

Universidad Nacional Autónoma de México  
Faculta de Medicina  
Unidad de Estudios de Posgrado  
Especialidad en Oftalmología

Análisis Molecular de los genes VSX1, SOD1 y AQP5 en  
pacientes mexicanos con queratocono familiar,  
esporádico y distrofia corneal polimorfa posterior

Quiñónez Emmert, Ingrid A

Asesor

Dr. Juan Carlos Centeno Ruíz  
Dr. Raúl Suárez Sánchez

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor y apoyo incondicional

A mi hermana por ayudarme a alcanzar mis metas

A mis profesores por su entrega y dedicación

A mi director de tesis por su paciencia

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	4 -12
II.	OBJETIVO.....	12
III.	JUSTIFICACIÓN.....	12
IV.	MÉTODO.....	13
V.	RESULTADOS.....	14
VI.	DISCUSIÓN.....	15-16
VII.	CONCLUSIÓN.....	16
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	17-19



## I.- INTRODUCCIÓN

El Queratocono (QC), es la distrofia corneal más común, en la cual la córnea desarrolla una forma cónica debida a un adelgazamiento no inflamatorio del estroma. Clásicamente tiene su inicio en la pubertad, es progresiva hasta la tercera o cuarta década de la vida, cuando usualmente se detiene.<sup>1</sup> El adelgazamiento corneal induce astigmatismo irregular, miopía y protrusión corneal (figura 1).

El QC generalmente es bilateral, aunque puede inicialmente afectar sólo un ojo ya que es asimétrico. Los síntomas son muy variables y dependen del estado de progresión de la enfermedad. De forma temprana puede no haber síntomas y usualmente genera disminución de la agudeza visual corregida, mientras que en la enfermedad avanzada se presenta distorsión con pérdida visual importante. Afortunadamente los pacientes con QC no llegan a la ceguera total por su enfermedad.<sup>2</sup>

Frecuentemente se presenta como una condición aislada, sin embargo existen reportes que muestran coexistencia con otros desórdenes. Las asociaciones comúnmente incluidas son síndrome de Down, ictiosis, síndrome de Ehlers Danlos, síndrome de Apert, amaurosis congénita de Leber, neurofibromatosis, síndrome de Bardet-Biedl, prolapso de válvula mitral, aniridia, queratoconjuntivitis vernal, lenticono posterior, distrofia de Avellino, distrofia endotelial de Fuchs, distrofia corneal Polimorfa Posterior (DCPP) y distrofia en Lattice, entre otras

enfermedades.<sup>3</sup> También se ha reportado fuerte asociación de QC en usuarios de lentes de contacto y pacientes con tallado constante de ojos.<sup>4</sup>

La incidencia de QC varía, se estiman entre 50 y 230 x 100 000 habitantes en la población general, aproximadamente 1 x 2000. La prevalencia es de 54.5 x 100 000. todos los grupos étnicos y en ambos sexos por igual.<sup>3,4</sup>

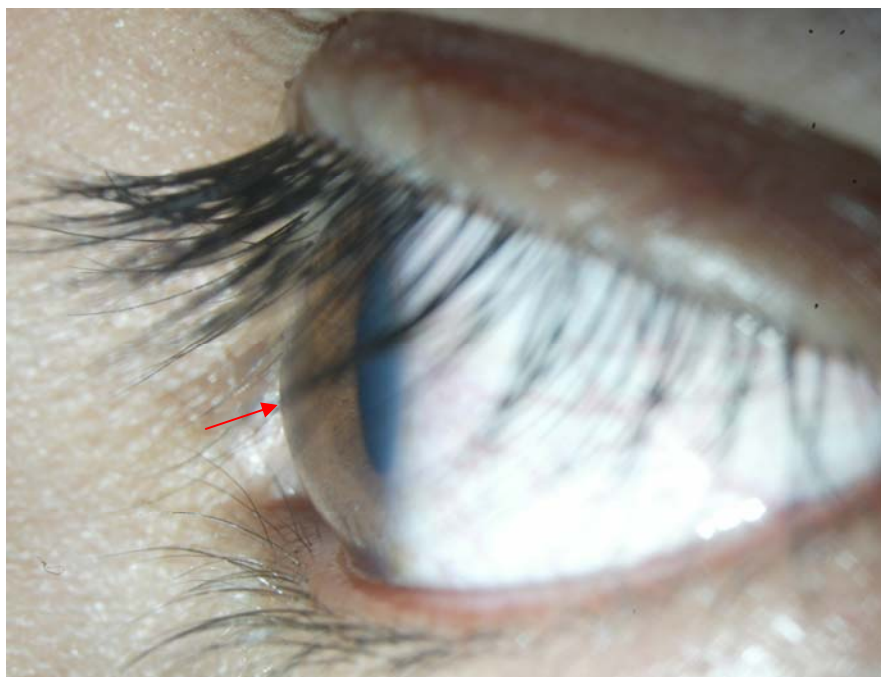


Fig. 1 Paciente del Hospital Conde de Valenciana, en donde se aprecia Protrusión corneal por QC

Los signos clínico también difieren según el grado de progresión. En los casos moderados o avanzados los signos detectables en la córnea por biomicroscopia son adelgazamiento estromal comúnmente inferotemporal, protrusión, anillo de Fleischer, estrías de Vogt, leucomas epiteliales, cicatrices en estroma anterior, nervios corneales prominentes, signo de Munson y Rizzuti.<sup>5</sup>

En los casos avanzados, existen cuadros agudos conocidos como Hidrops, que se presentan con baja visual súbita y dolor, en la biomicroscopia se aprecia inyección ciliar y opacidad estromal difusa generada por rupturas en la membrana de Descemet y edema generado por paso de humor acuoso a través de dichas rupturas (Fig 2). El edema puede persistir por semanas o meses, que disminuye gradualmente con mejoría del dolor y resolución de la hiperemia y opacidad corneal que será remplazada por una cicatriz. <sup>1</sup>

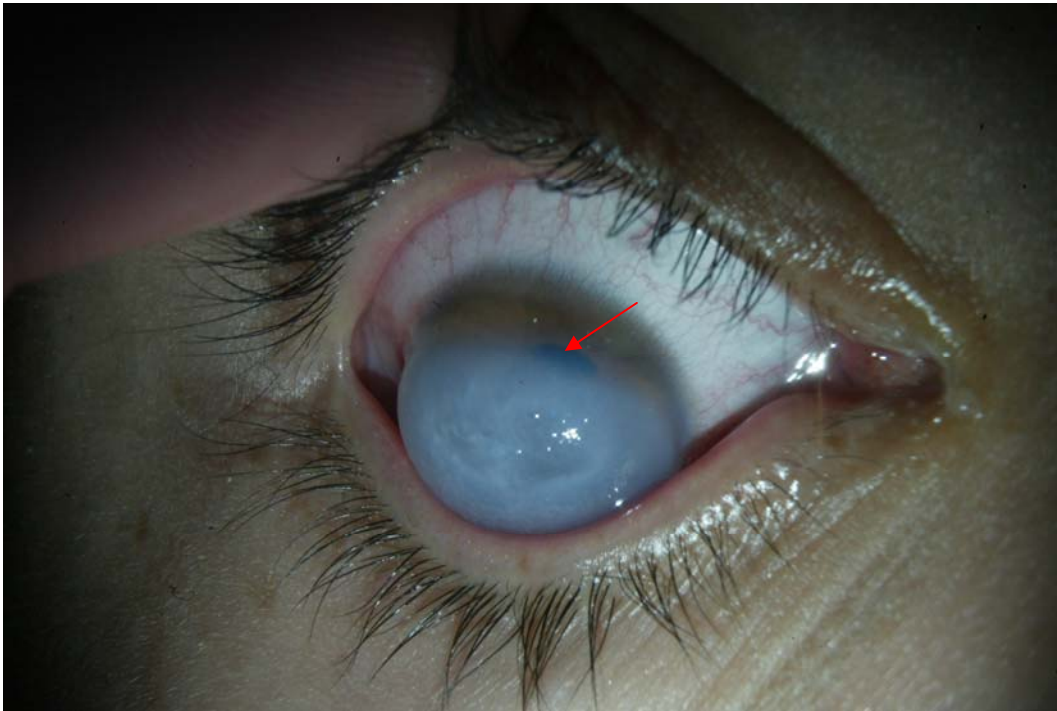


Fig. 2: Paciente de nuestra institución con cuadro agudo de Hidrops, por ruptura de la membrana de Descemet

En la enfermedad temprana, la córnea se aprecia normal a la biomicroscopia, sin embargo puede encontrarse una ligera distorsión de la luz o aplanamiento en las queratometrías. Las sombras “en tijera” o la “gota de aceite” en la retinoscopia son signos útiles para el diagnóstico. <sup>6</sup>



Rabinowitz sugiere que la queratometría  $> 47.20D$ , adelgazamiento de la córnea inferior comparada con la superior  $>1.2D$ , y cambio del eje astigmático mayor de 21 grados sugieren el diagnóstico de QC con una sensibilidad del 98% y una especificidad de 99.5%.

Histopatológicamente, el adelgazamiento estromal, rupturas en la capa de Bowman y el depósito de hierro en las capas basales del epitelio, conforman la triada clásica del QC. La membrana de Descemet raramente se afecta, excepto en las rupturas generadas en cuadros de Hidrops. (Fig.3) <sup>1</sup>

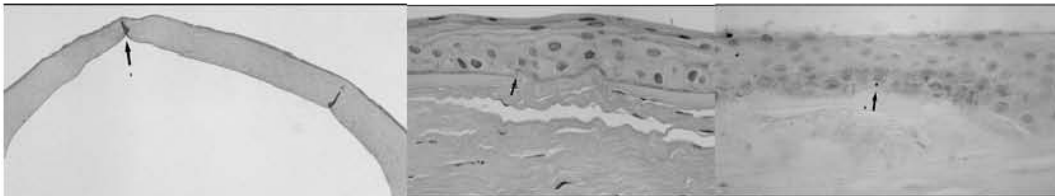


Fig. 3: De Izquierda a Derecha, Flechas: a) Muestra el adelgazamiento estromal, b) Señala ruptura en capa de Bowman, c) Se aprecia depósito de hierro en epitelio

Se ha considerado al QC como una alteración del tejido conectivo. La colágena es un componente corneal importante, ya que da soporte y su disposición genera la transparencia característica de esta estructura. Existen subtipos de colágena, entre los que conforman la córnea se encuentran el I, III, IV, V, VI, VII y VIII, los cuales se distribuyen a través de sus diversas capas (Fig 4).

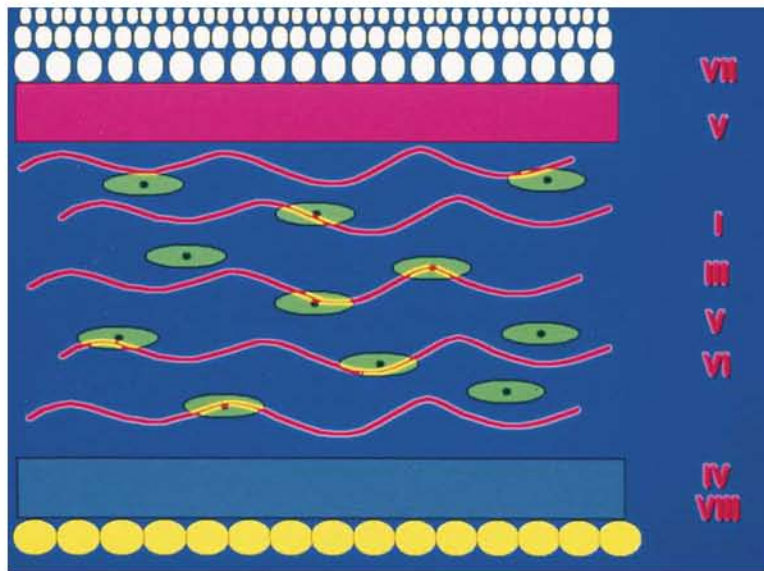


Fig 4 : Distribución de subtipos de colágeno en la córnea, de arriba abajo: Epitelio, Bowman ,Estroma, Descemet, Endotelio (referencia1)

Se han identificado diversos cromosomas que contienen los genes de los subtipos de colágeno y dichos genes pudieran ser excelentes candidatos para la patogénesis del QC.<sup>7,8</sup> Sin embargo, Brancati en 2004 reportó una familia italiana con QC autosómico dominante, con 2 generaciones afectadas, 7 miembros con diagnóstico definitivo de QC y 4 con formas de QC frustrado, se encontró un desorden en el cromosoma 3, región p14-q13, en donde se localiza en el gen de la colágeno COL8A1. El análisis de recombinación genética en esta familia definió una región crítica entre los marcadores D3S1600 y D3S1278, pero no se detectaron mutaciones patológicas en el gen de la colágeno COL8A1.<sup>9</sup>

Es claro que los factores genéticos tienen un papel importante en la etiología del QC. Esto ha sido evidenciado por la existencia de diversos casos familiares,

estudios de concordancia en gemelos y la bilateralidad de la enfermedad. La mayoría de los estudios publicados sugieren una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta o expresión variable, aunque algunos otros han sugerido herencia autosómica recesiva. En análisis previos se reporta concordancia en gemelos monocigóticos mayor que discordancia para el QC, lo que apoya de forma importante la teoría de un origen genético de la enfermedad. Aquellos casos de discordancia en gemelos monocigóticos pueden indicar que un cofactor ambiental, en adición a la susceptibilidad genética son necesarios para manifestar la enfermedad. La naturaleza bilateral del queratocono, sugiere de manera importante la presencia de una base genética.<sup>10</sup>

En los casos de QC familiar se reporta una incidencia del 6 al 23.5%, con penetrancia del 20%. Redmond sugiere que grados altos de astigmatismo, así como el QC frustrado son una expresión incompleta del gen del QC.<sup>10</sup> El estudio con mayor impacto de evidencia epidemiológica de factores genéticos en QC fue el realizado en el Cedars-Sinai Medical Center, el cual estudio a 95 familias con QC, realizado por Wang, que demostró que la prevalencia de QC en familiares de primer grado fue 15 a 67 veces mayor que en la población general.<sup>10</sup>

Li y colaboradores en 2004, examinaron 778 pacientes con QC y encontraron que 116 pacientes presentaban datos clínicos de QC unilateral. Se les realizó seguimiento de 6 meses a 8 años y aproximadamente el 50% de los ojos que en un inicio estaban normales, desarrollaron QC dentro de los 16 años siguientes. El mayor riesgo se apreció en los primeros 6 años.<sup>11</sup>

Atilano en 2005 encontró que las córneas afectadas por QC muestran tendencia a presentar menor proporción de DNA mitocondrial que de DNA nuclear, presentan menos subunidades de citocromo C oxidasa en las zonas adelgazadas, y un aumento significativo en el número de deleciones del DNA mitocondrial, comparado con las córneas de control, lo que sugiere que el mayor estrés oxidativo y la alteración en la integridad del DNA mitocondrial puede contribuir a la patogénesis del QC.<sup>12</sup>

La mutación en el gen VSX1 reportada por Mintz-Hittner en el 2004, se ha relacionado con alteraciones craneofaciales, ausencia del techo de la silla turca, anomalías en el desarrollo del endotelio corneal, y afección del mantenimiento de las células bipolares de los conos en el sistema visual y las células bipolares del sistema auditivo<sup>13</sup>. El gen VSX1 tiene 5 exones y mide 6.2 kb.<sup>14</sup> En el 2001 Ohtoshi y colaboradores determinaron que la estructura exon- intron del gen VSX1 en el humano y el ratón se encuentra totalmente conservada.<sup>15</sup> En varios casos de QC en algunas poblaciones se han demostrado mutaciones puntuales en el gen VSX1 gene (Visual System Homeobox Gene 1).

Heon en el 2002 identificó 2 mutaciones en el gen VSX1, la primera para Distrofia Polimorfa Posterior (DCPP), que es un padecimiento bilateral progresivo y asimétrico que se presenta en épocas tempranas de la vida, la característica microscópica de esta entidad es un endotelio con células multilaminadas con apariencia de células epiteliales o fibroblastos. En la exploración se encuentran

vesículas en la superficie posterior de la córnea y lesiones geográficas grisáceas, puede asociarse a edema estromal, corectopia y adhesiones iridocorneales. La segunda mutación fue para QC.<sup>16</sup>

Una de las mutaciones responsable del QC afecta el dominio y perjudica la conformación de DNA, R166W. Se encontraron otras 2 secuencias alteradas, L159M y G160D, se asoció a QC y DCPD respectivamente, e involucran a una región adyacente al dominio. En un paciente con DCPD grave, que requirió trasplante corneal a los 3 meses de edad se encontró sustitución en G160D, y una cuarta mutación P247R, en esta familia los pacientes con cambio en G160D presentaron sólo DCPD leve a moderada, mientras que la alteración sólo en P247R no generó anomalías corneales.<sup>16</sup>



Fig 5: Flecha: Vesículas en endotelio características de DCPD

Bisceglia y colaboradores en 2005 encontraron en 3 familias con QC una transición de Timina a Citosina en el nucleótido 323 del exon 1 del gen VSX1, resultando en una sustitución de Leucina a Prolina en el aminoácido 17 de la

proteína (L17P), pero estos hallazgos no han sido reproducibles en otros estudios.

17

Existe una asociación reconocida entre el QC y el Síndrome de Down, aproximadamente el 15% de los pacientes con trisomía 21 tienen QC. En el Síndrome de Down se ha visto implicado el gen Superóxido Dismutasa (*SOD1*).

Los estudios genéticos muestran que el QC puede estar relacionado al cromosoma 21 en el cuál se localiza *SOD1*. Dicho gen codifica una proteína de 154 a.a, en estudios muy recientes se muestra una delección intrónica de 7 nucleótidos asociada a QC <sup>18</sup>.

Rabinowitz menciona que la ausencia de transcripción de *AQP5* (acuaporina 5, proteína de membrana reguladora del transporte de agua) se ha identificado en tejido corneal con QC.<sup>19</sup>

## **II. OBJETIVO**

Realizar el análisis de los genes *VSX1*, *SOD1* y *AQP5* en pacientes mexicanos con QC familiar o esporádico y DCPD relacionada.

## **II. OBJETIVO**

Realizar el análisis de los genes *VSX1*, *SOD1* y *AQP5* en pacientes mexicanos con QC familiar o esporádico y DCPD relacionada.

## **III.- JUSTIFICACIÓN**

Debido a los avances de la medicina genética, es importante tratar de determinar el gen afectado en los pacientes con QC, ya que esta entidad afecta predominantemente jóvenes en edad productiva, con gran morbilidad, siendo una de las primeras causas de trasplante en la población mexicana. Además no se han realizado estudios previos de genes relacionados con QC en pacientes mexicanos.

#### IV.- MÉTODOS

Nueve pacientes fueron incluidos en el estudio: Cinco tuvieron diagnóstico de QC familiar, 3 de QC esporádico asociado a DCPD y un paciente con DCPD aislada.

A todos los pacientes se les realizó evaluación oftalmológica completa, microscopia especular, topografía corneal, estudio genealógico y análisis molecular de las uniones exon/intron y de las regiones codificantes de los genes *VSX1* (2158), *SOD1* (200) y *AQP5* (630). En cada paciente se analizaron las 2158 bases nucleotídicas del gen *VSX1*, las 630 bases del gen *AQP5* y un fragmento de al menos 200 bases del gen *SOD1* que incluye la región de 7 bases que se ha reportada con delección en un reporte previo..

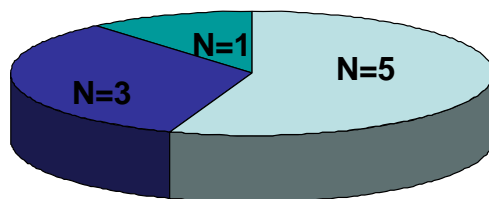


Fig 6: Distribución de fenotipos en nuestro estudio, 5 pacientes con QC, 3 pacientes con QC y DCPD, 1 con DCPD



El DNA genómico se obtuvo a partir de leucocitos sanguíneos, utilizando técnicas estandar y un kit Puregene de Gentra Systems. A partir de cada muestra de DNA se realizó PCR para cada gen utilizando oligonucleótidos específicos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa a partir de los cuales se recortaron las bandas con el DNA amplificado. El DNA fue purificado a partir de la banda de agarosa y el producto fue utilizado como templado para una segunda PCR en la que se utilizaron didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia (BigDye Terminator, Applied Biosystems, Foster City, USA).

## V.- RESULTADOS

Después de la secuenciación de las regiones codificantes y de las uniones exon/intron de los genes *VSX1* y *AQP5* y de un fragmento de 200 bases del gen *SOD1*, no se encontraron mutaciones en ningún paciente. Se reconocieron dos variantes del intron 1 en el gen *AQP5*, sin embargo, la frecuencia de estas variantes en nuestros pacientes es similar a la encontrada en el DNA del grupo control por lo que se consideró que no tienen relación con la enfermedad.

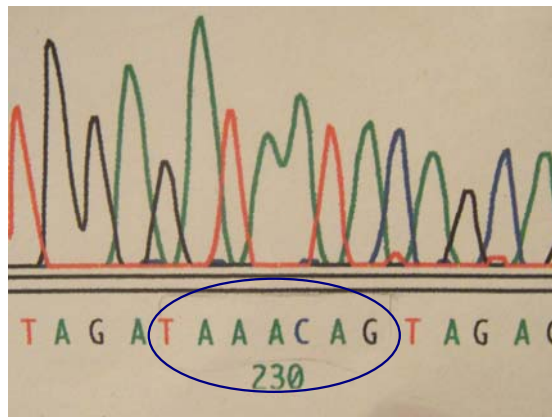


Fig 7: Paciente #3 de nuestro estudio: Gen *SOD1*, muestra secuencia normal con tracto de 7 nucleótidos asociado a QC. En todos los pacientes esta secuencia estuvo presente, descartándose la delección reportada previamente

## VI.- DISCUSIÓN

La genética del QC es extremadamente compleja y heterogénea, todo parece indicar que esta entidad es causada por múltiples genes y en muchas ocasiones puede ser el resultado de interacciones entre los genes y los factores ambientales, como el tallado de ojos y el uso de lentes de contacto, todo esto hace difícil identificar claramente un solo defecto genético. Las mejores oportunidades para identificar genes es en poblaciones con alta concentración de pacientes con QC,

debido a que se minimiza la heterogeneidad y el análisis genético tiene mayor validez.

La naturaleza de la enfermedad sugiere que los diferentes subtipos genéticos pueden resultar en diferentes mutaciones y no todos los casos familiares siguen los patrones característicos de herencia mendeliana.

A pesar del hecho de que los avances en el conocimiento de la genética molecular del QC han sido pocos, los marcadores genéticos en familias con QC proveen indicadores de una anomalía genética que causa un adelgazamiento corneal no inflamatorio, el continuar investigando, posiblemente nos lleve a una posible terapia génica para retardar la progresión de la enfermedad en individuos de alto riesgo.

La delección de 7 nucleótidos reportada en el gen SOD1, no fue encontrada en los pacientes de nuestro estudio, lo que nos indica que dicha mutación no se encuentra en todos los pacientes con QC, y puede tener cierta preferencia racial, así mismo no encontramos mutación en el gen SOD1 en la población mexicana de nuestro estudio.

Este es el primer trabajo en el que se analiza el gen de AQP5, debido a la ausencia de transcripción antes mencionada por Rabinowitz en pacientes con QC, consideramos que pudiera ser un gen involucrado en la patogénesis de la enfermedad, sin embargo no encontramos diferencia respecto al grupo control.



## VII.- CONCLUSIONES

Es el primer análisis del gen de AQP5 como parte de la patogénesis del QC.

A pesar de que la muestra es pequeña, nuestros resultados sugieren que las mutaciones en *VSX1*, *SOD1* y *AQP5* no están comúnmente asociadas al QC en nuestra población.

Estos resultados indican que existe una heterogeneidad genética considerable entre las diferentes poblaciones con QC.

No se encontró relación genética entre el QC y la DCPD en este estudio.

El análisis genético de grupos más numerosos, de pacientes con QC de diferentes orígenes étnicos es necesario para identificar la contribución de cada gen relacionado con la etiología de esta entidad.

## VIII.- REFERENCIAS

- 1.- Y Rabinowitz, Keratoconus, Mayor Review, Survey of Ophthalmology, Volume 42, No. 4, January- February 1998
- 2.- Lee LR, Hirst LW, Readshaw G: Clinical detection of unilateral keratoconus. Aust N Z J Ophthalmol 23:129–133, 1995
- 3.- Sharif KW, Casey TA, Colart J: Prevalence of mitral valve prolapse in Keratoconus patients. J R Soc Med 85:446–448,1992
- 4.- Krachmer JH, Feder RS, Belin MW: Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. Surv Ophthalmol 28:293–322, 1984
- 5.- Maguire LJ, Meyer RF: Ectatic corneal degenerations, The Cornea. 1988, pp 485–510
- 6.- Rabinowitz YS, Klyce SD, Krachmer JH, et al: Videokeratography, keratoconus, and refractive surgery. Opinions. Refract Corneal Surg 5:403–407, 1992
- 7.- Byers PH: Disorders of collagen biosynthesis and structure, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): Metabolic Basis of Inherited Disease. New York, McGraw Hill, 1995, ed 7, pp 4029–4077
- 8.- Zimmerman DL, Fischer RW, Winterhalter KH, et al: Comparitive studies of collagens in normal and keratoconus corneas, Exp Eye Res 46:431–442, 1988
- 9.- Brancati, Valente et al: A locus for autosomal dominant Keratoconus maps to human chromosome 3p14-q13. J Med Genet 41:188-192, 2004

- 10.- Y Rabinowitz, The genetics of keratoconus, *Ophthalmology Clinics of North America*, Volume 16, 2003 607-620
- 11.- Li, Rabinowitz et al: Longitudinal study of the normal eyes in unilateral Keratoconus patients. *Ophthalmology*, 111: 440-446, 2004
- 12.- Atilano, Coskun, et al: Accumulation of mitochondrial DNA damage in Keratoconus corneas. *Invest Ophthalm. Vis. Sci* 46: 1256-1263, 2005
- 13.- H Mintz-Hittner et al. *VSX1 (RINX) Mutation with Craniofacial Anomalies, Empty Sella, Corneal Endothelial Changes, and Abnormal Retinal and Auditory Bipolar Cells*, *Ophthalmology*, 2004, 111: 828-836.
- 14.- Hayashi, Huang: RINX (*VSX1*) a novel homeobox gene expressed in the inner nuclear layer of the adult retina, *Genomics* 67: 128-139, 2000.
- 15.- Ohtoshi, Justice, et al: Isolation and Characterization of *VSX1*, a novel mouse CVC paired-like homeobox gene expressed during embryogenesis and in the retina, *Biochem Biophys Res Commun.* 286: 133-140, 2001
- 16.- E Heón et al. *VSX1: A gene for posterior polymorphus dystrophy and keratoconus*, *Human Molecular Genetics* 2002; 11, 1029-1036.
- 17.- Bisceglia, Ciaschetti, et al: *VSX1* mutational analysis in a series of Italian patients affected by Keratoconus: detection of a novel mutation. *Invest Ophthalm Vis Sci*, 46: 39-45, 2005
- 18.- N Udar, et al. *SOD1: A Candidate Gene of Keratoconus*, *IOVS* 2006, 47, 3345-3351

- 19.-Y Rabinowitz et al. Gene Expression Profile Studies of Human Keratoconus Cornea for NEIBank: A Novel Cornea-Expressed Gene and the Absence of Transcripts of Aquaporin 5, IOVS 2005; 46, 1239-1246
- 20.- H Hutchings, et al. Identification of a new locus for isolated familial keratoconus at 2p24, J Med Genet 2005; 42: 88-94
- 21.- Duke-Elder S, Leigh AG: System of ophthalmology. Diseases of the outer eye, Vol 8. London, 1965, pp 964–976