk factors for autistic regression. *J. Child Neurol.* **25**, 429–434 (2010).
270. Giulivi, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction in autism. *JAMA* **304**, 2389–96 (2010).
271. Torrell, H. *et al.* Mitochondrial dysfunction in a family with psychosis and chronic fatigue syndrome. *Mitochondrion* **34**, (2017).
272. Li, Z. *et al.* Association of telomere length and mitochondrial DNA copy number with risperidone treatment response in first-episode antipsychotic-naïve schizophrenia. *Sci. Rep.* **5**, 1–7 (2015).
273. Rollins, B. L. *et al.* Mitochondrial Complex I Deficiency in Schizophrenia and Bipolar Disorder and Medication Influence. *Mol. Neuropsychiatry* **3**, 157–169 (2017).
274. Mamdani, F., Rollins, B., Morgan, L., Sequeira, P. A. & Vawter, M. P. The somatic common deletion in mitochondrial DNA is decreased in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **159**, 370–375 (2014).
275. Chestkov, I. V *et al.* ROS-Induced DNA Damage Associates with Abundance of Mitochondrial DNA in White Blood Cells of the Untreated Schizophrenic Patients. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 8587475 (2018).
276. Kriisa, K. *et al.* Antipsychotic treatment reduces indices of oxidative stress in first episode psychosis patients. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 7–13 (2016).
277. Missailidis, D. *et al.* An isolated complex v inefficiency and dysregulated mitochondrial function in immortalized lymphocytes from ME/CFS patients. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–26

- (2020).
278. Picard, M. *et al.* A Mitochondrial Health Index Sensitive to Mood and Caregiving Stress. *Biol. Psychiatry* **84**, 9–17 (2018).
 279. Mengel-From, J. *et al.* Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum. Genet.* 1149–1159 (2014). doi:10.1007/s00439-014-1458-9
 280. Casademont, J. *et al.* Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* **27**, 284–288 (2007).
 281. Scaini, G. *et al.* Second generation antipsychotic-induced mitochondrial alterations: Implications for increased risk of metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **28**, 369–380 (2018).
 282. Kumar, P. *et al.* Mitochondrial DNA copy number is associated with psychosis severity and anti-psychotic treatment. *Sci. Rep.* **8**, 12743 (2018).
 283. Grünig, D., Szabo, L., Marbet, M. & Krähenbühl, S. Valproic acid affects fatty acid and triglyceride metabolism in HepaRG cells exposed to fatty acids by different mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **177**, 113860 (2020).
 284. Smith, P. M. & Lightowers, R. N. Altering the balance between healthy and mutated mitochondrial DNA. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 309–13 (2011).
 285. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Hultman C, Larsson H, R. A. The Heritability of Autism Spectrum Disorder Analysis method B. *JAMA* **318**, 1182–1184 (2017).
 286. Hamdan, F. F. *et al.* High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **101**, 664–685 (2017).
 287. Napoli, E., Wong, S. & Giulivi, C. Evidence of reactive oxygen species-mediated damage to mitochondrial DNA in children with typical autism. *Mol. Autism* **4**, 2 (2013).
 288. Avdjieva-Tzavella, D. *et al.* Mitochondrial DNA mutations in two bulgarian children with autistic spectrum disorders. *Balkan J. Med. Genet.* **15**, 47–54 (2012).
 289. Pons, R. *et al.* Mitochondrial DNA abnormalities and autistic spectrum disorders. *J. Pediatr.* **144**, 81–85 (2004).
 290. Patowary, A., Nesbitt, R., Archer, M., Bernier, R. & Brkanac, Z. Next Generation Sequencing

- Mitochondrial DNA Analysis in Autism Spectrum Disorder. *Autism Res.* **10**, 1338–1343 (2017).
291. Wang, Y., Picard, M. & Gu, Z. Genetic Evidence for Elevated Pathogenicity of Mitochondrial DNA Heteroplasmy in Autism Spectrum Disorder. *PLoS Genet.* **12**, e1006391 (2016).
292. Santorsola, M. *et al.* A multi-parametric workflow for the prioritization of mitochondrial DNA variants of clinical interest. *Hum. Genet.* **135**, 121–36 (2016).
293. Ou, Y. H. *et al.* Aminoglycoside-associated nonsyndromic deafness and speech disorder in mitochondrial A1555G mutation in a family A case report. *Med. (United States)* **97**, 4–7 (2018).
294. Finsterer, J. Variant m.1555A>G in MT-RNR1 causes hearing loss and multiorgan mitochondrial disorder. *Medicine (Baltimore)*. **6**, 2019–2020 (2020).
295. Ye, K., Lu, J., Ma, F., Keinan, A. & Gu, Z. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10654–9 (2014).
296. Sequeira, A. *et al.* Mitochondrial Mutations in Subjects with Psychiatric Disorders. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
297. Nissanka, N. & Moraes, C. T. Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO Rep.* **21**, 1–12 (2020).
298. Rubino, F. *et al.* HmtDB, a genomic resource for mitochondrion-based human variability studies. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1150-9 (2012).
299. Bertolin, C. *et al.* Analysis of complete mitochondrial genomes of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *J. Hum. Genet.* **56**, 869–72 (2011).
300. Gonçalves, V. F. *et al.* Examining the role of common and rare mitochondrial variants in schizophrenia. *PLoS One* **13**, 1–9 (2018).
301. Li, H. *et al.* mtDNA Heteroplasmy in Monozygotic Twins Discordant for Schizophrenia. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4343–4352 (2016).
302. Hudson, G., Gomez-Duran, A., Wilson, I. J. & Chinnery, P. F. Recent Mitochondrial DNA Mutations Increase the Risk of Developing Common Late-Onset Human Diseases. *PLoS Genet.* **10**, (2014).

303. Gonzalez-Quereda, L. *et al.* Targeted next-generation sequencing in a large cohort of genetically undiagnosed patients with neuromuscular disorders in Spain. *Genes (Basel)*. **11**, 1–12 (2020).
304. Coleman M, B. J. Autism and lactic acidosis. *J Autism Dev Disord* **15**, 1–8 (1985).
305. Kato, K. *et al.* Effects of phencyclidine on behavior and extracellular levels of dopamine and its metabolites in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **150**, 163–169 (2000).
306. Bergersen, L. H. Lactate transport and signaling in the brain: Potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 176–185 (2015).
307. Dean, B., Thomas, N., Scarr, E. & Udawela, M. Evidence for impaired glucose metabolism in the striatum, obtained postmortem, from some subjects with schizophrenia. *Transl. Psychiatry* **6**, e949 (2016).
308. Beasley, C. L. *et al.* Metabolic abnormalities in fronto-striatal-thalamic white matter tracts in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **109**, 159–166 (2009).
309. Sullivan, C. R. *et al.* Measurement of lactate levels in postmortem brain, iPSCs, and animal models of schizophrenia. *Sci. Rep.* **9**, 1–7 (2019).
310. Rowland, L. M. *et al.* Elevated brain lactate in schizophrenia: a 7 T magnetic resonance spectroscopy study. *Transl. Psychiatry* **6**, e967 (2016).
311. Pinacho, R. *et al.* The glial phosphorylase of glycogen isoform is reduced in the dorsolateral prefrontal cortex in chronic schizophrenia. *Schizophr. Res.* **177**, 37–43 (2016).
312. Regenold, W. T. *et al.* Elevated Cerebrospinal Fluid Lactate Concentrations in Patients with Bipolar Disorder and Schizophrenia: Implications for the Mitochondrial Dysfunction Hypothesis. *Biol. Psychiatry* **65**, 489–494 (2009).
313. Morland, C. *et al.* The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain. *J. Neurosci. Res.* **93**, 1045–1055 (2015).
314. e Silva, L. F. S., Brito, M. D., Yuzawa, J. M. C. & Rosenstock, T. R. Mitochondrial Dysfunction and Changes in High-Energy Compounds in Different Cellular Models Associated to Hypoxia: Implication to Schizophrenia. *Sci. Rep.* **9**, 1–19 (2019).
315. Hagihara, H. *et al.* Decreased Brain pH as a Shared Endophenotype of Psychiatric Disorders. *Neuropsychopharmacology* **43**, 459–468 (2018).

316. Da Silva, T. *et al.* Mitochondrial function in individuals at clinical high risk for psychosis. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
317. Valiente-pallejà, A. *et al.* Increased blood lactate levels during exercise and mitochondrial DNA alterations converge on mitochondrial dysfunction in schizophrenia. *Schizophr. Res.* (2020). doi:10.1016/j.schres.2020.03.070
318. Dikoma C. Shungua, Nora Weiduschata, James W. Murroughb, Xiangling Maoa, Sarah Pillemerb, Jonathan P. Dykea, Marvin S. Medowc, Benjamin H. Natelsond, Julian M. Stewartc, and S. J. M. Increased ventricular lactate in chronic fatigue syndrome. III. Relationships to cortical glutathione and clinical symptoms implicate oxidative stress in disorder pathophysiology. *NMR Biomed.* **23**, 1–7 (2012).
319. Ostermann, S. *et al.* Exercise reveals the interrelation of physical fitness, inflammatory response, psychopathology, and autonomic function in patients with schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **39**, 1139–1149 (2013).
320. Ben-Shachar, D. Mitochondrial multifaceted dysfunction in schizophrenia; complex I as a possible pathological target. *Schizophr. Res.* (2016). doi:10.1016/j.schres.2016.10.022
321. Steiner, J. *et al.* Clozapine promotes glycolysis and myelin lipid synthesis in cultured oligodendrocytes. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–11 (2014).
322. Chan, S. T., Mccarthy, M. J. & Vawter, M. P. Psychiatric drugs impact mitochondrial function in brain and other tissues. *Schizophr. Res.* (2019). doi:10.1016/j.schres.2019.09.007
323. Halim, N. D. *et al.* Increased lactate levels and reduced pH in postmortem brains of schizophrenics: Medication confounds. *J. Neurosci. Methods* **169**, 208–213 (2008).
324. Khemakhem, A. M., Frye, R. E., El-Ansary, A., Al-Ayadhi, L. & Bacha, A. Ben. Novel biomarkers of metabolic dysfunction in autism spectrum disorder: potential for biological diagnostic markers. *Metab. Brain Dis.* **32**, 1983–1997 (2017).
325. Hassan, M. H., Sakhr, H. M., Desoky, T., Bakri, A. H. & Gabra, R. H. Possible Metabolic Alterations among Autistic Male Children: Clinical and Biochemical Approaches. *J. Mol. Neurosci.* **67**, 204–216 (2018).
326. Frye, R. E. & Rossignol, D. A. Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders. *Pediatr. Res.* **69**, 41R–7R (2011).

327. Rossignol, D. A. & Frye, R. E. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. *Mol. Psychiatry* **17**, 389–401 (2012).
328. Rossignol, D. A. & Frye, R. E. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* **17**, 290–314 (2012).
329. Nasca, A., Nardecchia, F., Commone, A. & Semeraro, M. Clinical and Biochemical Features in a Patient With Mitochondrial Fission Factor Gene Alteration. **9**, 1–8 (2018).
330. Schurr, A. & Payne, R. S. Lactate , not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: An in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* **147**, 613–619 (2007).

Les figures i imatges han estat creades amb [BioRender.com](https://www.biorender.com).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ANÀLISI DE LA FUNCIO MITOCONDRIAL EN TRASTORNS DEL NEURODESENVOLUPAMENT
Alba Valiente Pallejà



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI