



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS rs931798 Y rs970476 DEL
GEN *SGCD* CON LA DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA
CON LA EDAD (DMRE) EN PACIENTES MEXICANOS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

LILIANA GUADALUPE CORTÉS BALLINAS



MÉXICO, D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

VOCAL: M. EN C. JOSÉ IGNACIO PARAMO RAMÍREZ

SECRETARIO: DR. FRANCISCO JAVIER ESTRADA MENA

1er. SUPLENTE: DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

2° SUPLENTE: DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, ESCUELA DE MEDICINA, UNIVERSIDAD PANAMERICANA.

ASESOR DEL TEMA:

DR. FRANCISCO JAVIER ESTRADA MENA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. ALEXANDRA BERENICE LUNA ANGULO

SUSTENTANTE:

LILIANA GUADALUPE CORTÉS BALLINAS

Índice

1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 <i>PREVALENCIA DE LA DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA A LA EDAD.</i>	3
2.2 <i>FISIOPATOLOGÍA DE LA DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA A LA EDAD.</i>	3
2.3 <i>FENOTIPOS DE LA DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA A LA EDAD.</i>	6
2.4 <i>FACTORES DE RIESGO.</i>	8
2.5 <i>FACTORES GENÉTICOS.</i>	8
2.6 <i>GEN SGCD</i>	9
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVOS	15
5. HIPÓTESIS	16
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
6.1 <i>POBLACIÓN.</i>	17
6.2 <i>CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA.</i>	18
6.3 <i>METODOLOGÍA.</i>	19
6.3.1 <i>Extracción de ADN genómico.</i>	19
6.3.2 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	20
6.3.3 <i>Purificación de Productos de PCR</i>	22
6.3.4 <i>Secuenciación</i>	23
6.3.5 <i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)</i>	25
6.3.6 <i>Análisis Estadístico</i>	28
7. RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
7.1 <i>CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ANALIZADA.</i>	29
7.2 <i>DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS SNP RS970476 Y RS931798 DEL GEN SGCD.</i>	32
7.3 <i>ASOCIACIÓN DE LOS SNP RS970476 Y RS931798 CON DMRE.</i>	34
7.4 <i>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS SNP RS970476 Y RS931798.</i>	36
7.5 <i>ESTRATIFICACIÓN DE LA DMRE Y SU ASOCIACIÓN CON LOS SNP RS970476 Y RS931798.</i>	37
8. CONCLUSIONES	40
9. BIBLIOGRAFIA	41

1. RESUMEN

La degeneración Macular Relacionada con la edad (DMRE) es la primera causa de ceguera en adultos mayores y la tercera causa de ceguera a nivel mundial. Esta enfermedad crónico progresiva se caracteriza por la presencia de cúmulos de biomoléculas (drusas) en las capas externas de la retina causando la pérdida funcional de este tejido y consecuentemente la ceguera.

Aunque la etiología de esta enfermedad no es clara, se ha demostrado que está asociada a factores ambientales y genéticos. Estos últimos cobran importancia, ya que diferentes estudios han demostrado que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes como *CFH*, *HTRA1* y *ARMS2* están asociados con DMRE.

Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos genes que permitan seguir entendiendo de manera conjunta la aparición y evolución de DMRE. Estudios recientes de genomas completos muestran que los SNP rs931798 y rs970476 del gen *SGCD* pueden estar asociados con la DMRE. Este trabajo, pretende aclarar si ambos polimorfismos en *SGCD* se asocian con DMRE en pacientes mexicanos.

Para llevar a cabo este protocolo se obtuvo DNA genómico de un total de 265 muestras, 133 controles sin afecciones retinianas y 132 pacientes pertenecientes a la consulta de retina del Instituto de Oftalmología, Conde de Valenciana, de los cuales 39 presentaron el fenotipo seco caracterizado por la presencia de drusas en la totalidad de la región macular y 91 presentaron el fenotipo húmedo o exudativo en el cual existe neovascularización patológica a partir de la coroides.

Se llevó a cabo la genotipificación del SNP rs931798 por medio de secuenciación automatizada y del rs970476 con sondas Taqman.

Las características de los participantes fueron comparadas usando *chi* cuadrada o la prueba de *t* de student para muestras independientes. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue usado para evaluar que los genotipos estuvieran dentro de la distribución esperada. La asociación de los genotipos con DMRE se realizaron en

los software FASTSNP y SPSS con regresión logística, los resultados se presentaron como RM con intervalo de confianza al 95%.

Nuestros resultados establecen que existe una diferencia significativa en las edades de los grupos lo que confirma que la enfermedad se asocia con la edad ($p=4 \times 10^{-5}$) y se determinó que existe un 8% de riesgo acumulativo de presentar la enfermedad por año de vida.

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para sexo, hipertensión, diabetes o tabaquismo.

El polimorfismo rs931798 se asoció con la enfermedad en su genotipo G/A como un factor de riesgo (RM=1.74, I.C.=1.004-3.022, $p=0.048$). En el resto de los polimorfismos analizados no se encontró asociación con la DMRE.

Al buscar la interacción de los SNP de interés con los factores confusores observamos que la DMRE en el SNP rs970476 en el genotipo homocigoto G/G aumenta en los individuos hipertensos del grupo de los casos e incrementa en los no hipertensos del grupo de los controles. Mostrando una RM=3.85 (IC 95% 1.48-10.07) con un valor significativo de $p=0.023$.

Se determinaron cuatro posibles haplotipos, el más frecuente fue GG con una frecuencia de 0.5229. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo de casos y controles por lo que ningún haplotipo se asoció con la DMRE

Por lo tanto, este estudio demuestra que existe asociación de riesgo entre el polimorfismo rs931798 en su variante heterocigota con la degeneración macular relacionada a la edad demostrando que el gen *SGCD* se encuentra implicado en este padecimiento y constituye un nuevo blanco a desarrollar en el estudio de la patología.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Prevalencia de la degeneración macular relacionada a la edad.

La degeneración macular relacionada a la edad (DMRE) es la primera causa de ceguera en adultos mayores y la tercera causa de ceguera a nivel mundial¹. Esta enfermedad cuenta con una prevalencia global del 8.7% contribuyendo en un 5% a la ceguera mundial solo por debajo del glaucoma y la catarata². A ella se encuentran asociados diversos factores de riesgo como son la edad, la hipertensión, el tabaquismo, la etnia y la dieta. De entre estos la edad se destaca por ser el principal factor de riesgo asociado, presentando una incidencia alta a partir de los 50 años de edad siendo en países industrializados la primera causa de ceguera en personas mayores³.

En México las proyecciones estadísticas estimaron alrededor de 3,858,808 de casos en el año 2004⁴. Debido a que la esperanza de vida ha aumentado a 78 años para la mujer y 73 para el hombre y a que existe aumento significativo en la población mayor de 60 años⁵, la prevalencia de esta enfermedad en la población mexicana cobra gran importancia.

2.2 Fisiopatología de la degeneración macular relacionada a la edad.

La DMRE es una enfermedad crónica que afecta a la mácula, región de 5 mm de diámetro encargada de la agudeza visual y localizada en la zona central de la retina. La mácula consta de dos regiones morfológicamente distintas según la distribución de los fotorreceptores, la fovea y la foveola (Fig. 1).

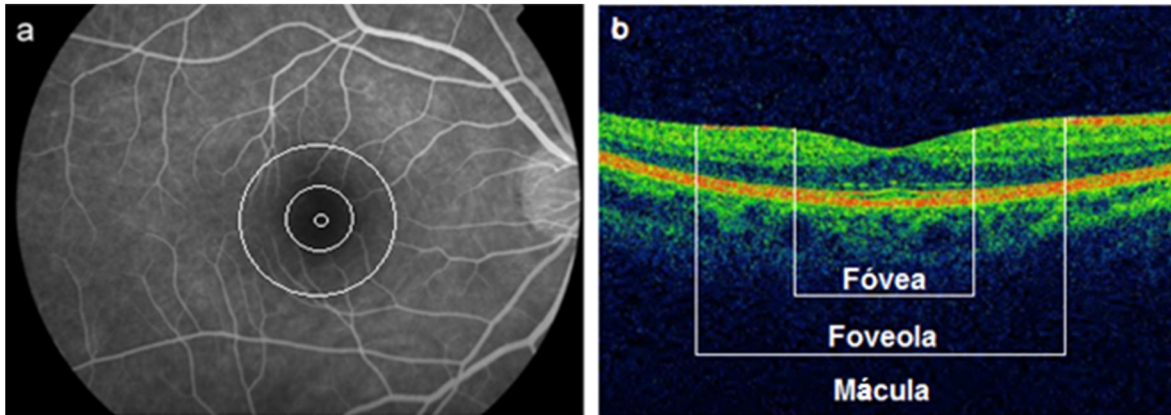


Figura 1. a) Angiografía de fluorescencia ocular donde los círculos concéntricos indican la mácula, la foveola y la fovea de afuera hacia adentro. b) Tomografía de coherencia óptica de la mácula en corte transversal. S. Khandhadia et al. / Immunobiology 217 (2012) 127– 146

La fovea es la región central de la mácula caracterizada por una depresión y está constituida únicamente de conos, los fotorreceptores encargados de responder en condiciones de luz diurna y diferenciar los colores mientras que la foveola se compone principalmente de bastones, los cuales proporcionan una agudeza visual baja y responden en condiciones de visión nocturna⁶.

Al observar la mácula con una cámara de fondo de ojo se observa un reflejo amarillento en esta zona debido a la presencia de la xantofila, un pigmento amarillo. La mácula normal se observa más oscura que el resto de la retina debido a este pigmento y a que el epitelio pigmentario retinal contiene más melanina, además de que tiene una sola capa de fibra nerviosa, lo que permite que la luz tenga un acceso directo a los bastones y conos⁷ (Fig. 2).

La DMRE es una enfermedad multifactorial que afecta principalmente a los fotorreceptores, al epitelio pigmentario retinal (EPR), la membrana de Bruch y a los coriocapilares. Los cambios detectables tempranos de la enfermedad son cambios que ocurren en la interface entre la retina macular y la capa de Bruch en donde se acumulan depósitos extracelulares anormales conocidos como drusas⁶.

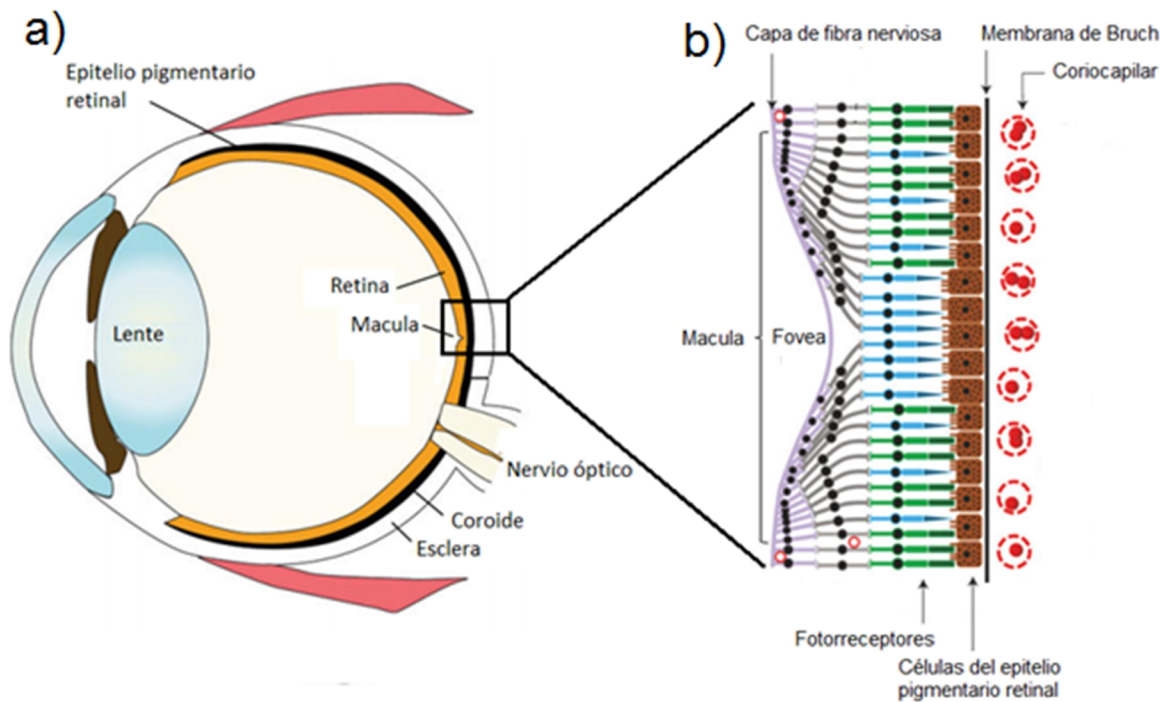


Figura 2. a) Diagrama del ojo y localización de la mácula. b) Capas que conforman a la retina. Modificado de S. Khandhadia et al. Immunobiology 217 (2012) 127– 146

Se cree que las drusas son material de desecho incompleto del EPR que no puede atravesar la membrana de Bruch para ser removido por los coriocapilares, entre sus componentes se han encontrado lípidos, lipoproteínas, glicoproteínas y factores del complemento (Fig. 3).⁸

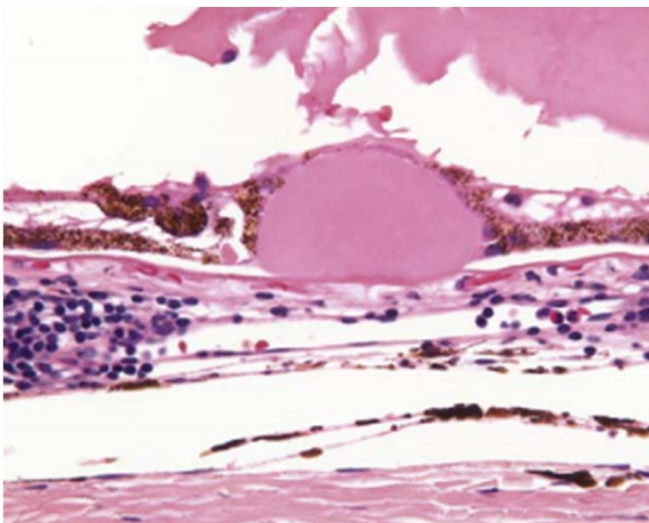


Figura 3. Corte histológico transversal con tinción hematoxilina-eosina. Se puede apreciar fácilmente una drusa localizada entre la membrana de Bruch y el EPR.

Donoso Survey of Ophthalmology 51 (2) March-April 2006

Las drusas frecuentemente se

encuentran como agregados en la región de la mácula y clínicamente son identificadas por examinación de fondo de ojo donde se observan como depósitos amarillentos que varían en tamaño, forma, color, consistencia y distribución y tienden a incrementar su número conforme avanza la edad⁹.

Se encuentran divididas en dos fenotipos morfológicos principales, duras y suaves, distinguibles por las características de sus bordes y el nivel de riesgo que confieren para el avance de la enfermedad. Las drusas duras son relativamente comunes en adultos mayores con o sin DMRE y no se consideran un factor de riesgo, a diferencia de las drusas suaves que se caracterizan por una apariencia más difusa y pálida y que si se encuentran de gran tamaño, en ambos ojos o un gran número de estas son consideradas un factor de riesgo importante para el desarrollo de cualquiera de los dos estadios tardíos de la enfermedad¹⁰. Por esta razón algunas veces las drusas suaves son reconocidas como signo clínico de estadios tempranos de DMRE aunque no existan alteraciones en la vista del paciente.¹¹

2.3 Fenotipos de la degeneración macular relacionada a la edad.

Clínicamente la enfermedad se clasifica en dos estadios avanzados, la forma seca o atrofia geográfica y la húmeda o neovascular. Aproximadamente del 10-15% de los casos son del tipo exudativo neovascular que aunque es el menos frecuente se conoce como el más severo¹².

Las características principales del fenotipo seco son la presencia de drusas, alteraciones pigmentarias y zonas de atrofia coriorretiniana que confluyen, en la forma más avanzada de la enfermedad. La pérdida de las células del EPR responsables del gasto metabólico de los fotorreceptores superficiales conlleva a la pérdida de fotorreceptores aledaños provocando un adelgazamiento de la retina y alteraciones progresivas en la visión (Fig. 4).¹³

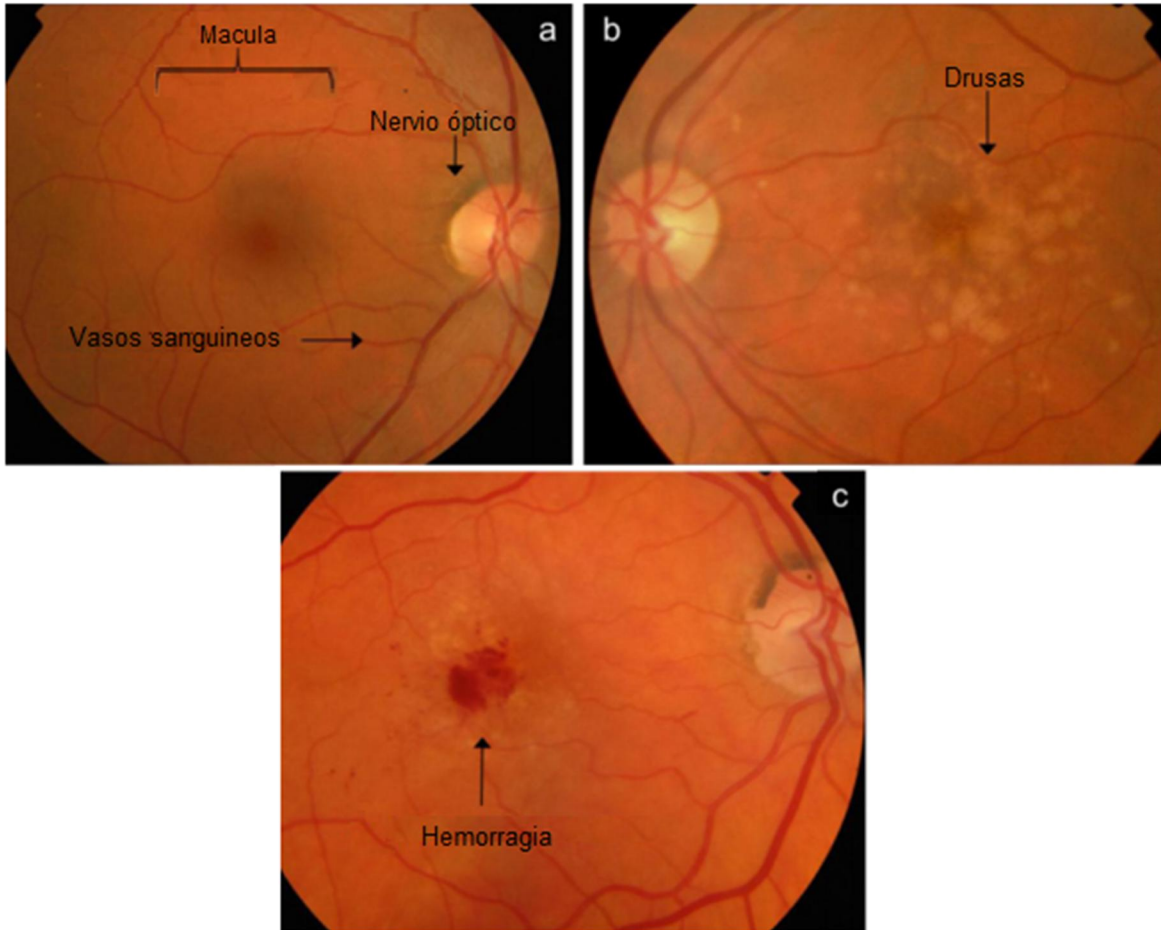


Figura 4. a) Fotografía de fondo de ojo donde se muestra una retina sin alteraciones ni drusas. b) Presencia de drusas de gran tamaño en la zona de la mácula. c) Hemorragia en la zona de la mácula donde también se observa neovascularización coroidal. Modificado de S. Khandhadia et al. / Immunobiology 217 (2012) pp. 127–146

La DMRE neovascular se caracteriza por la neovascularización coroidal (NVC), el crecimiento de vasos sanguíneos anormales de la coroides (Fig. 4). Estos nuevos vasos derraman sangre en la retina causando distorsiones en la visión, haciendo que las líneas rectas se vean onduladas, creando puntos ciegos y la pérdida de la visión central. La NVC generalmente es inestable con tendencia a tener hemorragias o exudados evolucionando a cicatrices fibrovasculares.¹⁴

En sus estadios iniciales la enfermedad puede ser asintomática y constituye un hallazgo casual en una exploración de fondo de ojo. Sin embargo, con frecuencia el paciente percibe visión borrosa y distorsionada o alteraciones en el tamaño o color de las cosas.

En las formas avanzadas el paciente presenta un escotoma o punto ciego dentro del campo visual central que le impide realizar actividades diarias como leer, manejar o incluso reconocer personas. En general la forma atrófica disminuye la visión a lo largo de los años mientras que la neovascular progresa rápidamente en pocas semanas o meses.¹⁵

2.4 Factores de riesgo.

Existen diversos factores asociados a la enfermedad como son la edad, el sexo, la etnia, el color del iris, el tabaquismo, obesidad y factores de riesgo vasculares como la hipertensión¹⁶. De entre estos se destacan la edad, y el tabaquismo por ser determinantes en los pacientes. El tabaquismo se considera un factor relevante en la etiología de la enfermedad por sus efectos en el daño oxidativo a la retina¹⁷.

Se ha descrito que existe una mayor prevalencia en la raza caucásica a diferencia de la negra o la hispana, así como en mujeres¹³.

En cuanto a la dieta, algunos estudios han demostrado que la ingesta total de grasas está asociada a la enfermedad al igual que la obesidad en hombres y mujeres¹⁸.

2.5 Factores genéticos.

Debido a que la etiología de la enfermedad aun no es clara, además de los factores ambientales se han realizado diversos estudios de asociación entre la enfermedad y genes que podrían estar implicados en su desarrollo, lo que ayudaría a comprender la enfermedad y prevenirla o generar tratamientos efectivos.

Ya que la enfermedad no se manifiesta clínicamente hasta después de los 55 años el estudio genético sólo es posible en una generación dentro del rango de edad a la vez, además de que los fenotipos son variados y la evolución es distinta entre los pacientes. Pese a estas dificultades se han logrado identificar diversas regiones del genoma humano que podrían definir aspectos moleculares implicados en este padecimiento¹⁹.

Algunos de los que hasta ahora han tenido un mayor impacto en la descripción de la patología son polimorfismos en los genes *CFH* y *ARMS2* que codifican para factores del complemento, a los que se ha atribuido hasta un 50% de riesgo²⁰.

Al tratarse de una enfermedad con gran heterogeneidad genética faltan muchos aspectos por describir por lo que se ha recurrido a utilizar técnicas que permitan analizar una mayor cantidad de información como son los estudios de genomas completos.

En 2007 se reportó un estudio de genoma completo en el que se incluyeron más de 100,000 SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) de entre los cuales se identificaron 7 de gran significancia perteneciente a los genes *CFH*, *CFHR4* y *SGCD*; este último con gran relevancia ya que anteriormente no existían reportes de asociación de este con la enfermedad a diferencia de los otros dos²¹.

2.6 Gen *SGCD*

El gen *SGCD* se encuentra ubicado en la región 5q33-q34 del genoma humano y codifica para la proteína delta sarcoglicano (δ -SG) que forma parte del subcomplejo de los sarcoglicanos formado por las subunidades α -, β -, δ -, γ -, ϵ - y ζ -.

Los dos polimorfismos identificados, rs970476 y rs931498, se encuentran en la región intrónica 2 del gen y existe entre ellos una distancia de 8,743 pares de bases (pb).

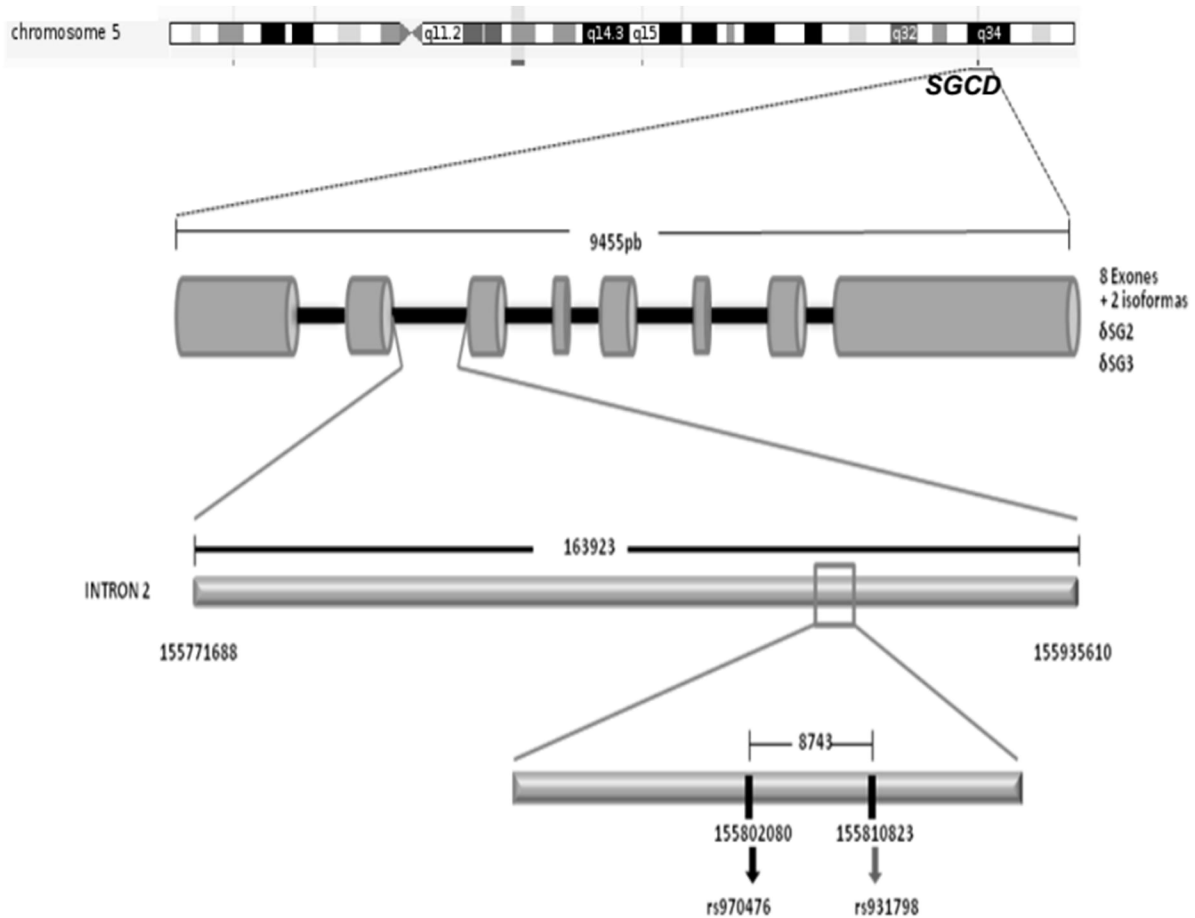


Figura 5. Ubicación de los polimorfismos rs970475 y rs931798.

Los sarcoglicanos son proteínas transmembranales con semejanzas estructurales entre sí, las subunidades β -, δ - y γ - mantienen su extremo amino terminal intracelularmente mientras que en el extremo carboxilo terminal tienen residuos de cisteína²².

Los sarcoglicanos junto con otras proteínas de membrana periféricas e integrales como los distroglicanos y el sarcospan entre otros, forman el complejo distrofina-glicoproteínas (CDG) el cual se localiza en el sarcolema. Este complejo se encarga de mantener y estabilizar las interacciones entre la matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular de actina durante las contracciones de músculo esquelético (Fig.6)²³.

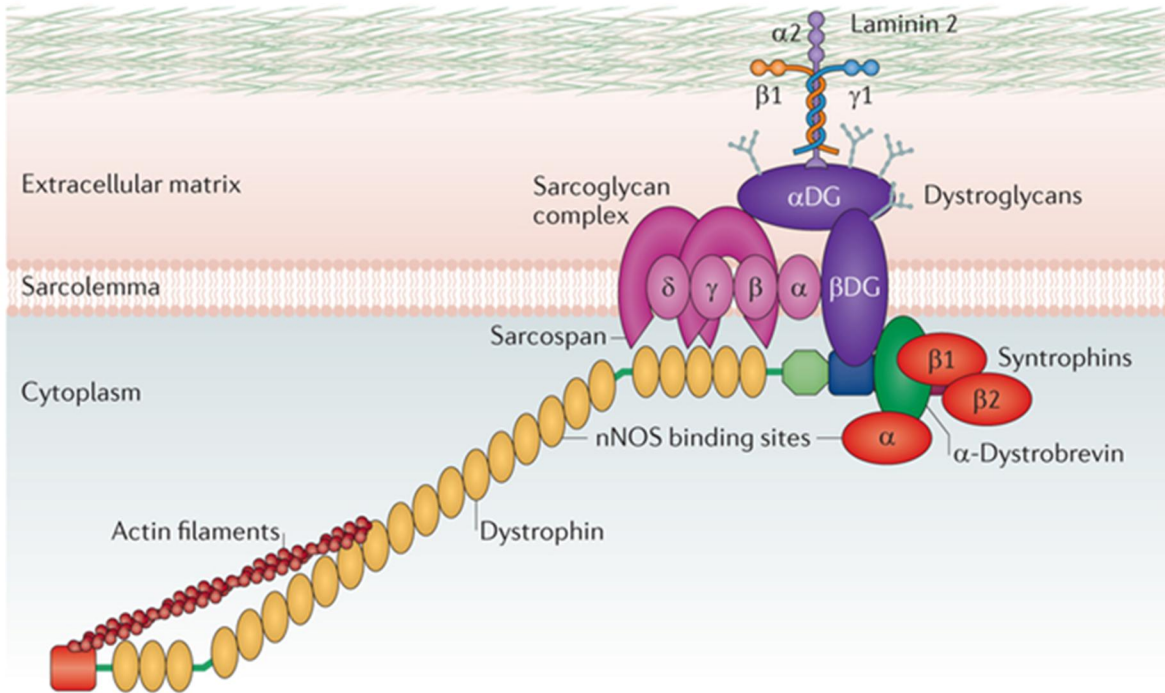


Figura 6. Representación del complejo distrofina-glicoproteínas. J. Fairclough et al. Therapy for Duchenne muscular dystrophy. Nature Reviews Genetics 14, 373–378 (2013)

Existen diferentes distrofias musculares asociadas a mutaciones en alguno de los genes que codifican a los miembros del CDG, mutaciones en los sarcoglicanos, a excepción de las subunidades ϵ - y ζ -, son las responsables las distrofias musculares de cintura o LGMD por sus siglas en inglés (Limb Girdle Muscular Dystrophies).²⁴

El CDG ha sido descrito en diferentes tipos de tejidos, incluido el sistema nervioso central. En retina los componentes de este complejo se encuentran ampliamente distribuidos y de manera independiente a la distrofina, lo que podría sugerir su asociación a funciones alternas al interactuar con canales iónicos. δ -SG se encuentra expresado principalmente en las capas externas y las centrales.²⁵

En nuestro grupo de trabajo analizamos por medio de inmunofluorescencia, las subunidades del complejo sarcoglicano en EPR, membrana de Bruch, Coroides y retinas murinas en modelo Knock out para δ -SG.

Este trabajo mostró una aparente fragilidad, que es notable en la capa de fotorreceptores del ratón Knock out y un adelgazamiento en la capa plexiforme interna en este mismo modelo, lo que sugiere posibles alteraciones en la visión del ratón KO para delta-SG (Fig. 7).

Hasta ahora se conoce la relación de δ -SG con la transducción de señales acopladas a canales de calcio²⁷ y su importancia en la regulación del flujo sanguíneo²⁸. Otros estudios con el mismo modelo murino se han llevado a cabo para tratar de encontrar alguna afección por alteraciones en esta proteína, sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado asociación con padecimientos musculares del ojo o descrito su importancia fisiológica en éste²⁶; por lo tanto, el objetivo de este trabajo es aclarar si existe alguna asociación entre polimorfismos de este gen y la DMRE.

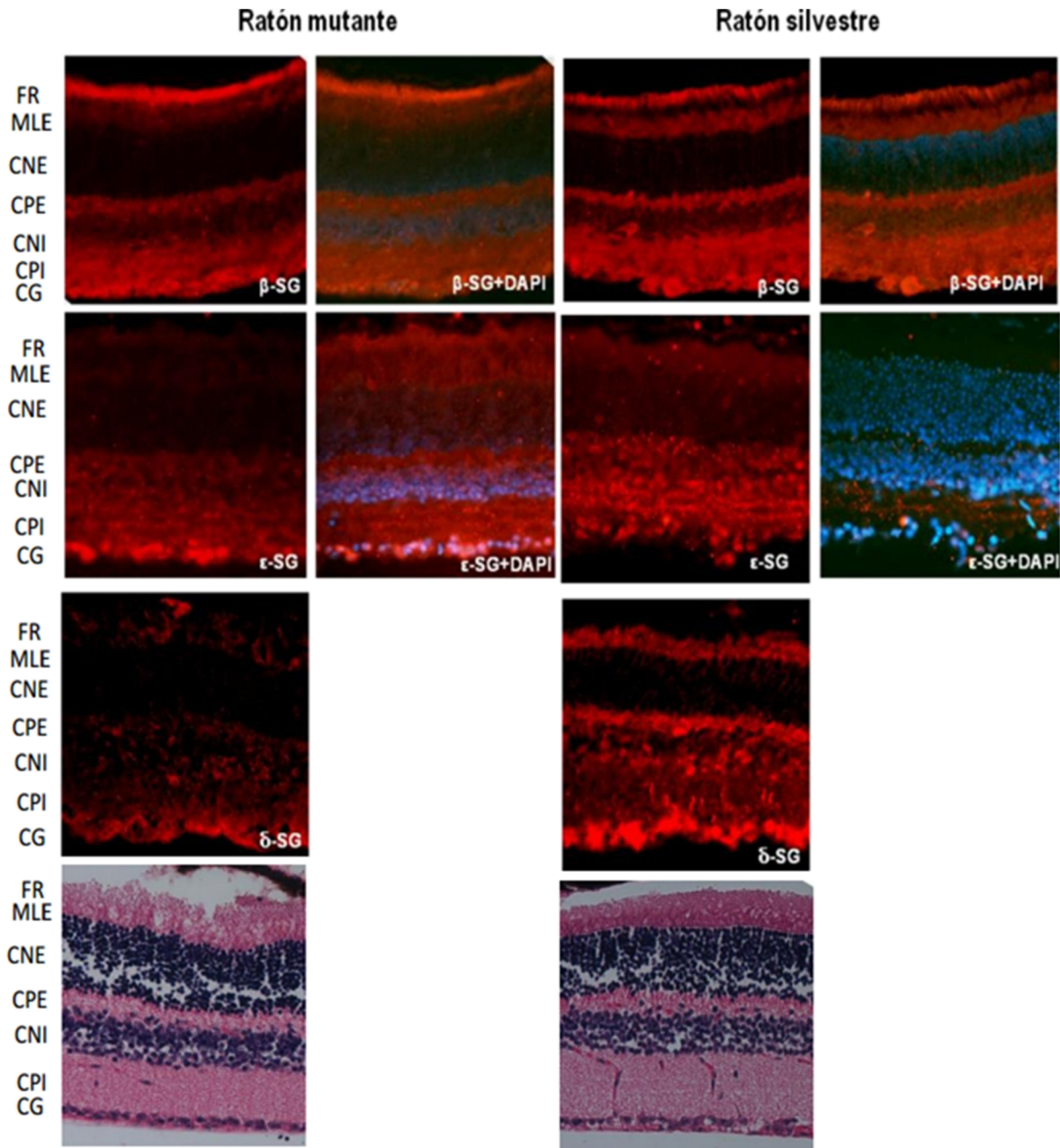


Figura 7. Inmunolocalización de Sarcoglicanos en retinas murinas de ratón knock out para delta-SG y ratón silvestre. Se muestra la distribución de los componentes del complejo sarcoglicano en las distintas capas de la retina, FR-Fotorreceptores, MLE-membrana limitante Externa, CNE-capa nuclear externa, CPE-capa plexiforme Externa, CNI-Capa Nuclear Interna, CPI-capa nuclear Interna, MLI membrana limitante interna. En las tinciones con Eosina-Hematoxilina de ambos modelos, la zona de fotorreceptores se observa menos densa y disgregada comparada con el modelo silvestre. La disminución de la capa plexiforme interna es clara en el modelo mutante.

3. JUSTIFICACIÓN

Pese a su relevancia clínica la DMRE es una enfermedad poco estudiada en población mexicana y sobre la cual poco se conoce sobre su etiología y desarrollo debido a su complejidad.

Ya que este padecimiento muestra una gran variabilidad entre poblaciones, y aunque se ha descrito la asociación de esta con diversos factores, no se han logrado establecer las bases etiológicas determinantes que permitan desarrollar tratamientos eficaces.

Recientemente se han identificado variantes genéticas que están asociadas a la presencia de esta patología y se ha planteado la posibilidad de que el gen *SGCD* este asociado a la presencia de la DMRE.

Por lo tanto, este estudio pretende aclarar si existe asociación entre los polimorfismos rs931798 y rs970476 del gen *SGCD* y la DMRE en pacientes mexicanos, contribuyendo así al estudio de las bases moleculares de esta enfermedad y en perspectiva aportar conocimientos que impulsen el desarrollo de nuevos tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes e incluso prevenir su aparición.

4. OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar la asociación de las variantes rs931798 y rs970476 del gen *SGCD* en la degeneración macular relacionada con la edad en pacientes mexicanos.

Objetivos específicos.

Determinar la asociación independiente de las variantes alélicas del gen *SGCD* con la presencia de DMRE en pacientes mexicanos.

Determinar la asociación de haplotipos de las distintas variantes analizadas en *SGCD* con DMRE en pacientes mexicanos.

5. HIPÓTESIS

Los polimorfismos de un solo nucleótido rs931798 y rs970476 del gen *SGCD* están asociados con la degeneración macular relacionada con la edad en pacientes mexicanos.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Población.

Estudio de casos-contróles, transversal comparativo y observacional. Todos los sujetos de este protocolo fueron reclutados en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Se estudiaron muestras de ADN de pacientes con Degeneración Macular relacionada con la Edad en estado avanzado y de individuos que no presentan esta patología. La selección se realizó por criterios clínicos fundoscópicos, y la formación de los grupos, cumplió con los siguientes criterios.

- ◆ Grupos de pacientes con DMRE

Criterios de inclusión:

Se incluyeron sujetos con Degeneración Macular Relacionada con la Edad, pertenecientes a la consulta de Retina del Hospital de Oftalmología Conde de Valenciana. Se seleccionaron aquellos pacientes que presentaron DMRE de grado 4 y 5 según el sistema de estratificación de la degeneración macular relacionada con la edad (CARMS, de sus siglas en Inglés)

El grado 4, se consideró como atrofia geográfica; con involucro del centro macular o atrofia geográfica no central de al menos 350 μm en tamaño. El grado 5 se consideró DMRE exudativo incluyendo los desprendimientos de EPR no drusoides, desprendimientos serosos o hemorrágicos de la retina, neovascularización coroidea con hemorragia o fibrosis subretiniana o sub-EPR, cicatrices consistentes con DMRE, desprendimiento de EPR seroso sin NVC y NVC o cicatriz disciforme. Los participantes con 65 años o más, cualquier sexo, con o sin antecedentes heredofamiliares y sin antecedentes de cirugía vitreoretiniana o enfermedades retinianas asociadas.

◆ Grupo de controles

Criterios de inclusión:

Todos los individuos de este grupo no pertenecieron al área de retina del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana y no fueron diagnosticados con DMRE. Participantes con 65 años o más, cualquier sexo, el tamaño de las drusas en caso de que estuvieran presentes no debió ser mayor de 65 μm de diámetro y no estar relacionados parentalmente con el grupo de pacientes.

Criterios de exclusión en ambos grupos.

Todas aquellas enfermedades que no permitan hacer un adecuado análisis de fondo de ojo.

Criterio de eliminación en ambos grupos.

Retiro de consentimiento informado

6.2 Cálculo del tamaño de muestra.

El cálculo del tamaño de la muestra, se realizó con el método estadístico para grados y proporciones propuesto por Kelsey (<http://www.openepi.com>) tomando las siguientes consideraciones.

- Tamaño de muestra para casos y controles no pareado:
- Nivel de confianza de dos colas (1-alfa) =95%
- Poder= 80%
- Proporción de casos y controles =1
- Proporción hipotética de controles con expuestos = 40
- Proporción hipotética de casos con expuestos = 57.14
- El valor más bajo de razón de momios para ser detectado= 2.0
- Formación de grupos con n=134 individuos por grupo.

6.3 Metodología.

6.3.1 Extracción de ADN genómico.

Se obtuvieron 3 ml de sangre venosa en tubos con anticoagulante (EDTA). El ADN se extrajo con el Kit PureGene DNA purification whole Blood (QIAGEN) bajo las siguientes condiciones. Se colocaron 3 ml de Solución de Lisis de Eritrocitos (RBC) en un tubo de 15 ml. Se agregó 1ml de sangre y se mezcló por inversión. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min.

Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de Solución de Lisis celular y 340 µl de solución de precipitación de proteínas. Se mezclaron por agitación con vortex y se centrifugaron las muestras a 13000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se depositó en un tubo limpio de 15 ml, se agregó 1ml de isopropanol y se homogenizo por inversión para precipitar el ADN. Se centrifugó por 3 min a 1300 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% para lavar el ADN precipitado, se centrifugó 1 min a 1300 rpm. Se retiró el sobrenadante y el ADN se hidrató en 300 µl de agua inyectable y se almacenó a -20°C hasta su uso. Se midió la pureza y se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría (nanodrop) y se valoró su integridad en geles de agarosa al 0.8% con GelRed(Biotim).

La valoración de la integridad del ADN obtenido de pacientes y controles mostró en la mayoría de las muestras una sola banda compactada y bien definida. Este corrimiento electroforético indicó que las moléculas de ADN extraídas no se fragmentaron o degradaron en la mayoría de las muestras (Fig.8). En aquellos pozos donde el ADN se observó excesivamente degradado (barrido) o en baja cantidad se repitió la extracción de esta biomolécula.

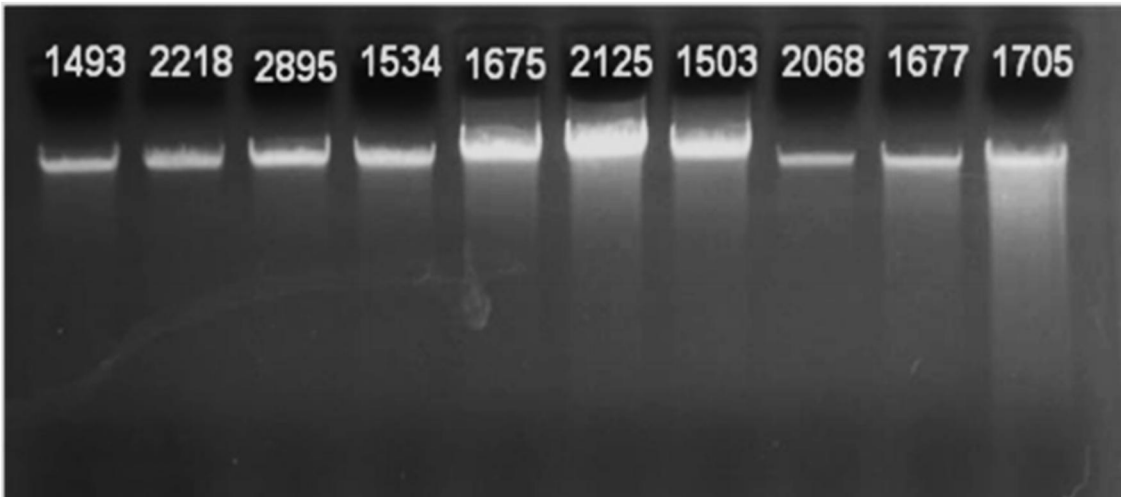


Figura 8. Muestras de pacientes con DMRE donde se determina la integridad del ADN extraído.

6.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se identificaron los SNP de interés del intrón dos de *SGCD* en la secuencia completa de gen (<http://www.ensembl.org/index.html>). Con ayuda del programa primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) se diseñaron un par de oligonucleótidos con las siguientes secuencias: TGGCCCTTGGCTATCTCTTC, TGGACCCTAGGATGAGCATGA (Fisiología Celular, UNAM). El fragmento teórico generado fue de 284 pb con un porcentaje de 50% de CG y una $T_m=54^\circ\text{C}$.

La reacción con un volumen final de 20 μl se llevó a cabo en un Termociclador (CR Corbett) con el siguiente programa:

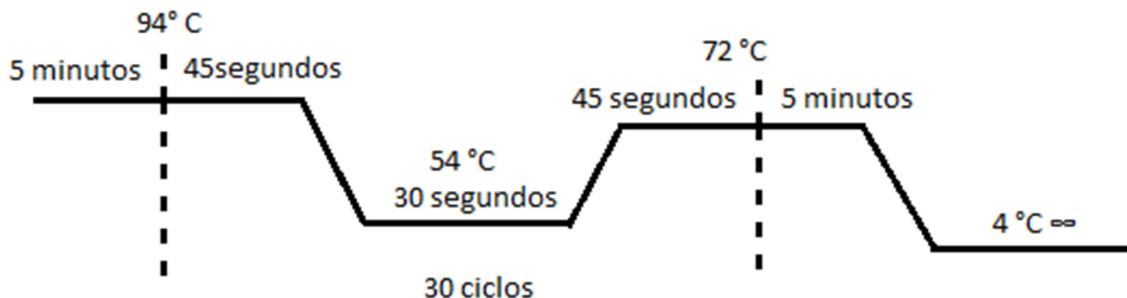


Diagrama 1. Representación del programa de PCR. Desnaturalización a 94°C por 5 minutos. 30 ciclos de un minuto y medio, extensión a 72°C y conservación a 4°C.

Tabla 1. Condiciones para reacción de PCR y su concentración.

Reactivo	Concentración	Volumen
Buffer	10X	2.0 µl
Cloruro de magnesio	25.0 mM	1.6 µl
dNTP's	2.0 mM	2.0 µl
Oligonucleótido adelantado	10 pM	2.0 µl
Oligonucleótido reverso	10 pM	2.0 µl
Taq Gold polimerasa (Applied Biosystems)	5 UI	0.16 µl
Muestra de ADN	~100 ng	Variable
Agua inyectable		c.b.p. 20 µl

Para determinar si la amplificación se había generado, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis de Agarosa al 2% con GelRed. Se compararon con un marcador de 100 pb O'RangeRule (Fermentas) para estimar su peso molecular.

Los fragmentos se observan cercanos al marcador de 300 pb, debido a que el amplicón deseado fue de 284 pb. El control negativo se consideró adecuado ya que no se observó ninguna amplificación. En la región inferior del gel se observaron bandas menores de 100 pb lo que indica la presencia de oligonucleótidos utilizados para la generación de los amplicones (Fig.9).

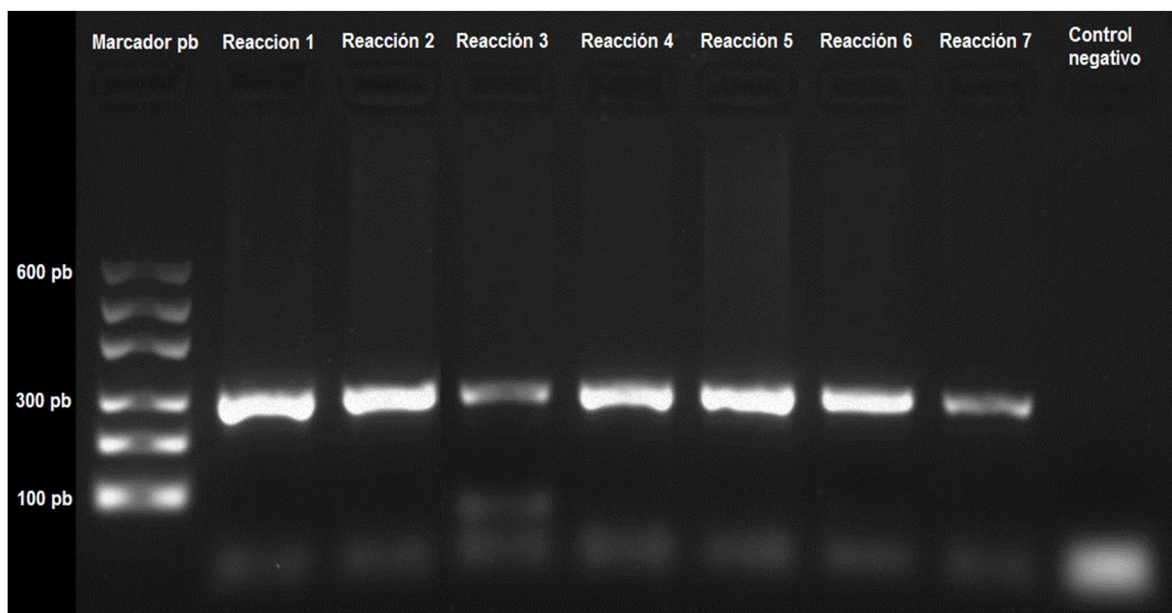


Figura 9. Gel donde se corrieron reacciones de PCR, marcador molecular y control negativo. Se observa un amplicón en las reacciones con aproximadamente 300 pb.

6.3.3 Purificación de Productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados con DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research). Se agregaron cinco volúmenes de Buffer de unión a ADN. La mezcla homogenizada se depositó en columna Zymo-Spin y se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 seg. Se agregaron 200 μ l Buffer de lavado de ADN a la columna y se volvió a centrifugar 13 000 rpm durante 30 seg. Se hidrató la matriz de la columna con 15 μ l de agua durante un minuto y se recuperó el producto de PCR en tubos limpios por centrifugación a 13000 rpm durante 30 seg. 2 μ l de producto de PCR fue sometido a electroforesis de Agarosa al 2% con Gel Red, para estimar su concentración utilizando MassRuler Expres LR reverse DNA ladder (Fermentas).

La purificación de los amplicones después de la PCR, permitió la eliminación de oligonucleótidos así como la reducción de sales propias de la reacción de PCR. Se observó que los fragmentos conservarán su tamaño esperado. Sin embargo, la banda inferior del gel desapareció, lo que determinó que la purificación fuera adecuada.

Se estimó con ayuda de un marcador de masa y peso molecular la concentración aproximada de los amplicones después de la purificación, con la finalidad de colocar una concentración conocida de productos de PCR para la secuenciación (Fig.10).

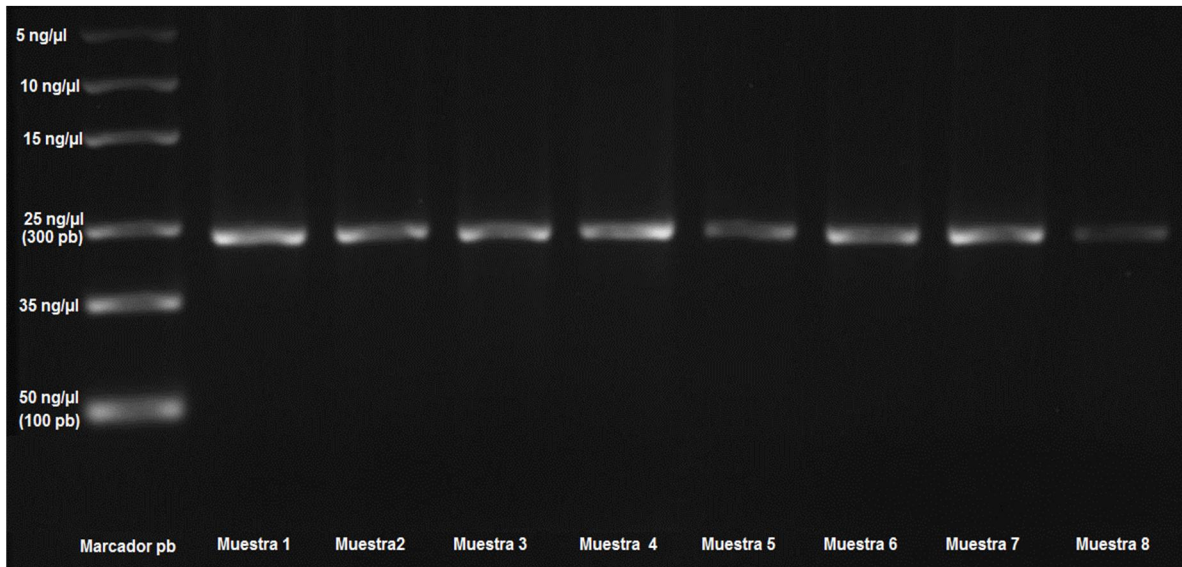


Figura 10. Gel en donde se corrieron muestras de PCR posteriores a su purificación, se aprecia la presencia única del amplicón de aproximadamente 300 pb.

6.3.4 Secuenciación

Los productos de PCR purificados fueron marcados con BigDye Terminator V2.3 (Applied Biosystems) junto con los siguientes reactivos.

Tabla 2. Condiciones para reacción de marcaje.

Reactivo	Concentración	Volumen
Big Dye	5X	2.0 µl
Oligonucleótido adelantado	10 pM	0.5 µl
Muestra de ADN	~30 ng	Variable
Agua inyectable		c.b.p. 10 µl

La reacción se llevó a cabo en termociclador CR Corbett con el siguiente programa:

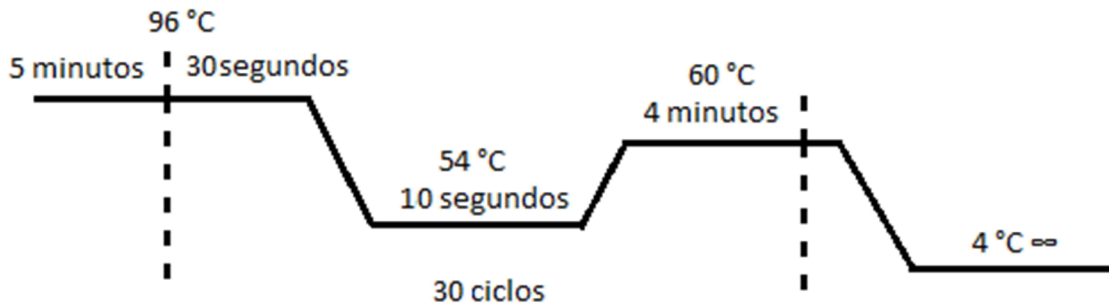


Diagrama 2. Representación del programa de marcaje. Desnaturalización a 96°C por 5 minutos. 30 ciclos de 4 minutos y 40 segundos y conservación a 4°C.

El producto marcado se purificó con ZR DNA Sequencing Clean-up Kit agregando 240µl de buffer de unión a secuencia. La mezcla homogenizada se transfirió a la columna Zymo-Spin IB, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 seg. Se agregaron 300 µl de buffer de lavado de secuenciación a la columna y se centrifugaron 30 seg a 13 000 rpm. Se agregaron 10 µl de agua directamente a la matriz de la columna y se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml. Para recuperar el producto de PCR marcado se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 segundos.

Los productos fueron secados (miniDNA) y resuspendidos con 15 µl de formamida. Se desnaturalizaron a 96°C con un pase a 4°C durante 3 min. Los productos se corrieron en un equipo de electroforesis capilar ABI310 (Applied Biosystems) en un módulo de 30 seg de tiempo de inyección, 2 KV de inyección, 25 min de electroforesis a 50°C. Los electroferogramas fueron analizados para determinar las variantes presentes en el programa FinchTV.

Se obtuvieron electroferogramas que permitieron distinguir los alelos de cada uno de los individuos analizados. Debido a que *SGCD* es un cromosoma somático, en la Figura 11, se muestra un ejemplo de un control heterocigoto para el SNP rs931798 donde se observa en verde el alelo A y negro el Alelo G.

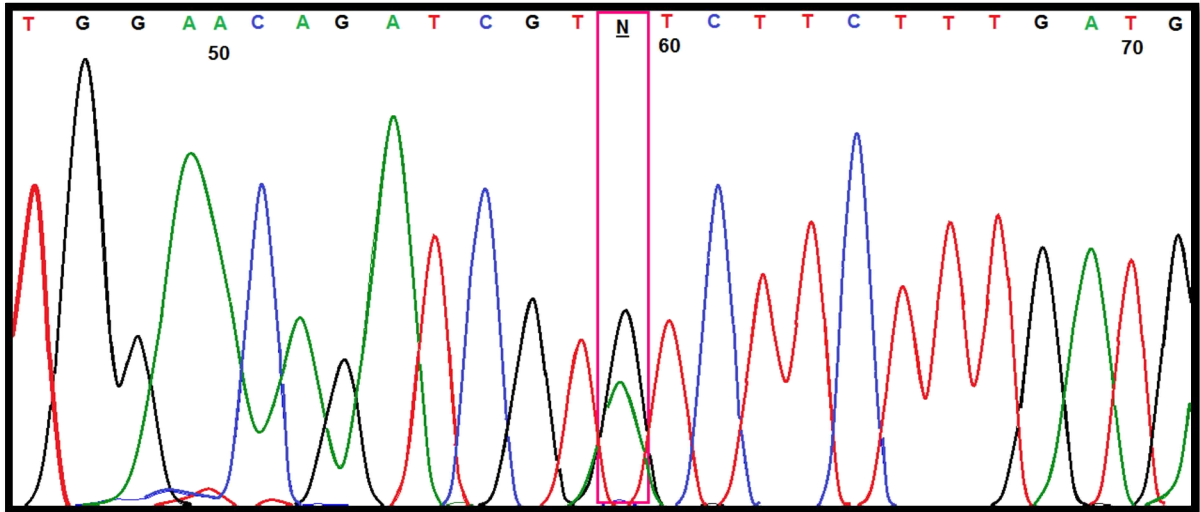


Figura 11. Fracción de electroferograma. Secuencia de un control en donde se señala en un recuadro rosa la variante heterocigota G/A para el SNP rs931798.

6.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)

Para esta técnica el equipo utilizado fue Piko-Real de Thermo scientific. Se hicieron alícuotas de las muestras de ADN con concentración aproximada de 10 ng/μl. Las muestras se corrieron en placas de 96 pozos colocando un control negativo cada 24 muestras y repitiendo en cada placa algunas con genotipo conocido.

La sonda utilizada para el SNP rs970476 de Applied Biosystems tiene la siguiente secuencia:

GTAAAAGAACTTTTGAAGATCCTT[G/T]TCCAAGATTCACCAGTTATTTACAT
 en donde se incluye la variante correspondiente a este polimorfismo.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μl de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3. Condiciones de reacción para genotipificación por sondas Taqman.

Reactivo	Concentración	Volumen
Master mix	2x	5.0 µl
Sonda	20x	0.5 µl
Alícuota de ADN	~10 ng/ µl	1.0 µl
Agua libre de nucleasas		3.5 µl

Una vez sellada la placa, se sometió al siguiente programa en el equipo, durante una hora.

Tabla 4. Condiciones de termociclador para genotipificación por sondas Taqman.

Paso	Parámetro	Variación
1	Temperatura	Temperatura: 95°C Tiempo: 7 minutos
2	Ciclo	Numero de ciclos:45 Numero de pasos dentro del ciclo:2 Temperatura: 95°C; Tiempo: 5 segundos Temperatura: 60°C; Tiempo: 30 segundos
3	Datos	Adquisición de datos.

Los resultados se muestran como gráficas de la emisión de fluorescencia en función del número de ciclo y dependiendo del genotipo se registra emisión de alguna de las dos sondas o ambas (Gráfico 1).

Con la información de todas las muestras en conjunto se obtiene una gráfica de discriminación alélica en la cual se puede observar la tendencia general de los alelos (Grafico 2).

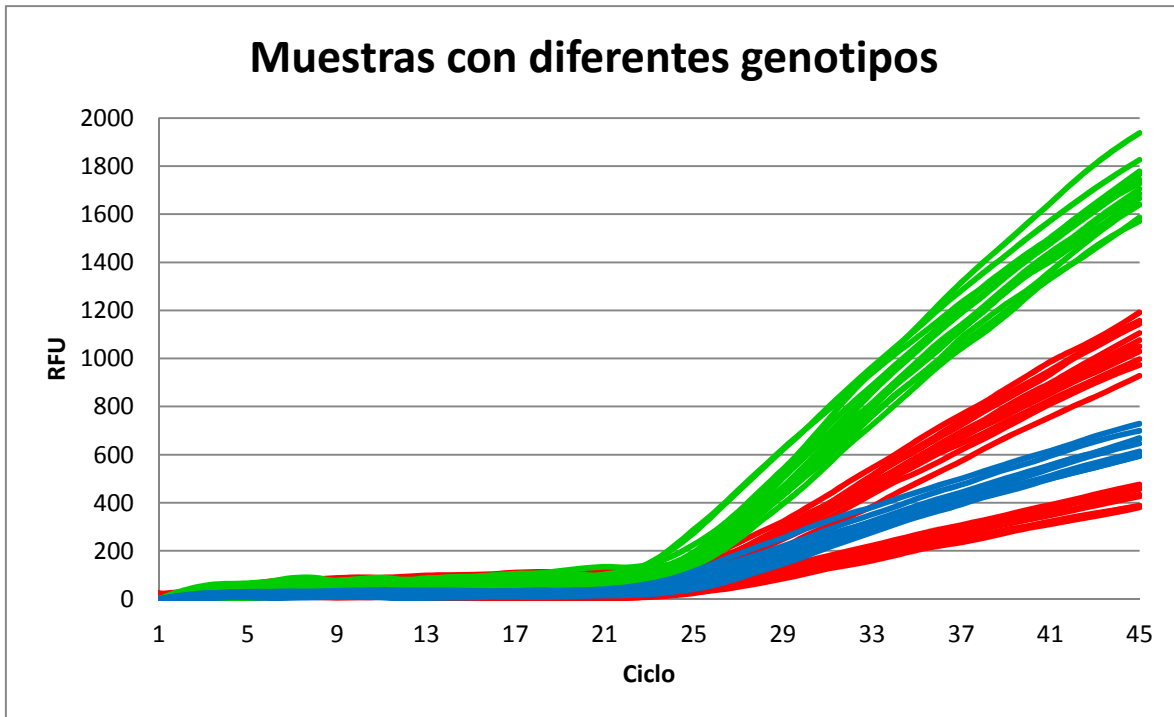


Gráfico 1. Amplificación de muestras con diferentes genotipos. El genotipo G/G se muestra en verde, el genotipo T/T se muestra en azul y la variante heterocigota G/T en rojo.

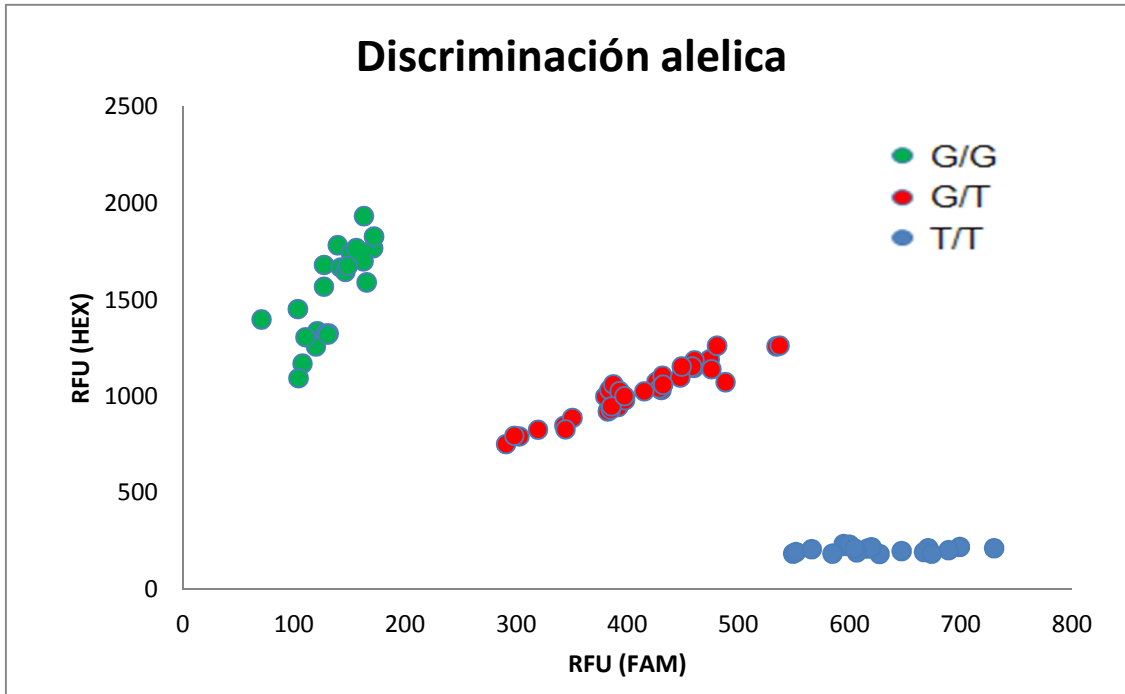


Gráfico 2. Discriminación alélica para el SNP rs970476 donde el genotipo se determina por la señal de uno o ambos fluoróforos. En este caso el alelo G marcado con el fluoróforo HEX y el alelo T con el fluoróforo FAM.

6.3.6 Análisis Estadístico

Las características de los participantes fueron comparadas usando *chi* cuadrada o la prueba de *t* de student para muestras independientes. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue usado para evaluar que los genotipos estuvieran dentro de la distribución esperada. La asociación de los genotipos con DMRE se realizaron en los software FASTSNP y SPSS con regresión logística, los resultados se presentaron como RM con intervalo de confianza al 95%. Los bloques de desequilibrio de ligamiento fueron obtenidos en el software haploview 4.1

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Características de la población analizada.

Se analizaron un total de 265 muestras, de las cuales 132 formaron el grupo de los casos y 133 de los controles. Se obtuvieron datos clínicos de los pacientes participantes tales como edad, sexo, tabaquismo, hipertensión arterial y diabetes.

La distribución de la variable edad se determinó con la prueba de Kolmogorov-Smirnof. El análisis de los datos, mostró una $p > 0.05$ para el grupo de los casos, por lo que se determinó que cuenta con una distribución normal, no así para el grupo de los controles. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para comparar las medias de ambos grupos obteniéndose un valor de significancia $p = 3 \times 10^{-5}$, estableciendo que existe una diferencia significativa entre ambos grupos (Tabla 5).

El valor obtenido de Razón de Momios (RM) para esta variable fue de 1.082 (I.C.=1.046-1.120), lo que además de representar un factor de riesgo permite determinar estadísticamente que existe un riesgo acumulativo del 8.2% con cada año que pasa a partir de los 55 años de edad en la población analizada.

Este resultado demuestra, como en muchos otros estudios realizados, que la edad es un factor de riesgo para presentar la enfermedad ya que con el envejecimiento existe un deterioro natural en la retina en la cual existe acumulación de desechos celulares, presencia de drusas, engrosamiento del tejido retinal, pérdida celular o proliferación descontrolada y resistencia a la muerte celular programada.^{29, 30, 31}

Al igual que en el envejecimiento natural, en la DMRE se presentan estas mismas alteraciones pero de manera desregulada, lo que conlleva a la precipitada pérdida de la visión.

Tabla 5. Datos generales de la población analizada.

	Casos	Controles	RM (I.C. 95%)	Valor de p
Edad (min-max)	76 (60-96) n= 132	72 (55-93) n= 133	1.082 (1.046-1.120)	$3 \times 10^{-5} \Delta$
Sexo				
Mujeres (%)	90 (68%)	78 (59%)	1.511	0.108 Φ
Hombres (%)	42 (32%) n=132	54 (41%) n=133	(0.914-2.499)	
Diabetes				
Con diabetes (%)	32 (25%)	39 (30%)	0.744	0.292 Φ
Sin diabetes (%)	97 (75%) n=129	88 (70%) n=127	(0.430-1.289)	
Hipertensión arterial				
Con hipertensión (%)	72 (54%)	62 (47%)	1.277	0.325 Φ
Sin hipertensión (%)	60 (46%) n=132	66 (53%) n=128	(0.785-2.080)	
Tabaquismo				
Si fuma (%)	27 (20%)	22 (17%)	1.121	0.721 Φ
No fuma (%)	104 (80%) n=131	95 (73%) n=117	(0.598-2.101)	

Δ Mann-Whitney, Φ chi-cuadrada, IBM SPSS statistics 20

En cuanto al sexo se aprecia una tendencia ($p=0.108$) en el grupo de las mujeres a padecer la enfermedad. Este parámetro es controversial ya que en diferentes poblaciones se ha reportado que existe una mayor prevalencia de esta enfermedad para este grupo pero sin diferencias significativas, por lo que se presume que esta variable podría verse influenciada por la longevidad y mayoría demográfica de éstas frente a los hombres³².

Debido a que este es un estudio retrospectivo y algunos de los datos clínicos de los participantes no se encontraban en su expediente no se logró recabar la totalidad de datos.

Al realizar los análisis, no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos para los datos de diabetes, hipertensión y tabaquismo. Estos fueron evaluados con la prueba de *chi-cuadrada* para variables nominales y su resultado, así como la síntesis de los datos recabados, se muestran en la tabla 5.

En el caso de diabetes los datos se encuentran distribuidos de manera homogénea entre ambos grupos y se encuentran en mayor cantidad los participantes no diabéticos. Este dato es semejante al reportado recientemente en un estudio de DMRE en población mexicana³³.

En otro estudio realizado recientemente en población de ascendencia mexicana, se reportó la hipertensión como un factor de riesgo, específicamente aumentos en la presión diastólica mostraron una asociación con el fenotipo exudativo de DMRE con un valor de $RM=3.3$ y $p=0.01$.³⁴ En este estudio para hipertensión existe una ligera tendencia en el grupo de los casos hacia los hipertensos y en el grupo de los controles prevalecen los no hipertensos. La diferencia es menor al 10% entre ambos grupos por lo que no represento un valor significativo.

Aunque el tabaquismo ha mostrado ser un factor de riesgo fuertemente asociado a la DMRE en otras poblaciones sugiriendo su posible participación en el aumento de radicales libres, disminución de antioxidantes, peroxidación lipídica y alteraciones del flujo coroidal.^{35,36} En este estudio se obtuvo un valor de significancia cercano a 1. Esto se debe a que entre los participantes de este

estudio con los que se formaron ambos grupos, predominan los no fumadores (aproximadamente 80%) probablemente este resultado está relacionado a que la mayoría provienen de zonas rurales en donde este hábito es poco común, por lo tanto no se considera como un elemento de relevancia en este estudio.

7.2 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP rs970476 y rs931798 del gen SGCD.

Para determinar la presencia un alelo de riesgo se obtuvieron las frecuencias alélicas en ambos grupos de estudio. Los SNP analizados mostraron que el alelo ancestral G en el polimorfismo rs931798 tiene mayor frecuencia que la variante A y en el caso de rs970497 el alelo más común es la variante G con una frecuencia de 0.55 aproximadamente en ambos grupos (Tabla 6).

No existe diferencia significativa en la frecuencia alélica entre ambos grupos y por lo tanto, en ninguno de los dos polimorfismos analizados se encontró un alelo de riesgo asociado a la enfermedad.

Tabla 6. Frecuencias alélicas de los SNP rs931798 y rs970476.

SNP	alelo	Casos (frecuencia) n=132	Controles (frecuencia) n=133	RM (95% IC)	Valor de p
rs931798					
	G	170 (0.64)	187 (0.70)	0.764 (0.531-1.100)	0.147
	A	94 (0.36)	79 (0.30)		
rs970476					
	T	121 (0.46)	120 (0.45)	0.971 (0.690-1.367)	0.867
	G	143 (0.54)	146 (0.55)		

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg y las diferencias entre los valores observados y los esperados. Según la hipótesis de equilibrio, no fueron significativas. Ambos grupos de estudio mostraron que la transmisión de los alelos fue independiente y no ocurrieron fenómenos de distorsión. Esto demuestra que la selección y genotipificación en las muestras fueron adecuados (Tabla 7).

Se determinaron las frecuencias genotípicas en ambos grupos observando que en el polimorfismo rs970476 la variante G/T predomina con frecuencias similares, mientras que para rs931798 existe una frecuencia mayor en el genotipo G/A en el grupo de los casos comparado con el grupo de los controles donde el genotipo G/G es más frecuente.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y equilibrio de H-W de los SNP rs931798 y rs970476.

SNP	Genotipo	Casos (%)	Equilibrio de H-W (valor de p)	Controles (%)	Equilibrio de H-W (valor de p)
rs970476					
	G/G	41 (31%)	0.50	42 (31%)	0.43
	G/T	61 (46%)		62 (47%)	
	T/T	30 (23%)		29 (22%)	
rs931798					
	G/G	51 (38%)	0.17	67 (50%)	0.59
	G/A	68 (52%)		53 (40%)	
	A/A	13 (10%)		13 (10%)	

H-W: equilibrio de Hardy-Weinberg. El equilibrio fue calculado en <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>

7.3 Asociación de los SNP rs970476 y rs931798 con DMRE.

La solidez de los resultados en los estudios de asociación genética depende en gran medida del diseño de investigación elegido. En este caso, con base en el Criterio de Información de Akaike (AIC), se determinó que se usaría el modelo sobredominante en la estimación del riesgo de la variante genética.

Este modelo consiste en establecer que los individuos homocigotos para el genotipo más frecuente y el genotipo variante tienen el mismo riesgo.

Se determinó la Razón de Momios (RM) y el Intervalo de Confianza (IC95%) en los programas SNPStat y SPSS.

Bajo este modelo para el SNP rs931798 se obtuvo un OR=1.74, IC95%(1.004-3.022) con un valor de p=0.048. Estos resultados mostraron el aumento del genotipo (G/A) en el grupo de los casos lo que confirió riesgo para presentar la DMRE. (Tabla 8).

Tabla 8. Asociación de los genotipos con DMRE en modelo sobredominante.

SNP	Genotipo	n (%)		RM (IC 95%)	Valor de p
		Casos	Controles		
rs931798					
	G/G-A/A	63 (49%)	70 (60%)	1.00	0.048
	G/A	66 (51%)	46 (40%)	1.74 (1.004-3.022)	
rs970476					
	G/G-T/T	71 (55%)	62 (54%)	1.00	0.99
	G/T	58 (45%)	54 (46%)	1.00 (0.60-1.69)	

La asociación del haplotipo con la enfermedad se analizó por medio de regresión logística en el programa SNPStats y Haploview. Se determinaron cuatro posibles haplotipos, el más frecuente fue GG con una frecuencia de 0.5229 empero, no se observaron diferencias significativas entre el grupo de casos y controles por lo que ningún haplotipo se asoció con la Degeneración Macular Relacionada con la Edad (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación de los haplotipos de los SNP de interés del intrón dos del gen *SGCD* con DMRE.

Haplotipo	Frecuencia	RM (IC 95%)	Valor de p
GG	0.5229	1.00	-----
AT	0.3041	0.79 (0.53-1.17)	0.24
AG	0.1506	1.38 (0.85-2.26)	0.19
GT	0.0223	1.03 (0.32-3.31)	0.97

Valor de p para la prueba = 0.063

Nuestros resultados en los análisis de haplotipos no muestran contribución a la aparición de la enfermedad. Por este motivo se decidió analizar el desequilibrio de ligamiento para ambos SNP. Como se observa en el Gráfico 3 el SNP rs931798 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el SNP rs970476 ($D' = 87$).

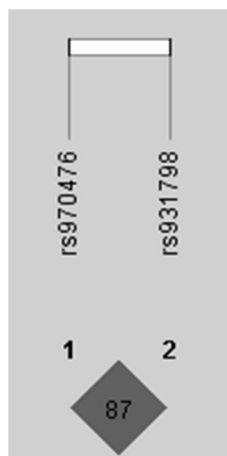


Gráfico 3. Análisis de Desequilibrio de ligamiento de los SNP de interés. Los números dentro de los diamantes muestra el valor de D' para el análisis de pares. Un valor por arriba de 80 denota un alto desequilibrio de ligamiento entre dos variantes.

Por lo tanto establecemos que la razón por la que ambos polimorfismos aparecen en el estudio de asociación de genoma completo es que aunque solo el rs931798 presente asociación con la enfermedad, debido a que segregan juntos ambos obtienen un valor significativo de asociación con la enfermedad.

7.4 Análisis bioinformático de los SNP rs970476 y rs931798.

Utilizando el Software HaploReg v2 (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) se evaluó la capacidad de estos SNP para regular factores de transcripción. Los resultados obtenidos se condensan en la tabla 10 en donde se indican posibles proteínas y regiones reguladoras afectadas por estos polimorfismos.

Tabla 10. Resultados del análisis bioinformático de los SNP rs931798 y rs970476.

SNP	Proteínas de unión	Regiones reguladoras alteradas
rs931798	JunD	GATA-3, EVI-1
rs970476		NF-AT1

Aunque no se conoce alguna actividad específica de NF-AT1 y Evi-1 en retina o tejido nervioso, para JunD y GATA-3 se han descrito diferentes mecanismos de regulación de daño retinal y desarrollo endotelial en los que se ven involucrados respectivamente.

Para GATA-3 se han descrito que su ausencia afecta la regulación de muchos genes contiguos y además la inducción de muchos transcritos sugiriendo que actúa como un regulador positivo y negativo en células endoteliales. Por lo tanto, existen especulaciones acerca de que estados patológicos o inflamación podrían provocar modificaciones a la señalización mediada por GATA-3 y derivar en la disfunción de células endoteliales.³⁷

Se ha demostrado que JunD regula las respuestas transcripcionales tempranas en células ganglionares de retina cuando existe daño axonal³⁸, aproximadamente a una distancia de 10 pb existe una secuencia potenciadora de este elemento (Tabla 10). Por lo tanto, podría ocurrir la posibilidad de que cuando en el SNP rs931798 se presenta la variante heterocigota esta proteína se ve desregulada y por lo tanto también su función de reparación.

7.5 Estratificación de la DMRE y su asociación con los SNP rs970476 y rs931798.

Con la finalidad de analizar la asociación entre los genotipos y los fenotipos de la DMRE los grupos fueron separados en neovascular y atrofia geográfica. Aunque no se observó asociación entre los genotipos y alguno de los fenotipos de la degeneración macular, se puede apreciar una tendencia ($p=0.168$) en el SNP rs931798 a estar asociado con el fenotipo húmedo (Tabla 11).

Esto cobró relevancia ya que junto con el resultado del análisis bioinformático, se aprecia una posible relación entre el polimorfismo rs931798 que puede estar implicado en la desregulación de procesos neovasculares y el fenotipo húmedo que se caracteriza por estos mismos.

Tabla 11. Asociación de los polimorfismos rs931798 y rs970476 con los fenotipos de la DMRE.

Fenotipo	Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia		Valor de p
			Casos	Controles	
Seco (n=39)					
	rs931798	G/G	0.44	0.50	0.796
		G/A	0.46	0.40	
		A/A	0.10	0.10	
	rs970476	G/G	0.36	0.32	0.824
		G/T	0.46	0.46	
		T/T	0.18	0.22	
Húmedo (n=91)					
	rs931798	G/G	0.37	0.50	0.168
		G/A	0.53	0.40	
		A/A	0.10	0.10	
	rs970476	G/G	0.30	0.31	0.830
		G/T	0.45	0.47	
		T/T	0.22	0.25	

Al buscar la interacción de los SNP de interés con los factores confusores observamos que la DMRE en modelo codominante presenta una asociación de riesgo con un valor de 2.63 (I.C.=1.05-6.58) con el SNP rs970476 en el genotipo heterocigoto (G/T) al presentarse con mayor frecuencia en el grupo de los casos no hipertensos que en los controles. Así mismo, el genotipo homocigoto G/G se encuentra con mayor frecuencia en los casos del grupo de los hipertensos en comparación con los controles, presentando también una asociación de riesgo con un valor de 3.13 (I.C.=1.16-8.46). Ambas asociaciones obtuvieron un valor de $p=0.03$ por lo que son significativas (Tabla.12).

Tabla 12. Asociación del polimorfismo rs970476 con hipertensión arterial en pacientes de DMRE en modelo codominante, ajustado por edad y sexo.

SNP	Genotipo	n		RM (IC 95%)	Valor de p
		DMRE	Controles		
rs970476					
Sin hipertensión	G/G	14	22	1.00	0.03
	G/T	32	25	2.63 (1.05-6.58)	
	T/T	14	14	1.50 (0.52-4.32)	
Con hipertensión	G/G	27	14	3.13 (1.16-8.46)	
	G/T	26	29	1.53 (0.61-3.80)	
	T/T	16	12	2.19 (0.74-6.49)	

8. CONCLUSIONES

La edad es un factor de riesgo para presentar DMRE en pacientes mexicanos.

El genotipo G/A en el SNP rs931798 es un factor de riesgo para la degeneración macular relacionada con la edad.

El genotipo G/T del SNP rs970476 mostró asociación con la hipertensión en el fenotipo húmedo de DMRE.

En nuestro estudio no se encontró contribución en haplotipo de los SNP rs931798 y rs970476 con la presencia de la degeneración macular relacionada con la edad.

En este trabajo mostramos que el gen *SGCD* está asociado con la degeneración macular relacionada con la edad.

Los análisis in silico mostraron que el SNP rs931798 podría tener actividad sobre la regulación del ADN que puede estar impactando en DMRE y otras patologías, por lo que estos SNP ameritan más estudios.

9. BIBLIOGRAFIA

1. S. Resnikoff, D. Pascolini, D. Etya'ale. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* **2004**, 82, 844-51.
2. S. Mariot, WorldHealthOrganization. GLOBAL DATA ON VISUAL IMPAIRMENTS 2010. WHO/NMH/PBD/12.01
3. P. Luthert. Pathogenesis of age-related macular degeneration. Mini-symposium ocular pathology diagnostic histopathology. 17, 1.
4. Statistics by Country for Age-related macular degeneration.
http://www.rightdiagnosis.com/a/age_related_macular_degeneration/stats-country.htm#extrapwarning
5. INEGI 2009. Población. Esperanza de vida. Consultado:
<http://cuentame.inegi.org.mx/impresion/poblacion/esperanza.asp>
6. S. Bonnel, S. Mohand-Said, J. Sahel. The aging of the retina. *Experimental Gerontology.* **2008**, 38, 825–831.
7. Al Lens et al. *Ocular anatomy and physiology.* 2nd edition. Slack Inc. **2008**, 89.
8. A. Donoso, D. Kim, A. Frost. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration. *Survey of ophthalmology.* **2006**, 51, 2.
9. M. Rudolf, M. Clark, M. Chimento. Prevalence and Morphology of Druse Types in the Macula and Periphery of Eyes with Age-Related Maculopathy. *IOVS,* **2008**, 49, 3.
10. X. Ding, M. Patel, Chi-Chao Chan. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research.* **2009**, 28, 1–18.
11. C. Nag, S. Wadhwa. Ultrastructure of the human retina in aging and various pathological states. *Micron.* **2012**, 43, 759–781.
12. S. Hageman, K. Gehrs, V. Johnson. Age-Related Macular Degeneration (AMD), in *The Organization of the Retina and Visual System.* University of Utah Health Sciences Center: Salt Lake City (UT). 2008

13. J. Ambati, K. Ambati, S. Yoo. Age-Related Macular Degeneration: Etiology, Pathogenesis, and Therapeutic Strategies. *Survey of ophthalmology*. **2003**, 48, 3.
14. I. Bhutto, G. Luty. Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular Aspects of Medicine*. **2012**, 33, 295–317.
15. I. Lozano, S. López, I. Elosua. Actualización en el manejo de la degeneración macular asociada a la edad. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. **2012**, 47, 5, 214–219.
16. L. Lim, P. Mitchell, J. Seddon, Age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1. **2012**, 379.
17. B. Neuner, A. Komm, J. Wellmann. Smoking history and the incidence of age-related macular degeneration. *Addictive Behaviors*. **2009**, 34, 938–947.
18. E. Cho, S. Hung, W. Willett. Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. *American Journal of Clinical Nutrition*. **2001**, 73, 209–18.
19. S. Haddad, C. Chen, S. Santangelo. The Genetics of Age-Related Macular Degeneration: A Review of Progress to Date. *Survey of ophthalmology*. **2006**, 51, 4.
20. A. Swaroop, K. Branham, W. Chen. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Human Molecular Genetics*. **2007**, 16, 2.
21. W. Lin, W. Lee. Incorporating prior knowledge to facilitate discoveries in a genome-wide association study on age-related macular degeneration. *BMC Research Notes*. **2010**, 3, 2.
22. H. Ueda, K. Ueda, T. Baba. δ - and γ - Sarcoglycan Localization in the Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **2001**, 49, 4, 529–537.

23. G. Miller, E. Wang, K. Nassar. Structural and functional analysis of the sarcoglycan–sarcospan subcomplex. *Experimental cell research*. **2007**, 313, 639–651.
24. F. Estrada, D. Mornet, H. Rosas-Vargas. A novel isoform of δ -sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2006**, 340, 865–871.
25. C. Dalloz, T. Claudepierre, F. Rodius. Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the *mdx* mutation. *Molecular and cellular neuroscience*. **2001**, 17, 908-920.
26. J. Porter, A. Merriam, A. Hack. Extraocular muscle is spared despite the absence of an intact sarcoglycan complex in g- or d- sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscular Disorders*. **2000**, 11, 197-207.
27. A. Solares-Pérez, J. Sánchez, A. Zentella-Dehesa. Intracellular Ca^{2+} transients in delta-sarcoglycan knockout mouse skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2010**, 1800, 373–379.
28. A. Bocquet, E. Chantemèle, Y. Fromes. Alteration of microvascular mechanotransduction in syrian hamster lacking delta-sarcoglycan is caused by enhanced oxidative stress. *The FASEB Journal*. **2007**, 21, 593.1.
29. D. Ardeljan, C. Chan. Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Progress in Retinal and Eye Research*. **2013**, 1-22.
30. P. Cackett, Y. Wong, T. Aung. Smoking, Cardiovascular Risk Factors, and Age-related Macular Degeneration in Asians: The Singapore Malay Eye Study. *American Journal of Ophthalmology*. **2008**, 146, 6, 960-967.
31. F. Choudhury, R. Varma, R. McKean-Cowdin. Risk factors for four-year incidence and progression of Age-Related Macular Degeneration: The Los Angeles latino eye study. *American Journal of Ophthalmology*. **2011**, 152, 3, 385-395.
32. W. Smith, J. Assink, R. Klein. Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. **2001**, 108, 697-704.

33. B. Buentello-Volante, G. Rodriguez-Ruiz, A. Miranda-Duarte. Susceptibility to advance age-related macular degeneration and alleles of complement factor H, complement factor B, complement component 2, complement component 3, and age-related maculopathy susceptibility 2 genes in a Mexican population. *Molecular Vision*. **2012**, 18, 2518-2525 .
34. S. Fraser-Bell, J. Wu, R. Klein. Cardiovascular Risk Factors and Age-related Macular Degeneration: The Los Angeles Latino Eye Study. *American Journal of Ophthalmology*. **2008**, 145, 2, 308-316.
35. B. Neuner, A. Komm J. Wellmann. Smoking history and the incidence of age-related macular degeneration. *Addictive Behaviors*. **2009**, 34, 938–947.
36. R. Cong, B. Zhou, Q. Sun. Smoking and the Risk of Age-related Macular Degeneration: A Meta-Analysis. *AEP* **2008**, 18, 8, 647–656.
37. H. Song, J. Suehiro, Y. Kanki; Critical Role for GATA3 in Mediating Tie2 Expression and Function in Large Vessel Endothelial Cells. *The journal of biological chemistry*. **2009**, 284, 42, 29109–29124.
38. K. Fernandes, J. Harder, J. Kim; JUN regulates early transcriptional responses to axonal injury in retinal ganglion cells. *Experimental Eye Research*. **2013**, 112, 106-117.