



Polimorfismos en el ADN mitocondrial en pacientes con ablación vestibular por la administración de gentamicina

Beatriz Aguilar-Maldonado¹
María Cecilia Esteinou-Madrid³
Graciela Meza²

¹ Técnico académico titular A.

² Investigador titular C.

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

³ Jefa de Audiología y Otoneurología, Hospital Ángeles de las Lomas, México, DF.

RESUMEN

Antecedentes: los aminoglucósidos constituyen un grupo de antibióticos con gran potencial antimicrobiano para combatir enfermedades infecciosas graves e infecciones producidas por organismos multirresistentes a otros antibióticos. Su administración debe mantenerse regulada debido a sus consecuencias tóxicas para los sistemas auditivo-vestibular y renal.

Objetivo: identificar mutaciones en el ADN mitocondrial asociadas con hipersensibilidad a aminoglucósidos en pacientes mexicanos.

Pacientes y método: estudio comparativo efectuado con tres pacientes tratadas con gentamicina. Se realizaron pruebas clínicas para determinar la función auditiva y vestibular de las pacientes. El análisis del ADN mitocondrial se realizó en muestras de sangre mediante técnicas de biología molecular y las secuencias se compararon con la secuencia de referencia Cambridge (rCRS) para el ADN mitocondrial humano.

Resultados: los estudios clínicos mostraron que dos de las pacientes sufrieron ablación vestibular, pero ninguna tuvo daño auditivo. Después de un periodo de rehabilitación vestibular, sólo una paciente se recuperó del daño en el vestíbulo. Al analizar las secuencias del ADN mitocondrial se encontraron cambios en las tres pacientes, algunos de ellos localizados en las regiones hipervariables 2 y 3; las dos pacientes con daño vestibular mostraron mayor número de cambios que la paciente sin daño. Asimismo, en la paciente que no tuvo recuperación de la función vestibular, se localizaron cambios en la región del ADN en donde se unen factores de transcripción mitocondrial, lo que puede afectar de manera importante la función mitocondrial.

Conclusión: algunas de las modificaciones encontradas en la secuencia del ADN mitocondrial pudieran ser las responsables del daño vestibular causado por la gentamicina y de la permanencia del daño.

Palabras clave: ablación vestibular, gentamicina, electronistagmografía, susceptibilidad a aminoglucósidos, mutaciones en ADN mitocondrial, audiometría, emisiones otoacústicas.

Mitochondrial DNA Polymorphisms in Patients with Vestibular Ablation by Gentamicin

ABSTRACT

Background: Aminoglycosides are a group of antibiotics with great antimicrobial potential against severe infectious diseases and infec-

Recibido: enero 2014

Aceptado: marzo 2014

Correspondencia

Dra. Beatriz Aguilar Maldonado
Apartado postal 70-253
04510 México, DF
baguilar@ifc.unam.mx

Este artículo debe citarse como

Aguilar-Maldonado B, Esteinou-Madrid MC, Meza G. Polimorfismos en el ADN mitocondrial en pacientes con ablación vestibular por la administración de gentamicina. An Orl Mex 2014;59:113-120.

tions produced by organisms multi-resistant to other antibiotics. Their administration should be regulated due to their toxic consequences for auditive-vestibular and renal systems.

Objective: To identify mitochondrial DNA mutations associated to hypersensitivity to aminoglycoside in Mexican patients.

Patients and method: A comparative study of three patients treated with gentamicin was done. Clinical tests were performed to determine auditory and vestibular function. Mitochondrial DNA analysis was determined in peripheral blood samples by molecular biological techniques. Resulting oligonucleotides were sequenced and compared with existing normal reference sequences (rCRS) reported for human mitochondrial DNA.

Results: Clinical studies of vestibular function of the three patients evidenced no damage in one of the patients whereas the remaining two showed severe vestibular affection. After a long period of rehabilitation, only one patient of the two affected recovered vestibular function. In none of the cases, auditory function was compromised. When mitochondrial DNA sequences were attained, some changes were evident in the three patients, some of them localized in the hypervariable regions 2 and 3; the most numerous changes were found in the patient showing no recovery of vestibular function, especially where transcription factors bind to mitochondrial DNA, thus affecting deeply the mitochondrial function.

Conclusion: Some of the modifications found in mitochondrial DNA sequence can be responsible for vestibular damage caused by gentamicin and of the absence of recovery of vestibular function.

Key words: vestibular ablation, gentamicin, electronystagmography, aminoglycoside susceptibility, mitochondrial DNA mutations, audiometry, otoacoustic emissions.

Los aminoglucósidos constituyen un grupo de antibióticos con gran potencial antimicrobiano para combatir enfermedades infecciosas graves, como la tuberculosis, y lidiar con infecciones producidas por organismos multirresistentes a otros antibióticos. Su administración debe mantenerse regulada debido a sus consecuencias tóxicas para los sistemas auditivo-vestibular y renal.¹ Entre los factores más importantes que originan el daño por aminoglucósidos destacan la dosis acumulada y la duración del tratamiento. Por ello, con la finalidad de disminuir los riesgos, se han diseñado estrategias terapéuticas que permiten prescribir dosis menores, pero

mantienen la efectividad del antibiótico.² Sin embargo, clínicamente, en los sujetos se ha encontrado una amplia variabilidad en la respuesta a los aminoglucósidos. Esta variación puede explicarse, en parte, por la dosis y el tiempo del tratamiento, pero también existen individuos con susceptibilidad alta a los aminoglucósidos; en estos individuos, dosis mínimas del antibiótico provocan sordera de manera inmediata o ataxia.³

Desde hace varias décadas se han descrito familias con múltiples individuos que padecieron sordera inducida por el tratamiento con aminoglucósidos. Estos estudios mostraron una



predisposición a la ototoxicidad inducida por los aminoglucósidos que se trasmite por vía materna, por lo que se concluyó que se trataba de un defecto mitocondrial.^{4,5} El análisis del genoma mitocondrial de las familias afectadas mostró que había diferentes mutaciones, principalmente en el gen que codifica la subunidad 12S del ARN ribosomal.⁶⁻⁸ Las mutaciones presentes en este gen que se han asociado con la hipersensibilidad a los aminoglucósidos en poblaciones de origen asiático, europeo e incluso latinoamericano son: 1) la sustitución del nucleótido A por G en la posición 1555,⁹⁻¹² 2) la eliminación-inserción alrededor del nucleótido 961,¹³ 3) el cambio de C por T en la posición 1494¹⁴ y el cambio de C por T en la posición 1189.¹⁵ Por otra parte, en el gen del ARN de transferencia para serina (UCN) se identificó una región susceptible a mutaciones asociadas con sordera no sindrómica, como la mutación A7445®G.¹⁶

El mecanismo mediante el cual estas mutaciones causan la susceptibilidad a los aminoglucósidos no se ha aclarado completamente; sin embargo, hay evidencia de que estos cambios causan un apareamiento no clásico de algunos nucleótidos de la cadena polinucleotídica que produce un cambio en la conformación de la subunidad 12S del ARN ribosomal, de manera que semeja la subunidad 16S del ARN ribosomal de las bacterias, modificando la síntesis de proteínas y la unión de los aminoglucósidos en esta región del genoma mitocondrial.¹⁷

En este trabajo se realizó una evaluación clínica y un análisis genético por biología molecular de tres mujeres tratadas con gentamicina, dos de ellas con alteraciones vestibulares, con la finalidad de determinar la existencia de cambios en la secuencia del ADN mitocondrial que pudieran asociarse con daño en el vestíbulo y la recuperación de la función vestibular.

PACIENTES Y MÉTODO

Estudio comparativo efectuado con tres pacientes tratadas con gentamicina, en el que la función vestibular y auditiva fueron determinadas en el Hospital Ángeles Interlomas por la Dra. Cecilia Esteinou.

Los equipos utilizados fueron: audiómetro marca Madsen, modelo Orbiter 922, versión 2; impedanciómetro marca Madsen, modelo Zodiac 901; emisiones otoacústicas marca Otodynamics, modelo V5, ILO 92OAE System. Para la posturografía se utilizó un equipo Equitest, versión 5.08, NeuroCom International. En la electronistagmografía se utilizó agua de deshielo a 0 grados, equipo Nystar versión 1.77.

La rehabilitación vestibular se realizó con el equipo Balance Master, versión 8.06 sistema NeuroCom International.

El análisis del ADN mitocondrial se realizó en el Instituto de Fisiología Celular. El ADN mitocondrial de los pacientes se extrajo de sangre periférica utilizando DNAzol, según las especificaciones del proveedor (Invitrogen). Se amplificaron diferentes fragmentos de ADN mitocondrial, abarcando desde la posición 15 hasta la 1,624 (1,609 nucleótidos) y la región del nucleótido 7,367 al 7,751. Para ello se usaron varios pares de oligonucleótidos y la técnica de PCR de punto final; los fragmentos obtenidos se purificaron por columna según las especificaciones del proveedor (QIAGEN) y posteriormente se secuenciaron por duplicado de manera bidireccional en un secuenciador ABI PRISM 310. Los alineamientos de las secuencias obtenidas se realizaron con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el sitio web: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ y se compararon con la secuencia de referencia Cambridge (rCRS) para el ADN mitocondrial humano. La asignación de

los haplogrupos se realizó con la base de datos del genoma mitocondrial MITOMAP en el sitio web: www.mitomap.org.

Caso 1

Paciente femenina de 33 años, con antecedente de infección de vías urinarias, tratada con cinco dosis de 80 mg de gentamicina. No mostró ningún síntoma que sugiriera alteraciones en la función vestibular.

Caso 2

Paciente femenina de 31 años, con antecedente de infección gastrointestinal, tratada con cinco dosis de 80 mg de gentamicina. Tuvo mareos, incapacidad de permanecer de pie y sensación de vértigo y ataxia.

Se le realizaron las siguientes pruebas: audiometría tonal completa y emisiones otoacústicas por producto de distorsión, con audición normal e impedanciometría y reflejos estapediales normales. La electronistagmografía mostró el diagnóstico de arreflexia vestibular bilateral y con la posturografía dinámica computarizada se obtuvo el diagnóstico de disfunción vestibular.

Se le dio rehabilitación vestibular durante aproximadamente seis meses. La paciente tiene actualmente una marcha adecuada.

Caso 3

Paciente femenina de 60 años, tratada con cinco dosis de 80 mg de gentamicina por padecer un absceso molar y posteriormente un absceso profundo de cuello. Tuvo mareos, incapacidad de permanecer de pie, sensación de vértigo y ataxia. Se le realizó una audiometría tonal completa y emisiones otoacústicas por producto de distorsión que mostraron audición normal, con caída selectiva en 8,000 Hz. La impedanciometría y

los reflejos estapediales fueron normales. La electronistagmografía evidenció el diagnóstico de arreflexia vestibular bilateral y la posturografía dinámica computarizada arrojó el diagnóstico de disfunción vestibular.

Se le dio rehabilitación vestibular durante aproximadamente un año. Actualmente la paciente continúa con oscilopsia y con cierta lateropulsión hacia la derecha y tiene que ayudarse con la colocación de focos por la noche para iluminar la zona por donde camina.

RESULTADOS

En todos los casos estudiados la audición no sufrió daño; sin embargo, en los casos 2 y 3 la electronistagmografía y la posturografía dinámica computarizada evidenciaron arreflexia vestibular bilateral y disfunción vestibular, respectivamente. En la Figura 1 se muestran las cuatro posturografías dinámicas computarizadas de estas pacientes realizadas antes y después de la rehabilitación vestibular. Después de varios meses de rehabilitación, la paciente del caso 2 tuvo una recuperación importante de la función vestibular, ejemplificada con los resultados de la posturografía antes y después de la rehabilitación (Figura 1 A y B). La paciente del caso 3, a pesar de tener una terapia de rehabilitación más prolongada, no logró recuperar la función vestibular (Figura 1 C y D).

Respecto al análisis de la secuencia del ADN mitocondrial, se analizaron primero las regiones en donde se han reportado los cambios relacionados con la susceptibilidad a los aminoglucósidos; es decir, la región del gen 12S del ARN ribosomal¹⁵ y la región del gen para el ARNt para serina; sin embargo, no se encontró ninguno de los cambios reportados; por otro lado, sí se encontraron algunos de los cambios relacionados con el haplogrupo y dos cambios en la región del gen 12S mitocondrial para los

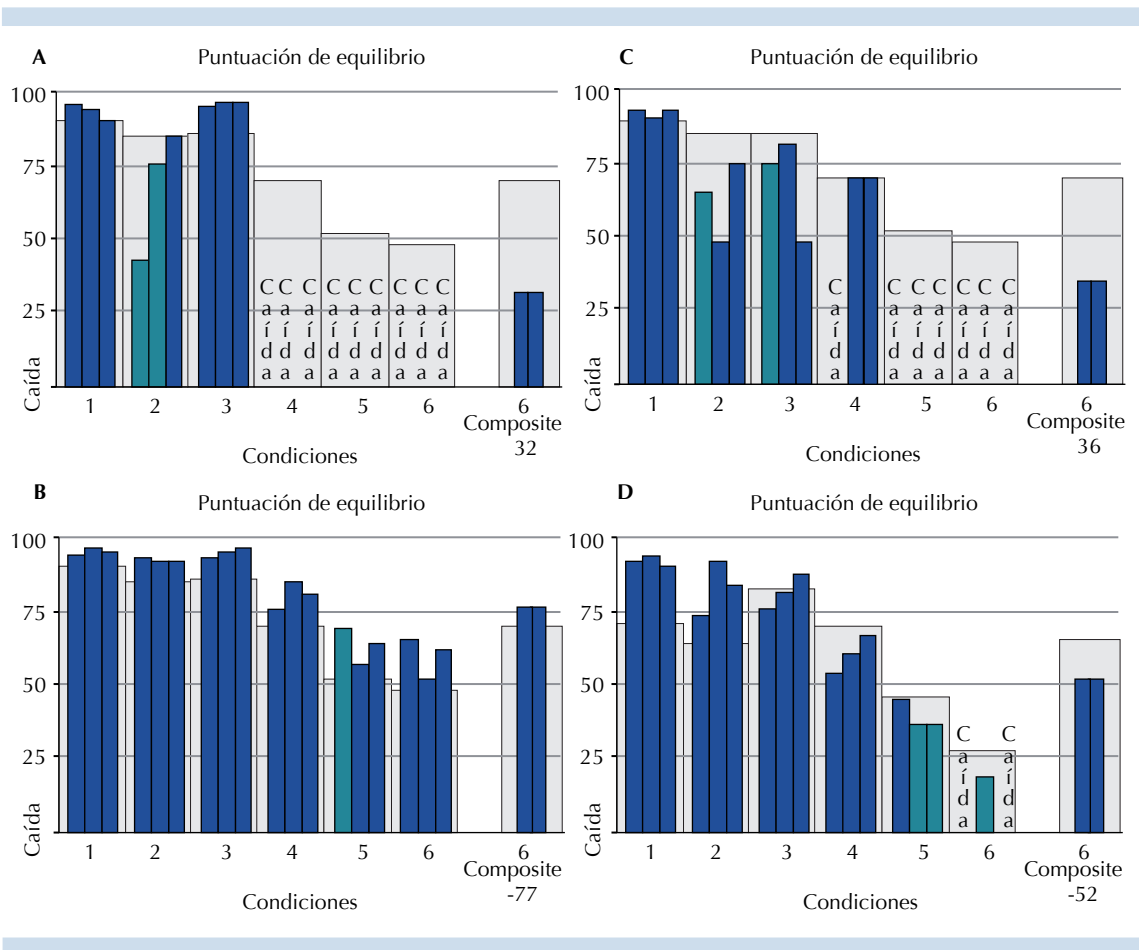


Figura 1. Posturografías de los casos 2 y 3 antes y después de la rehabilitación. Se muestran las seis condiciones del examen de posturografía. Caso 2 antes (A) y después (B) de la rehabilitación vestibular. Caso 3 antes (C) y después (D) de la rehabilitación vestibular.

casos 1 y 2, G834T y DEL1228 A, respectivamente; además del cambio G1438A, que se encontró en los tres casos. Estos cambios no parecen tener relevancia en la susceptibilidad a los aminoglucósidos, ya que se encontraron en la paciente sin daño vestibular y en las que sí lo tuvieron. Con estos resultados se investigaron entonces las regiones hipervariables 2 y 3, donde se encontraron algunos cambios interesantes (Cuadro 1).

El cambio de adenina por guanina en la posición 663 se relaciona con el haplogrupo A, mientras

que el cambio de adenina por guanina en la posición 827 es representativo del haplogrupo B.¹⁸ Entonces, la paciente que tuvo daño vestibular irreversible pertenece al haplogrupo A y las pacientes sin daño vestibular y con daño vestibular reversible pertenecen al haplogrupo B.

DISCUSIÓN

En cuanto a los otros cambios encontrados en la secuencia mitocondrial analizada, se encontró que la paciente sin daño vestibular mostró el menor número de cambios, seguida por la pa-

Cuadro 1. Polimorfismos encontrados en pacientes femeninas tratadas con gentamicina

Caso 1	<u>A263G</u>	<u>G499A</u>	C602G	A827G*	G834T*	<u>G1438A*</u>
Caso 2	<u>A263G</u>	INS301C INS310C <u>G499A</u>	A693G*	A827G*	DEL1128A*	<u>G1438A*</u>
Caso 3	T146C T152C A153G <u>A263G</u>	DEL311C DEL523A DEL525C	A663G*			<u>G1438A*</u>

Igual en las tres. Cambio de haplogrupo
 Igual en haplogrupo B * Cambio en la región 12S ARNr

ciente con daño vestibular reversible; el mayor número de cambios se encontró en la paciente con daño vestibular irreversible.

Los cambios A263G, T146C, T152C, A153G, INS301C, INS310C y DEL311C se encuentran en la región hipervariable 2 (HV2); el cambio G499A se localiza en la región hipervariable 3 (HV3) del ADN mitocondrial, por lo que se esperaba que ninguno de estos cambios tuvieran relevancia en la función mitocondrial.¹⁹

En las tres pacientes se encontró una guanina en lugar de una adenina en las posiciones 263 y 1438. Al estar presentes estos cambios en la paciente sin daño vestibular y en las que sí lo mostraron, es poco probable que estos cambios tengan relación con la susceptibilidad a la gentamicina.^{19,20}

En la paciente sin daño vestibular se encontró un cambio de una citosina por una guanina en la posición 602, este cambio se encuentra en la región que codifica para el ARN de transferencia de la fenilalanina; también se encontró un cambio de una timina en lugar de una guanina en la posición 834, este cambio se encuentra en la región que codifica a la subunidad 12S del ARN ribosomal;²¹ sin embargo, ninguno de estos cambios parece tener efecto en la susceptibilidad a la gentamicina.

En el caso de la paciente con daño vestibular reversible se encontró un cambio de una guanina en lugar de una adenina en la posición 693; además, existe una eliminación de una adenina en la posición 1128; ambos cambios se encuentran en la región que codifica a la subunidad 12S del ARN ribosomal.²¹ Esta subunidad posee una estructura secundaria en donde se observan varios bucles y horquillas; estas estructuras se establecen por la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes nucleótidos complementarios, de manera que cuando ocurre sustitución, eliminación o inserción de ciertos nucleótidos existe la posibilidad de que se modifiquen los puentes de hidrógeno que mantienen la estructura de la subunidad 12S, ocasionando cambios conformacionales; sin embargo, en los casos que nos ocupan no parece tener efecto en la función vestibular.

Asimismo, en la paciente con daño vestibular irreversible se encontraron dos cambios localizados en el sitio de unión para factores de transcripción mitocondrial;²¹ éstos son: DEL523A (no está presente la adenina en la posición 523) y DEL525C (no está presente la citosina en la posición 525), lo que implica que, si se modifica la afinidad de los factores de transcripción mitocondrial en este sitio, podría afectarse la transcripción de ARNs de transferencia y de ARN ribosomales; por tanto, podría afectarse la



viabilidad mitocondrial y, por ende, la función vestibular. Ésta pudiera ser la explicación de por qué la paciente del caso 3 no pudo lograr la recuperación de la función vestibular a pesar de seguir una terapia de rehabilitación.

Aunque son abundantes los reportes de daño auditivo por la administración de aminoglucósidos, son escasos los que describen daño vestibular en forma exclusiva;²² por tanto, siempre que sea necesaria la administración de estos antibióticos es recomendable hacer un seguimiento de la función vestibular, aunado a un estudio del ADN mitocondrial mediante biología molecular para detectar si existe susceptibilidad al daño vestibular por ese medicamento y poder recomendar un tratamiento alternativo.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias en las secuencias del ADN mitocondrial en el sujeto control y en las dos pacientes tratadas con gentamicina. Algunos cambios que se localizaron en las regiones hipervariables, variables y en el gen 12S rRNA son indicativos de haplogrupos diferentes (A o B). Sin embargo, los cambios localizados en las regiones de unión a factores de transcripción mitocondrial (DEL523A y DEL525A) sugieren que posiblemente estos cambios sean la causa de que la paciente que los tuvo no lograra recuperar la función vestibular.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Bióloga Guadalupe Códiz Huerta y a la Maestra en Ciencias Minerva Mora Cabrera, de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su apoyo en la asesoría en PCR, la síntesis de los oligonucleótidos y la secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados. A la Sra. Cecilia Escalona Ochoa, por su gran apoyo en el trabajo diario del laboratorio.

REFERENCIAS

1. Peloquin CA, Berning SE, Nitta AT, Simone PM, et al. Aminoglycoside toxicity: daily *versus* thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases. *Clin Infect Dis* 2004;38:1538-1544.
2. Gilbert DN. Once-daily aminoglycoside therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:399-405.
3. Higashi K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness. *Clin Genet* 1989;35:433-436.
4. Hutchin TP, Cortopassi GA. Mitochondrial defects and hearing loss. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1927-1937.
5. Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet* 2007;71:379-391.
6. Bacino C, Prezant TR, Bu X, Fournier P, et al. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics* 1995;5:165-172.
7. Casano RA, Johnson DF, Bykhovskaya Y, Torricelli F, et al. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1999;20:151-156.
8. Zhao L, Young WY, Li R, Wang Q, et al. Clinical evaluation and sequence analysis of the complete mitochondrial genome of three Chinese patients with hearing impairment associated with the 12S rRNA T1095C mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1503-1508.
9. Bravo O, Ballana E, Estivill X. Cochlear alterations in deaf and unaffected subjects carrying the deafness-associated A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:511-516.
10. Noguchi Y, Yashima T, Ito T, Sumi T, et al. Audio-vestibular findings in patients with mitochondrial A1555G mutation. *Laryngoscope* 2004;114:344-348.
11. Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet* 2005;117:9-15.
12. Casano RA, Bykhovskaya Y, Johnson DF, Hamon M, et al. Hearing loss due to the mitochondrial A1555G mutation in Italian families. *Am J Med Genet* 1998;79:388-391.
13. Bae JW, Lee KY, Choi SY, Lee SH, et al. Molecular analysis of mitochondrial gene mutations in Korean patients with non-syndromic hearing loss. *Int J Mol Med* 2008;22:175-180.
14. Rodríguez-Ballesteros M, Olarte M, Aguirre LA, Galán F, et al. Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C/T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J Med Genet* 2006;43:e54.
15. Meza G, Torres-Ruiz NM, Tirado-Gutiérrez C, Aguilera P. mtDNA mutations, hearing loss and aminoglycoside treatment in Mexicans. *Braz J Otorhinolaryngol* 2011;77(5):573-576.

16. Chen J, Yuan H, Lu J, Liu X, et al. Mutations at position 7445 in the precursor of mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in three maternal Chinese pedigrees with sensorineural hearing loss. *Mitochondrion* 2008;8:285-292.
17. Wei Q, Xu D, Chen Z, Li H, et al. Maternally transmitted aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss caused by the 1494C> T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two Chinese families. *Int J Audiol* 2013;52:98-103.
18. Muyderman H, Sims NR, Tanaka M, Fuku N, et al. The mitochondrial T1095C mutation increases gentamicin-mediated apoptosis. *Mitochondrion* 2012;12:465-471.
19. Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, Rochtchina E, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and age-related hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:929-933.
20. Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, et al. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4174-4179.
21. MITOMAP: Mitochondrial DNA Function Locations. Disponible en <http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/GenomeLocs>.
22. Dobie RA, Black FO, Pezsnecker SC, Stallings VL. Hearing loss in patients with vestibulotoxic reactions to gentamicin therapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:253-257.