



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
FUNDACIÓN DE ASISTENCIA PRIVADA CONDE DE VALENCIANA
I.A.P.

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO
LIS155GLN DEL COMPONENTE 3 DEL COMPLEMENTO (C3) Y
RIESGO PARA DESARROLLAR DEGENERACIÓN MACULAR
RELACIONADA CON LA EDAD EN POBLACIÓN MEXICANA**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN

OFTALMOLOGÍA

AUTOR

DR. GERARDO LEDESMA GIL

DIRECTORES DE TESIS

**DR. FEDERICO GRAUE WIECHERS
DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ**

MÉXICO D. F. 2015



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.

Índice

Resumen.....	3
Antecedentes.....	4
Fisiología.....	5
Fisiopatología.....	5
DMRE temprana.....	6
DMRE avanzada.....	6
Progresión a DMRE tardía.....	8
Factores de riesgo en DMRE.....	8
Asociación genética.....	9
Variantes raras en DMRE.....	12
Polimorfismos en C3 y riesgo para DMRE.....	13
Justificación.....	14
Planteamiento del problema.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
Material y métodos.....	16
Diseño del estudio.....	16
Tamaño de la muestra.....	16
Evaluación clínica.....	16
Análisis estadístico.....	19
Estudios genéticos.....	19
Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica.....	19
Determinación de la concentración y pureza del DNA obtenido.....	20
Amplificación parcial por PCR del gen C3.....	20
Secuenciación automatizada de los productos de PCR.....	21
Consideraciones éticas.....	22
Resultados.....	23
Discusión.....	24
Conclusión.....	25
Bibliografía.....	26
Anexo 1.....	32

Resumen

La degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) es la principal causa de pérdida de la visión central irreversible en personas mayores de 50 años en los países desarrollados, afecta a casi el 10% de los mayores de 65 años y afecta a más del 25% de las personas de más 75 años de edad. Es una enfermedad de origen complejo en la que se han descrito tanto factores genéticos como ambientales, los cuales desempeñan un papel importante en su fisiopatología. Múltiples variantes de genes y factores de estilo de vida como el tabaquismo se han asociado con la enfermedad. Mientras que determinar la etiología específica de la enfermedad sigue siendo un reto importante, la información genética ha proporcionado oportunidades para la mejora de la evaluación de riesgos, diagnóstico molecular y pruebas clínicas de variantes genéticas, tratamiento y manejo. En 2 estudios originales recientemente publicados se identificó una variante en el gen C3 de complemento K155Q (frecuencia en casos = 1,06%; frecuencia en Controles = 0,39%, OR = 2,68), la cual confiere un mayor riesgo para desarrollar DMRE, probablemente a través de la disminución en la inhibición de C3 por el Factor H, que a su vez provoca una mayor activación de la vía alterna del complemento. La variante de riesgo para DMRE K155Q, recientemente identificada, no ha sido estudiada aún en poblaciones latinas. El nuestro es un estudio de asociación de casos y controles para identificar si el polimorfismo Q155K del C3 confiere riesgo para desarrollar DMRE en pacientes mexicanos.

El reclutamiento de los pacientes se realizó mediante los criterios de inclusión para el protocolo evaluando a cada paciente de manera individual, se recolectaron los datos clínicos y las de muestras de sangre para la extracción de DNA, se realizó una PCR inicial del gen C3 a partir de DNA genómico, posterior una purificación de DNA y secuenciación automática de la variación Lis155Gln. Se secuenciaron 106 pacientes con DMRE y 106 controles sanos. Encontrándose en ninguno de ellos la variante.

La variante Lis155Gln del gen C3 del complemento no se relaciona con la presencia de degeneración macular relacionada a la edad en la población mexicana.

Antecedentes

La retina humana sufre cambios como parte del curso natural del envejecimiento, lo que resulta en la aparición de depósitos de material acelular amarillento focal, llamados drusas entre el epitelio pigmentario de la retina y la membrana de Bruch (1).

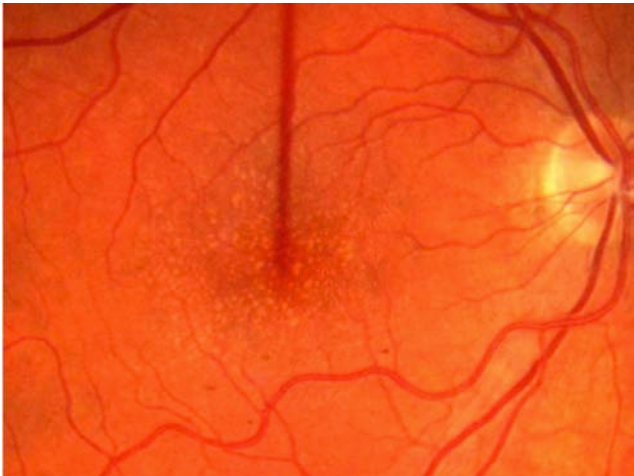


Imagen 1. Drusas en área macular.

Las drusas son clasificadas como pequeñas (<63 micras de diámetro con márgenes discretos), medio (63-124 micras) o grandes (>125 m con bordes indistintos). Las drusas son patognómicas de la DMRE, sin embargo cuando se presentan solas y pequeñas las probabilidades de desarrollar DMRE avanzada, son pocas (1). El desprendimiento focal del epitelio pigmentario de la retina (EPR), la angiogénesis entre la membrana de Bruch y la retina, y la atrofia de la retina externa son las lesiones que causan pérdida de la visión central en la DMRE avanzada. Los pacientes presentan un amplio espectro de características clínicas con base en el

tamaño de las drusas y las anomalías pigmentarias (hipopigmentación e hiperpigmentación) (2).

En el estudio “Age-Related Eye Disease Study (AREDS)” se desarrolló una escala de 5 puntos definiendo el riesgo para desarrollar DMRE avanzada (3).

Fisiología

Los conos y bastones son las células fotorreceptoras responsables de la fototransducción (proceso mediante el cual estímulos luminosos son transformados en impulsos nerviosos). Estos fotorreceptores están dispuestos de manera que hay una mayor densidad de conos en el centro de la mácula (fóvea), la cual va disminuyendo en la periferia a medida que la densidad de bastones aumenta.

El EPR se encuentra en estrecho contacto con los fotorreceptores. El EPR es responsable de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, el transporte de vitaminas, reducción de la dispersión de la luz, además de actuar como barrera selectiva entre la coroides y la retina (1). La membrana basal de las células epiteliales del pigmento de la retina forma la capa interior de la membrana de Bruch, que se compone también de una matriz extracelular especializada y de la membrana basal de la coriocapilar.

Fisiopatología

La fisiopatología es aun poco conocida. Sin embargo, la degeneración del EPR, relacionado con el estrés oxidativo, parece ser un componente crucial. Los cambios en la matriz extracelular de la membrana de Bruch y la formación de depósitos de lipofuscina son fundamentales para la progresión de la enfermedad. El engrosamiento progresivo de la membrana de Bruch reduce la capacidad del oxígeno para difundirse a través del epitelio pigmentario de la retina y los

fotorreceptores. La hipoxia provoca la liberación de factores de crecimiento y citosinas, que estimulan el crecimiento de nuevos vasos coroideos, entre el EPR y la retina, formando una membrana neovascular coroidea (2). Los nuevos vasos dejan escapar líquido y / o sangre, dando como resultado la distorsión y la reducción de la claridad de la visión central.

DMRE temprana

Se caracteriza por drusas, cambios pigmentarios y atrofia del EPR. El nivel de discapacidad visual asociada es variable. La angiografía con fluoresceína demuestra patrones irregulares del pigmento de la retina y atrofia (1).

Las drusas se identifican clínicamente como depósitos amarillos de lipofuscina, que están dentro de la membrana de Bruch. Varían en tamaño y forma.

DMRE avanzada

La atrofia geográfica ("seca") se presenta hasta en el 20% de los casos. Se manifiesta como zonas bien delimitadas de atrofia de más de dos diámetros de disco que permite la visualización directa de los vasos coroideos. La acumulación de lipofuscina en el epitelio pigmentario de la retina se cree que contribuye a los cambios atróficos. La pérdida de visión se produce una vez que la fovea se ve afectada. Para el seguimiento se utilizan las imágenes de autofluorescencia, que muestran diferentes patrones de anormalidad lo que permite conocer la progresión de la enfermedad (2).



Imagen 2. Atrofia geográfica.

La DMRE neovascular ("húmeda") se caracteriza por el desarrollo de la neovascularización coroidea llevando al desprendimiento del EPR. Dicho desprendimiento lleva a la metaplasia fibrosa y esta a su vez genera una cicatriz subretiniana llamada cicatriz disciforme. La angiografía con fluoresceína se debe realizar en todos los pacientes con DMRE con disminución de la agudeza visual ya que nos permite evidenciar la presencia de neovascularizaciones coroideas(2). También puede orientar las opciones de tratamiento.

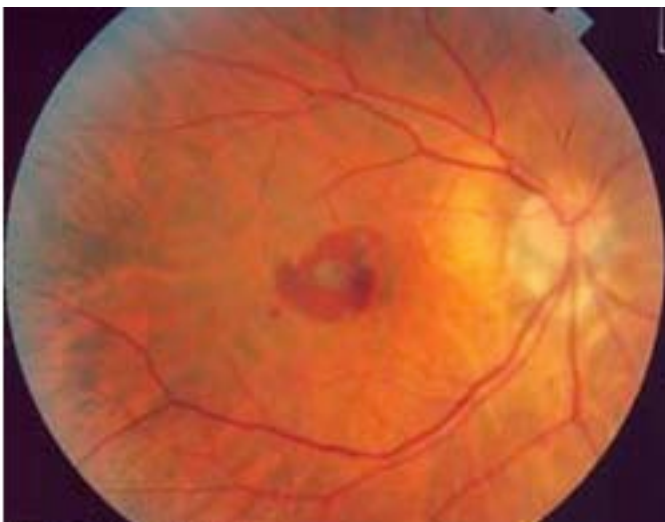


Imagen 3. Membrana neovascular.

La neovascularización coroidea se puede clasificar por angiografía, según el patrón de crecimiento de los vasos. La clásica se caracteriza por hiperfluorescencia temprana que es bien delimitada y puede tener un “patrón en encaje”.

La variedad oculta se caracteriza por hiperfluorescencia tardía que es mal definida. En estudios de investigación, la neovascularización coroidea se ha subdividido en mayormente clásica, en la que más de 50% de la lesión tiene las características de la neovascularización coroidea clásica. Mínimamente clásica, en la que menos del 50% de la lesión tiene las características de la neovascularización coroidea clásica; y oculta pura, en el que ningún componente clásico puede ser identificado(1).

Progresión a DMRE tardía

Gracias al estudio AREDS, se identificó que los cambios en la pigmentación y drusas grandes (> 250 micras) son los más importante para predecir la progresión a DMRE avanzada, se desarrolló una escala de puntuación clínica sencilla para predecir el riesgo de la progresión. 1 punto para cada ojo con drusas grandes. Para los pacientes con enfermedad tardía en un ojo, 2 puntos son para el ojo con la enfermedad avanzada y un 1 punto por cada una de las drusas o anomalías pigmentarias en el ojo contralateral. El riesgo a 5 años de progresión a DMRE avanzadas es del 0,5%, 3,0%, 12,0%, 25% y 50%, respectivamente, según la calificación de 0 a 4 (4).

Factores de riesgo en DMRE

La DMRE es una enfermedad multifactorial, por lo general causada por muchas variantes genéticas y también influenciado por factores ambientales, como la dieta y el tabaquismo (5, 6).

Las drusas grandes se asocian con un aumento del riesgo de progresión a DMRE avanzada. El

envejecimiento y el tabaco han demostrado ser los factores de riesgo ambientales más importantes, ya que el índice tabáquico (IT) se asocia directamente, por lo general duplicando el riesgo en comparación con los no fumadores (7) . Además, se ha visto una clara asociación entre la DMRE intermedia y los padecimientos cardiovasculares como la hipertensión arterial sistémica (HAS) y la hipertrigliceridemia (8, 9,11).

El estudio longitudinal multicéntrico de aterosclerosis de 10 años, incluyó cuatro grupos raciales/étnicos encontrado una prevalencia de DMRE de 2,4% en los afroamericanos , 4.2% en los hispanos, 4,6% en asiáticos en comparación con el 5,4% en los caucásicos (10) .

Asociación genética

A lo largo de los últimos años a través de estudios de agregación familiar y estudios en gemelos se han identificado múltiples factores genéticos diferentes en los loci: 1q25-31, 9p13, 9p24, 10q26, 15q21 y 17q25 (4).

Los estudios realizados en familias afectadas han mostrado que el riesgo relativo de un pariente de primer grado es de aproximadamente 6 a 12 veces mayor que el de la población en general y que algunas familias confieren mayor grado de riesgo (12).

Tanto en estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) como estudios de asociación general han aportado de manera más significativa en la identificación de loci asociados al riesgo de desarrollar DMRE, por lo que se han implicado genes tales como CFH (13-17), C3 (18, 19), C2-CFB (20), CFI (21), una región en el cromosoma 10 con HTRA1/LOC387715/ARMS2 (22-27), de la CETP (25), TIMP3 (25), CFG (26), VEGFA (27), COL10A1 (27), TNFRSF10A (28), y APOE (29-31) (Tabla 1) (1).

Genes asociados a DMRE
CFH
C3
C2-CFB
CFI
HTRA1
LOC387715
ARMS2
CETP
TIMP3
CFIG
VEGFA
COL10A1
TNFRSF10A
APOE

Tabla 1. Genes asociados a DMRE.

El ADM Gene Consortium Project compuesto por 18 grupos de investigación, comparó GWAS mas de 7.600 casos y mas de 30.000 controles y se replicación 32 SNPs involucrando más de 9200 casos y 8000 controles para lograr un análisis compuesto de mas de 16.900 casos de DMRE avanzada con controles pareados. Se confirmaron 12 loci antes reportados, y se identificaron seis nuevos loci. Este meta-análisis proporciona quizás las mejores estimaciones de razón de momios y la diferencia de género para las poblaciones asiáticas y europeas. El objetivo principal del meta-análisis fue el fortalecimiento de la evidencia a favor (o en contra) de la DMRE (32).

Se han identificado múltiples loci, lo que hace evidente la importancia de la heredabilidad en la DMRE. En un esfuerzo por identificar adicionales loci con menor riesgo para desarrollar la patología, los cuales no se logran detectar con los GWAS por diferentes causas con el tamaño de la muestra, los meta-análisis están tomando un importante papel para explicar la heredabilidad.

La población mexicana está compuesta principalmente por mestizos, que son personas con ascendencias amerindias, europeas y en menor medida africanos. Debido a la mezcla

étnica/racial, estas poblaciones son ideales para identificar variantes genéticas asociadas a enfermedades complejas como la DMRE (33).

Se han realizado escasos estudios de asociación entre la DMRE y variantes genéticas en pacientes mexicanos y latinos. El primer estudio de casos y controles, fue publicado en el 2012 analizando los alelos del factor de complemento H (CFH), el factor de complemento B (CFB), el factor de complemento 2 (C2) y el factor de complemento 3 (C3). En dicho estudio se identificaron diferencias significativas en la distribución alélica de casos y controles para las variantes Y402H del CFH ($p=1\times 10^{-5}$), A69S en ARMS ($p=4\times 10^{-7}$) y R32Q en CFB ($p=0.01$). Las razones de momios (OR) obtenidas para los alelos de riesgo de estas 3 variantes fueron 3.8 (2.4-5.9), 3.04 (2.2-4.3), y 2.5 (1.1-5.7), respectivamente. Los resultados apoyan que CFH, ARMS2 y CFB se asocian consistentemente con la enfermedad, incluso en los grupos étnicos con una compleja mezcla, como son los mestizos mexicanos (34).

Este estudio sirvió como antecedente para otras investigaciones analizando diferentes haplotipos de CFH y ARMS (35), en donde se resecuenciaron todos los exones de CFH en 96 sujetos mexicanos (48 casos de DMRE y 48 controles), encontrando siete polimorfismos previamente asociados a DMRE (SNP; rs10490924, rs4151667, rs547154, rs1047286, rs2230199, rs1410996, y rs1061170) se investigaron en 754 pacientes mestizos sin relación familiar: 273 pacientes con DMRE avanzada, 201 controles sanos, y 280 controles de población. Se seleccionaron siete SNPs que han sido fuertemente asociados con la DMRE en varios grupos étnicos, incluyendo dos en el gen CFH (rs1061170 [Tyr402His] y rs1410996), dos en C3 (rs2230199 [Arg80Gly] y rs1047286 [Pro292Leu]), uno en C2 (rs547154 [IVS10]), uno en CFB (rs4151667 [Leu9His]), y uno en ARMS2 (rs10490924 [Ala69Ser]). Los resultados de este estudio publicado en 2014 también apoyaron la participación de variantes de CFH, ARMS, CFB, C2 y C3 en el desarrollo de DMRE en mexicanos y población latina (35).

La identificación de múltiples loci ha permitido el descubrimiento de varias vías biológicas importantes en la patogénesis de la DMRE, tales como la vía del complemento, el metabolismo colesterol y lípidos, la vía de matriz extracelular/colágeno, vía del estrés oxidativo y la angiogénesis (36).

Variantes raras en DMRE

Los esfuerzos más recientes en la investigación de la genética de DMRE están enfocados en las variantes raras que se relacionan con la patogénesis de la enfermedad (37). Por ejemplo, Boon et al. (38) encontraron un gran número de mutaciones en PRPH2 en un grupo de pacientes en Holanda con distrofia coroidea areolar central que puede ser confundido con DMRE.

El concepto de que las variantes raras pueden contribuir a la heredabilidad está bien establecido. En 2010, una simulación por Sobrin et al. (39) demostró que los SNPs más comunes son insuficientes para explicar el desarrollo DMRE severa y que existen mutaciones raras que juegan un papel más importante.

Una variante rara que contribuye al riesgo es el haplotipo H5 CFH, que incluye una mutación que conduce a un cambio de R1210C y a un CFH deficiente (40). Este ejemplo demuestra que tanto las variaciones en el mismo gen, ya sean comunes o raras, modulan el riesgo de DMRE.

Algunas mutaciones sin sentido en el gen de la Flibulina-5 se han encontrado en 1.7% de los pacientes estadounidenses con DMRE (41). Variantes raras en hemicentina-1 (Fibulina-6), que codifica una proteína de la matriz extracelular, también se han asociado a riesgo de la enfermedad (42).

Polimorfismos en C3 y riesgo para DMRE

En 2 estudios originales recientemente publicados (43, 44) se identificó una variante en el gen C3 de complemento. Esta variante consiste en el cambio de una lisina a una glutamina en la posición 155 de la proteína C3 (K155Q) y tuvo una frecuencia en casos de 1,06%; comparada con una frecuencia en Controles de 0,39%, OR = 2,68. Dicha variante confiere un mayor riesgo para desarrollar DMRE, probablemente a través de la disminución en la inhibición de C3 por el Factor H, que a su vez provoca una mayor activación de la vía alterna del complemento.

Para confirmar la variación de K155Q, se tomó una muestra total de 4,526 casos y 3.787 controles y, de nuevo, se observa fuerte asociación (Controles = 0,5%; casos = 1,3%, $p = 7,7 \times 10^{-7}$). Además en 471 familias con múltiples casos de DMRE se identificaron 18 familias nucleares que también portaban la variante K155Q.

La evidencia más fuerte de esta variante se reportó en el trabajo deCODE Genetics (44), donde estudiaron 1,143 casos de degeneración macular en islandeses y 51.435 controles islandeses obteniéndose una razón de momios de 3.45.

En el estudio AREDS II (45) se estudiaron 1606 con DMRE reportando la variante con una frecuencia 1,77%, similar al estudio (42) con una frecuencia de 0,30% en los controles y de 0.50% en los casos.

Se ha sugerido que las posibles consecuencias funcionales de la variante K155Q incluyen afectación de la unión de factor H del complemento a C3b. El factor H inhibe C3b y limita las respuestas inmunes mediadas por la vía alterna del complemento. La hipótesis es que K155Q

afecta la unión del primer dominio de macro-globular de C3 a CFH y por lo tanto interfiere con la inactivación de la vía, aunque esto debe ser confirmado.

La variante de K155Q es rara y se asocia con casi 3 veces mayor riesgo de desarrollar DMRE. Junto con la variante rara de CFH R1210C y la variante de común C3 R102G, pueden reducir la unión de CFH a C3b, afectando la capacidad del factor H para inactivar la vía alterna del complemento. La variante de riesgo para DMRE K155Q, recientemente identificada, no ha sido estudiada aún en poblaciones latinas.

Justificación

La DMRE tiene un impacto profundo en la calidad de vida de los pacientes, ya que los afectados llegan a ser incapaces de leer, escribir, caminar o conducir debido a la pérdida de la visión central. Debido a la falta de tratamientos efectivos para pacientes con etapas avanzadas de la enfermedad, las investigaciones deben enfocarse también a la identificación de las causas de esta enfermedad para prevenirla o retrasar su progresión. Este proyecto tiene como objetivo identificar si existe asociación entre una variante recientemente descrita en el gen del componente 3 del complemento y el riesgo de desarrollar DMRE en sujetos mexicanos. La identificación de tal asociación permitiría la instauración de una prueba sencilla, accesible y confiable que permita identificar, de manera oportuna, a sujetos con riesgo genético elevado para desarrollar la enfermedad y permitiría establecer medidas para retrasar la aparición de la enfermedad, aplicar tratamientos tempranos y prevenir complicaciones graves como la ceguera.

Planteamiento del problema

La fisiopatología específica de la DMRE, no se conoce por completo, de ahí la necesidad de buscar factores de riesgo relacionados con la patología. Se han descrito variantes genéticas que

aumenta el riesgo. La variante Lis155Gln recientemente descrita es un factor de riesgo descrita en una población diferente a la mexicana. Por lo que es una interrogante si la variante Lis155Gln se asocia a riesgo para desarrollar DMRE en la población mexicana.

Hipótesis

El polimorfismo Lis155Gln del componente 3 del complemento aumenta el riesgo para desarrollar DMRE en población mexicana.

Objetivo general

Identificar si existe asociación entre la variante Lis155Gln del C3 y riesgo para desarrollar DMRE en población mexicana.

Objetivos específicos

Identificar la frecuencia de la variantes polimórficas Lis155Gln del componente 3 del complemento (C3) en sujetos mexicanos con degeneración macular relacionada con la edad y compararla con la frecuencia en un grupo de pacientes sanos pareados por edad y sexo.

- Establecer la frecuencia de estas variantes en un grupo de enfermos y compararla con un grupo de pacientes sanos pareados por edad y sexo.
- Establecer índices de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en base a la presencia o ausencia de determinadas variantes génicas en nuestra población.

Material y métodos

Diseño del estudio

El diseño del estudio es de tipo transversal y analítico, ya que se realizó una sola medición (genotipificación) en sujetos con criterios clínicos de DMRE. Se compararon las frecuencias de la variante genética en los individuos enfermos (casos), y los individuos sanos (controles). A partir de la frecuencia observada en cada uno de los grupos en estudio se realizó un análisis estadístico que permita identificar si existe asociación.

Tamaño de la muestra

El cálculo de la muestra se realizó con el programa OpenEpi (<http://www.openepi.com/>) para un estudio de casos y controles no pareados y con base a los siguientes supuestos: Nivel de confianza del 95%, Poder del 80%, relación 1:1 de casos/controles, y razón de momios de al menos 2.3, basados en un OR de 2.68 obtenido en un estudio reciente (44). del polimorfismo Lis155Gln. El cálculo fue de 94 sujetos en cada grupo, pero se decidió aumentar el tamaño de la muestra para hacerla más representativa a 106 casos y 106 controles.

Evaluación clínica

El estudio se llevó a cabo en el Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”. Se incluyeron 106 pacientes Mexicanos mestizos (por lo menos 2 generaciones de ascendentes nacidos en México) con criterios diagnósticos estrictos para DMRE. Los criterios de inclusión de los pacientes fueron:

Criterios de Inclusión

- Individuos de uno u otro género.
- Mayores de 60 años de edad.

- Con degeneración macular relacionada con la edad grado 4 o 5* bilateral o degeneración macular relacionada con la edad grado 4 o 5* unilateral con cualquier tipo de drusas en el ojo contralateral.
- Con o sin antecedentes familiares de degeneración macular relacionada con la edad.
- Sin antecedentes de cirugía vítreo-retiniana o de enfermedades retinianas asociadas.
- Sin enfermedades oculares que condicionen opacidad de medios e impidan la estatificación de la degeneración macular relacionada con la edad (alteraciones corneales, cataratas, etc.).

*De acuerdo al sistema CARMS (*Clinical Age-Related Maculopathy Staging System*). (Se elige el ojo con mayor grado de afección.) Grado 4= atrofia geográfica; grado 5= neovascularización coroidea.

Crterios de Exclusión

- Con algún dato de patología oftalmológica a cualquier nivel que dificulte la visualización de la retina.
- Con retinopatía diabética o de cualquier origen diferente a DMRE.
- Con antecedentes de cirugía oftalmológica de catarata o retina.
- Que no acepten firmar el consentimiento informado.

Crterios de Eliminación

- Pacientes que retiren el consentimiento informado.
- Pacientes cuya muestra de DNA sea insuficiente para la genotipificación y no puedan ser ubicados para la toma de una nueva muestra de sangre.

Aunque no se trata de un estudio de causalidad, se consideró al polimorfismo Lis155Gln la variable independiente y a la DMRE como la variable dependiente o de desenlace.

Controles

- Sujetos de uno u otro género.
- De 65 años de edad o mayores.
- Sin degeneración macular relacionada con la edad y sin presencia de drusas maculares mayores de 65 micras en ningún ojo.

La identificación de los casos se realizó por al menos un especialista retinólogo del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”. Además de los estudios confirmatorios de DMRE, en cada paciente se realizó un cuestionario para identificar factores familiares o ambientales que pudieran asociarse al desarrollo de la enfermedad, incluyendo antecedente de familiares con DMRE, entidad de origen, entidad de residencia, actividades laborales presente y pasadas, tabaquismo, enfermedades crónicas concomitantes (diabetes mellitus, obesidad, hipertensión arterial, enfermedades vasculares), uso crónico o reciente de medicación ocular o extraocular, entre otros.

Una vez identificado el sujeto que cumpliera con los criterios de inclusión, se le informó detalladamente de las características del estudio y otorgó su consentimiento informado para participar en el estudio mediante la firma de una Carta de Información y Consentimiento (Anexo 1). Del mismo modo, los sujetos incluidos como controles debieron leer y firmar la carta de consentimiento para poder ser incluidos en el estudio.

Análisis estadístico

El equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de controles se realizaría mediante análisis por chi cuadrado. Se considerarían significativos los valores de P menores a 0.05. Valores de OR superiores o inferiores a 1 se considerarían como evidencia de riesgo aumentado o disminuido, respectivamente. Estos parámetros son utilizados de manera rutinaria en estudios de asociación genética de pequeña-mediana escala como el que se propone en esta investigación.

Estudios genéticos

Después de la firma del consentimiento Informado, se extrajo a cada paciente una muestra de 2 mL de sangre por medio de punción venosa. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente para proceder a la extracción del DNA genómico dentro de las siguientes 12 horas de la toma.

Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica

Se colocaron 500 microlitros de sangre total en un microtubo eppendorf de 2 mL con 1 mL del reactivo DNAzol BD (Invitrogen, Carlsbad, E.U.A) y se agregaron 400 microlitros de alcohol isopropílico agitando vigorosamente el tubo durante 1 minuto. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para después centrifugarla a 6000 rpm durante 6 minutos, se añadieron 500 microlitros de DNAzol BD al botón residual y se agitó hasta disolver el botón. De nuevo, la muestra se centrifugó 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 6000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de alcohol con una micropipeta. Finalmente, se agregaron al botón 200 microlitros 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 pureza del DNA obtenido

Se determinó la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitió evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción protéica. Se consideraron adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se realizó electroforesis en geles de agarosa de cada muestra de DNA obtenida para verificar que no exista degradación de éste ácido nucleico. La concentración de DNA obtenida se determinó por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/ microlitro.

Amplificación parcial por PCR del gen C3

A partir del DNA de los sujetos afectados y de los controles se realizó amplificación por PCR del fragmento del gen C3 que incluye la posición nucleotídica polimórfica (codón 155) relacionada con DMRE. Se utilizaron pares de oligonucleótidos específicos y secuenciación nucleotídica directa automatizada, dependiendo de cada caso.

Sentido (Fw) 5' - cac agt tct cta tcg gat ct -3'

Antisentido (Rv) 5' - ca agg agt cct gct tga ccg -3'

El tamaño del amplificado corresponde a 122 pb.

Cada reacción de amplificación de PCR tuvo un volumen final de 25 microlitros y contuvo buffer para PCR 1X, de 50-100 ngs de DNA genómico, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTP's, 2.5 unidades de enzima TaqPolimerasa, 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido), MgCl₂ entre 1 y 3 mM y agua bidestilada c.b.p. 25 microlitros. Se utilizó un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 3 min a 95°C para la desnaturalización inicial,

35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas 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 separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% 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. Se reconocieron las bandas de interés y se escindió del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Promega) o el método de unión a silica (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 1.2% teñido con bromuro de etidio. Después se realizó la secuenciación nucleotídica directa de los productos de PCR.

Secuenciación automatizada de los productos de PCR

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica del fragmento génico. Cada reacción de 10 microlitros contuvo 2 microlitros de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la enzima ampliTaq polimerasa; se agregaron además 1 microlitro del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 micromolar, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 20 microlitros. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 25mL de amortiguador de carga TSR (*Template Supresión Reagent*, Applied Biosystems) o de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems) y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararon con las secuencias silvestres de cada gen para identificar las variantes alélicas de interés.

Consideraciones éticas

El documento de consentimiento informado se le presentó a cada uno de los pacientes que cumplieron con los criterios previamente establecidos. Se explicó al momento el procedimiento de la toma de muestra con sus riesgos y complicaciones. Se explicó el uso de la información y la confidencialidad de datos. Se resolvieron todas las dudas previo a la firma del consentimiento.

Resultados

Se incluyeron 106 pacientes afectados y 106 controles. De los pacientes afectados 39 fueron hombres (36.8%) y 67 mujeres (63.2%) con una edad promedio de 77.3 años. En lo que respecta a factores ambientales 9 pacientes (8.5%) refirieron haber fumado en algún momento de sus vidas mientras que 4 (3.8%) aún lo hacían. En cuanto a patologías asociadas 21 (19.8%) pacientes presentaban diabetes mellitus tipo 2 y 49 (46.2%) hipertensión arterial sistémica.

Datos demográficos de los pacientes con DMRE

Hombres	39 (36.8%)
Mujeres	67 (63.2%)
Diabetes	21 (19.8%)
Hipertensión	49 (46.2%)
Tabaquismo	13 (12.3%)

Tabla 2. Datos demográficos de los pacientes con DMRE.

Además de los pacientes afectados, se secuenciaron 106 controles sanos. De los 106 pacientes afectados y de los 106 controles ninguno presentó la variante Lis155Gln.

Prevalencia de la variante Lis155Gln en DMRE

Grupo	Prevalencia
Pacientes afectados (106)	0
Pacientes controles (96)	0

Tabla 3. Prevalencia de la variante Lis155Gln en DMRE.

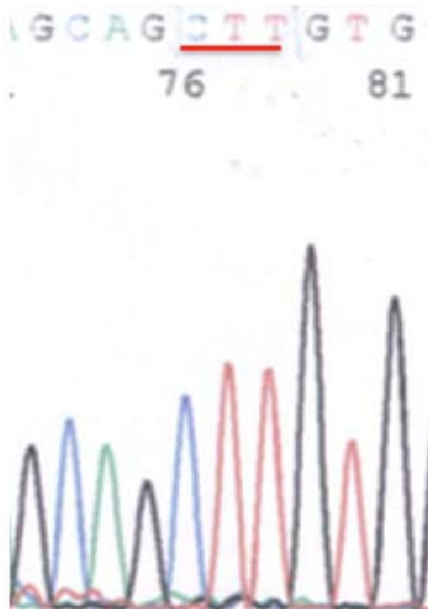


Imagen 4. Secuencia parcial del gen C3 en DNA de un paciente con DMRE, Se señala el triplete correspondiente a lisina 155 normal (secuencia antisentido).

Discusión

La degeneración macular relacionada con la edad es una patología que afecta gravemente la visión de los pacientes que la padecen a nivel mundial. A pesar de las diversas investigaciones que han tratado de encontrar su causa, esta permanece desconocida. Tanto factores genéticos como ambientales han sido relacionados con dicha patología sin encontrar alguno que prevalezca. En nuestro estudio tratamos de encontrar una relación entre la variante Lis155Gln y los pacientes mexicanos con DMRE. Dicha variante se ha reportado como un factor de riesgo para presentar DMRE y se ha establecido que su presencia confiere un riesgo 200% mayor de desarrollar la enfermedad (OR=3). Sin embargo, en este estudio que incluyó 106 casos de DMRE y 106 controles sin la enfermedad, la variante K155Q no fue identificada en ninguno de los sujetos. Este resultado es sorprendente e indica que este polimorfismo genético no juega un papel en el riesgo para DMRE en nuestra población. Previamente la variante K155Q fue identificada en 1.06% de los casos y en 0.39% de los controles en un estudio en población de EUA (43) y 2,4% en casos y

0.7% en controles en otro estudio que incluyó pacientes de Europa y EUA (40). Es interesante hacer notar que la base de datos de Exoma EXAC que incluye a sujetos mexicanos controles indica que el polimorfismo K155Q se observó en 408 de 121354 alelos, para una frecuencia alélica de 0.0033 (<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000125730>). Este dato apoya los resultados en nuestro estudio acerca de que la variante K155Q es de muy baja frecuencia en nuestra población, a diferencia de población estadounidense y europea. Aun cuando los resultados de esta investigación no apoyan la participación del polimorfismo K155Q en el riesgo para desarrollar DMRE en pacientes mexicanos, la información obtenida en esta investigación es de gran importancia ya que confirma que las diferencias étnicas entre poblaciones originan variabilidad en los factores genéticos que predisponen a una misma patología. Nuestro estudio demostró que no existe relación entre la variante Lis155Gln del gen C3 del complemento la degeneración macular relacionada a la edad en población mexicana y abre las puertas a futuras investigaciones para tratar de identificar nuevos polimorfismos genéticos que aumentan el riesgo de presentar tal afección en nuestra población.

Conclusión

La variante Lis155Gln del gen C3 del complemento no se relaciona con la presencia de degeneración macular relacionada a la edad en la población mexicana

Bibliografía

1. Paul Riordan-Eva, Emmett T. Cunningham Jr. Vaughan & Asbury's General Ophthalmology. Edición 18. Estados Unidos de America. McGraw-Hill Companies. Julio 2011. Capitulo 10 Retina (pag. 222 - 237).
2. Jack J. Kanski, Brad Bowling, Clinical Ophthalmology: A Systemati Approach: Expert Consult. Edición 7. Reino Unido. Elsevier Health Sciences, 2011. Capitulo 14. Acquired Macular Disorders (pag. 611 - 627).
3. Ferris FL, Davis MD, Clemons TE et al. A simplified severity scale for age- related macular degeneration: AREDS Report No. 18. Arch Ophthalmol 2005; 123: 1570–1574.
4. R Ratnapriyaa and EY Chewb. Age-related macular degeneration – clinical review and genetics update. Clin Genet 2013; 84: 160–166.
5. Smith W, Assink J, Klein Ret al. Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. Ophthalmology 2001; 108: 697–704.
6. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and metaanalysis. BMC Ophthalmol 2010; 10: 31
7. Clemons TE, Milton RC, Klein R et al. Risk factors for the incidence of advanced age-related macular degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. Ophthalmology 2005;112: 533–539.
8. Munch IC, Linneberg A, Larsen M. Precursors of age-related macular degeneration: associations with physical activity, obesity and serum lipids in the Inter 99 Eye Study. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54 (6): 3932–3940.

9. Kabasawa S, Mori K, Horie-Inoue K et al. Associations of cigarette smoking but not serum fatty acids with age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 2011; 118: 1082–1088.
10. Klein R, Klein BE, Knudtson MD et al. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology* 2006; 113: 373–380.
11. Spencer KL, Olson LM, Schnetz-Boutaud N et al. Using genetic variation and environmental risk factor data to identify individuals at high risk for age-related macular degeneration. *PLoS One* 2011; 6:e17784.
12. Michael B. Gorin, MD PhD. Genetic insights into age-related macular degeneration: Controversies addressing Risk, Causality, and Therapeutics. *Mol Aspects Med.* 2012 August ; 33(4): 467–486. doi:10.1016/j.mam.2012.04.004.
13. Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308: 421–424.
14. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005;308: 419–421.
15. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308: 385–389.
16. Zarepari S, Branham KE, Li M et al. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2005; 77:149–153.
17. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006; 38: 1049–1054.

18. Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2007; 39: 1200–1201.
19. Yates JR, Sepp T, Matharu BK et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2007; 357:553–561.
20. Gold B, Merriam JE, Zernant J 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.
21. Fagerness JA, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Daly MJ, Seddon JM. Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 100–104.
22. Dewan A, Liu M, Hartman S et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 2006; 314:989–992.
23. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3227–3236.
24. Kanda A, Chen W, Othman M et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:16227–16232.
25. Chen W, Stambolian D, Edwards AO et al. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 7401–7406.

26. Neale BM, Fagerness J, Reynolds R 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 USA* 2010; 107:7395–7400.
27. Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J et al. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 3699–3709.
28. Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Nat Genet* 2011; 43:1001–1004.
29. Klaver CC, Kliffen M, van Duijn CM et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 200–206.
30. McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat* 2011; 32: 1407–1416.
31. Zarepari S, Reddick AC, Branham KE et al. Association of apolipoprotein E alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in a large cohort from a single center. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1306–1310.
32. The AMD Gene Consortium, Fritsche LG, Chen W et al. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2013;45: 433–439.
33. Sans M. Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. *Hum Biol* 2000; 72:155-77. [PMID: 10721616].
34. Buentello-Volante B. 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. *Mol Vis.* 2012;18:2518-25.

35. Varma R, Fraser-Bell S, Tan S, Klein R, Azen SP. Prevalence of age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology* 2004; 111:1288-97. [PMID: 15234128].
36. Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med* 2012; 33: 467–486.
37. Michael B. Gorin, MD PhD. Genetic insights into age-related macular degeneration: Controversies addressing Risk, Causality, and Therapeutics. *Mol Aspects Med.* 2012 August ; 33(4): 467–486. doi:10.1016/j.mam.2012.04.004.
38. Boon CJ, Klevering BJ, Cremers FP, Zonneveld-Vrieling MN, Theelen T, Den Hollander AI, Hoyng CB. Central areolar choroidal dystrophy. *Ophthalmology.* 2009; 116(4):771–782. 782 e771.
39. Sobrin L, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Fagerness JA, Daly MJ, Seddon JM: Genetic profile for five common variants associated with age-related macular degeneration in densely affected families: a novel analytic approach. *Eur J Hum Genet* 2010, 18:496–501.
40. Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, Tan PL, Tai AK, Ripke S, Gowrisankar S, Vemuri S, Montgomery K, Yu Y, Reynolds R, Zack DJ, Campochiaro B, Campochiaro P, Katsanis N, Daly MJ, Seddon JM: A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2011, 43:1232–1236.
41. Stone EM, Braun TA, Russell SR, Kuehn MH, Lotery AJ, Moore PA, Eastman CG, Casavant TL, Sheffield VC: Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004, 351:346–353.

42. Schultz DW, Klein ML, Humpert AJ, Luzier CW, Persun V, Schain M, Mahan A, Runckel C, Cassera M, Vittal V, Doyle TM, Martin TM, Weleber RG, Francis PJ, Acott TS: Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family. *Hum Mol Genet* 2003, 12:3315–3323.
43. Xiaowei Zhan, et al. Identification of a Rare Coding Variant in Complement 3 Associated with Age-related Macular Degeneration. *Nat Genet.* 2013 Nov; 45(11)
44. Helgason H, et al. A rare nonsynonymous sequence variant in C3 confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2013 Nov; 45(11):1371-4.
45. Group AR, et al. The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2): study design and baseline characteristics (AREDS2 report number 1). *Ophthalmology.* 2012; 119:2282–9.

Anexo 1

Yo _____, declaro libremente que acepto participar de manera voluntaria en el estudio **“Estudio de asociación entre el polimorfismo Lis155Gln del componente 3 del complemento (C3) y riesgo para desarrollar degeneración macular relacionada con la edad en una muestra de población Mexicana”** que se realizará en los Departamentos de Retina y de Genética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana y que estará bajo la responsabilidad de los Drs. Juan Carlos Zenteno Ruiz y Gerardo Ledesma Gil. Se me ha explicado que se requiere de la toma de una muestra de 2 mililitros de sangre venosa y que esta toma no representa ningún riesgo para mi salud más que la posible formación de un pequeño moretón en el área de la punción. Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de sangre se utilizará exclusivamente para investigar las alteraciones genéticas que produjeron mi enfermedad ocular. También me ha sido señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en esta investigación en el momento en que yo lo desee y que esta decisión no afectaría la calidad de la atención que recibo por parte del personal de este hospital. Finalmente manifiesto que se me han respondido satisfactoriamente todas mis dudas y que los médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar las que pudieran surgir eventualmente.

Atentamente nombre y firma, _____

México, D.F., a _____ de _____ de 20__

Dirección y teléfono _____

Médico responsable nombre y firma _____