



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
FUNDACIÓN "CONDE DE VALENCIANA"

DETECCIÓN DE DELECCIONES EN DNA MITOCONDRIAL
HETEROPLÁSMICO POR MEDIO DE PCR EN EL SÍNDROME
DE KEARNS-SAYRE

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el diplomado de especialidad en
OFTALMOLOGÍA

Presenta el

DR. JUAN ARTURO RAMIREZ MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz

ASESORES

Dra. Claudia Elena Murilo Correa

Dra. Jessica Vargas Ortega

Dr. Alejandro Navas Pérez

Dra. Lulu Ululani Gurria Quintana



México, D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INTRODUCCIÓN

Las citopatías mitocondriales son un grupo poco común de enfermedades multisistémicas en las que existe evidencia bioquímica, histopatológica y/o genética de disfunción mitocondrial ⁽¹⁾. Estas enfermedades se manifiestan como síndromes clínicos muy bien definidos y son causadas por defectos moleculares en el DNA mitocondrial (DNAMt) que pueden variar desde mutaciones puntuales a rearrreglos génicos mayores como duplicaciones o deleciones. ⁽²⁾ Los tejidos con gran demanda metabólica de energía oxidativa, tales como el músculo y el cerebro son particularmente susceptibles a las mutaciones del DNAMt. A pesar de que las enfermedades relacionadas al DNAMt pueden ser diferenciadas con base en sus características clínicas, la mayoría de ellas comparte las manifestaciones de acidosis láctica y proliferación masiva de mitocondrias en el músculo, que origina un patrón histopatológico típico de fibras rojas-rasgadas⁽³⁾. Las manifestaciones clínicas inician generalmente en la infancia y pueden incluir acidosis láctica, anemia, miopatía, anomalías neurológicas, alteraciones endocrinas, enfermedades renales, sordera neurosensorial, distrofia retiniana atípica, y defectos en el sistema de conducción cardíaca, siendo estos últimos la principal causa de muerte prematura.

Las tres principales enfermedades asociadas a deleciones del DNAMt son el síndrome de Pearson, la oftalmoplejia externa progresiva crónica y el síndrome de Kearns-Sayre (SKS) ⁽⁴⁾. El SKS es un desorden pleiotrópico, descrito por primera vez en 1958 y que se caracteriza principalmente por oftalmoplejia externa progresiva crónica, retinopatía pigmentaria, bloqueo cardíaco y ataxia cerebelosa ⁽⁵⁾.

La edad usual para su inicio es antes de los 20 años de edad y los sujetos afectados frecuentemente presentan datos clínicos asociados como sordera y alta concentración de proteínas en el líquido cefalorraquídeo ⁽⁶⁾. Los síntomas endocrinos tales como diabetes, hiperaldosteronismo y amenorrea son también comunes.

Las deleciones en el DNAMt asociadas al SKS son variables y fluctúan desde 1.3 hasta 8 kilobases (kb) con distintas cantidades de DNAMt deletado presente en diferentes tejidos, lo que correlaciona con la naturaleza multisistémica del síndrome ⁽⁷⁻⁹⁾. El rearrreglo mas frecuente observado en el DNAMt de pacientes con SKS es la “delección común” de 4977pb (dDNAMt⁴⁹⁷⁷), localizada entre los nucleótidos 8482 y 13640⁽¹⁰⁾ del DNAMt y que se encuentra en aproximadamente 50% de los sujetos afectados ⁽¹⁰⁾. Además de las deleciones del DNAMt mencionadas, se han identificado también mutaciones puntuales en algunos pacientes de SKS ⁽⁶⁾.

Existen pocos reportes en la literatura que describan una investigación oftalmológica completa de pacientes con SKS así como análisis molecular del DNAMt. En este trabajo se reportan los resultados de una evaluación oftalmológica completa así como el análisis del DNAMt en una paciente Mexicana con el diagnóstico de SKS con una técnica de PCR que permite identificar la delección común en el DNAMt de los pacientes con SKS tanto en estado de heteroplásmia como de heteroplasmía.

ABSTRACT

Objective: To describe the clinical data and the results of molecular analyses of the Mitochondrial DNA in a patient with complete Kearns-Sayre Syndrome.

Methods: A female patient aged 15-years with severe ptosis and restricted ocular motility. Molecular analyses of mitochondrial DNA from the patient included PCR amplification of a region where the common Kearns-Sayre deletion is located and Genotype-Phenotype correlations are discussed.

Results: The affected patient showed ptosis, progressive external ophthalmoplegia, pigmentary changes in peripheral retina and right bundle block. Molecular analysis disclosed a ~5kb deletion in mitochondrial DNA and some wild type mtDNA indicating heteroplasmy.

Conclusions: Molecular analysis of mitochondrial DNA confirmed the clinical diagnosis of Kearns-Sayre syndrome. PCR is a fast method to identify the common 4997 bp deletion in Kearns-Sayre syndrome, in this cases PCR diagnosis could avoid invasive methods such as muscular biopsy or spinal tap.

RESUMEN

Objetivo: El síndrome de Kearns-Sayre (SKS) es un desorden neuromuscular causada por defectos genéticos en el DNA mitocondrial siendo deleciones de tamaño variable la alteración mas común. Se describen las características clínicas y los resultados del análisis molecular del DNA mitocondrial en una paciente Mexicana con Síndrome de Kearns-Sayre..

Métodos: Examen Oftalmológico completo caracterización fenotípica del Síndrome de Kearns-Sayre análisis del DNA mitocondrial por reacción en cadena de Polimerasa (PCR). Se discuten correlaciones Genotipo-Fenotipo.

Resultados: La paciente afectada mostró Ptosis, oftalmoplegia progresiva externa cambios pigmentarios en retina periférica y bloqueo de rama derecha del haz de His. Los análisis moleculares arrojaron una deleción de ~5 kb en el DNA mitocondrial además de trazas de DNA sin alteraciones indicando heteroplasmía

Conclusiones: El análisis molecular del DNA mitocondrial confirmó el diagnóstico clínico de síndrome de Kearns-Sayre. La utilización de PCR, como se describe en este trabajo, es un método rápido y económico para el diagnóstico de la deleción común de 4977 pb en el síndrome de Kearns-Sayre. En estos casos, el diagnóstico por PCR evitaría procedimientos diagnósticos invasivos y traumáticos como biopsia muscular o punción lumbar.

Palabras Clave: Síndrome de Kearns-Sayre; estrabismo; oftalmoplejia; DNA mitocondrial; heteroplasmía.

Key Words: Kearns-Sayre syndrome; strabismus; ophthalmoplegia; mitochondrial DNA; heteroplasmy

Sujetos, Material y Métodos

Un paciente femenino de 15 años de edad fue referido a nuestro hospital debido a ptosis y limitación a los movimientos oculares bilaterales de 2 años de evolución. La paciente no contaba con antecedentes de diabetes, hipertensión o trauma y no se encontraron antecedentes familiares de ptosis, miopatías o enfermedades hereditarias. A la exploración oftalmológica, la agudeza visual en el ojo derecho de 20/40(.)20/20 y en el izquierdo de 20/25(.)20/25; las presiones intraoculares fueron de 11 mmHg (OD)y 12 mmHg (OI). La exploración de movimientos oculares mostró marcada limitación en todas las direcciones de la mirada para ambos ojos, con una exotropía de 15 dioptrías prismáticas (Figura 1). La apertura palpebral fue de 7.0 mm en ambos ojos, con función muy disminuida del elevador en ambos ojos (5.0 mm) y reflejo pupila margen de 1.0 mm en ambos ojos. El diámetro pupilar se encontró dentro de rango normal y el reflejo pupilar se halló intacto. No se encontraron alteraciones en el segmento anterior de ambos ojos. La exploración bajo dilatación pupilar del fondo de ojo reveló múltiples cambios pigmentarios con un patrón en “sal y pimienta” en el ecuador y la periferia retiniana de ambos ojos (figura 2).La angiografía con fluoresceína mostró atrofia moderada del epitelio pigmentado de la retina (figura 3), mientras que la electroretinografía evidenció disminución del umbral a respuesta de estímulos luminosos, previa dilatación y adaptación a la oscuridad. La electromiografía cinetológica demostró afección de todos los músculos extraoculares, del músculo frontal y de músculos faringeos. A la electrocardiografía de 12 derivaciones se encontró bloqueo incompleto de rama derecha del haz de His.

El análisis citológico y químico del líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar mostró niveles elevados de proteínas (124mg/dl). Se integró un diagnóstico clínico de Síndrome de Kearns- Sayre y la paciente fue referida al departamento de Genética para diagnóstico.

Estudios Moleculares del DNA mitocondrial: La investigación se realizó previa autorización por el comité de Bioética de la Institución y firma de consentimiento informado por los padres de la paciente. Se tomó a la propósita una muestra de 8 ml de sangre periférica a partir de la que se obtuvo un concentrado plaquetario del que se aisló el DNAm con la ayuda del QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se amplificó DNAm por medio de PCR utilizando los cebadores MT-1 y MT-2 (indicados en la Tabla 1), tomados de Brenner et al ⁽¹³⁾. MT-1 flanquea la región del DNAm de la “delección común” del SKS en la dirección 5’, mientras que MT-4 flanquea el sitio de la delección en sentido 3’. Este par de cebadores amplifica un producto de ~5kb: si la “delección común” de 4977pb del SKS, esta presente, el producto de PCR obtenido será de 550 pb; en caso de que la delección esté ausente, el producto esperado de ~5kb será amplificado; el DNAm heteroplásmico mostrará ambas bandas. Cada 25µl de reacción de PCR incluyeron 150ngs de DNAm, MgCl₂ a una concentración final de 1.5mM, 200µM de cada dNTP, 1.0 µM de cada cebador, y 1.25 U de HotStart *Taq* polimerasa (Quiagen). Los cebadores MT-1 y MT-4 fueron utilizados y el programa de temperaturas incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 15minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, alineamiento a 65.2°C por un minuto y extensión a 72°C por 3 minutos; con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Se utilizó un Marcador standard de DNA de 100 pb para confirmar el tamaño de los productos amplificados. Para descartar la posibilidad de contaminación causada por la amplificación mediante PCR, en cada reacción de PCR se incluyó un tubo en el cual el templado de DNA fue omitido y substituido por H₂O el cual sirvió como control negativo.

Resultados

La Amplificación mediante PCR del DNAm_t de la paciente con SKS mostró la presencia de dos productos: una banda de 550pb que indica la presencia de la “deleción común” de ~5 kb y una banda de DNAm_t silvestre. (Figura 4, línea 3), lo cual demuestra la presencia de mitocondrias con DNA normal y otras con DNA con la deleción (heteroplásmía); en contraste, la amplificación por PCR en el DNAm_t de un sujeto normal evidenció solo una banda de 5 kb excluyendo la presencia de deleción (figura 4, línea 2). Estos resultados fueron consistentes después de 3 amplificaciones independientes de DNAm_t de la paciente y control positivo. En ningún caso, el control negativo produjo amplificación del DNAm_t, excluyendo amplificación debida a contaminación por DNA.

DISCUSIÓN

El SKS es una enfermedad neuromuscular poco frecuente caracterizada por un inicio antes de los 20 años de edad, oftalmoplejia externa progresiva crónica, y degeneración pigmentaria de la retina. Otros hallazgos frecuentes en los individuos afectados incluyen defectos en el sistema de conducción cardiaca, ataxia cerebelosa y concentración elevada de proteínas en liquido cefalorraquídeo (> 100mg/dl).

Los pacientes con SKS presentan ptosis bilateral como uno de los primeros signos de la enfermedad seguida por oftalmoplejia externa progresiva crónica algunos años después. En nuestro caso tanto las lateroversiones como la supra e infraversión se encontraron afectadas, indicando una forma severa de la enfermedad; los defectos en el sistema de conducción cardiaca son comunes en el síndrome (se presentan en 57% de los pacientes) y en nuestro caso se documentó electrocardiográficamente

solo un bloqueo incompleto leve; estos datos nos indican que existe heterogeneidad fenotípica en el SKS, un hecho que puede generar retos y dificultades en el diagnóstico de este síndrome en algunos pacientes. En este contexto es interesante destacar que la “deleción común” del SKS en el DNAMt se encuentra fuertemente relacionada con las alteraciones de conducción cardíaca ^(8,15) Nuestro caso demuestra y confirma esta correlación. El seguimiento cardiovascular está indicado en todo paciente con SKS, para así identificar y tratar tempranamente las alteraciones y complicaciones graves de aparición tardía.

En el SKS, así como en otros desordenes relacionados con DNAMt, puede encontrarse heteroplasmía, una mezcla de DNAMt mutante con silvestre en la misma célula o tejido. La relación de DNA mutante con DNA silvestre es de suma importancia para determinar la severidad del fenotipo en un desorden mitocondrial. La ausencia de Ataxia cerebelosa y sordera neurosensorial en nuestro paciente pudiera estar relacionada a este fenómeno. Por otro lado, la biopsia de músculo estriado es uno de los métodos usuales para el diagnóstico histopatológico de SKS, siendo las fibras rojas-rasgadas el hallazgo característico en el músculo afectado.

Sin embargo, el desarrollo de procedimientos diagnósticos no invasivos como lo es la demostración de la “deleción común” de SKS por medio de PCR, puede evitar la necesidad de toma de biopsias, facilitando el abordaje de los pacientes con sospecha de SKS. La PCR es una útil alternativa para los casos en los que el paciente rechaza la biopsia muscular como método diagnóstico.

Los métodos por PCR para detectar la “deleción común” de SKS están basados en el hecho de que si la deleción está ausente el fragmento de 5kb no será visualizado por su gran tamaño para amplificación; contrariamente, si la deleción está presente, el

pequeño fragmento remanente de DNAm_t, será fácilmente amplificado y detectado (10,13). Una clara desventaja de este abordaje es la imposibilidad de detectar heteroplasmía. En el método descrito en este trabajo fue posible amplificar el pequeño fragmento indicativo de la “delección común” de SKS así como el fragmento de ~5kb de DNAm_t silvestre, demostrando así la presencia de mitocondrias heteroplásmicas. Similarmente, este método podría detectar homoplasmía para DNAm_t mutante o normal del tejido investigado.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders. I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 2000; 355: 299-304.
- 2.- Johns DR. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 1995; 333: 638-644.
- 3.- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 2656-2668.
- 4.- Blakely EL, He L, Taylor RW, Chinnery P F, Lightowlers R N, Schaefer A M and Turnbull M. Mitochondrial DNA deletion in "identical" twins brothers. *J Med Genet* 2004; 41: e19.
- 5.- Kearns TP, Sayre GP. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch Ophthalmol* 1958; 60: 280-289.
- 6.- Degoul F, Nelson I, Lestienne P, Francois D, Romero N, Duboc D. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome and ocular myopathies: genetic, biochemical and morphological studies. *J Neurol Sci* 1991; 101:168-177.
- 7.- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA.. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346.
- 8.- Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New Eng J Med* 1989; 320 1293-1299.

- 9.- Larsson NG, Holme E, Kristiansson B, Oldfors A, Tulinius M. Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 1990; 28:131-136.
- 10.- Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, Matt DW. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod* 1999;5:927-933.
- 11.- Seneca S, Verhelst H, De Meirleir L, Meire F, Ceuterick-De Groote C.. A new mitochondrial point mutation in the transfer RNA(Leu) gene in a patient with a clinical phenotype resembling Kearns-Sayre syndrome . *Arch Neurol* 2001; 58: 1113-1118.
- 12.- Bosbach S, Kornblum C, Schroder R, Wagnere M. Executive and visuospatial deficits in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *Brain* 2003; 126:1231-1240.
- 13.- Brenner CA, Wolny YM, Barritt JA, Matt DW, Munne S, Cohen J.. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:887-892.
- 14 Simaan EM, Mikati MA, Touma EH, Ritig A. Unusual presentation of Kearns-Sayre syndrome in early childhood. *Pediatr Neurol* 1999; 21: 830-831.
- 15.- Young TJ, Shah AK, Lee MH, Hayes DL. Kearns-Sayre syndrome: a case report and review of cardiovascular complications. *Pacing Clin Electrophysiol* 2005; 28:454-457.

DETECCIÓN DE DELECCIONES EN DNA MITOCONDRIAL HETEROPLÁSMICO POR MEDIO DE PCR EN EL SÍNDROME DE KEARNS-SAYRE

PCR-BASED DETECTION OF HETEROPLASMIC DELETED MITOCHONDRIAL DNA IN KEARNS-SAYRE SYNDROME

RAMÍREZ-MIRANDA A¹, NAVAS-PÉREZ A², GURRIA-QUINTANA L², VARGAS-ORTEGA J², MURILLO-CORREA C², ZENTENO JC^{1,3}

RESUMEN

Objetivo: El síndrome de Kearns-Sayre (SKS) es un trastorno neuromuscular causado por defectos genéticos en el DNA mitocondrial siendo deleciones de tamaño variable la alteración más común. Se describen las características clínicas y los resultados del análisis molecular del DNA mitocondrial en una paciente Mexicana con Síndrome de Kearns-Sayre.

Métodos: Examen oftalmológico completo, caracterización fenotípica del Síndrome de Kearns-Sayre y análisis del DNA mitocondrial mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se discuten correlaciones genotipo-fenotipo.

Resultados: La paciente afectada mostró ptosis, oftalmoplejia progresiva externa cambios pigmentarios en retina periférica y bloqueo de rama derecha del haz de His. Los análisis moleculares revelaron una deleción de ~5 kb en el DNA mitocondrial

ABSTRACT

Objective: To describe the clinical data and the results of molecular analyses of the mitochondrial DNA in a patient with Kearns-Sayre Syndrome.

Methods: Molecular analyses of mitochondrial DNA from the patient included PCR amplification of a region where the common Kearns-Sayre deletion is located and Genotype-Phenotype correlations are discussed.

Results: The affected patient showed ptosis, progressive external ophthalmoplegia, pigmentary changes in the peripheral retina and right bundle block. Molecular analysis disclosed a ~5kb deletion in the mitochondrial DNA and some wild type mtDNA indicating heteroplasmy.

Conclusions: Molecular analysis of mitochondrial DNA confirmed the clinical diagnosis of Kearns-Sayre syndrome. PCR provides a rapid method to identify the common 4997 bp deletion in Kearns-

Recibido: 7/11/06. Aceptado: 4/2/08.

Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. México DF. México.

¹ Doctor en Medicina. Departamento de Genética.

² Doctor en Medicina. Departamento de Estrabismo.

³ Doctor en Ciencias. Unidad de Investigación.

Correspondencia:

Arturo Ramírez-Miranda

Chimalpopoca 14 Col. Obrera 06800

México DF, México

E-mail: arturoramir@gmail.com

además de trazas de DNA sin alteraciones indicando heteroplasmia.

Conclusiones: El análisis molecular del DNA mitocondrial confirmó el diagnóstico clínico de síndrome de Kearns-Sayre. La utilización de PCR, como se describe en este trabajo, es un método rápido y económico para el diagnóstico de la delección común de 4977 pb en el síndrome de Kearns-Sayre. En estos casos, el diagnóstico por PCR evitaría procedimientos diagnósticos invasivos y traumáticos como biopsia muscular o punción lumbar.

Palabras Clave: Síndrome de Kearns-Sayre; estrabismo; oftalmoplejia; DNA mitocondrial; heteroplasmia.

Sayre syndrome. In such cases, PCR diagnosis could avoid invasive methods such as muscle biopsy or spinal tap (*Arch Soc Esp Oftalmol* 2008; 83: 155-160).

Key words: Kearns-Sayre syndrome, strabismus, ophthalmoplegia, mitochondrial DNA, heteroplasmia.

INTRODUCCIÓN

Las citopatías mitocondriales son un grupo poco común de enfermedades multisistémicas en las que existe evidencia bioquímica, histopatológica y/o genética de disfunción mitocondrial (1). Estas enfermedades se manifiestan como síndromes clínicos muy bien definidos y son causadas por defectos moleculares en el DNA mitocondrial (mtDNA) que pueden variar desde mutaciones puntuales a rearrreglos génicos mayores como duplicaciones o deleciones (2). Los tejidos con gran demanda metabólica de energía oxidativa, tales como el músculo y el cerebro son particularmente susceptibles a las mutaciones del mtDNA a pesar de que las enfermedades relacionadas al mtDNA pueden ser diferenciadas en base a sus características clínicas, la mayoría de ellas comparten las manifestaciones de acidosis láctica y proliferación masiva de mitocondrias en el músculo, que origina un patrón histopatológico típico de fibras rojas-rasgadas (3). Las manifestaciones clínicas se inician generalmente en la infancia y pueden incluir acidosis láctica, anemia, miopatía, anormalidades neurológicas, alteraciones endocrinas, enfermedades renales, sordera neurosensorial, distrofia retiniana atípica, y defectos en el sistema de conducción cardíaca, siendo estos últimos la principal causa de muerte prematura.

Las tres principales enfermedades asociadas a deleciones del mtDNA son el síndrome de Pearson, la oftalmoplejia externa progresiva crónica y el síndrome de Kearns-Sayre (SKS, OMIM #530000)

(4). El SKS es un trastorno pleiotrópico, descrito por primera vez en 1958 y que se caracteriza principalmente por oftalmoplejia externa progresiva crónica, retinopatía pigmentaria, bloqueo cardíaco y ataxia cerebelosa (5).

La edad usual para su inicio es antes de los 20 años de edad y los sujetos afectados frecuentemente presentan datos clínicos asociados como sordera y alta concentración de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (6). Son también comunes síntomas endocrinos tales como diabetes, hiperaldosteronismo y amenorrea.

Las deleciones en el mtDNA asociadas al SKS son variables y fluctúan desde 1,3 hasta 8 kilobases (kb) con distintas cantidades de mtDNA delecionado presentes en diferentes tejidos, lo que se correlaciona con la naturaleza multisistémica del síndrome (7-9). El rearrreglo más frecuente observado en el mtDNA de pacientes con SKS es la «delección común» de 4977pb (mtDNA⁴⁹⁷⁷), localizada entre los nucleótidos 8482 y 13640 (10) del mtDNA y que se encuentra en aproximadamente 50% de los sujetos afectados (10). Además de las deleciones del mtDNA mencionadas, se han identificado también mutaciones puntuales en algunos pacientes de SKS (6).

Existen pocas publicaciones que describan una investigación oftalmológica completa de pacientes con SKS así como análisis molecular del mtDNA. En este trabajo se presentan los resultados de una evaluación oftalmológica completa así como el análisis del mtDNA en una paciente mexicana con diagnóstico de SKS mediante técnica de PCR que



Fig. 1: Ptosis bilateral y oftalmoplejia en una paciente de 15 años de edad con el diagnóstico de Síndrome de Kearns-Sayre.

permite identificar la delección común en el mtDNA de los pacientes con SKS tanto en estado de heteroplasmia como de homoplasmia.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Una paciente de 15 años de edad fue referida a nuestro hospital debido a ptosis y limitación a los movimientos oculares bilaterales de 2 años de evolución. La paciente no contaba con antecedentes de diabetes, hipertensión o trauma, contaba con el antecedente ginecológico de menarquia a los 13 años con ciclos regulares y no se encontraron antecedentes familiares de ptosis, miopatías o enfermedades hereditarias. A la exploración física la estatura de la paciente fue de 160 cm, y la exploración neurológica no mostraba evidencia de distrofia muscular, ataxia, o sordera. A la exploración oftalmológica, la agudeza visual en el ojo derecho (OD) fue de 20/40 y en el izquierdo (OI) de 20/25; las presiones intraoculares fueron de 11 mmHg (OD) y 12 mmHg (OI). La exploración de movimientos oculares mostró marcada limitación en todas las direcciones de la mirada para ambos ojos, con una exotropía de 15 dioptrías prismáticas (fig. 1). La apertura palpebral era de 7 mm en ambos ojos, con función muy disminuida del elevador en ambos ojos (5 mm) y reflejo pupila margen de 1 mm en ambos ojos. El diámetro pupilar se encontraba dentro del rango normal y los reflejos pupilares se hallaban intactos. No se encontraron alteraciones en el seg-

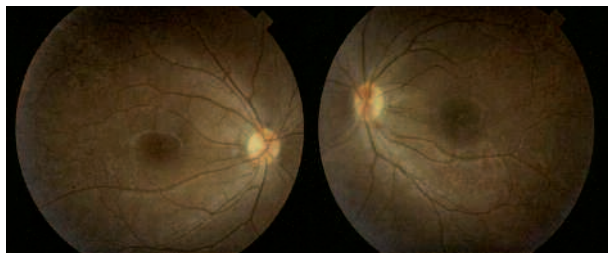


Fig. 2: Apariencia del polo posterior mostrando cambios pigmentarios y palidez de cabeza de nervio óptico.

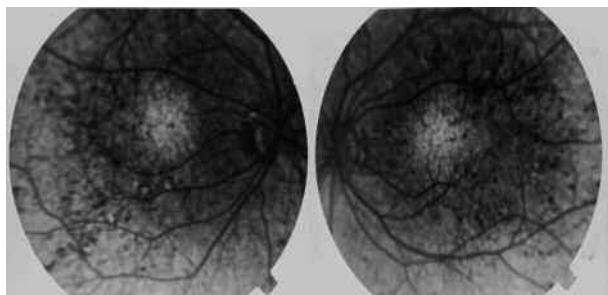


Fig. 3: Angiografía con fluoresceína mostrando atrofia difusa del epitelio pigmentado de la retina.

mento anterior de ambos ojos. La exploración bajo dilatación pupilar del fondo de ojo reveló múltiples cambios pigmentarios con un patrón en «sal y pimienta» en el ecuador y la periferia retiniana de ambos ojos (fig. 2). La angiografía con fluoresceína mostró atrofia moderada del epitelio pigmentado de la retina (fig. 3), mientras que la electroretinografía evidenció disminución del umbral a respuesta de estímulos luminosos, previa dilatación y adaptación a la oscuridad. La electromiografía cinetológica demostró afección de todos los músculos extraoculares, del músculo frontal y de músculos faríngeos. En la electrocardiografía de 12 derivaciones se encontró bloqueo incompleto de rama derecha del haz de His.

El análisis citológico y químico del líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar mostró niveles elevados de proteínas (124 mg/dl). La paciente fue diagnosticada clínicamente de Síndrome de Kearns-Sayre y fue referida al departamento de Genética.

Estudios Moleculares del DNA mitocondrial: La investigación se realizó previa autorización por el comité de Bioética de la Institución y firma de consentimiento informado por los padres de la paciente. A partir de una muestra de 8 ml de sangre periférica se obtuvo un concentrado plaqueta-

Tabla I. Secuencia de los cebadores utilizados en el estudio de la delección de mtDNA. Los números entre paréntesis indican la posición del nucleótido

MT-1 (8468) 5'- CTT TGA AGT AGG GCC CGT ATT TAC - 3'
 MT-4 (13707) 5'- CTG CGA ATA GGC TTC CGG CTG CC - 3'

rio del que se aisló el mtDNA con la ayuda del QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se amplificó el mtDNA por medio de PCR utilizando los cebadores MT-1 y MT-4 (indicados en la tabla I), tomados de Brenner et al (13). MT-1 flanquea la región del mtDNA de la «delección común» del SKS en la dirección 5', mientras que MT-4 flanquea el sitio de la delección en sentido 3'. Este par de cebadores amplifica un producto de ~5kb: si la «delección común» de 4977pb del SKS, está presente, el producto de PCR obtenido será de 550 pb; en caso de que la delección esté ausente, el producto esperado de ~5kb será amplificado; el mtDNA heteroplásmico mostrará ambas bandas. Cada 25 µl de reacción de PCR incluyeron 150 ngs de mtDNA, MgCl₂ a una concentración final de 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada cebador, y 1,25 U de HotStart *Taq* polimerasa (Quiagen). Los cebadores MT-1 y MT-4 fueron utilizados y el programa de temperaturas incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 15 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, alineamiento a 65,2°C por minuto y

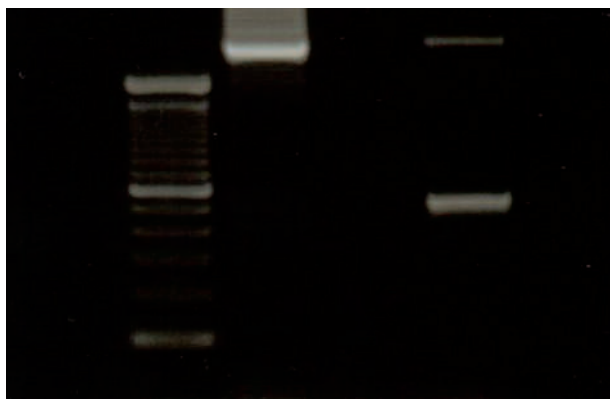


Fig. 4: Productos amplificados de mtDNA por medio de PCR. Línea 2: DNA control mostrando una banda de alto peso molecular correspondiente a mtDNA normal de ~5 kb; línea 3: DNA de la paciente mostrando una banda de 550 pb indicativa de la delección común y una banda menos intensa de ~5 kb correspondiente al mtDNA silvestre, demostrando heteroplasmia mitocondrial.

extensión a 72°C por 3 minutos; con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Se utilizó un marcador estándar de DNA de 100 pb para confirmar el tamaño de los productos amplificados. Para descartar la posibilidad de contaminación causada por la amplificación mediante PCR, en cada reacción de PCR se incluyó un tubo en el cual el templado de DNA fue omitido y sustituido por H₂O el cual sirvió como control negativo.

RESULTADOS

La Amplificación mediante PCR del mtDNA de la paciente con SKS mostró la presencia de dos productos: una banda de 550 pb que indica la presencia de la «delección común» de ~5 kb y una banda de mtDNA silvestre (fig. 4, línea 3), lo cual demuestra la presencia de mitocondrias con DNA normal y otras con DNA con la delección (heteroplasmia); en contraste, la amplificación por PCR en el mtDNA de un sujeto normal evidenció solo una banda de 5 kb excluyendo la presencia de delección (fig. 4, línea 2). Estos resultados fueron consistentes después de 3 amplificaciones independientes de mtDNA de la paciente y control positivo. En ningún caso, el control negativo produjo amplificación del mtDNA, excluyendo amplificación debida a contaminación por DNA.

DISCUSIÓN

El SKS es una enfermedad neuromuscular poco frecuente caracterizada por un inicio antes de los 20 años de edad, oftalmoplejia externa progresiva crónica, y degeneración pigmentaria de la retina. Otros hallazgos frecuentes en los individuos afectados incluyen defectos en el sistema de conducción cardíaca, ataxia cerebelosa y concentración elevada de proteínas en líquido cefalorraquídeo (>100 mg/dl).

Los pacientes con SKS presentan ptosis bilateral como uno de los primeros signos de la enfermedad seguida por oftalmoplejia externa progresiva crónica algunos años después. En nuestro caso tanto las lateroversiones como la supra e infraversión se encontraron afectadas, indicando una forma severa de la enfermedad; los defectos en el sistema de conducción cardíaca son comunes en el síndrome (se presentan en 57% de los pacientes) y en nuestro caso se documentó electrocardiográficamente solo

un bloqueo incompleto leve; estos datos nos indican que existe heterogeneidad fenotípica en el SKS, un hecho que puede generar retos y dificultades en el diagnóstico de este síndrome en algunos pacientes. En este contexto es interesante destacar que la «deleción común» del SKS en el mtDNA se encuentra fuertemente relacionada con las alteraciones de conducción cardiaca (8,15). Nuestro caso demuestra y confirma esta correlación. El seguimiento cardiovascular está indicado en todo paciente con SKS, para así identificar y tratar tempranamente las alteraciones y complicaciones graves de aparición tardía.

En el SKS, así como en otros trastornos relacionados con el mtDNA, puede encontrarse heteroplasmia, una mezcla de mtDNA mutante con silvestre en la misma célula o tejido. La relación de DNA mutante con DNA silvestre es de suma importancia para determinar la severidad del fenotipo en un desorden mitocondrial. La ausencia de ataxia cerebelosa y sordera neurosensorial en nuestra paciente podría deberse a este fenómeno. Por otro lado, la biopsia de músculo estriado es uno de los métodos usuales para el diagnóstico histopatológico de SKS, siendo las fibras rojas-rasgadas el hallazgo característico en el músculo afectado.

Sin embargo, el desarrollo de procedimientos diagnósticos no invasivos como la demostración de la «deleción común» de SKS por medio de PCR, puede evitar la necesidad de toma de biopsias, facilitando el abordaje de los pacientes con sospecha de SKS. La PCR es una útil alternativa para los casos en los que el paciente rechaza la biopsia muscular como método diagnóstico.

Los métodos por PCR para detectar la «deleción común» de SKS están basados en el hecho de que si la deleción está ausente el fragmento de 5 kb no será visualizado por su gran tamaño para amplificación; contrariamente, si la deleción está presente, el pequeño fragmento remanente de mtDNA, será fácilmente amplificado y detectado (10,13). Una clara desventaja de este abordaje es la imposibilidad de detectar heteroplasmia. En el método descrito en este trabajo fue posible amplificar el pequeño fragmento indicativo de la «deleción común» de SKS así como el fragmento de ~5 kb de mtDNA silvestre, demostrando así la presencia de mitocondrias heteroplásmicas. Similarmente, este método podría detectar homoplasmia para mtDNA mutante o normal del tejido investigado.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen al patronato de la Fundación «Conde de Valenciana» por el apoyo para realizar este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders. I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 2000; 355: 299-304.
2. Johns DR. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 1995; 333: 638-644.
3. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 2656-2668.
4. Blakely EL, He L, Taylor RW, Chinnery P F, Lightowlers R N, Schaefer A M, et al. Mitochondrial DNA deletion in «identical» twins brothers. *J Med Genet* 2004; 41: e19.
5. Kearns TP, Sayre GP. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch Ophthalmol* 1958; 60: 280-289.
6. Degoul F, Nelson I, Lestienne P, Francois D, Romero N, Duboc D. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome and ocular myopathies: genetic, biochemical and morphological studies. *J Neurol Sci* 1991; 101: 168-177.
7. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346.
8. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New Eng J Med* 1989; 320: 1293-1299.
9. Larsson NG, Holme E, Kristiansson B, Oldfors A, Tulinius M. Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 1990; 28: 131-136.
10. Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, Matt DW. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 927-933.
11. Seneca S, Verhelst H, De Meirleir L, Meire F, Ceuterick-De Grootte C. A new mitochondrial point mutation in the transfer RNA(Leu) gene in a patient with a clinical phenotype resembling Kearns-Sayre syndrome. *Arch Neurol* 2001; 58: 1113-1118.
12. Bosbach S, Kornblum C, Schroder R, Wagnere M. Executive and visuospatial deficits in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *Brain* 2003; 126: 1231-1240.
13. Brenner CA, Wolny YM, Barritt JA, Matt DW, Munne S, Cohen J. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 887-892.
14. Simaan EM, Mikati MA, Touma EH, Ritig A. Unusual presentation of Kearns-Sayre syndrome in early childhood. *Pediatr Neurol* 1999; 21: 830-831.
15. Young TJ, Shah AK, Lee MH, Hayes DL. Kearns-Sayre syndrome: a case report and review of cardiovascular complications. *Pacing Clin Electrophysiol* 2005; 28: 454-457.