



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA

POLIMORFISMO DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA (*LIPC*) Y SU RELACIÓN
CON EL PERFIL DE LÍPIDOS EN INDIVIDUOS CON DEGENERACIÓN
MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
SERGIO GROMAN LUPA

DRA. MARÍA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÉXICO, D.F. ABRIL 2014



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.

“POLIMORFISMO DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA (*LIPC*) Y SU RELACIÓN CON EL PERFIL DE LÍPIDOS EN INDIVIDUOS CON DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD”

INTRODUCCIÓN

La degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), es una enfermedad neurodegenerativa, es la primera causa de ceguera irreversible a nivel mundial en personas mayores de 50 años. Se estima que aproximadamente 15 millones de norteamericanos tiene DMRE. La prevalencia de la enfermedad es de 85%-90% para la forma no neovascular (seca) y 10%-15% para la forma neovascular (húmeda).¹

El envejecimiento normal resulta en un espectro de cambios en la macula, muchos clínicamente indetectables, que afectan la retina externa, el epitelio pigmentado de la retina, la membrana de Bruch y la coriocapilaris ^[2-5]:

- Disminución de los fotorreceptores en densidad y distribución
- Cambios ultraestructurales ocurren en el epitelio pigmentado de la retina (EPR), incluyendo pérdida de gránulos de melanina, formación de gránulos de lipofuscina, y acumulo de cuerpos residuales.
- Acumulo de depósitos basales laminares; estos consisten en material granular ricos en lípidos y fibras de colágeno que se encuentran entre la lámina basal (membrana plasmática) de las células del epitelio pigmentado y la membrana basal del mismo.
- Cambios involucionales progresivos ocurren en la coriocapilaris.

Todos estos cambios representan envejecimiento pero pueden no ser parte de DMRE. Las anomalías asociadas a la DMRE que no son parte del proceso de

envejecimiento normal pueden ser clasificadas como no-neovasculares y neovasculares.²

DMRE no-neovascular

La mayoría de los pacientes con DMRE tienen solo anormalidades no-neovasculares, como drusas y anormalidades del EPR (hiperpigmentación focal, degeneración del EPR, atrofia geográfica). Estos pacientes se encuentran generalmente asintomáticos o pueden tener una leve disminución de la visión y/o metamorfopsias. La forma geográfica avanzada puede tener escotoma central o pericentral. La pérdida visual severa por DMRE ocurre en individuos con anormalidades neovasculares o atrofia geográfica subfoveal del EPR.^[2-5]

Clínicamente, las drusas son lesiones pequeñas amarillentas redondas localizadas a nivel del EPR en la macula. Histológicamente, este material corresponde a un engrosamiento anormal de la membrana de Bruch. Ultraestructuralmente, este material incluye depósitos basales laminares (material granular rico en lípidos y fibras espaciadas de colágena) y depósitos basales lineares (vesículas de fosfolípidos y gránulos electrón-densos dentro de la membrana de Bruch). Las drusas pueden separar al EPR de la membrana de Bruch, resultando en un desprendimiento localizado del EPR. Debido a que las drusas no afectan a los fotorreceptores, típicamente no causan síntomas. Se han desarrollado varias clasificaciones con el fin de distinguir a las drusas que progresaran a atrofia o neovascularización coroidea de las que no. Las drusas se han clasificado en ^[2-5]:

- Pequeñas (<64 µm en diámetro)
- Intermedias (64 -124 µm)
- Grandes (> 125 µm)

Se ha descrito que el riesgo de progresión a DMRE avanzada en pacientes con drusas pequeñas fue de 1.3% en contraste con 18% en pacientes con drusas intermedias o grandes. Además se describen a las drusas como duras (discretas,

bien demarcadas), blandas (amorphas, mal demarcadas) y confluentes. Las drusas blandas y confluentes tienen mayor riesgo de progresión.^[2-5]

Las anomalías del EPR pueden tener diferentes patrones. Cuando el área de atenuación del EPR atenuados o ausente es contigua, se conoce como atrofia geográfica. Si la atrofia no cubre un área contigua se le conoce como no atrofia no geografía. El aumento del pigmento en la retina externa lleva a hiperpigmentación focal del EPR. Los pacientes con zonas de hiperpigmentación tienen mayor riesgo de progresión a formas más avanzadas de DMRE.^[2-5]

DMRE neovascular

La característica que distingue a la forma neovascular de la DMRE es la presencia de neovascularización coroidea. Cualquier disrupción de la membrana de Bruch, como la presencia de drusas, puede incrementar la posibilidad de que ocurra una ruptura, permitiendo que tejido neovascular de la coriocapilaris perfora la membrana de Bruch. Estos nuevos vasos se acompañan de fibroblastos, resultando en un complejo fibrovascular que destruye la arquitectura normal de la coriocapilaris, membrana de Bruch, y el EPR. Además, este tejido fibrogliol y fibrovascular puede destruir a los fotorreceptores, llevando a una cicatriz disciforme. Los pacientes experimentan pérdida visual súbita, metamorfopsias, y escotoma paracentral. Clínicamente, puede haber elevación del EPR; lípidos, líquido o sangre subretinianos o intraretinianos.^[6-8]

La DMRE se clasifica por el Sistema de Clasificación Clínica de la Maculopatía Relacionada con la Edad en 5 estadios con fines de manejo y de investigación⁹:

1. Sin drusas o < 10 drusas pequeñas sin anomalías del EPR
2. Aproximadamente > 10 drusas pequeñas o < 15 drusas intermedias asociadas con anomalías del EPR
 - a. Drusas
 - b. Cambios del ER (hiperpigmentación e hipopigmentación)
 - c. Drusas y cambios del EPR

3. Aproximadamente > 15 drusas intermedias o cualquier drusa grande
 - a. Desprendimiento del EPR no drusenoide
 - b. Desprendimiento del EPR drusenoide
4. Atrofia geográfica con involucro del centro macular, o atrofia geográfica no central de al menos 350 µm de tamaño
5. DMRE neovascular, incluyendo desprendimientos del EPR no drusenoides AMD, desprendimientos de retina serosos o hemorrágicos, membrana neovascular coroidea con fibrosis subretiniana o sub-EPR, o cicatrices por el tratamiento.
 - a. Desprendimiento serosos del EPR sin membrana coroidea neovascular.
 - b. Membrana coroidea neovascular o cicatriz disciforme

El riesgo de la DMRE aumenta con la edad. El 6.4% de los pacientes de 65-74 años y 19.7% de los pacientes mayores de 75 años tuvieron signos de DMRE. Además, los pacientes mayores de 80 años tiene una prevalencia 6 veces mayor que los pacientes entre 60 y 64 años. Desafortunadamente, el impacto de la DMRE continuara aumentado conforme la población envejece. Se estima que el número de pacientes con DMRE incrementara 60% para el año 2020.¹

Los factores de riesgo que se han relacionado con DMRE son historia familiar, tabaquismo, hipermetropía, color de iris claro, hipertensión, hipercolesterolemia, género femenino, y enfermedad cardiovascular.¹⁰

El manejo de la DMRE en su variante no neovascular está enfocado en suplemento alimenticio con antioxidantes y vitaminas (Vitamina C, vitamina E, zinc, luteína, zeaxantina), que han demostrado una reducción en la progresión a formas más avanzadas hasta en un 25%. También se recomienda evitar la exposición a luz UV, así como cambios en el estilo de vida (tabaquismo, obesidad). En cuanto al manejo de la DMRE neovascular, la mayor parte de la investigación se ha enfocado en el bloque del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual ha sido identificado como uno de los principales activadores de la angiogénesis en la DMRE. ^[11-15] Los agentes antiangiogénicos más utilizados en la actualidad son los anticuerpos monoclonales Bevacizumab, Ranibizumab y Aflibercept, los cuales se administran por medio de una inyección

intravítrea y bloquean todas las isoformas del VEGF. También se ha utilizado la terapia fotodinámica que consiste en la administración intravenosa del antitangiogénico verteporfina, y la aplicación de luz roja en el área de la retina afectada que activa a la verteporfina produciendo daño local al endotelio neovascular, resultand en oclusión de los vasos sanguíneos. Los corticoesteroides intravítreos, tratan y previenen la infamación, bloqueando la regulación a la alta del VEGF, disminuyen los espacios entre las células endoteliales, y limitan la fiborisis, minimizando la cicatrización. También se puede utilizar fotocoagulación directa de los vasos sanguíneos, sin embargo son pocos los pacientes candidatos a este tratamiento. ^[11-15]

ANTECEDENTES

No se conoce la etiología de la DMRE a pesar de la prevalencia de esta enfermedad, sin embargo se ha identificado que la historia familiar es un factor importante. En estudios con gemelos monocigóticos con DMRE e influencias ambientales y nutricionales comunes, la apariencia fundoscopica y el grado de pérdida visual fueron muy similares (89%-100%).^[10-15] La concordancia clínica en gemelos dicigóticos fue menor pero aun sustancial (46%).^[10-15] La enfermedad tiene una tasa de recurrencia 3-6 veces mayor en familiares de un paciente afectado en comparación a la población general y el riesgo estimado de heredabilidad de la DMRE es de hasta 71%. ^[10-15] La importancia de la herencia en la DMRE fue confirmada cuando estudios recientes de asociación del genoma completo identificaron diferentes genes asociados con DMRE, en particular los relacionados con la vía alterna del complemento, primero en el gen del factor del complemento H (*CFH*)¹⁸. Desde entonces se han identificado polimorfismos de riesgo en el factor de complemento B (*CFB*)¹⁹, factor de complemento 2 (*C2*)¹⁹, factor de complemento 3 (*C3*)²⁰, factor del complemento I (*CFI*)²¹, factor relacionado a CFH 3 (*CFHR3*)²², factor relacionado a CFH 1 (*CFHR1*)²² y factor de susceptibilidad a maculopatía relacionada con la edad 2 (*ARMS2*)²³. Tres variantes alélicas – CFH Y402H, ARMS2 A69S y C3 R102G – representan el 75%

del riesgo poblacional atribuible para el desarrollo de DMRE.²⁴ Aunque no se sabe cómo las mutaciones en la cascada del complemento predisponen a los pacientes a DMRE, es aceptado que la disregulación de la vía innata del complemento lleva a respuestas inflamatorias aberrantes que resultan en acumulo de desechos celulares en la membrana de Bruch; sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual la vía del complemento es activada. Probablemente, un gran rango de estímulos inflamatorios a lo largo de la vida puede ser responsable llevando a los signos y síntomas de la DMRE. Otro locus de susceptibilidad se ha encontrado en el cromosoma 10q26, y la mutación probablemente se encuentre en un gen conocido como LOC387715 o dentro del promotor de un gen vecino conocido como HTRA1.²³ Aun no se ha descubierto la vía alterada por este locus.

La mayoría de los estudios anteriormente mencionados se han realizado en población de origen caucásica y asiática. Es importante realizar replicaciones independientes en distintas poblaciones para el mejor entendimiento de las bases moleculares de la DMRE a través de la posible identificación de diferencias étnicas específicas en variantes genéticas que puedan modificar la enfermedad. Un estudio reciente realizado en población mexicana encontró asociación significativa con las variantes CFHY402H, ARMS2 A69S, y CFB R32Q, con razones de momios de 6.3, 5.3, y 2.5 respectivamente, considerando el estado homocigoto del alelo de riesgo. Considerando las variantes de riesgo para CFH y ARMS2 (C-T), juntas confieren una razón de momios de 7, así como un riesgo atribuible en los expuestos de 85.5%, para el desarrollo de DMRE, siendo de los riesgos más altos obtenidos en una población. Estos resultados corroboran que estos alelos son los principales factores de riesgo genético, inclusive en poblaciones con una gran mezcla ancestral como es la población mexicana.²⁵

En otro estudio reciente realizado en población mexicana se encontró diferencias étnicas significativas en la frecuencia alélica de polimorfismos de base única (SNP's) como *rs1061170* en *CFH*, *rs2230199* en *C3*, y *rs10490924* en *ARMS2*. Además encontraron que polimorfismos en *C2* y *CFB* (*rs547154* y *rs4151667*) pueden ejercer un efecto protector en nuestra población. Esto revela diferencias

étnicas significativas en frecuencias alélicas y abre la posibilidad de encontrar otros factores genéticos no descubiertos que puedan ser responsables de riesgo y protección de DMRE en población mestiza mexicana.²⁶

En este sentido un estudio reciente de asociación del genoma completo identificó una asociación significativa entre polimorfismos en el gen que codifica para la lipasa hepática (LIPC)²⁷ localizado en el cromosoma 15q22, y estadios avanzados de la DMRE. LIPC, codifica para la lipasa hepática que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos, monoglicérols, diglicéridos, triglicéridos y tioesters de acyl-CoA, es crítica en el metabolismo de las HDL [24,25] y es expresada en el hígado y en retina²⁷. Una de sus principales funciones es convertir el colesterol HDL a LDL. LIPC ejerce la función de hidrolasa de triglicéridos y a su vez funciona como ligando para el metabolismo mediado por receptores de lipoproteínas.

A la fecha, los estudios que evalúan la asociación entre lípidos séricos y DMRE han sido inconsistentes. La lipasa hepática ha demostrado tener un impacto en la aterogénesis y en los factores de riesgo cardiovasculares asociados con la DMRE. En otro estudio reciente, se demostró que el alelo T del polimorfismo rs10468017 de gen de la LIPC, incrementa los niveles de HDL, y disminuye el riesgo de DMRE [40,41,42]. También se ha propuesto como otra posibilidad que el polimorfismo de LIPC influya en la función de a HDL como transportador de luteína y zeaxantina a la retina, y es conocido que la disminución en el consumo de estos dos carotenoides está asociado a menor riesgo de DMRE.⁴²

Es por esto que el estudio de LIPC puede representar otra posible vía en la patogénesis de la DMRE. Los estudios a la fecha hoy descritos se han realizado la mayor parte de ellos en población caucásica, sin embargo los polimorfismos identificados en estudios pueden no ser los mismos en nuestra población. Además debido a que se ha sugerido una mayor susceptibilidad genética en nuestra población para padecer enfermedades como diabetes, dislipidemia, e hipertensión los cuales son factores de riesgo para la DMRE, es de gran relevancia explorar esta vía en mexicanos, pues tal vez en nuestra población la vía del metabolismo de los lípidos sea inclusive más importante que la vía de complemento.⁴³ A la

fecha ningún estudio se ha realizado en nuestra población que identifique los cambios en el perfil lipídico y los polimorfismos del gen LIPC con la DMRE.

Además de identificar genes asociados a mayor o menor riesgo de DMRE, se han desarrollado modelos estadísticos para predecir a los pacientes que tiene mayor posibilidad de progresar de las etapas tempranas e intermedias a las formas avanzadas de la enfermedad como la atrofia geográfica y la neovascularización coroidea. Estos modelos incluyen factores genéticos así como demográficos (edad, sexo, nivel escolar), ambientales (tabaquismo, índice de masa corporal, uso de antioxidantes), y características maculares. ^[44,45,46,47] En un estudio reciente en 2,560 sujetos sin DMRE avanzada, se genotipificaron 12 SNPs. Se aplicó un modelo multivariado de Markov para progresión de normal a drusas intermedias, después a drusas grandes, y finalmente a enfermedad neovascular y atrofia geográfica. Controlando los factores ambientales, demográficos y otros SNP's, se encontró que el polimorfismo rs10468017 del gen LIPC estuvo asociado con disminución en el riesgo de progresión de drusas grandes a DMRE neovascular. Este genotipo también demostró una tendencia a disminuir el riesgo de progresión de normal a drusas intermedias. También se encontró que el alelo T del polimorfismo *rs1883025* en *ABCA1* estuvo asociado a disminución en el riesgo de progresión de normal a drusas intermedias y de drusas intermedias a drusas grandes. También los genes *CFH*, *C3*, *CFB*, y *ARMS2/HTRA1* estuvieron asociados a progresión de drusas intermedias a drusas grandes, y de drusas grandes a DMRE neovascular y atrofia geográfica. Estos hallazgos serán útiles para diseño de ensayos clínicos y medicina personalizada.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN)

¿Existe relación entre el polimorfismo rs10468017 del gen de la lipasa hepática, el perfil de lípidos y la degeneración macular relacionada con la edad?

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre el polimorfismo *rs10468017* del gen de la lipasa hepática (LIPC) y el perfil de lípidos en individuos con degeneración macular relacionada con la edad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las concentraciones de lípidos (HDL, LDL, colesterol, triglicéridos) de sujetos con DMRE avanzada (grado 3, 4 y 5).
- Determinar la frecuencia del polimorfismo rs10468017 del promotor del gen de LIPC en sujetos con DMRE avanzada (grado 3, 4 y 5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de Estudio. Estudio transversal analítico.

Criterios de Inclusión. Pacientes con Degeneración Macular Relacionada al Edad de acuerdo con el Sistema de Estadificación de Maculopatía Relacionada con la Edad estadios 3, 4 y 5, no relacionados, mayores de 60 años.

Criterios de Exclusión. Pacientes con comorbilidad oftalmológica con afección retiniana (retinopatía diabética, distrofias retinianas) consumo de medicamentos modificadores del perfil de lípidos (hipolipemiantes orales) y enfermedades sistémicas (Diabetes Mellitus, Insuficiencia hepática).

Criterios de Eliminación. Muestra Insuficiente de sangre para la determinación del perfil de lípidos o de ADN.

Muestra. En este estudio piloto se incluyeron 30 pacientes que son los mínimos necesarios para poder realizar el análisis estadístico en base a la fórmula clásica de Freeman: $[n = 10 * (k + 1)] = 30$.

VARIABLES DEL ESTUDIO

Polimorfismo del gen de la lipasa hepática:

Definición conceptual: variante de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la lipasa hepática.

Definición operativa: Genotipo observado en la posición polimórfica rs10468017 del gen de la lipasa hepática determinado por las posibles combinaciones CC, CT, TT.

Colesterol Total:

Definición conceptual: esteroles componente de membranas celulares, insoluble en agua que es transportado en la circulación unido a lipoproteínas.

Definición operativa: Medición en suero con analizador automatizado Cobas C 111 (Roche) y con reactivos y calibradores de Roche Diagnostics.

Niveles: Normal < 200 mg/dl, Limite: 200 – 239 mg/dl Alto > 239 mg/dl

HDL (High Density Lipoproteins)

Definición conceptual: grupo de lipoproteínas plasmáticas de alta densidad constituidas principalmente por proteína; participan en el transporte de colesterol y triglicéridos. Niveles altos disminuyen el riesgo cardiovascular

Definición operativa: Medición en suero con analizador automatizado Cobas C 111 (Roche) y con reactivos y calibradores de Roche Diagnostics.

Niveles: Bajo: < 39 mg/dl Alto > 60 mg/dl

LDL (Low Density Lipoproteins)

Definición conceptual: grupo de lipoproteínas de baja densidad que constituyen las principales transportadoras de colesterol en la circulación; niveles altos están asociados con aumento del riesgo cardiovascular.

Definición operativa: Medición en suero con analizador automatizado Cobas C 111 (Roche) y con reactivos y calibradores de Roche Diagnostics.

Niveles: Óptimo < 100 mg/dl, Deseable < 130 mg/dl, limítrofe alto: 139 -159 mg/dl, alto 160-189 mg/dl, muy alto > 190 mg/dl

Triglicéridos

Definición conceptual: lípidos constituidos por tres cadenas de ácidos grasos esterificadas a una molécula de fosfato de glicerol.

Definición operativa: Medición en suero con analizador automatizado Cobas C 111 (Roche) y con reactivos y calibradores de Roche Diagnostics.

Niveles: Deseable < 150 mg/dl, Limítrofe 150–199 mg/dl, Alto > 200 mg/dl

CLASIFICACIÓN DE VARIABLES

Variable	Dependencia	Escala de medición		Parámetro
Polimorfismo del gen LIPC	Independiente	Cualitativa politémica	nominal	Presente o ausente
DMRE	Dependiente	Cualitativa politémica	ordinal	Grado 1, 2, 3, 4 y 5
Colesterol Total	Dependiente	Cuantitativa razón	continua de	Normal ó Alto
HDL	Dependiente	Cuantitativa razón	continua de	Bajo ó Alto
LDL	Dependiente	Cuantitativa razón	continua de	Normal ó Alto
Triglicéridos	Dependiente	Cuantitativa razón	continua de	Normal ó Alto

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.

Previa firma de la Hoja de Información y Consentimiento Informado (anexo 3), se extrajeron 9 mL de sangre por punción venosa en cada sujeto. Se colocaron 4 mL en un tubo BD Vacutainer Morado (EDTA) para obtención de ADN y vacutainer amarillo sin anticoagulante para obtención de suero.

EXTRACCIÓN DEL ADN (ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO) GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.

Se colocaron 500 μ L de sangre total en un microtubo de 2 mL con 1 mL de reactivo DNAzol BD (Invitrogen) y se agregaron 400 μ L de alcohol isopropílico agitando vigorosamente durante 1 minuto. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 6000 rpm (revoluciones por minuto) durante 6 minutos, se añadieron 500 μ L de DNAzol BD al botón residual y se agitó hasta disolver el botón. Se centrifugó nuevamente la muestra a 6000 rpm, esta vez por 5 minutos, se decantó el sobrenadante, se agregó al botón 1 mL de etanol al 75% y se agitó hasta disolver el botón. La muestra se centrifugó a 600 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de alcohol con una micropipeta. Finalmente, se agregó al botón 200 μ L de hidróxido de sodio (NaOH) 8 mM o de agua bidestilada estéril y se almacenó la muestra a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y DE LA PUREZA DEL ADN OBTENIDO.

Se determinó la concentración y la pureza del ADN 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 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se consideran adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se

realizó electroforesis en geles de agarosa de cada muestra de ADN obtenida para verificar que no exista degradación de este ácido nucleico. La concentración de ADN obtenida se determinó por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/ μ L.

Amplificación parcial por PCR del gen LIPC. Se realizó análisis molecular amplificación por PCR y secuenciación nucleotídica de 221 pares de bases del gen LIPC que incluye a los nucleótidos polimórficos por estudiar. Se efectuó la amplificación por PCR a partir del ADN de los sujetos afectados y de los controles utilizando pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal del gen. Los primers que se utilizaron fueron:

- Sentido: AAGTGCTGATGTGAGCTACC
- Antisentido: AGTTCAGTCGTAAATTCTAC

Se exploró el locus LIPC en el SNP *rs10468017*, que es una región promotora que influencia la expresión de LIPC.

La reacción de amplificación de PCR se realizó en un volumen total de 20 μ l que con buffer para PCR 1X, de 100-200 ngs de DNA genómico, 0.3 mM de cada uno de los cuatro dNTP's, 10 μ L de kit HotStart, 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido), MgCl₂ a una concentración de 2.5 mM y agua bidestilada c.b.p. 20 μ l. Se utilizó un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial y activación de la DNA polimerasa, 38 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a 54.6°C y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final. Los productos obtenidos de la amplificación se sometieron a 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 pb.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La identificación del polimorfismo *rs10468017* en el gen LIPC se realizó por secuenciación nucleotídica directa. Se recortaron del gel de agarosa las bandas de interés con el DNA y se purificó el producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (QIAGEN). La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinó por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de LIPC y cada reacción de 10 µl contendrá 0.5 µl de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxynucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxynucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 0.5 µl del oligonucleótido correspondiente (sentido o antisentido), 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 10 µl. Para esta PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 15 segundos a 50°C para el alineamiento y 4 minutos a 60°C para la extensión. Los productos de esta segunda PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied, Biosystems) para eliminar el exceso de ddNTPs fluorescentes y de dNTPs no marcados. Cada muestra se resuspendió en 20 µl de formamida desionizada y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron en un secuenciador automático 3130 Genetic analyzer y las secuencias de DNA obtenidas se compararon con las secuencias silvestres de LIPC publicadas en la base de datos Ensembl (www.ensembl.com) para identificar los genotipos en cada muestra

Determinación de lípidos. A partir de la muestra sérica con química seca automatizada. Se determinaran colesterol total, HDL, triglicéridos y LDL con

analizador automatizado Cobas C 111 (Roche) y con reactivos y calibradores de Roche Diagnostics

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Este estudio fue sometido a los comités de Investigación y Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana para su dictamen y en su caso aprobación y realización. Cumple con los criterios de la Declaración de Helsinki para investigación en humanos.

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

- Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección II, investigación con riesgo mínimo, se anexa hoja de consentimiento informado.

- Título Segundo, Capítulo III De la investigación en menores de edad o incapaces, Artículos 34-39

El cuidado y el trato humanitario de los pacientes durante una investigación científica demandan una aplicación profesional basado en el conocimiento de las necesidades de los pacientes y de los requerimientos especiales de los programas de investigación científica. Es por esto que en este protocolo cuidaremos la integridad física y psicológica de quienes participan en el estudio, a través de:

- Disponibilidad y adecuación en la aplicación de procedimientos que causen el menor daño.
- Calidad en el entrenamiento y experiencia del personal involucrado en los procedimientos.
- No debe haber duplicación innecesaria de muestras.
- Cuidado después del procedimiento.
- Ambiente laboral seguro para el personal.

Es por lo mencionado que todos los pacientes que ingresarán a este estudio contarán con una carta de consentimiento, que será firmada por el paciente mismo y por la Institución que le da el tratamiento. Se garantizará la confidencialidad de los datos y serán utilizados únicamente para difusión del trabajo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos obtenidos se utilizó estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión: rango, media, mediana, moda, desviación estándar, proporciones o porcentajes.

Por tener dos muestras se utilizó estadística inferencial con escala de intervalo: prueba de homogeneidad de varianza; si ésta demostró homogeneidad, entonces T de *student* o análisis de varianza; en caso de no demostrar homogeneidad de varianza se utilizó estadística no paramétrica. Se consideró como estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

Se utilizó análisis con razón de momios para evaluar el riesgo que condicionaba cada genotipo para presentar dislipidemia.

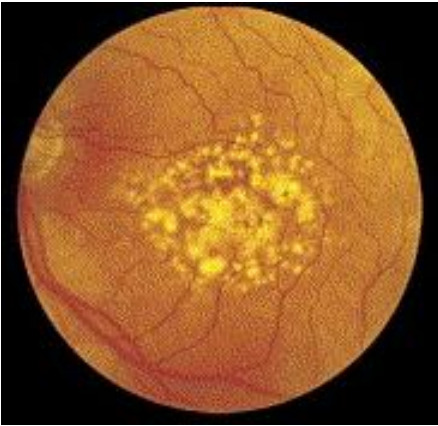
RESULTADOS

1. Características Clínicas de pacientes con DMRE

Se estudiaron en total a 30 pacientes, 17 mujeres (57%) y 13 hombres (43%) con edad promedio de 70(+/-6) años con diagnóstico clínico de Degeneración Macular Relacionada con la Edad auxiliado por angiografía con fluoresceína de retina y tomografía de coherencia óptica en caso de que el médico lo considerara necesario. Se utilizó el Sistema de Clasificación Clínica de la Degeneración Macular Relacionada con la Edad anteriormente descrito, incluyendo a pacientes con los estadios más avanzados de la enfermedad (a partir del estadio 3). De los 30 pacientes analizados 3 pacientes tenían estadio 3 (10%) (figura 1), 12 pacientes estadio 4 (40%) (figura 2) y 15 pacientes estadio 5 (50%) (figura 3).

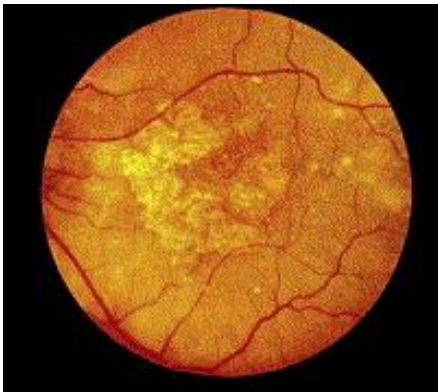
A continuación se muestran fotografías representativas de los 3 estadios de DMRE en los pacientes estudiados.

FIGURA 1. FOTOGRAFÍA DE FONDO DE OJO DE PACIENTE CON DMRE ESTADIO 3.



En la fotografía se observan manchas amarillentas confluentes en el área macular central sugestivas de despegamiento drusenoides del epitelio pigmentado de la retina.

FIGURA 2. FOTOGRAFIA DE FONDO DE OJO DE PACIENTE CON DMRE ESTADIO 4



En la fotografía se observa area hipopigmentada que permite la visualización de la vasculatura coroidea, imagen sugestiva de atrofia geográfica.

FIGURA 3. FOTOGRAFIA DE FONDO DE OJO DE PACIENTE CON DMRE ESTADIO 5



En la fotografía se observa presencia de hemorragia subretiniana en sector macular temporal así como cicatriz disciforme en el área central, cuadro representativo de neovascularización coroidea.

2. Polimorfismo rs10486017 del Gen LIPC

Se tomaron muestras sanguíneas en ayuno a todos los pacientes para la obtención del perfil de lípidos y para secuenciación del gen de la lipasa hepática (LIPC).

Al analizar el genotipo del gen LIPC en los pacientes estudiados encontramos que 17 fueron homocigotos CC (57%) (figura 4), 12 heterocigotos CT (40%) (figura 5) y 1 homocigoto TT (figura 6). Esta relación se mantiene en comparación a otros estudios con más pacientes¹².

IMAGEN DE SECUENCIACIÓN DE PACIENTE HOMOCIGOTO CC

T T G C A A C A T T T C A

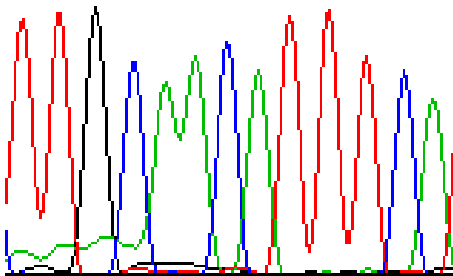


Gráfico de una secuencia de ADN obtenido por electroforesis capilar (electroferograma). Se muestra un sector de 13 nucleótidos para demostración. La flecha indica homocigoto C

IMAGEN DE SECUENCIACIÓN DE PACIENTE HETEROCIGOTO CT

T T G C A A Y A T T T C A

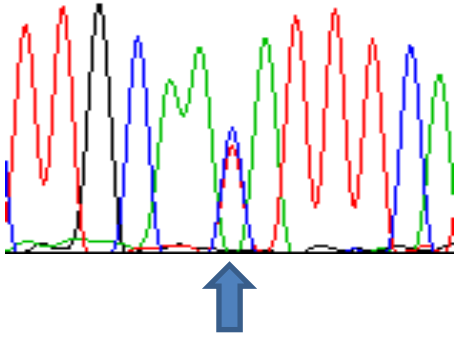


Gráfico de una secuencia de ADN obtenido por electroforesis capilar (electroferograma). Se muestra un sector de 13 nucleótidos para demostración. La flecha indica una Y con dos espigas, lo que se traduce en heterocigoto C/T

IMAGEN DE SECUENCIACIÓN DE PACIENTE HOMOCIGOTO TT

T T G C A A T A T T T C A

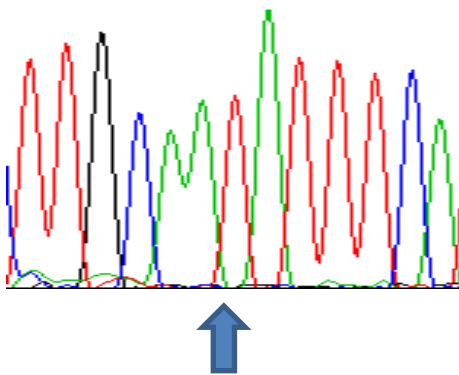


Gráfico de una secuencia de ADN obtenido por electroforesis capilar (electroferograma). Se muestra un sector de 13 nucleótidos para demostración. La flecha indica una T, lo que se traduce en homocigoto T.

3. Relación de DMRE con el polimorfismo rs10468017 del gen LIPC

En el grupo con genotipo CC, 2 pacientes presentaban estadio 3 de DMRE (11%), 7 pacientes presentaban estadio 4 de DMRE (41%) y 7 pacientes presentaban estadio 5 de DMRE (41%)

En el grupo con genotipo CT, 1 paciente presentó estadio 3 de DMRE (8.3%), 5 pacientes presentaron estadio 4 de DMRE (41%) y 6 pacientes presentaron estadio 5 de DMRE (50%).

El paciente con genotipo TT presentó estadio 3 de DMRE.

4. Relación de lípidos séricos con el polimorfismo rs10468017 del gen LIPC

Se analizó la relación entre el genotipo de LIPC y los lípidos séricos. El promedio del perfil de lípidos en el grupo de alelos CC fue para HDL 43.53 mg/dL (+/- 17 mg/dL), LDL 114.18 mg/dL (+/- 32 mg/dL), colesterol 176.24 mg/dL (+/- 31 mg/dL), y triglicéridos 160.41 mg/dL (+/- 70 mg/dL).

En el grupo de alelos CT el promedio fue para HDL 33.79 mg/dL (+/- 20 mg/dL), LDL 112.66 mg/dL (+/- 41 mg/dL), colesterol 167.89 mg/dL (37 mg/dL) y triglicéridos 159.53 mg/dL (+/- 61 mg/dL).

Solo encontramos una paciente con el alelo TT con un nivel de HDL de 103 mg/dL, de LDL 115 mg/dL, colesterol 217 mg/dL y triglicéridos 128 mg/dL.

Comparación de Lípidos Séricos entre Genotipos

	Genotipo LIPC: rs10468017			Valor P*
	CC	CT	TT	
	N= 17 Prom ± Desviación Estándar	N= 12 Prom ± Desviación Estándar	N= 1	
Lípidos séricos				
HDL (mg/dL)	44 ± 17	36 ± 17	103	0.09
LDL (mg/dL)	114 ± 32	113 ± 41	115	0.73
Colesterol (mg/dL)	176 ± 31	168 ± 37	217	0.96
Triglicéridos (mg/dL)	160 ± 70	160 ± 61	128	0.85

*Valor P calculado con prueba t para los grupos CC y CT

4.1. Relación del polimorfismo *rs10468017* del gen LIPC y HDL

El 50% del total de los pacientes estudiados tuvo el nivel de HDL por debajo del rango normal (35-65 mg/dL). Si lo analizamos por genotipo de LIPC, en el grupo con genotipo CC el 41% tuvo el nivel de HDL por debajo del rango normal y el 66% del grupo CT estuvo por debajo del rango normal. Del total de los pacientes, 4 pacientes (el 13%) tuvo el nivel de HDL por arriba del rango normal. De estos pacientes, 2 se encontraban en el grupo del genotipo CC (el 11%), 1 en el grupo del genotipo CT (el 8.3%) y el paciente con genotipo TT presentó niveles de HDL por arriba del rango normal (103 mg/dL).

4.2. Relación del polimorfismo *rs10468017* del gen LIPC y LDL

El 36% del total de los pacientes estudiados tuvo el nivel de LDL por arriba del rango normal (100-129 mg/dL). Si lo analizamos por genotipo de LIPC, en el grupo con genotipo CC el 35% de los pacientes estuvo por arriba del rango normal, y en el grupo del genotipo CT el 41% de los pacientes estuvo por arriba del rango normal. El paciente con el alelo TT presentó nivel dentro del rango normal (115 mg/dL). El 33% del total de los pacientes tuvo el nivel de LDL por debajo del rango normal, en el grupo CC el 35% estuvo por debajo del rango normal y el 33% en el grupo CT estuvo por debajo del rango normal.

4.3. Relación del Polimorfismo *rs10468017* del gen LIPC y Colesterol Total

De todos los pacientes estudiados, ninguno presentó niveles por arriba del rango normal de colesterol (150-250 mg/dL) y el 26% presentó niveles por debajo del rango normal. Si lo analizamos por genotipo de LIPC, el 17% de los del grupo con genotipo CC tenían el nivel de colesterol por debajo del rango normal y el 41% del grupo con genotipo CT tenían el nivel de colesterol por debajo del rango normal.

4.4. Relación del Polimorfismo *rs10468017* del gen LIPC y Triglicéridos

El 43% de todos los pacientes estudiados tuvo el nivel de triglicéridos por arriba del rango normal (25-165 mg/dL). Si lo analizamos por genotipo de LIPC, el 47% del grupo con genotipo CC estuvo por arriba del rango normal y el 42% de los pacientes con genotipo CT estuvo por arriba del rango normal. El paciente con genotipo TT presentó niveles normales de triglicéridos (128 mg/dL). Ningún paciente presentó niveles por debajo del rango normal de triglicéridos.

4.5. Comparación del promedio de lípidos séricos entre grupos

Al comparar los promedios del perfil de lípidos entre grupos encontramos una diferencia para HDL entre el grupo CC (43.53 mg/dL) y el grupo CT (33.79 mg/dL) de 9.74 mg/dL ($p = 0.09$). Para LDL la diferencia del promedio entre el grupo CC (114.18 mg/dL) y el grupo CT (112.66 mg/dL) fue de 1.52 mg/dL ($p=0.73$), para colesterol la diferencia del promedio entre el grupo CC (176.24 mg/dL) y el grupo CT (167.89 mg/dL) fue de 8.35 mg/dL ($p=0.96$) y para triglicéridos la diferencia del promedio entre el grupo CC (160.41 mg/dL) y el grupo CT (159.53 mg/dL) fue de 0.96 mg/dL ($p=0.85$).

4.6. Riesgo de dislipidemia en función del genotipo.

Analizamos el riesgo de presentar algún tipo de dislipidemia en función del genotipo CC y CT como se muestra en la siguiente tabla. Encontramos una razón de momios de 2.85 para HDL y 5.36 para triglicéridos, sin ser estadísticamente significativos.

Riesgo de Dislipidemia en Función del Genotipo

	Genotipo LIPC: rs10468017		Razón de Momios (Intervalo de confianza 95%)	Valor p
	CC N= 17 N (%)	CT N= 12 N (%)		
Lípidos séricos				
HDL (mg/dL)				
↓	7(41)	8(67)	2.85(0.49 -18.03)	p = 0.264
↑	10(59)	4(34)		
LDL (mg/dL)				
↓	9(53)	6(50)	0.88(0.16 - 4.96)	p = 1
↑	8(47)	6(50)		
Colesterol (mg/dL)				
↓	6(35)	5(42)	1.31(0.22 - 7.63)	p = 1
↑	11(65)	7(58)		
Triglicéridos (mg/dL)				
↓	2(12)	5(42)	5.36(0.63 - 65.33)	p = .06
↑	15(88)	7(58)		

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte en analizar el polimorfismo del gen de la lipasa hepática en población mexicana, así como su relación con lípidos séricos y Degeneración Macular Relacionada con la Edad.

Basados en el reciente descubrimiento de la asociación del polimorfismo rs10468017 en la región promotora de este gen y las diferentes hipótesis en cuanto al papel que juegan los lípidos séricos en la fisiopatología de la Degeneración Macular Relacionada con la Edad, decidimos explorar la presencia del polimorfismo en pacientes con estadios avanzados de Degeneración Macular Relacionada con la Edad, así como su relación lípidos séricos.

La Lipasa Hepática es una enzima de síntesis y localización principalmente hepática. Como hidrolasa de triglicéridos y fosfolipasa interviene en la transformación de la lipoproteína de densidad intermedia (IDL) en lipoproteína de baja densidad (LDL) y en el catabolismo de la lipoproteína de alta densidad (HDL). Además actúa como ligando entre las lipoproteínas y distintos receptores de la superficie celular, en el catabolismo de las lipoproteínas. Estudios previos han demostrado que el gen de la lipasa hepática está asociado a síndrome metabólico, aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares.

Nuestros resultados demostraron que el genotipo CC fue el más frecuente en pacientes con DMRE avanzada, seguido del genotipo CT y finalmente el menos frecuente fue el TT. Esta distribución era la esperada dado que el alelo C es el nativo y es la que se ha reportado en otras poblaciones.⁴² Esto es interesante, ya que se ha reportado que el alelo T confiere menor riesgo para DMRE, lo que sugiere que es por esto que en pacientes con la enfermedad fue el menos frecuente. Además diferentes estudios han demostrado que el alelo T del gen LIPC está asociado a una disminución en la actividad de la lipasa hepática, la cual actúa en los fosfolípidos del colesterol HDL y de los triglicéridos, lo que lleva a un

aumento en los niveles de HDL.⁵² En nuestro trabajo no encontramos que los pacientes con el alelo T tuvieran niveles más altos en el colesterol HDL en comparación a los pacientes con el genotipo CC; tal vez al incrementar la muestra de pacientes podríamos encontrar una diferencia significativa.

Cabe destacar que la única paciente que presentó el genotipo TT tuvo un perfil de lípidos normal con HDL incrementado y estadio de DMRE 3.

No encontramos diferencias en el perfil de lípidos entre los genotipos, esto se puede deber a que el tamaño de la muestra es insuficiente o podría ser que este polimorfismo este asociado DMRE de forma independiente al perfil de lípidos y que el mecanismo por el cual el genotipo TT del polimorfismo *rs1046817* del gen de LIPC confiera menor riesgo de DMRE avanzada sea independiente a los lípidos séricos y sea a través de un efecto directo sobre proteínas de retina como se ha sugerido en otros estudios.^{31, 37} El fenómeno principal en la progresión de la DMRE es el acúmulo de detritus celulares, proteínas y lípidos en la membrana de Bruch, resultando en hipoxia celular y la producción consecuente de moléculas angiogénicas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que promueve el crecimiento de vasos sanguíneos aberrantes.⁵⁴ Adicionalmente, el estrés oxidativo en el ojo puede causar oxidación de fosfolípidos. Estos productos de oxidación son pro-inflamatorios y pueden llevar a la apoptosis del EPR, producción de VEGF y angiogénesis. Debido a que LIPC es una enzima importante en el metabolismo de lípidos, y se ha demostrado que está relacionada al acúmulo de drusas y progresión de drusas grandes a DMRE avanzada, puede modular el riesgo de DMRE, al afectar la homeostasis de los lípidos, y el acumulo de biomoléculas dañinas en el ojo

Este estudio confirma que el polimorfismo más frecuente es el CC, seguido de CT y finalmente el menos frecuente es el TT en pacientes con DMRE en nuestra población. Es necesario analizar este polimorfismo en un grupo de sujetos sanos para poder determinar diferencias con sujetos no afectados. Además es necesario incrementar la muestra de pacientes con un diseño de estudio de casos y

controles para poder determinar si existe asociación entre el polimorfismo con los lípidos séricos y la DMRE.

La siguiente fase de nuestro estudio será realizar una comparación con controles sanos para determinar si realmente el genotipo TT es menos frecuente en pacientes sanos en comparación a pacientes con DMRE e incrementar la muestra para poder establecer si existe una asociación del polimorfismo *rs10468017* del gen LIPC con DMRE en base a un análisis con regresión logística.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que analiza el gen *LIPC* en población mexicana en pacientes con DMRE. Aunque no hubo diferencias en el perfil de lípidos según el genotipo, sugiere que el genotipo TT confiere menor riesgo de DMRE avanzada y justifica un estudio con mayor número de pacientes y con un diseño de casos y controles para poder establecer esta asociación que ya ha sido demostrada en otras poblaciones. Ya se ha demostrado asociación entre factores de riesgo cardiovasculares con la DMRE, los cuales son de alta prevalencia en nuestra población por lo que la relación entre los lípidos y la DMRE, pudiera ser más importante en mexicanos en comparación a otras poblaciones. Se requiere más investigación para dilucidar los mecanismos específicos entre las lipoproteínas y la patogénesis y progresión de la DMRE que aclarará el papel de *LIPC* en DMRE y podrá llevar a nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de la DMRE.

PERSPECTIVAS

Se ha logrado un gran progreso en el conocimiento de los factores genéticos en la DMRE con > del 50% de la heredabilidad explicada por variantes genéticas ya identificadas. Dentro de las enfermedades multifactoriales, la DMRE es única en el sentido que una gran proporción de la base genética de la enfermedad es explicada por relativamente un pequeño número de variantes. Se requiere de un análisis combinado de la información de los múltiples estudios de asociación del genoma completo (meta-análisis) para poder determinar de forma sistemática variantes genéticas de riesgo leve y de riesgo moderado. Los loci de susceptibilidad para DMRE hasta ahora identificados están permitiendo tener mejor conocimiento de la fisiopatología de la DMRE, sin embargo estos resultados deben ser interpretados con precaución porque los alelos asociados no son responsables de causar la enfermedad. Estas variantes alélicas también se encuentran en la población libre de la enfermedad o control, sin embargo su frecuencia está significativamente alterada en pacientes con DMRE. Además, los genes asociados a DMRE pueden interactuar con otros genes o factores no genéticos para producir diferentes fenotipos clínicos. El marcador asociado puede ser el reflejo del efecto acumulativo de múltiples alelos causales de baja frecuencia, por lo que se requiere la secuenciación de regiones cromosómicas más grandes para identificar todas las variantes patogénicas. También se necesitará la caracterización funcional de estos genes para determinar su relevancia en la fisiopatología de la DMRE y que se pueda reflejar en mejores tratamientos. Además, la identificación temprana de los riesgos genéticos se podría traducir en regímenes preventivos más eficaces e intervenciones. Actualmente ya se ofrecen pruebas genéticas basadas en el riesgo relativo asociado con las variantes más comunes de la DMRE, sin embargo no existen acciones preventivas eficientes aunque podamos identificar a los sujetos en riesgo. Por otra parte, a través de la farmacogenómica se podrá lograr un mejor

pronóstico de resultado del tratamiento que se traducirá en menores efectos secundarios y beneficios en la calidad de vida de los pacientes.

Con la reciente rápida progresión de la investigación, el futuro pinta prometedor para los pacientes con DMRE y para los científicos y clínicos involucrados en estos estudios. Se requiere de un modelo de integración genómico-funcional para conocer mejor la fisiopatología de la DMRE. El estudio de los mecanismos que regular la expresión de los genes y un mayor interés en las modificaciones epigenéticas en retinas normales y con DMRE podrán revelar nuevo conocimiento en el futuro cercano.

El riesgo genético y la frecuencia de los polimorfismos genéticos asociados difieren entre grupos étnicos, es por esto que es fundamental realizar replicación de estudios genéticos de asociación para determinar la magnitud del efecto de los alelos asociados a la enfermedad. Continuaremos esta línea de investigación en nuestra población para lograr un mejor entendimiento de la genética de la DMRE y de los mecanismos de la enfermedad podrá ofrecer nuevos tratamiento, mejorar la predicción del riesgo y severidad de la enfermedad, posibilidades de prevención y eventualmente terapia personalizada y manejo de esta enfermedad devastadora.

REFERENCIAS

1. R. Klein, C.-F., et al. "Prevalence of age-related macular degeneration in the US population," *Archives of Ophthalmology* vol.129, no. 1, pp. 75–80, 2011
2. W. R. Green and C. Enger, "Age-related macular degeneration histopathologic studies: the 1992 Lorenz E. Zimmerman lecture," *Ophthalmology* ,vol.100,no.10, pp.1519–1535,1993
3. W. R. Green, "Histopathology of age-related macular degeneration," *Molecular vision* vol.5,p.27,1999.
4. K.M.Gehrs,D.H.Anderson,L.V.Johnson,andG.S.Hageman, "Age-related macular degeneration—emerging pathogenetic and therapeutic concepts," *Annals of Medicine* ,vol.38,no.7, pp. 450–471, 2006
5. S.Sarks,S. Cherepanoff, M.Killingsworth,andJ.Sarks,"Relationship of basal laminar deposit and membraneous debris to the clinical presentationofearlyage-related maculardegeneration," *InvestigativeOphthalmologyandVisualScience* ,vol.48,no.3, pp. 968–977, 2007.
6. H. E. Grossniklaus and W. R. Green, "Choroidal neovascularization," *American Journal of Ophthalmology* ,vol.137,no.3,pp. 496–503, 2004
7. C. Campa, C. Costagliola, C. Incorvaia et al., "Inflammatory mediators and angiogenic factors in choroidal neovascularization: pathogenetic interactions and therapeutic implications," *Mediators of Inflammation* ,vol.2010,ArticleID546826,14 pages, 2010.
8. H.R.Coleman,C.-C.Chan,F.L.FerrisIII,andE.Y.Chew,"Age- related macular degeneration," *TheLancet* ,vol.372,no.9652, pp. 1835–1845, 2008
9. Seddon JM, et al. Evaluation of the Clinical Age-Related Maculopathy Staging system. *Ophthalmology* 2006;113:260-6
10. U. Chakravarthy, T. Y. Wong, A. Fletcher et al., "Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis," *BMC Ophthalmology* ,vol.10,no.1, article 31, 2010
11. H. Shahid, J. C. Khan, V. Cipriani et al., "Age-related macular degeneration: the importance of family history as a risk factor," *British Journal of Ophthalmology* ,vol.96,no.3,pp.427–431, 2012.

12. C.C.Klaver,R.C.Wolfs,J.J.Assink,C.M.vanDuijn, A.Hofman,andP.T.deJong,“Geneticriskofage-related maculopathy: population-based familial aggregation study,” *Archives of Ophthalmology* ,vol.116,no.12,pp.1646–1651,1998
13. B. E. Klein, R. Klein, K. E. Lee, E. L. Moore, and L. Danforth, “Risk of incident age-related eye diseases in people with an affected sibling: the Beaver Dam eye study,” *American Journal of Epidemiology* ,vol.154,no.3,pp.207–211,2001
14. W. Smith and P. Mitchell, “Family history and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study,” *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* ,vol.26,no.3,pp.203– 206, 1998.
15. M. M. Liu, C. C. Chan, and J. Tuo, “Genetic mechanisms and age-related macular degeneration: common variants, rare variants, copy number variations, epigenetics, and mitochondrial genetics,” *Human Genomics* ,vol.6,article13,2012.
16. A.Thakkestian,M.McEvoy,U.Chakravarthyetal.,“The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis,”*American Journal of Epi-demiology* ,vol.176,no.5,pp.361–372,201
17. A. Fagerness, J. B. Maller, B. M. Neale, R. C. Reynolds, M. J. Daly, and J. M. Seddon, “Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD,” *European Journal of Human Genetics* ,vol.17,no.1,pp.100–104,2009
18. Haines JL, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308:419–421.
19. Gold B, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38: 458–462.
20. Maller JB, et al. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2007;39:1200–1201.
21. Fagerness JA, et al. Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:100–104.
22. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006; 38:1173-7.
23. Conley YP, Jakobsdottir J, Mah T, Weeks DE, Klein R, Kuller L, Ferrell RE, Gorin MB. CFH, ELOVL4, PLEKHA1 and LOC387715 genes and susceptibility to

age-related maculopathy: AREDS and CHS cohorts and meta-analyses. *Hum Mol Genet* 2006; 15:3206-18.

24. Deangelis MM, Silveira AC, Carr EA, Kim IK. Genetics of age-related macular degeneration: current concepts, future directions. *Semin Ophthalmol* 2011; 26:77-93.

25. Buentello-Volante B, Rodriguez-Ruiz G, Miranda-Duarte A, et al. Susceptibility to advanced 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

26. Contreras AV, Zenteno-Ruiz JC, Fernandez-Lopez JC, et al. CFH haplotypes and ARMS2, C2, C3, and CFB alleles show association with susceptibility to age-related macular degeneration in Mexicans. *Molecular Vision*. 2014 Jan 14;20:105-16.

27. Neale B, et al. Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (*LIPC*). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 April 20; 107(16): 7395–7400

28. Hasham SN, Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2006;372:179–183.

29. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009;41:56–65.

30 van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, et al. Cholesterol and age-related macular degeneration: is there a link? *Am J Ophthalmol* 2003;137:750 –2.

31. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Cruickshanks KJ. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2003;110:1273– 80.

32. Hyman L, Schachat AP, He Q, Leske C, Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2000;118:351– 8.

33. Tomany SC, Wang JJ, van Leeuwen R, et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* 2004;111:1280 –7.

34. Hogg RE, Woodside JV, Gilchrist SE, et al. Cardiovascular disease and hypertension are strong risk factors for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 2008;115:1046 –52.

35. Abalain JH, Carre JL, Leglise D, et al. Is age-related macular degeneration associated with serum lipoprotein and lipoparticle levels? *Clin Chim Acta* 2002;326:97–104.
36. Nowak M, Swietochowska E, Marek B, et al. Changes in lipid metabolism in women with age-related macular degeneration. *Clin Exp Med* 2005;4:183–7.
37. Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1701–8.
38. Seddon JM, Cote J, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Arch Ophthalmol* 2003;121: 1728–37.
39. Seddon JM, Cote J, Davis N, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Arch Ophthalmol* 2003;121:785–92.
40. Tserentsoodol N, et al. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis*. 2006;12:1319–1333
41. Seddon J, et al. Associations of smoking, body mass index, dietary lutein, and the LIPC gene variant rs10468017 with advanced age-related macular degeneration. *Mol. Vis*. 2010; 16:2412-2424
42. Reynolds R, et al. Serum Lipid Biomarkers and Hepatic Lipase Gene Associations with Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol*.2010;117: 1989-1995.
43. Gorodezky C, Alaez C, Vazquez-Garcia MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Perez-Luque E, Muñoz L. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol* 2001; 62:979-91.
44. Seddon J, Reynolds R, Maller J, et al. Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2044-2053.
45. Seddon JM, Reynolds R, Yu Y. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using demographic, environmental, genetic, and ocular factors. *Ophthalmology* 2011;118(11):2203-2211.
46. Maller J, George S, Purcell S, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006;38:1055-1059.

47. Yu Y, Reynolds R, Rosner B, Daly MJ, Seddon JM. Prospective assessment of genetic effects on progression to different stages of age-related macular degeneration using multi-state Markov models. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(3):1548-1556.
48. Tserentsoodol N, Gordiyenko NV, Pascual I, et al. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis* 2006;12: 1319–33.
49. Chasman DI, Pare G, Zee RY, et al. Genetic loci associated with plasma concentration of low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, apolipoprotein A1, and apolipoprotein B among 6382 white women in genome-wide analysis with replication. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1:21–30.
50. Tan JS, Mitchell P, Smith W, Wang JJ. Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2007;114:1143–50.
51. van Leeuwen R, Ikram MK, Vingerling JR, et al. Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3771–7.
52. Verdier C, Ruidavets JB, Bongard V, et al. Association of hepatic lipase -514T allele with coronary artery disease and ankle-brachial index, dependence on the lipoprotein phenotype: the GENES study. *PLoS One*. 2013 Jul 9;8(7):e67805. doi: 10.1371/journal.pone.0067805.
53. Hindorff LA, Lemaitre RN, Smith NL, Bis JC, Marcianti KD, Rice KM, et al. Common genetic variation in six lipid-related and statin-related genes, statin use and risk of incident nonfatal myocardial infarction and stroke. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18 (8:677–682).
54. Starita C, Hussain AA, Patmore A, Marshall J. Localization of the site of major resistance to fluid transport in Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38

P[lœá^Ü^&[^&&5} Á^Öæ] • /~~~~~M^&@K'''''' Á

Nombre:_____ Edad:____ Sexo:____

Peso:_____ Talla:_____ Tabaquismo:_____

Biomarcadores lipídicos

Colesterol Total: Normal o Alto

HDL: Bajo o Alto

LDL: Normal o Alto

Triglicericos: Normal o Alto

Polimorfismo: CC, CT, TT

TEXTO INFORMATIVO

Estimado paciente:

Quiero informarle que en la unidad de investigación, se está llevando a cabo el estudio denominado **“CAMBIOS EN EL PERFIL LIPIDICO Y SU RELACIÓN CON POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA (LIPC) EN INDIVIDUOS CON DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD”**.

El objetivo de este estudio es conocer la predisposición genética y su relación con niveles anormales de lípidos en sangre en individuos con Degeneración Macular Relacionada a la Edad.

El estudio consiste en tomar una muestra de sangre del brazo del paciente a través de una punción de vena periférica (piquete en el pliegue del codo, antebrazo o mano principalmente). Este estudio es gratuito.

Con la muestra sanguínea se realizará medición de los niveles de lípidos (HDL, LDL, Colesterol, Triglicéridos) así como una análisis genético.

Quiero informarle que la toma de muestra no afecta ninguna estructura y causa daño mínimo que si lo hubiera sería la aparición de una coloración violácea (moretón) en el sitio de punción, el cual desaparecerá en los días subsiguientes sin dejar ninguna otra complicación.

Queremos aprovechar la oportunidad para invitarle a participar en este estudio, aclarándole que en caso de que no acepte participar, esta negativa no tendrá ninguna repercusión en la atención de usted en este Instituto, además que tiene el derecho de retirar su participación en el momento en que lo desee, sin que al retirarse del estudio repercuta de manera negativa en la atención que está recibiendo. La información que se obtenga será estrictamente confidencial y será utilizada sólo para fines de la investigación. Los resultados se le darán a conocer a usted en caso que así lo desee.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con el Dr. Sergio Groman Lupa al 5442-1700 ext. 3212 o personalmente en la Unidad de Investigación de este Instituto.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO _____

NOMBRE DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

Declaro que he leído la información correspondiente, que se me han aclarado las dudas y que voluntariamente estoy de acuerdo en donar una muestra sanguínea para ser usada en el estudio **“CAMBIOS EN EL PERFIL LIPIDICO Y SU RELACIÓN CON POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA (LIPC) EN INDIVIDUOS CON DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD”** cuyos objetivos, procedimientos, beneficios y riesgos se me han explicado previamente.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han aclarado cualquier duda y contestado cualquier pregunta y que me han ofrecido explicar cualquier otra inquietud que, al momento de firmar la presente no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha informado que mi participación en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me brinda y que toda la información que se obtenga sobre mi persona será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Firmo la presente junto al investigador que me informó o mi médico tratante y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Texto informativo para obtener mi autorización.

Firma o huella digital del paciente o representante legal

Nombre, Dirección y Firma de Testigo 1, mi relación con el paciente es de:

Nombre, Dirección y Firma de Testigo 2, mi relación con el paciente es de:

Nombre y Firma del Médico Tratante o Investigador Responsable _____

México D.F., a _____ de _____ de 200__.