



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.

---

---

FACULTAD DE  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA  
FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

ANÁLISIS CLÍNICO GENÉTICO EN UN CASO FAMILIAR DE  
DISTROFIA CONO-BASTÓN.

TESIS DE POSGRADO  
Para obtener el título de especialidad en

**OFTALMOLOGÍA**

Presenta

**JONATHAN URIEL QUEVEDO MARTÍNEZ**

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ



México, D.F.

Agosto de 2010



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.

---

**DR. ENRIQUE GRAUE WIECHERS**

Profesor Titular del Curso

Universidad Nacional Autónoma de México

---

**DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ LOAIZA**

Jefe del Departamento de Enseñanza

Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana”

---

**DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ**

Director de Tesis

Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana”

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios mi Señor por haberme dado la oportunidad de vivir, haberme guiado y apoyado para llegar a este momento.

A mi madre, consejera y amiga, a quien admiro y quien nunca dejo de confiar en mí. Cuyo esfuerzo y ejemplo se ve reflejado en este éxito de mi vida.

Al resto de mi familia que siempre me motivo a llegar a esta meta.

A Rosa María Zesati, un ángel que Dios puso en mi camino desde el principio de mi formación profesional.

A los amigos que Dios me permitió conocer en esta etapa de mi vida, quienes me apoyaron y a quienes espero tener cerca en las etapas por venir.

A mis maestros, los médicos del Instituto, gracias por su apoyo, paciencia, amistad y conocimientos.

A los doctores Juan Carlos Zenteno y Oscar Chacón, por su esfuerzo y dedicación indispensable para la realización de este proyecto.

Por último pero no menos importante a los pacientes, quienes pusieron su salud y la luz de sus ojos en mis manos. Esas personas de quienes aprendí mucho tanto en el ámbito profesional como en el personal.

## INDICE

Antecedentes e introducción.....	3
Objetivos y Justificación.....	16
Material y Métodos.....	16
Resultados.....	21
Discusión.....	27
Conclusiones .....	30
Bibliografía .....	31
Anexos.....	41

## **ANTECEDENTES E INTRODUCCIÓN:**

### **DISTROFIAS RETINIANAS:**

Las distrofias retinianas son una serie de enfermedades hereditarias de la retina que conducen a la degeneración de los fotorreceptores. Las distrofias retinianas se caracterizan por ser progresivas, simétricas y de origen hereditario. El carácter progresivo de la enfermedad origina disminución importante de la agudeza visual y puede conducir hasta ceguera dependiendo del grado de afección y del involucro de la mácula. <sup>3</sup>

Las distrofias retinianas son poco frecuentes a excepción de la retinosis pigmentaria, que se presenta en 1 de cada 4000 individuos. <sup>2</sup>

Las distrofias retinianas se clasifican de acuerdo a la localización de la alteración en las diferentes capas o células de la retina. <sup>3</sup>

### CLASIFICACIÓN DE LAS DISTROFIAS

#### 1. Distrofias hereditarias retinianas

1.1.1. Con predominio de afectación de bastones

1.1.2. Retinosis pigmentaria

#### 1.2. Con predominio de afectación de conos

1.2.1. Enfermedad de Stargardt

#### 1.3. Mixtas

1.3.1. Distrofias cono/bastones

1.3.2. Enfermedad de Leber

2. Distrofias hereditarias de retina-vítreo
  - 2.1. Vitreoretinopatía exudativa familiar
  - 2.2. Retinosquiasis
    - 2.2.1. Juvenil ligada al sexo
    - 2.2.2. Retinosquiasis foveal familiar
3. Distrofias hereditarias de la coroides
  - 3.1.1. Coroideremia
4. Enfermedades sindrómicas
  - 4.1. Síndrome de Usher
  - 4.2. Síndrome de Bardet-Biedl
  - 4.3. Ataxia y Retinosis Pigmentaria (ACAD tipo II)
  - 4.4. Neurolipo fucsinosis

### **DISTROFIA CONO-BASTÓN**

La distrofia cono bastón (DCB) es una enfermedad heredada, progresiva que causa deterioro inicial de los conos y subsecuentemente de los bastones.<sup>1</sup> Puede ser heredada de forma autosómica dominante pero es más frecuente la transmisión autosómica recesiva. La DCB tiene una prevalencia aproximada de 1 en cada 50000 pacientes. <sup>1-2</sup>

## CUADRO CLÍNICO

La sintomatología incluye disminución de la agudeza visual que se inicia en la primera década de la vida, fotofobia, discromatopsia en grados variables, nictalopía que no es tan prominente como la afección de la agudeza visual y disminución de los campos visuales centrales con periferia respetada. <sup>2</sup> La retina puede estar normal en etapas tempranas pero con la progresión, el epitelio pigmentado de la retina puede tomar un aspecto granular y finalmente atrófico. La macula se puede observar normal o con lesiones finas y posteriormente se desarrollan depósitos de pigmento en forma de espículas en el área macular y varios grados de atrofia retiniana.<sup>1</sup> Los vasos retinianos pueden observarse normales o con disminución de su calibre. Se observa palidez del nervio óptico de predominio temporal pues corresponde al haz papilomacular.<sup>3</sup> Las DCB severas de aparición temprana pueden acompañarse de nistagmus.<sup>2</sup> La evaluación psicofísica en la distrofia de conos demuestra pérdida del campo visual central, mientras que la recuperación del blanqueamiento es monofásica con un límite final de bastones normal.<sup>3</sup> La visión de color es usualmente anormal en etapas tempranas de la enfermedad con elevación de los límites protan, deuteran, tritan o cualquier combinación de las anteriores. En la distrofia cono bastón, la función depende de los bastones incluyendo campos visuales y visión nocturna que va a ser afectada en grado variable dependiendo del grado de involucro. <sup>2</sup>



## DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El diagnóstico se establece por evaluación electrofisiológica que se caracteriza por disfunción del sistema fotópico y preservación de la función escotópica.<sup>5</sup> Los resultados dependen de la etapa de la enfermedad y la edad de presentación.<sup>4-7</sup> El tiempo implícito de cambio en las respuestas flicker cambia a 30hz acompañados por ondas a y b retrasadas posterior a una disminución de la respuesta fotópica.<sup>1-2</sup>

Actualmente no existe tratamiento para la DCB sin embargo es esencial ayudar a los pacientes a maximizar la visión que tienen con una refracción adecuada y control por visión baja sobre todo con dispositivos que ayuden a los pacientes a mejorar la nictalopía.

## GENÉTICA DE LAS DISTROFIAS CONO-BASTÓN

### DCB AISLADAS

Las formas no sindromáticas son genéticamente heterogéneas y actualmente se conocen 13 genes responsables para la DCB no sindromática (**Tabla 1**) los cuales se clasifican en varias categorías.

MUTACIÓN	GEN AFECTADO	LOCUS	REGIÓN
CORD1	Delección	18q21.1-q21.3	18q
CORD2	CRX	19q13.3	19q

CORD3	ABCA4	1p22.1	1p
*CORD4	Cerca NF1	-	17q
CORD5	PITPNM3	17p13.1	17p
CORD6 (RCD2)	GUCY2D	17p13.1	17p
CORD7	RIMS1	6q12-q13	6q
CORD8	^CRABP2, GNAT2, KCNJ10	1q12-q24	1q
CORD9	ADAM9	8p11, 8p11.23	8p
CORD10	SEMA4A	1q22	1q
CORD11	RAXL1	19p13.3	19p
CORD12	PROM1	4p15.3	4p
CORD13	RPGRIP1	14q11	14q
CORDX1	ORF15	Xp21.1	Xp
CORDX2	RPGR	Xq27	Xq
CORDX3	CACNA1F	Xp11.23, Xp11.4 – q13.1	Xp

**Tabla 1. Genes reportados que originan DCB (OMIM).**

**\*, ^: Los reportan como propuestos como candidatos, aun no comprobados.**

*Primera categoría:*

Incluye los genes responsables generalmente de DCB. El gen predominante en esta categoría es CRX, que codifica una proteína con homeodominio que controla la diferenciación y supervivencia de los fotorreceptores.<sup>8</sup> La mayoría de las mutaciones CRX causa DCB autosómica dominante con una prevalencia estimada del 5 al 10% de todas las DCB dominantes.<sup>8-9</sup> La severidad de la enfermedad es altamente variable con algunos casos leves y otros severos. La manifestación más severa de este espectro clínico por mutaciones en CRX es la amaurosis congénita de Leber<sup>10-11</sup> Además de CRX, se han identificado otros dos genes exclusivos para DCB, RIM1 y HGR4. Estos genes codifican proteínas involucradas en la transmisión sináptica de los fotorreceptores.<sup>12</sup>

*Segunda categoría:*

Incluye los genes frecuentemente encontrados en las distrofias maculares. Actualmente comprende esencialmente un gen, el ABCA4 que está involucrado en el metabolismo del retinol y es el responsable de la enfermedad de Stargardt, considerada la degeneración macular juvenil hereditaria más frecuente. Se ha reconocido que las mutaciones en ABCA4 son responsables del 30 al 60% de los casos de DCB autosómica recesiva.<sup>13-18</sup> Las mutaciones más deletéreas están asociadas con los casos más severos de DCB<sup>19</sup>. Además, en esta categoría se han incluido las mutaciones en GUCA1A identificadas en una familia con DCB autosómica dominante. Este gen codifica una proteína que activa guanilato ciclasa.<sup>19</sup>

### *Tercera categoría:*

Incluye dos genes encontrados en RP, uno es RDS el cual codifica para la proteína periférica de los segmentos externos de los fotorreceptores. Es bien conocido que las variaciones fenotípicas inter e intrafamiliares con mutaciones en RDS incluyendo casos de distrofia macular dominante o DCB dominante. El otro gen en esta categoría es RPGR involucrado en el tráfico de opsinas, particularmente en los conos. Este gen es responsable de una forma de RP ligada al X pero también de casos de DCB ligada al X con locus encontrado en COD1 o CORDX1 <sup>20</sup>. Adicionalmente en esta categoría encontramos a CACNA1F reportada en un caso de DCB familiar antes conocido como CORDX3 <sup>21</sup>.

### *Cuarta categoría:*

Incluye genes que causan DCB pero que comúnmente se asocian a amaurosis congénita de Leber. Se han descrito diversas familias de DCB con mutaciones en RPGRIP1 y AIPL1. <sup>22</sup> Existen familias con DCB reportadas con mutaciones en GUCY2D tienen una condición dominante por mutaciones restringidas al exón 12, que codifica el dominio de dimerización de guanilato ciclasa. <sup>22</sup>

Un tercer gen es NPHP4 se ha asociado con enfermedad que afecta a ojo y riñón de forma simultánea. <sup>22</sup>

La DCB ligada al X es generalmente heterogénea y se han identificado dos diferentes loci. El COD1 localizado en Xp21.1-4 y recientemente identificado como

el gen RPGR (Exón ORF15) y el COD2, sin gen identificado, localizado entre los marcadores DXS92 y DXS1113 en Xq27.2-q28 <sup>48-49</sup>

#### DCB SINDROMÁTICA

Existen algunos síndromes de los cuales la DCB forma parte. El síndrome de Bardet Biedl es una enfermedad autosómica recesiva con una prevalencia de 1 en cada 13500 a 160,000, se asocia con polidactilia postaxial, obesidad, hipogonadismo, retraso mental o psicomotor y anormalidades renales. La distrofia tiene involucro macular con disminución de la agudeza visual, fotofobia e hiperfluorescencia foveomacular. <sup>4</sup> A la fecha se han identificado 14 loci asociados con el síndrome de Bardet-Biedl. <sup>1,2</sup>

La ataxia espinocerebelar tipo 7 es una degeneración por expansión de poliglutamina en la proteína ataxina. Se hereda de forma autosómica dominante. La enfermedad inicia con depósitos granulares en la mácula que se expanden a toda la retina y progresan hasta un estado atrófico. <sup>2</sup>

Las enfermedades ectodérmicas como la amelogenesis imperfecta, hipotricosis con distrofia macular juvenil, síndromes dismórficos y disfunciones metabólicas como en anemia megaloblástica y Refsum con ácido fitánico aumentado también se han asociados a formas sindromáticas de DCB. <sup>2,6</sup>

## GENES MÁS FRECUENTEMENTE RELACIONADOS CON DCB

### CRX

CRX (Cone Rod homeobox), pertenece a la familia de homeobox *OTD/OTX* y es un factor de transcripción fundamental para la diferenciación de fotorreceptores y para el mantenimiento de las redes regulatorias de transcripción para el desarrollo de la retina normal. Este gen posee un dominio pareado seguido por una región básica, un dominio WSP y una cola OTX. Las mutaciones en el gen CRX condicionan degeneración de los fotorreceptores que condicionan patologías como DCB2 (CORD2), amaurosis congénita de Leber tipo VII (LCA7) y retinosis pigmentaria de aparición tardía. <sup>8-9</sup>

Estudios in vivo demuestran que CRX se une específicamente a elementos regulatorios en los promotores de diversos genes específicos para el funcionamiento de los fotorreceptores, incluyendo a la rodopsina. En el caso del promotor de rodopsina, CRX actúa sinérgicamente con la transcripción del factor NRL (neural retinal leucine zipper). CRX se ha asociado con varias formas de degeneración retiniana. R41W, R41Q, E80A, A158T, V242M son mutaciones identificadas en pacientes con distrofia cono bastón de herencia autosómica dominante. <sup>10-11</sup>

### ABCA4

El gen ABCA4 fue descubierto en 1997, a partir de un intervalo 2cM intervalos entre los marcadores polimórficos DIS406 y DIS236 en 1p13-p21 <sup>50</sup>. El gen

ABCA4 consiste en 50 exones y codifica una proteína con un peso molecular de 220kDa <sup>51-54</sup>, conocida como RIM (RmP) importante en el funcionamiento de la retina <sup>51</sup>

El transportador de cassette que liga ATP (ABC) constituye una familia de proteínas transmembranales también codificadas por ABCA4, transportan sustancias a través de membranas. <sup>23</sup> Uno de los miembros de esta familia es la proteína ABCA4, que es expresada en los conos y los bastones. Funciona como transportador para N retinaldehído fosfatidiletanolamina y all trans retinal. La alteración en el transporte de este desde el lumen hasta el citosol altera el ciclo visual finalmente llevando a acumulación de n retinaldeído y lipofuscina tóxica en el EPR con subsecuente fagocitosis de los fotorreceptores. <sup>24</sup>

Las mutaciones en ABCA4 se identificaron inicialmente en pacientes con enfermedad de Stargardt de herencia autosómica recesiva, en la variedad fundus flavimaculatus y subsecuente también en DCB y RP. Más aun, cambios heterocigotos en ABCA4 se han propuesto como un factor de susceptibilidad para el desarrollo de la degeneración macular relacionada con la edad. <sup>25</sup>

Se ha observado un espectro de enfermedades retinianas relacionadas con ABCA4 comprendiendo distrofias retinianas. Así la enfermedad de Stargardt, la RP y la DCB de herencia autosómica recesiva pueden originarse por mutaciones en ABCA4<sup>30</sup> Finalmente y como se mencionó anteriormente, se han identificado mutaciones en este gen en una proporción significativamente más alta de forma estadística en sujetos con degeneración macular relacionada con la edad <sup>31-33</sup>

A la fecha se han descrito más de 400 secuencias de variación en ABCA4 dentro de los cuales ciertas mutaciones son las más frecuentes causantes de enfermedad de Stargardt como G863A, A1038V y G1961E <sup>52</sup>. Dentro de las mutaciones que se han asociado a DCB de herencia autosómica recesiva, una mutación en un sitio de splicing es responsable del 65% de los casos. <sup>56</sup>

Es difícil inferir la patogenicidad de las mutaciones heterocigotas en ABCA4 por el hecho de que la frecuencia de portadores en la población general es del 2 al 3% <sup>56</sup>

Se ha descrito una gran heterogeneidad alélica (Human Gene Mutation Database), adicionalmente la frecuencia de portador de mutaciones en ABCA4 es particularmente alta en la población general y oscila entre 1 de cada 50 y 1 de cada 10 <sup>45-47</sup>.

Se especula que los diferentes fenotipos son resultados de una variación de combinaciones de mutaciones con efecto leve a moderado o severo del gen ABCA4. Se presume que la intensidad de las enfermedades retinianas se explican por el monto residual de actividad de RmP<sub>53</sub>. De esta forma las diferentes combinaciones de mutaciones de ABCA4 dan origen a distrofias retinianas como STGD, DCB y RP pero también formas intermedias y sobrepuestas. <sup>30</sup>

La relación entre el genotipo ABCA4 y la severidad del fenotipo de la enfermedad ha resultado en muchas hipótesis, de acuerdo a estas de cada alelo ABCA4 produce ya sea una proteína de funcionalidad anormal o no produce proteína. La suma de la función residual final del par de alelos ABCA4 puede variar de normal a no existente.<sup>14</sup> La severidad clínica de ABCA4 se piensa esta inversamente relacionada a la función residual de ABCA4. De hecho individuos con mutaciones



truncadas en ambos alelos representan una pérdida completa de la función ABCR y corresponde al fenotipo reportado en las distrofias retinianas más severas.<sup>15</sup>

Sin embargo la prevalencia en mutaciones del gen ABCA4 en DCB autosómica recesiva ha variado considerablemente entre estudios, entre 23 a 65%<sup>26-29</sup>.

Se ha demostrado que los fotorreceptores son los principales contribuyentes a la pérdida de sensibilidad en la enfermedad causada por ABCA4.<sup>14</sup>

De acuerdo con la hipótesis que involucra la función residual de ABCR, cada alelo de ABCA4 no produce proteína o produce una con funcionalidad anormal. La suma total de los residuos forma el par de alelos ABCA4 que pueden variar de normales a no existentes. La severidad clínica del ABCA4 se cree esta inversamente relacionada a la función de ABCR.

El espectro clínico definido por ABCA4 es muy amplio pero no hay forma de predecir cuándo y quienes van a progresar a ceguera. Sin embargo, en la mayoría de los individuos con ABCA4, el fenotipo varía entre intermedio y los extremos<sup>34</sup>

#### **PATOGÉNESIS ORIGINADA POR ABCA4**

La patogénesis de la enfermedad ABCA4 puede potencialmente incluir dos vías. Una de estas es la pérdida de la función. La pérdida parcial de la función puede resultar de la actividad disminuida de las proteínas mutantes propiamente sintetizadas, dobladas y transportadas a los bordes de los segmentos externos de los discos.<sup>34-38</sup> La pérdida de la función completa resulta de la degradación de proteínas mal plegadas o truncas.

La pérdida de la función de ABCR resulta en una enfermedad de retina por acumulación de sustancias tóxicas dentro de los fotorreceptores o de las células vecinas de RPE. Es importante notar que las proteínas mal plegadas pueden exacerbar la pérdida de la función.<sup>39-40</sup> Normalmente el sistema celular por degradación y depuración de las proteínas mal plegadas es sumamente eficiente. Pero el estrés elevado del fotorreceptor causado por la acumulación de atRAL puede sobrepasar el recambio de proteínas causando un estrés e iniciación de una vía de apoptosis.<sup>41-44</sup>

La presentación fenotípica universal de ABCA4 es una degeneración progresiva de los fotorreceptores y el RPE en la mácula. Cuando ABCA4 progresa de una degeneración de mácula únicamente al total de la retina, la calidad de vida se deteriora dramáticamente con pérdida de la movilidad y la independencia.<sup>44</sup>

La enfermedad retiniana causada por la mutación ABCA4 cubre un espectro de severidad variado. El criterio clínico se usa como método de comparación. La enfermedad de Stargardt es considerada como el representante de un fenotipo menos severo que la distrofia de conos o la retinosis pigmentaria atípica. El ERG es una forma objetiva de medir la cantidad de retina afectada.<sup>50</sup>

## **JUSTIFICACIÓN:**

La distrofia de cono bastón es una enfermedad rara en la cual hay un gran espectro de manifestaciones fenotípicas y que puede ser causada por mutaciones en diversos genes. El gen más frecuentemente involucrado es ABCA4 por lo que el análisis de este gen en casos esporádicos y familiares de DCB permitirá aumentar el conocimiento de las características clínicas y genéticas de esta enfermedad.

## **OBJETIVOS:**

Identificar la causa genética de la DCB en un caso familiar de la enfermedad.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **PACIENTES**

Se incluyeron sujetos de una familia con diagnóstico confirmado de DCB a los que se le realizó historia clínica y genética completa, de igual forma se realizó exploración oftalmológica y genética utilizando muestras extraídas de sangre periférica, previo consentimiento informado. (ANEXO 1)

De los pacientes incluidos se obtuvieron datos (ANEXO 2) identificación del paciente, antecedentes heredofamiliares y personales patológicos junto con un árbol genealógico completo, sintomatología relacionada con DCB, inicio de los síntomas, datos de exploración oftalmológica y estudios de gabinete (electroretinograma). Los síntomas relacionados con DCB que fueron interrogados

de forma intencionada fueron disminución de la agudeza visual, fotofobia, discromatopsia, nictalopía y disminución de los campos visuales.

Los datos de la exploración oftalmológica necesarios para el diagnóstico de estos pacientes incluyen cualquiera de los siguientes: depósitos pigmentarios parecidos a espículas óseas frecuentemente en área macular, atenuación de los vasos retinianos, palidez del nervio óptico y atrofia retiniana en grados variables.

Los hallazgos electroretinográficos requeridos incluyeron una disminución importante de la amplitud tanto de la onda A como de la B con involucro fotópico principalmente.

Se obtuvieron datos sobre la genealogía de las generaciones pasadas de los pacientes.

#### **EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE SANGRE PERIFÉRICA.**

A cada sujeto se le extrajo una muestra de 2 ml de sangre periférica por punción venosa y se procedió a aislar el DNA genómico a partir de los leucocitos utilizando 1 ml del reactivo DNAzol BD (Invitrogen) por cada 500 microlitros de muestra; se agregaron 400 microlitros de alcohol isopropílico agitando vigorosamente el tubo durante 1 minuto. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para después centrifugarla a 6000 rpm durante 6 minutos, se añadió 500 microlitros de DNAzol BD al botón residual y se agitó hasta disolver el botón. De nuevo, la muestra se centrifugara a 6000 rpm, esta vez por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó al botón un ml de etanol al 75% posteriormente se agitó hasta disolver el botón. La muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de alcohol con

micropipeta. Finalmente se agregó al botón 200 microlitros de óxido de sodio (NaOH) 8mM o de agua bidestilada estéril y se almacenó la muestra a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

#### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL DNA OBTENIDO.**

Se determinó la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 NM de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitió evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280nm corresponde a la fracción proteica. Se consideraran adecuadas relaciones entre 1.6 y 2. Además se realizó electroforesis en gel de agarosa por cada muestra de DMA obtenida para verificar que no exista degradación de ácido nucleico.

#### **AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN ABCA4**

A partir de DNA genómico de los sujetos afectados se realizó la amplificación por PCR de los exones 12, 17, 23, 24, 29, 31, 40, 41, 42 y 44. Se eligieron estos 10 exones, del total de 50 exones del gen, debido a que en éstos se han descrito la mayoría de las mutaciones en pacientes con enfermedad de Stargardt en otras poblaciones. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para estas regiones. Cada reacción de PCR de 20 µL contenía 1U de HotStart Taq polimerasa (Qiagen), 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 0.3µM de cada primer, DMSO al 8% y 150ng de DNA genómico.

Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pares de bases.

Se identificaron las bandas de interés y se recortaron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Promega).

La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinó por comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

#### **SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DIRECTA DE LOS PRODUCTOS DE PCR.**

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica del fragmento amplificado del gen ABCA4. Cada reacción de 20 $\mu$ L contuvo 4 $\mu$ L de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub> y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 1 $\mu$ L del oligonucleótido correspondiente para ambas cadenas de DNA a una concentración de 10 $\mu$ M, 10-20ng de DNA de cada producto del PCR como templado y agua bidestilada para volumen final de 20 $\mu$ L. Para esta PCR se utilizará un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para desnaturalización, 15 segundos a 50°C para el alineamiento y 4 minutos a 60°C para extensión.

Los productos de esta segunda PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de dNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 $\mu$ L de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos. Los productos se analizaron en un secuenciador automático ABI Prism 310 y las secuencias obtenidas en sujetos sanos y enfermos se compararon con las secuencias silvestres del gen ABCA4.

## RESULTADOS

Se incluyeron 8 pacientes miembros de una misma familia (Figura 1.) de los cuales cuatro de ellos estaban afectados con la enfermedad.

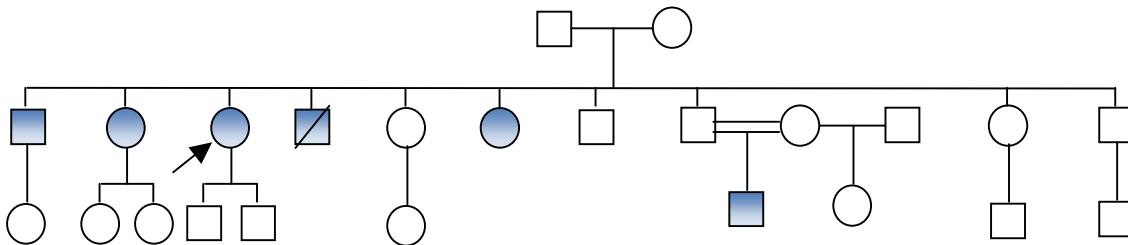
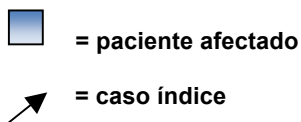


Figura 1. Árbol genealógico de la familia afectada con distrofia cono-bastón. Se observa transmisión autosómica recesiva.



## VALORACIÓN CLÍNICA

Todos los pacientes iniciaron con disminución de la agudeza visual progresiva durante la primera década de la vida con una media de presentación de 11 años (6 – 14 años), todos presentaron una refracción con miópica en promedio de 3.5D (2-5.5D), se caracterizaban por no corregir con corrección. La agudeza visual promedio fue de 0.04 LogMAR (0.0005 a 0.06) después de 20 años de enfermedad en promedio.



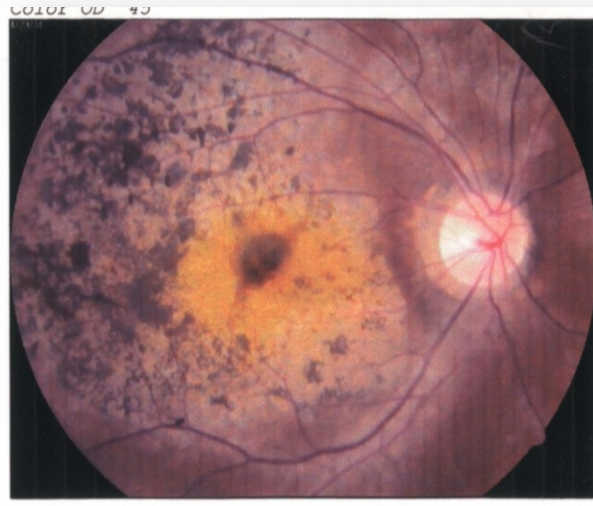
Las pruebas de visión al color en tres pacientes tenían alteraciones del eje verde – rojo (2 pacientes), en el azul-amarillo (1 paciente) y resultados caóticos (1 paciente) en la prueba Farnsworth Munsell de 15 colores.

Todos los afectados refirieron fotofobia, tres pacientes (75%) durante la primera década de la vida, un paciente durante la tercera.

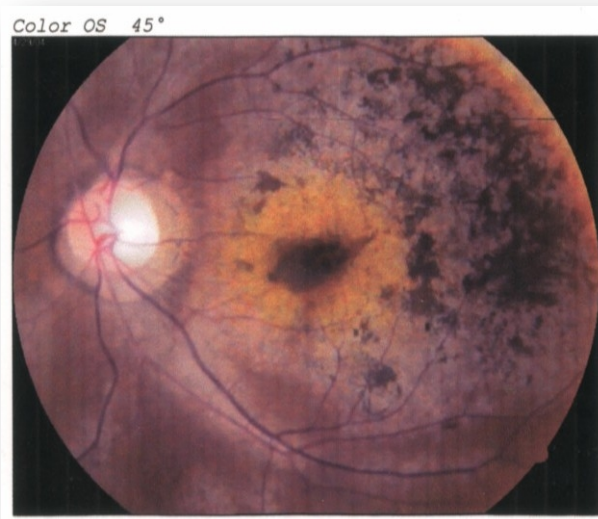
Al momento de la exploración oftalmológica se observa en el fondo de ambos ojos papila pálida y disminución marcada del calibre de los vasos. Atrofia amplia y excéntrica del epitelio pigmentado de la retina de predominio temporal con acumulación irregular de pigmento ocupado casi en su totalidad el espacio entre las arcadas. Los bordes de la lesión bien delimitados con imagen de “Diana de tiro”, dimensiones aproximadas de 6 a 8 diámetros de disco. El área foveolar presenta pérdida de la estructura conservando únicamente coloración amarillenta con mayor intensidad hacia el centro de la fovea. En esta área se aprecia la existencia de atrofia coriocapilar en diferentes grados. El fondo predominante de gris claro en la macula se ve cubierto por manchas ovaladas de color gris oscuro en la periferia de la mácula. Del lado temporal aparecen manchas casi negras que parecen encontrarse encima de las demás.

El área de atrofia se extiende hacia el ecuador siguiendo el trayecto de los grandes vasos. Se observa acumulación de pigmento en forma de espículas óseas disminuyendo su tamaño en las alteraciones más periféricas y con mayor extensión alrededor de las venas.

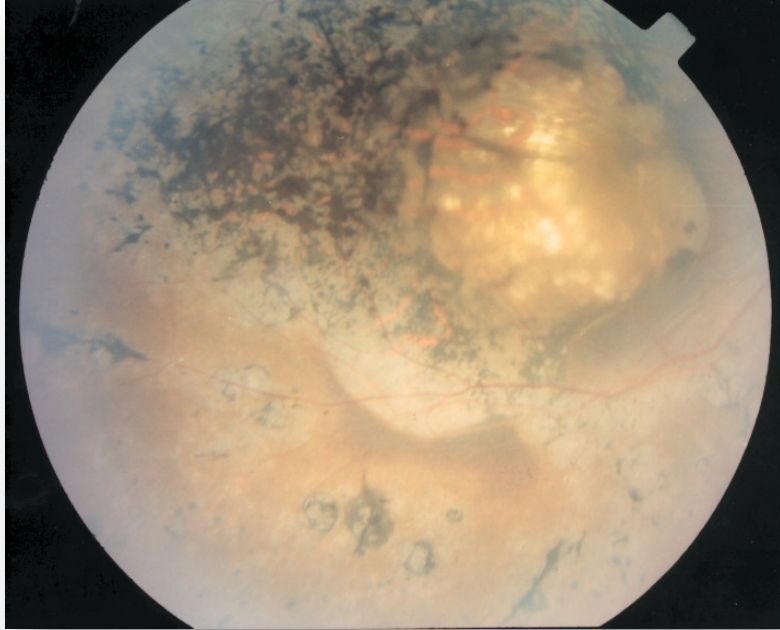
En el campo visual de Goldman se observa un escotoma central y constricción leve de los campos visuales periféricos en todos los pacientes afectados.



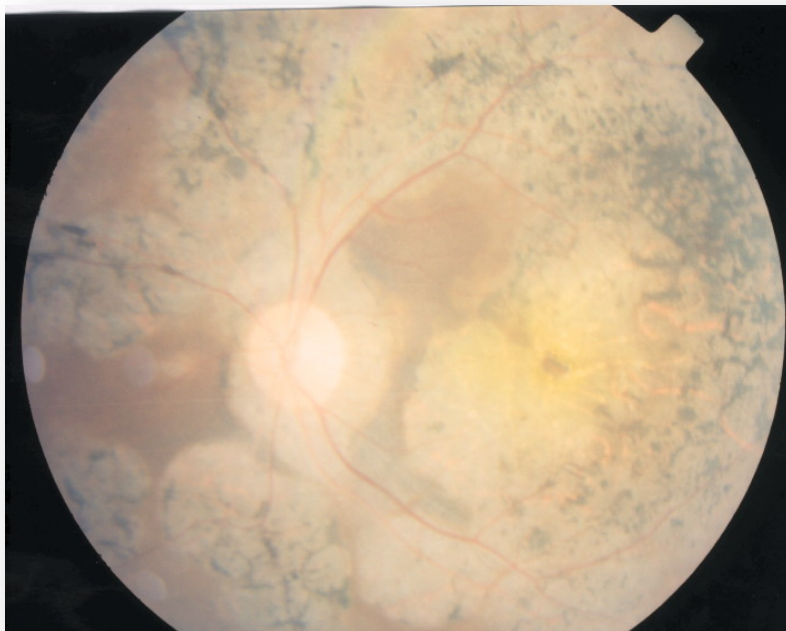
**Figura 2. Fondo de ojo derecho de paciente 1 (Caso índice) con palidez de nervio óptico, alteraciones maculares con atrofia corioretiniana y depósito de pigmento periférico.**



**Figura 3. Fondo de ojo izquierdo de paciente 1 (Caso índice) con palidez de nervio óptico, alteraciones maculares con atrofia corioretiniana y depósito de pigmento periférico.**



**Figura 4. Fondo de ojo derecho de paciente 2 con palidez de nervio óptico y de fondo en general, alteraciones maculares con atrofia corioretiniana y depósito de pigmento periférico.**



**Figura 5. Fondo de ojo izquierdo de paciente 2 con palidez de nervio óptico y de fondo en general, alteraciones maculares con atrofia corioretiniana y depósito de pigmento periférico.**

La fluorangiografía reporta tiempos coroideos, arterial y venoso dentro de parámetros normales. Desde etapas tempranas se observa hipofluorescencia por bloqueo y posiblemente pérdida de la coriocapilar. El borde de la lesión se observa hiperfluorescente debido a las áreas de atrofia del EPR adyacente.

El estudio de electroretinografía reporta respuesta subnormal de conos y bastones (3 pacientes) y abolida (1 paciente)

#### **ANÁLISIS GENÉTICO**

Se realizó secuenciación de los exones 12, 17, 23, 24, 29, 31, 40, 41, 42 y 44 del gen ABCA 4 en el DNA purificado de los 4 pacientes afectados y tres controles sanos.

No se demostró ninguna mutación que pudiera explicar la enfermedad en estos exones. Sin embargo se identificaron diversos polimorfismos ya descritos en la literatura, uno de los cuales fue discordante entre miembros afectados de la familia. (**Tabla 2**). Este polimorfismo del exón 40 permitió descartar que la enfermedad estuviera ligada al gen ABCA4.

<b>PACIENTE</b>	<b>POLIMORFISMO EN EXÓN 40 DE ABCA4</b>
1 (Caso Índice)	G / G
2	G / G
<b>3</b>	<b>G / C</b>
4	G / G

**Tabla 2-** El análisis de los alelos asociados a un polimorfismo de base única en el exón 40 del gen ABCA4 indica que este gen no es responsable de la enfermedad en esta familia particular, ya que el paciente 3 muestra una combinación diferente de alelos para esta variante.

Debido a los datos que indican que ABCA4 no es responsable de la DCB en esta familia, se realizó un estudio de ligamiento del genoma completo utilizando un microarreglo de SNPs de 250K (250,000 SNPs). Los datos (no mostrados) indican que la enfermedad está ligada a un locus en el brazo corto del cromosoma 18. A la fecha, no se ha identificado ningún gen o locus asociado a 18p en DCB, por lo que es muy probable que el locus en la familia descrita en este trabajo corresponda a un gen nuevo de DCB.

## **DISCUSIÓN:**

La presentación fenotípica de la distrofia cono bastón es una degeneración progresiva de los fotorreceptores y del epitelio pigmentado de la retina en la mácula, que disminuye de forma dramática la visión del paciente, limitando así el desempeño de sus actividades cotidianas. Cuando la enfermedad progresa desde la afección de la mácula únicamente a la totalidad de la retina la pérdida de la función es importante. <sup>58</sup>

La sintomatología primaria en los pacientes del estudio fue la disminución de la agudeza visual mejor corregida. Todos los pacientes presentaron miopía de leve a moderada (menor a 6 dioptrías) y presentaron alteraciones de la visión al color principalmente en el eje rojo-verde. En todos los pacientes del estudio la sintomatología se inició en la infancia con progresión lenta. <sup>3 - 4</sup>

La adaptación a la oscuridad está ausente en todos los pacientes de nuestro estudio al igual que la visión de color. En uno de los pacientes la prueba de visión de color se mostró alterada sin patrón específico de daño, dato compatible con los reportados por Meire et al, en el que este tipo de alteraciones se presentaba en los pacientes con mayor edad y por tanto mucho tiempo de progresión de la enfermedad. <sup>59 - 62</sup>

Los campos visuales presentan clásicamente un escotoma central que va progresando a afección periférica. El diagnóstico definitivo se hace con los estudios electrofisiológicos en los que se reportó ondas a y b retrasadas posterior a una disminución de la respuesta fotópica, que con el paso del tiempo y el grado de afección se van aplanando. <sup>3</sup>

La prevalencia reportada de mutaciones en el gen ABCA4 en pacientes con DCB oscila de 25 a 40% dependiendo del estudio <sup>60-65</sup>, sin embargo no hay datos estadísticos a este respecto en población mexicana. Contrario lo descrito en la literatura universal, debido al polimorfismo encontrado en el exón 40, descartamos que el origen de la enfermedad se encuentre en una alteración de la secuencia del gen ABCA4. <sup>64</sup>

Los diferentes reportes de prevalencia pueden ser atribuidos al diseño del estudio o por diferencias sustanciales en la muestra de pacientes (8 a 54 pacientes). De igual forma los criterios de inclusión, ya que el fenotipo puede ser confundido con enfermedad de Stargardt que tiene una prevalencia de alteración en ABCA4 del 58 a 75% o con retinosis pigmentaria con una prevalencia de mutación del gen ABCA4 de 5%. <sup>62</sup>

Se descartó que la alteración genética se encontrara en ABCA4 debido al polimorfismo encontrado en el paciente 3. Se realizó un estudio de microarreglo utilizando un chip de 250KNSP para identificar la región en donde se presenta la alteración genética posiblemente responsable de la DCB. Este estudio se realizó por ser rápido, efectivo y útil tanto para diagnóstico genético como para investigación como herramienta de tamizado inicial. Se encontró una alteración de la secuencia en la región 18P común para todos los pacientes afectados. Dentro de la región 18p identificada por análisis de ligamiento en esta familia existen 60 genes descritos, de los cuales por su relación con el desarrollo de las estructuras de la retina, los posibles candidatos son TUB6 (Beta 6 tubulina) y AFG3L2 (Gen de la familia de ATPasa 3 like 2).

TUB6 es un gen localizado en el Locus NP\_196786449, codifica para beta 6 tubulina, que es un constituyente estructural del citoesqueleto y consta de 449 aminoácidos.<sup>58</sup>

AFG3L2 codifica para una proteína que constituye una subunidad catalítica de la proteasa m-AAA, que es un complejo proteolítico dependiente de ATP localizado en la membrana interna de la mitocondria. Su función es degradar las proteínas con alteraciones en el plegamiento regulando así el ensamblado de los ribosomas. Esta localizado en el locus NG\_023361 y consta de 55333 pares de bases.<sup>59</sup>



## **CONCLUSIONES:**

En este estudio se presenta a una familia mexicana con diagnóstico de distrofia cono bastón con un patrón de herencia autosómico recesivo.

Los cuatro miembros de la familia afectados con la enfermedad presentaron características clínicas similares y compatibles con la enfermedad. Los estudios de gabinete en particular las pruebas de electrofisiológicas confirmaron el diagnóstico.

En el análisis genético se descartó que mutaciones en el gen ABCA4 fueran responsables de la DCB en esta familia.

El estudio de ligamiento realizado en esta familia permitió identificar una región de 18p en la que posiblemente se encuentre el gen responsable.

No se ha descrito ningún gen o región en 18p asociado a DCB, por lo que postulamos que se trata de un nuevo gen asociado a DCB.

Futuros estudios de cada uno de los genes presentes en esta región nos llevarán a identificar la mutación responsable de la distrofia cono bastón en esta familia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hamel CP. **Cone and Rod Dystrophy** *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007, 10.1186/1750-1172-2-7
2. Hamel CP, Griffoin JM, Bazalgette C, Lasquelles L, Duval PA, Bareil C, Beaufriere L, Bonnet S, Eliaou C, Marlhens F, Schmitt-Bernard CF, Tuffery S, Claustres M, Arnaud B: **[Molecular genetics of pigmentary retinopathies: identification of mutations in CHM, RDS, RHO, RPE65, USH2A and XLR51 genes]**. *J Fr Ophthalmol* 2000, **23(10)**:985-995.
3. Ryan S. **RETINA**, 4th Edition, El Servier 2004, Section 6: Retinal degenerations and dystrophies.
4. Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA: **New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey**. *J Med Genet* 1999, **36(6)**:437-446.
5. Aleman TS, Cideciyan AV, Volpe NJ, Stevanin G, Brice A, Jacobson SG: **Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) shows a cone-rod dystrophy phenotype**. *Exp Eye Res* 2002, **74(6)**:737-745.
6. Downey LM, Keen TJ, Jalili IK, McHale J, Aldred MJ, Robertson SP, Mighell A, Fayle S, Wissinger B, Inglehearn CF: **Identification of a locus on chromosome 2q11 at which recessive amelogenesis imperfecta and cone-rod dystrophy cosegregate**. *Eur J Hum Genet* 2002, **10(12)**:865-869.

7. Ili IK, Smith NJ: **A progressive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta: a new syndrome.** *J Med Genet* 1988, **25(11):738-740.**
8. Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, Bellingham J, Ng D, Herbrick JA, Duncan A, Scherer SW, Tsui LC, Loutradis-Anagnostou A, Jacobson SG, Cepko CL, Bhattacharya SS, McInnes RR: **Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor.** *Cell* 1997, **91(4):543-553.**
9. Swain PK, Chen S, Wang QL, Affatigato LM, Coats CL, Brady KD, Fishman GA, Jacobson SG, Swaroop A, Stone E, Sieving PA, Zack DJ: **Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration.** *Neuron* 1997, **19(6):1329-1336.**
10. Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J: **Evidence of autosomal dominant Leber congenital amaurosis (LCA) underlain by a CRX heterozygous null allele.** *J Med Genet* 2003, **40(7):e90.**
11. Swaroop A, Wang QL, Wu W, Cook J, Coats C, Xu S, Chen S, Zack DJ, Sieving PA: **Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX: direct evidence for the involvement of CRX in the development of photoreceptor function.** *Hum Mol Genet* 1999, **8(2):299-305.**
12. Kobayashi A, Higashide T, Hamasaki D, Kubota S, Sakuma H, An W, Fujimaki T, McLaren MJ, Weleber RG, Inana G: **HRG4 (UNC119) mutation**

- found in cone-rod dystrophy causes retinal degeneration in a transgenic model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41(11)**:3268-3277.
13. Briggs CE, Rucinski D, Rosenfeld PJ, Hirose T, Berson EL, Dryja TP: **Mutations in ABCR (ABCA4) in patients with Stargardt macular degeneration or cone-rod degeneration.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, **42(10)**:2229-2236.
  14. Ducroq D, Rozet JM, Gerber S, Perrault I, Barbet D, Hanein S, Hakiki S, Dufier JL, Munnich A, Hamel C, Kaplan J: **The ABCA4 gene in autosomal recessive cone-rod dystrophies.** *Am J Hum Genet* 2002, **71(6)**:1480-1482.
  15. Fishman GA, Stone EM, Eliason DA, Taylor CM, Lindeman M, Derlacki DJ: **ABCA4 gene sequence variations in patients with autosomal recessive cone-rod dystrophy.** *Arch Ophthalmol* 2003, **121(6)**:851-855.
  16. Klevering BJ, Yzer S, Rohrschneider K, Zonneveld M, Allikmets R, van den Born LI, Maugeri A, Hoyng CB, Cremers FP: **Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa.** *Eur J Hum Genet* 2004, **12(12)**:1024-1032.
  17. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FP: **Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy.** *Am J Hum Genet* 2000, **67(4)**:960-966.
  18. Papaioannou M, Ocaka L, Bessant D, Lois N, Bird A, Payne A, Bhattacharya S: **An analysis of ABCR mutations in British patients with**

- recessive retinal dystrophies.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41(1)**:16-19.
19. Rozet JM, Gerber S, Souied E, Ducroq D, Perrault I, Ghazi I, Soubrane G, Coscas G, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J: **The ABCR gene: a major disease gene in macular and peripheral retinal degenerations with onset from early childhood to the elderly.** *Mol Genet Metab* 1999, **68(2)**:310-315.
20. Demirci FY, Rigatti BW, Wen G, Radak AL, Mah TS, Baic CL, Traboulsi EI, Alitalo T, Ramser J, Gorin MB: **X-linked cone-rod dystrophy (locus COD1): identification of mutations in RPGR exon ORF15.** *Am J Hum Genet* 2002, **70(4)**:1049-1053.
21. Hameed A, Abid A, Aziz A, Ismail M, Mehdi SQ, Khaliq S: **Evidence of RPGRIP1 gene mutations associated with recessive conerod dystrophy.** *J Med Genet* 2003, **40(8)**:616-619.
22. Anne Caroline Wiik, Claire Wade, Tara Biagi, et al. **A deletion in nephronophthisis 4 (NPHP4) is associated with recessive cone-rod dystrophy in standard wire-haired dachshund** *Genome Res.* published online August 7, 2008
23. Cole SP, Deeley RG. **Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP.** *Bioessays* 1998 Nov; 20(11):931–40.
24. Veronique BD Kitiratschky<sup>1</sup>, Tanja Grau<sup>1</sup>, Antje Bernd<sup>2</sup>, Eberhart Zrenner<sup>2</sup>, Herbert Ja'gle<sup>2</sup>, Agnes B Renner<sup>3</sup>, Ulrich Kellner<sup>3,4</sup>, Gu'nther Rudolph<sup>5</sup>, Samuel G Jacobson<sup>6</sup>, Artur V Cideciyan<sup>6</sup>, Simone Schaich<sup>1</sup>, Susanne Kohl<sup>1</sup> and Bernd Wissinger\*, **ABCA4 gene analysis in patients with**

- autosomal recessive cone and cone rod dystrophies**, European Journal of Human Genetics (2008) 16, 812–819
25. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N et al: **Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration**. Science 1997; 277: 1805– 1807.
  26. Ducroq D, Rozet JM, Gerber S et al: **The ABCA4 gene in autosomal recessive cone-rod dystrophies**. Am J Hum Genet 2002; 71: 1480–1482.
  27. Fishman GA, Stone EM, Eliason DA, Taylor CM, Lindeman M, Derlacki DJ: **ABCA4 gene sequence variations in patients with autosomal recessive cone-rod dystrophy**. Arch Ophthalmol 2003;121: 851– 855.
  28. Klevering BJ, Yzer S, Rohrschneider K et al: **Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa**. Eur J HumGenet 2004; 12: 1024– 1032.
  29. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K et al: **Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy**. Am J Hum Genet 2000; 67: 960– 966.
  30. Klevering BJ, Deutman AF, Maugeri A, Cremers FP, Hoyng CB. **The spectrum of retinal phenotypes caused by mutations in the ABCA4 gene**. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2005 Feb;243(2):90-100.
  31. Allikmets R **Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration**. Am J Hum Genet 2000, 67:487– 491

32. Allikmets R **Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease.** Am J Hum Genet 2000 67:793–799
33. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski JR, Leppert M **Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration.** Science 277:1805–1807
34. Cideciyan AV, Swider M, Aleman TS, Tsybovsky Y, Schwartz SB, Windsor EA, Roman AJ, Sumaroka A, Steinberg JD, Jacobson SG, Stone EM, Palczewski K. **ABCA4 disease progression and a proposed strategy for gene therapy** Hum Mol Genet. 2009 Mar 1;18(5):931-41.
35. Weng, J., Mata, N.L., Azarian, S.M., Tzekov, R.T., Birch, D.G. and Travis, G.H. **Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice.** Cell 1999, 13–23.
36. Sun, H., Molday, R.S. and Nathans, J. **Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease.** J. Biol. Chem. 2004, 274, 8269–8281.
37. Molday, R.S. **ATP-binding cassette transporter ABCA4: molecular properties and role in vision and macular degeneration.** J. Bioenerg. Biomem. 2007, 39, 507–517.
38. Pawar, A.S., Qtaishat, N.M., Little, D.M. and Pepperberg, D.R. (2008) **Recovery of rod photoresponses in ABCR-deficient mice.** Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 49, 2743–2755.

39. Lomas, D.A. and Parfrey, H. **Alpha1-antitrypsin deficiency**. Molecular pathophysiology. 2004 Thorax, 59, 529–535.
40. Görlach, A., Klappa, P. and Kietzmann, T. **The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control**. Antioxid. Redox. Signal. (2006), 8, 1391–1418.
41. Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J. **Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?** Antioxid. Redox. Signal. (2007), 9, 2277–2293.
42. Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. **A trip to the ER: coping with stress**. Trends Cell. Biol. (2004), 14, 20–28.
43. Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M. and Walter, P. **IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response**. Science, (2007) 318, 944–949.
44. Gregersen, N., Bross, P., Vang, S. and Christensen, J.H. **Protein misfolding and human disease**. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. (2006), 7, 103–124.
45. Ducroq D, Shalev S, Habib A, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. **Three different ABCA4 mutations in the same large family with several consanguineous loops affected with autosomal recessive cone-rod dystrophy**. Eur J Hum Genet. 2006 Dec;14(12):1269-73. Epub 2006 Aug 9.
46. Maugeri A, Flothmann K, Hemmrich N et al: **The ABCA4 2588G4C Stargardt mutation: single origin and increasing frequency from South-West to North-East Europe**. Eur J Hum Genet 2002; 10: 197– 203.



47. Yatsenko AN, Shroyer NF, Lewis RA, Lupski JR: **Late-onset Stargardt disease is associated with missense mutations that map outside known functional regions of ABCR (ABCA4).** *Hum Genet* 2001; 108: 346– 355.
48. Jalkanen R, Demirci FY, Tynismaa H, Bech-Hansen T, Meindl A, Peippo M, Mäntyjärvi M, Gorin MB, Alitalo T. **A new genetic locus for X linked progressive cone-rod Dystrophy** *J Med Genet.* 2003 Jun;40(6):418-23.
49. Yang Z, Peachey NS, Moshfeghi DM, Thirumalaichary S, Chorich L Shugart YY, Fan K, Zhang K. **Mutations in the RPGR gene cause X-linked cone dystrophy.** *Hum Mol Genet* 2002;11:605-11.
50. Westerfeld C, Mukai S **Stargardt's Disease and the ABCR Gene** *Semin Ophthalmol.* 2008 Jan-Feb;23(1):59-65. Review.
51. Broccardo C, Luciani MF, Chimini G. **The ABCA class of mammalian transporters.** *Biochim Biophys Acta* 1999 Dec 6; 1461(2):395–404.
52. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, et al. **Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy.** *Am J Hum Genet* 2000; 67(4):960–966.
53. Van Driel MA, Maugeri A, Klevering BJ, Hoyng CB, et al. **ABCR unites what ophthalmologists divide.** *Ophthalmic Genet* 1998 Sep; 19(3):117–22. Review.
54. Xi Q, Li L, Traboulsi EI, Wang QK. **Novel ABCA4 compound heterozygous mutations cause severe progressive autosomal recessive cone-rod dystrophy presenting as Stargardt disease,** *Mol Vis.* 2009;15:638-45. Epub 2009 Apr 3.

55. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, et al. **Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration.** *Science* 1997; 277:1805–1807.
56. Ducroq D, Rozet JM, Gerber S, et al. **The ABCA4 gene in autosomal recessive cone-rod dystrophies.** *Am J Hum Genet.* 2002;71:1480–1482.
57. Fishman GA, Stone EM, Eliason DA, Taylor CM, Lindeman M, Derlacki DJ. **ABCA4 gene sequence variations in patients with autosomal recessive cone-rod dystrophy.** *Arch Ophthalmol.* 2003;121:851–855.
58. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=TUB6>]
59. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=AFG3L2>]
60. Suzanne Yzer,<sup>1,2</sup> L. Ingeborgh van den Born,<sup>1</sup> Marijke N. Zonneveld, **Molecular and phenotypic analysis of a family with autosomal recessive cone-rod dystrophy and Stargardt disease,** *Mol Vis* 2007; 13:1568-1572
61. Meire FM, Van Genderen MM, Lemmens K, Ens-Dokkum MH. **Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome (TRMA) with cone-rod dystrophy.** *Ophthalmic Genet.* 2000 Dec;21(4):243-50
62. Ducroq D, Rozet JM, Gerber S, et al. **The ABCA4 gene in autosomal recessive cone-rod dystrophies.** *Am J Hum Genet* 2002;71:1480–1482
63. Fishman GA, Stone EM, Eliason DA, Taylor CM, Lindeman M, Derlacki DJ. **ABCA4 gene sequence variations in patients with autosomal recessive cone-rod dystrophy.** *Arch Ophthalmol* 2003;121:851–855.
64. Klevering BJ, Yzer S, Rohrschneider K, et al. **Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod**

**dystrophy and retinitis pigmentosa.** Eur J Hum Genet 2004;12:1024–1032.

65. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, et al. **Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy.** Am J Hum Genet 2000;67:960–966.

## ANEXO 1:

### CARTA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO

Yo \_\_\_\_\_, declaro libremente que acepto participar de manera voluntaria en el estudio “**ANALISIS CLINICO-GENÉTICO EN UN CASO FAMILIAR DE DISTROFIA CONO-BASTÓN.**” que se realizará en el servicios de Genética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana y que estará bajo la responsabilidad del Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz. Se me ha explicado que se requiere de la toma de una muestra de 2 mililitros de sangre venosa periférica y que esta toma no representa ningún riesgo para mi salud más que la posible formación de un hematoma en el área de punción. Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de sangre se utilizará exclusivamente para investigar las alteraciones que produjeron mi enfermedad. Manifiesto que se me ha informado que este estudio puede identificar a sujetos que en mi familia presenten la alteración genética y que aun siendo sanos en este momento, desarrollarán la enfermedad posteriormente; se me ha asegurado que esta información será utilizada para fines de atención médica de la familia y que podrá ser divulgada con nuestro consentimiento explicito. También me ha sido señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en la investigación en el momento en que yo lo desee y que esta decisión no afectaría la calidad de la atención que recibo por parte del personal de este hospital. Finalmente manifiesto que se me ha responido satisfactoriamente todas mis dudas y que los médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar todas mis dudas y que los

médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar las dudas que pudieran surgir en el transcurso del estudio.

Atentamente

Nombre \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Dirección y teléfono:

-

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Médico \_\_\_\_\_ responsable: \_\_\_\_\_

Nombre y firma

Testigo \_\_\_\_\_ 1:

Nombre y firma

Testigo \_\_\_\_\_ 2:

Nombre y firma

ANEXO 2

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre:

\_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Sintomatología:

Disminución de la visión:      Si ( )      No ( )

Edad de inicio del síntoma:

\_\_\_\_\_

Fotofobia:                      Si ( )      No ( )

Edad de inicio del síntoma:

\_\_\_\_\_

Discromatopsia:              Si ( )      No ( )

Edad de inicio del síntoma:

\_\_\_\_\_

Nictalopia: Si ( ) No ( )

Edad de inicio del síntoma:

---

Reducción del Campo Visual: Si ( ) No ( )

Edad de inicio del síntoma:

---

Mencione otros familiares afectados:

---

---

---

---

Otras enfermedades oftalmológicas:

---

---

---

---

Exploración oftalmológica:

AV

OD:                      OI:

Error refractivo:

OD:                      OI:

PIO:

OD:                      OI:

Biomicroscopía:

---

---

---

---

Fundoscopia OD

Espículas óseas:                      Si ( )                      No ( )

Atenuación de vasos retinianos: Si ( )                      No ( )

Palidez de NO:                      Si ( )                      No ( )

Atrofia retiniana:                      Si ( )                      No ( )



Fundoscopia OI

Espículas óseas: Si ( ) No ( )

Atenuación de vasos retinianos: Si ( ) No ( )

Palidez de NO: Si ( ) No ( )

Atrofia retiniana: Si ( ) No ( )

Descripción de ERG:

---

---

---

---

Otros estudios (Fluorangiografía, Campimetría, Visión al color):

---

---

---

---

Genealogía:

Lugar de nacimiento y apellidos de los bisabuelos (anterior)

Lugar de nacimiento y apellidos de los abuelos:

Lugar de nacimiento y apellidos de los padres: