



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
CAMPO DE CONOCIMIENTO: CIENCIAS MÉDICAS

“ESTUDIO PILOTO DE ANÁLISIS DEL GEN EFEMP1 EN ENFERMEDAD DE
DRUSEN EN POBLACIÓN MEXICANA.”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
LEYLA SORAYA CAMARILLO BLANCARTE

TUTOR:
DR. FABIO ABDIEL SALAMANCA GÓMEZ
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DEL 2018



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.

Contenido	Página
➤ Resumen	4
➤ Antecedentes	5
➤ Justificación y planteamiento del problema	25
➤ Pregunta de investigación	26
➤ Objetivos	27
➤ Material y métodos	27
➤ Consideraciones éticas	38
➤ Resultados	40
➤ Discusión	50
➤ Conclusiones	53
➤ Referencias	54

Resumen

“Estudio piloto de análisis del gen *EFEMP1* en enfermedad de Drusen en población mexicana.” Camarillo-Blancarte Leyla, Salamanca Abdiel Fabio. UMAE de Pediatría, CMNSXXI. **INTRODUCCIÓN.** La enfermedad de Drusen es una entidad autosómica dominante con expresividad variable y penetrancia incompleta. Pertenece al grupo de las distrofias maculares hereditarias caracterizadas por disfunción progresiva de los fotorreceptores provocando pérdida de la agudeza visual a temprana edad por depósitos de drusas que se distribuyen de manera radial alrededor del nervio óptico. En muchas familias es causada por una mutación somática de cambio de sentido R345W del gen *EFEMP1*, donde el cambio de una arginina por triptofano conlleva a una aparente deficiencia en la secreción y acumulación de la proteína en el retículo endoplásmico y en lisosomas. Sin embargo, hay individuos afectados que no presentan dicha mutación, lo que sostiene que un resultado negativo para la mutación conocida no excluye el diagnóstico clínico. Aún se desconoce su incidencia a nivel mundial y a nuestro saber no hay reportes en nuestra población por lo que surge la necesidad de su estudio molecular. **OBJETIVOS.** Identificar y describir el espectro mutacional de la región codificante del gen *EFEMP1* y describir la distribución encontradas en sujetos mexicanos con diagnóstico clínico de drusas y sujetos con visión baja de causa desconocida del Servicio de Oftalmología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI mediante secuenciación automatizada. **MÉTODOS.** Es un estudio piloto de tipo análisis genético molecular, descriptivo, observacional, transversal y prolectivo. Se llevó a cabo extracción de DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica para amplificar el gen por medio de PCR y obtener la secuencia del gen en estudio de cada sujeto a través de secuenciación automatizada. Se declara no haber conflictos de interés. **RESULTADOS.** Se estudiaron cuatro familias, tres de ellas mexicanas y una compuesta de padres de origen alemán; de todos los sujetos posibles, solo 12 sujetos fueron candidatos para ser analizados por contar clínicamente con drusas sin embargo, en ninguno de ellos se encontró mutación alguna o polimorfismos. **CONCLUSIONES.** Realizar secuenciación de siguiente generación es una alternativa viable para investigar el origen y causa de la patología en cada caso.

Antecedentes

- **Análisis genético molecular**

La Ley de Investigación Biomédica especifica las condiciones de los estudios de genética y sus implicaciones, así mismo define y aclara el concepto de análisis genético donde refiere a todo aquel procedimiento destinado a detectar la presencia, ausencia o variantes de uno o varios segmentos del material genético (ácido desoxirribonucleico o ADN), lo cual incluye pruebas indirectas para detectar un producto génico o un metabolito específico que sea indicativo ante todo de un cambio genético determinado. Hace la distinción con análisis genético-poblacional donde refiere que es aquella investigación que tiene por objeto entender la naturaleza y magnitud de las variaciones genéticas dentro de una población o entre individuos de un mismo grupo o de grupos distintos. Por lo tanto, el análisis genético permite conocer el orden de los eventos y la interferencia entre productos proteicos.

El análisis de un gen por lo general abarca el estudio de sus componentes estructurales y con frecuencia la secuencia codificante se analiza por secuenciación automatizada, ya que este método provee información detallada con resolución de hasta el cambio de una sola base, por tal motivo se opta por este método para nuestro estudio. Incluso con éste método puede ser tan específico que se puede manejar la muestra de ADN para ver los patrones de metilación del mismo individuo si así se desea (1).

- **Concepto de gen**

Aún después de 50 años del descubrimiento del ADN no se ha llegado a una definición universal de un gen. Sin embargo, se sabe transmite rasgos, produce polipéptidos y genera evolución. Por tanto, los genes son secuencias de ácidos nucleicos cuyo contenido tiene el potencial de realizar más de una de las funciones antes mencionadas. Con el propósito de analizar su estructura y organización se ha propuesto utilizar la siguiente definición en donde un gen es todo aquello de la secuencia genómica que estaría representado en el transcrito primario de ácido ribonucleico o RNA (por sus siglas en inglés) si se expresara. Bajo este tenor, las regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR, 3'UTR), los exones no codificantes y los intrones son parte de un gen, pero las secuencias reguladoras a menos que se transcriban no lo son (2, 3).

- **Espectro mutacional**

El espectro mutacional es la tasa de mutaciones que le han ocurrido a un gen o a un locus (lugar) específico. Las mutaciones pueden persistir por grandes periodos de tiempo y su frecuencia en la población tiende a elevarse, a diferencia de las variantes deletéreas que tienden a ser más escasas. La fuente de toda variación genética radica en el proceso mutacional que ocurre a diferentes tasas en distintos sitios del genoma; nótese que además también puede ocurrir en la línea germinal. Por lo tanto, una mutación se define como cualquier cambio heredable y detectable en el material genético que provoca un cambio en el genotipo, el cual es transmitido

a las células hijas y a las generaciones siguientes pudiendo ser a nivel somático o bien, germinal (4, 5).

El tipo más común de mutación es una transición, el cual consiste en el cambio de un solo nucleótido, donde una purina cambia por otra (A o G); y transversión donde una purina cambia por una pirimidina (G a C) o viceversa. Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) es una sustitución de un nucleótido que se encuentra presente en más del 1% de la población y se estima que existen de 3 a 10 millones de variantes de SNPs en el genoma con una frecuencia mayor al 1%. La mayoría de los SNPs ocurren en regiones no codificantes del genoma pero se estima que alrededor de 10,000 a 50,000 SNPs suceden en regiones codificantes y originan productos proteicos alterados. Sin embargo, por convención se entiende que un polimorfismo por lo general no genera alteración mientras que una mutación provoca enfermedad.

Otras formas comunes de mutación incluyen las inserciones, deleciones e inversiones de una o más bases y debido a la disponibilidad de contar con las secuencias del genoma ha hecho posible investigar la distribución de cualquier tipo de cambio de secuencia y su relación en distintos individuos y poblaciones (5).

Para fines de este proyecto nos centraremos en la detección de presencia o ausencia de segmentos de ADN por secuenciación automatizada puesto que es un método sencillo y confiable como ya se mencionó. El análisis del gen incluirá los exones codificantes, por lo tanto se amplificarán las regiones exónicas codificantes del gen *EFEMP1* a partir de ADN genómico por secuenciación automatizada, realizando después el análisis de las mutaciones que se encuentren por medio de

un análisis bioinformático y su respectivo análisis de predicción funcional; ya que las mutaciones pueden tener impacto sobre la proteína a la cual codifican y la predicción funcional establece si el cambio encontrado en cada sujeto es benigna o maligna y su impacto en la función proteica.

El impacto del cambio de un aminoácido en la función o estructura de una proteína se puede predecir de manera confiable *in silico* para saber si el cambio es deletéreo o silencioso, en este caso se hará uso de Polyphen (ver material y métodos).

- **Generalidades de distrofias maculares hereditarias**

Las distrofias maculares o distrofias retinianas hereditarias (*Inherited retinal dystrophies*, IRDs por sus siglas en inglés) se pueden definir como un grupo de enfermedades genéticas caracterizadas por la disfunción progresiva de los fotorreceptores que provocan pérdida de la agudeza visual a edad temprana (6).

La mácula se ubica en la retina central, temporal al disco óptico y mide 6mm de diámetro, en el centro se encuentra la fóvea de 0.35mm de diámetro, que contiene una población de células de fotorreceptores responsables de la visión a color (7). Entre las IRDs más frecuentes se encuentran la enfermedad de Stargardt (STGD; OMIM #248200), retinosis o retinitis pigmentosa (RP), distrofia de conos/bastones (CRD), distrofia macular vitelliforme o enfermedad de Best (VMD OMIM #153700) y la distrofia macular de enfermedad de Drusen o de Drusas dominantes o Drusas familiares, también conocida como Distrofia retiniana de Doyme Honeycomb o bien, Malattia Leventinese, (OMD; OMIM #126600) (8). Aunque ahora ya en desuso también se le designó como coroiditis guttata, coroiditis de Hutchinson-Tay o bien

coriorretiniris superficial de Holthouse-Batten (9). No obstante, para fines del proyecto nos referiremos a cualquiera de estas como Enfermedad de Drusen pues el nombre engloba a la misma enfermedad.

Como grupo, estas formas de IRD se presentan en una frecuencia de seis individuos por cada 10,000. Sin embargo, representan una carga diagnóstica diferente debido a la variabilidad del fenotipo que se sobrepone con otras alteraciones y a la heterogeneidad genética de las entidades (es decir, un mismo cuadro clínico puede tener distintas causas genéticas). El análisis clínico aun cuando es minucioso es insuficiente para determinar el defecto genético, pues en muchos casos de distrofias maculares se ha visto que la mutación está presente en niños que aún no presentan las características clínicas de la entidad (penetrancia incompleta) por lo que el estudio molecular de los mismos sería benéfico para su pronóstico y calidad de vida. Muchos de los sujetos con distrofias maculares son casos esporádicos sin una historia familiar definitiva de alteración en la agudeza visual por lo que dificulta el diagnóstico y el asesoramiento en el modelo de herencia (6). El 90% de todas las distrofias maculares lo ocupan la enfermedad de Stargardt y la distrofia macular de Best, sin embargo, la enfermedad de Drusen por su alto parecido con la distrofia macular dependiente de edad (*age-related macular degeneration*, AMD por sus siglas en inglés) la convierte en un diagnóstico diferencial (7) de suma importancia para la clínica y la salud pública del país.

La AMD temprana es una enfermedad multifactorial con implicaciones genéticas complejas, provoca una degeneración crónica y progresiva de los fotorreceptores, del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y de la membrana de Bruch (7). La AMD

se caracteriza por áreas de hiperpigmentación en la retina exterior o de la coroides y/o áreas de hipopigmentación del EPR asociadas con drusas suaves. El cuadro clínico de la AMD tradía incluye atrofia gegográfica y neovascularización coroidea con neovascularización de la membrana subretiniana o cicatrices intra o subretinianas o desprendimiento retiniano neurosensorial con exudados y hemorragia. La importancia de la AMD radica en que es la principal causa de ceguera no tratable en el mundo occidental con una prevalencia del 5% antes de los 50 años de edad y del 11.8% a los 80 años (10) y el 33% de ojos obtenidos por autopsia de cadáveres mayores de 65 años. Se estima que el 30% de la población mundial a los 75 años presentan cierto grado de AMD y se espera el doble dentro de los próximos 15 años (7). Lo que deja lugar a duda si realmente es ceguera por edad o bien por Enfermedad de Drusen. A ciencia cierta se desconoce la incidencia y prevalencia de la Enfermedad de Drusen, sin embargo, se sabe que las drusas del nervio óptico tienen una incidencia del 3 al 24% (11, 12). Por otro lado, ya que la población mexicana comparte hasta un 6% de genes de población asiática, existe un estudio de China del Norte donde se reporta la incidencia de drusas en el nervio óptico de 1:1,000 adultos jóvenes (13, 14, 15) lo que refuerza el posutlado anterior que señala si se debe a ceguera por edad o por Enfermedad de Drusen y la necesidad del diagnóstico certero.

- **Enfermedad de Drusen**

Como ya se mencionó, de las maculopatías hereditarias más parecidas a la AMD es la enfermedad de Stargardt y la Enfermedad de Drusen (16). En el Reino Unido en 1925 se describió originalmente como distrofia retiniana de Doyme honeycomb

(DHRD) y en Suiza como Malattia leventinese (MLVT) en algunas familias por lo que se pensó en efecto fundador. Esta enfermedad tiene un modelo de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta caracterizada por la aparición de drusas en edad adulta temprana (17). La sintomatología clínica aparece en la adolescencia o bien en la tercera década de la vida, progresando hasta presentar escotoma central a los 40 años. Doyne la describió como “panal de abeja” siendo la presencia de drusas hialinas en la región papilo-macular con una disposición radial. En 1948 Waardenburg afirma por primera vez que estas entidades son parecidas y en 1962 los reportes histológicos las definen como la misma enfermedad. Por lo que en 1996 se les asignó un locus bajo el mismo nombre (18). De manera inicial se presenta en el adulto joven con la presencia de pequeñas drusas en la mácula que se distribuyen de forma radial alrededor del nervio óptico, sin embargo, casi no hay reportes en menores de edad (19).

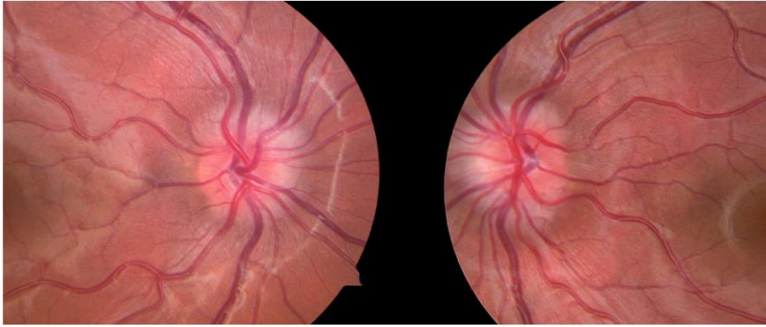
El primer signo clínico identificable es la presencia de drusas y los primeros síntomas visuales incluyen disminución de la agudeza visual, discromatopsia, escotomas relativos, fotofobia y/o metamorfopsia. En etapas avanzadas la agudeza visual se deteriora y los escotomas se desarrollan de forma definitiva, seguida de atrofia geográfica y/o neovascularización coroidea (20).

En algunos casos, las drusas forman un patrón radial que se extiende hacia la periferia de la retina. El depósito se encuentra en el polo posterior y en el área peripapilar con una distribución radial con variabilidad fenotípica intra e interfamiliar (21).

El diagnóstico de la enfermedad de Drusen hasta ahora es clínico (ya que hay pocos laboratorios moleculares que se dedican al diagnóstico específico de dicha entidad) y se realiza por exploración del fondo de ojo, donde se observan pequeñas y discretas drusas que radían hacia la periferia de la retina. De manera progresiva, las drusas confluyen hasta formar una apariencia de panal de abeja. Los reportes histopatológicos confirman los depósitos externos a la membrana basal del EPR que ocupa todo el grosor de la membrana de Bruch (22). Los criterios clínicos para el diagnóstico incluyen la presencia de drusas con una distribución en líneas que radían del centro a la fóvea; además el color del fondo de la retina muestra drusas amarillo-blancusco de distintos tamaños, las más grandes se ubican alrededor de la mácula. Así mismo, también se observa un espacio parcial en el centro de la mácula y las drusas más pequeñas visibles se observan en la periferia de la lesión en una distribución de tipo radial (16, 17, 20, 23, 24). El protocolo habitual de diagnóstico es clínico: exploración de fondo de ojo bajo dilatación pupilar, se puede hacer uso de fluorangiografía (FAG, por sus siglas en inglés) o bien tomografía coherente óptica (OCT, por sus siglas en inglés).

La Enfermedad de Drusen como ya se mencionó tiene penetrancia incompleta y expresividad variable, por lo que cada familia es una valiosa oportunidad para búsqueda de mutaciones o alteraciones genéticas que puedan explicar la variabilidad en el fenotipo. La figura 1 es un ejemplo de la expresión variable intrafamiliar de la enfermedad.

Figura 1. Fotografía del fondo de ojo de ambos ojos de un niño de 10 años con drusas en el disco óptico. (25)



- **Drusas**

Depósitos basales y drusas. Los depósitos basales son acumulaciones de *debris* entre el EPR y la membrana basal. Existen dos tipos: 1) los depósitos basales laminares y 2) los depósitos basales lineales. Los laminares se ubican en la membrana basal interna del EPR y contienen gránulos con colágena tipo IV, laminina, glucoproteínas, glucosaminoglucanos, carbohidratos, colesterol y apolipoproteínas B y E. Los depósitos basales lineales son electro-densos y contienen gránulos de fosfolípidos, son fuertes marcadores de progresión a drusas y a degeneración macular dependiente de edad más que los depósitos basales laminares. Se han reportado en edades tempranas de la presencia de depósitos basales y drusas subclínicas (7, 16, 26, 27).

Las drusas son depósitos extracelulares que se forman por debajo del EPR y la membrana basal. Aparecen de forma inicial en el área macular pero también ocurren en la periferia de la retina. Desde el punto de vista clínico, las drusas se definen según su ubicación, forma y tamaño: los oftalmólogos las distinguen entre drusas

maculares y periféricas, pequeñas o grandes, con bordes bien definidas o duras o menos definidas o suaves o confluentes (16, 25, 26, 27).

Las drusas se describen por su tamaño, forma y tinción con PAS (ácido periódico de Schiff); en un inicio se observan como pequeños parches amarillentos en la mácula por debajo del EPR.

En el aspecto molecular las drusas contienen proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, elementos inhibidores del complemento, apolipoproteínas, lípidos, entre otras. Varían en el contenido de ácidos grasos y colesterol, con una razón estable entre colesterol esterificado y no esterificado. Con frecuencia las proteínas de las drusas sufren modificaciones post-transcripcionales. Se sabe que la presencia de proteínas modificadas por oxidación, como la TIMP3, la vitronectina y la cristalina o los lípidos en las drusas sugieren que el estrés oxidativo es crucial para su formación (28, 29).

Los componentes de las drusas se derivan de grasas modificadas y proteínas producidas por: 1) fotorreceptores y/o, 2) células del EPR y/o, 3) células coroideas (células endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso), o 4) derivados de constituyentes del plasma. La mayoría de los lípidos en las drusas, incluyendo el colesterol oxidado se derivan del EPR y de los fotorreceptores y sólo una pequeña parte del plasma. El contenido protéico de las drusas ya se ha analizado por perfiles de expresión de RNA mensajero (mRNA) de fotorreceptores humanos, del EPR y de células coroideas y perfiles proteómicos de plasma humano generado por la base de datos Ingenuity donde se observó que al menos el 20% de las proteínas en las

drusas también están presentes en plasma, el 32% de las proteínas de las drusas se sintetizan potencialmente de las células coroideas, el 12% proviene del EPR y el 3% de los fotorreceptores (7, 16, 27, 30).

Aún cuando todavía se desconoce el por qué las drusas se desarrollan en la mácula, existe una combinación estructural específica, así como molecular y con propiedades funcionales que predisponen a su formación en el área macular. Se cree que la alta densidad de fotorreceptores tiene un papel importante en su formación, en particular en el anillo perifoveal. La fagocitosis local de los fotorreceptores del segmento exterior por el EPR causa un gran acúmulo localizado de estrés oxidativo y una formación focal de *detritus* en la membrana (31).

También las propiedades estructurales de la membrana basal tienen una función importante en la formación de las drusas. La membrana basal en la mácula tiene una capa delgada elástica y una más abierta comparada con la periferia. En el ojo sano de manera inicial, el EPR macular y la membrana basal se deshacen del exceso de las moléculas oxidadas y ácidos grasos al transportarlos al torrente sanguíneo. Sin embargo, hay proteínas que llegan a la membrana basal del lado coroideo; tras las modificaciones por la oxidación hay proteínas que ya sea física o químicamente se quedan atrapadas en la membrana basal iniciando así los primeros esbozos para la formación de las drusas en la mácula. Además, las propiedades locales funcionales del EPR macular también están involucradas en la formación de drusas (31). Por último, desde hace tiempo se ha pensado que esta distrofia puede ser un error innato del metabolismo del EPR debido al depósito y acumulación por la gran actividad lisosomal que produce hisrólisis celular del EPR

(7,16, 31), sin embargo, este postulado aún no se ha descartado ni se ha estudiado a profundidad en menores de edad y por lo tanto tampoco hay registros.

- **Genética de las fibulinas**

En la década de los 90 se descubrió la primera de la familia de seis fibulinas, que son proteínas de la matriz extracelular (*extracellular-matrix* ECM, por sus siglas en inglés). Las fibulinas son una familia ancestral de proteínas conservadas de manera evolutiva. Contienen una serie de módulos de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF-like) seguidos de un módulo de tipo fibulina en el extremo carboxilo (como se ilustra en la figura 2). Las fibulinas tienen un diverso arreglo de proteínas de tipo ligando, funcionan como puentes intramoleculares que estabilizan la organización de las supramoléculas de la ECM, como las fibras elásticas de la membrana basal. Su nombre proviene del vocablo latino *fibula* que significa “broche” (31, 32). La función de las fibulinas se resume en la tabla 1.

Figura 2. Estructura de las fibulinas (20, 31).

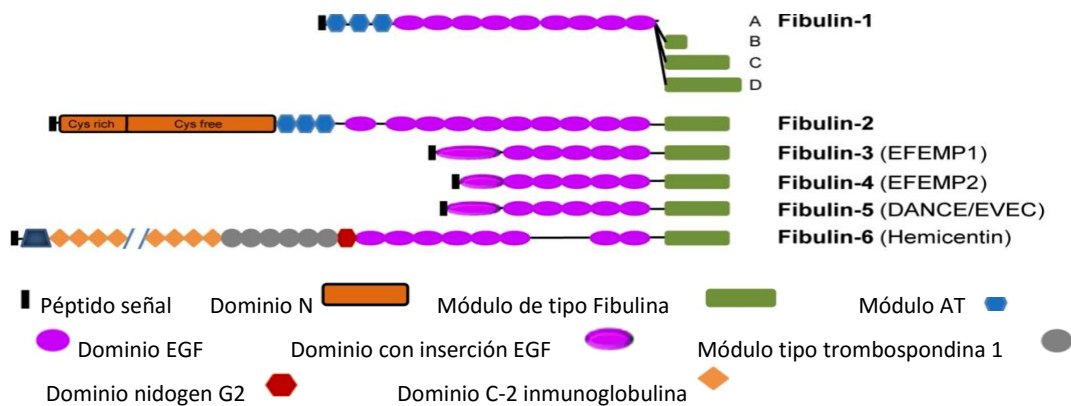


Tabla 1. Nomenclatura de la familia de las fibulinas

Nombre					
Fibulina 1 BM90	Fibulina 2	Fibulina 3 FBLN 3 T16, S15	Fibulina 4 MBP1, UPH1, H411	Fibulina 5 DANCE, EVEC, UP50	Fibulina 6 Hemicentina, him4
Locus					
22q13.31	3p24-p25	2p16	11q13	14q32.1	1q25
Gen					
<i>FBLN1</i>	<i>FBLN2</i>	<i>EFEMP1</i>	<i>EFEMP2</i>	<i>FBLN 5</i>	<i>FBLN 6</i>
Función					
Unión a tropoelastina. Colágena en piel y vasos sanguíneos y aorta. Formación válvulas septales cardiacas.	Unión a tropoelastina. Se une a elastina. Formación válvulas septales cardiacas. Endotelio coronario.	Formación válvulas septales cardiacas. Venas umbilicales. Se expresa en cerebro, placenta, corazón, ojo y vasos sanguíneos.	Capa media de venas y arterias.	Unión a tropoelastina. Se une a integrinas y elastina. Células de músculo liso vascular. Endotelio arterial pulmonar.	Adhesión celular, interacción célula - célula
En modelo murino					
Por haploinsuficiencia: sindactilia. Retinopatía		Malattia Leventinese	Retinopatía.	Aorta tortuosa, emfisema y cutis laxa.	Prolapso uterino
En cáncer					
Fibrosarcoma Ca de mama	Metástasis	Ca mama, páncreas. Gliomas	Ca de colon	Fibrosarcoma	

(5, 7, 18, 20, 33, 34, 35, 36, 37, 38)

Para fines de este estudio nos centraremos en la Fibulina 3, también conocida como *EFEMP1*, que en OMIM su número de identificación es #126600 y en ensembl tiene una entrada con número de identificación: ENSG00000115380, cuya ubicación ese encuentra según ensembl en el cromosma 2:56,093,102-56,151,274; el gen tiene

14 transcritos debido a variantes por corte y empalme (*splicing*) ver figura 3. (39)

Figura 3. Transcritos del gen *EFEMP1*, nombre, número de identificación del transcrito, longitud en pares de bases (bp), proteína codificada con número de identificación, número de aminoácidos (aa) y transcrito codificante o no (39).

Show All entries		Show/hide columns			
Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype
EFEMP1-001	ENST00000394555	3024	ENSP00000378058	493	Protein coding
EFEMP1-201	ENST00000394554	2917	ENSP00000378057	493	Protein coding
EFEMP1-003	ENST00000355426	1820	ENSP00000347596	493	Protein coding
EFEMP1-202	ENST00000424836	1809	ENSP00000399145	355	Protein coding
EFEMP1-008	ENST00000438672	733	ENSP00000392055	172	Protein coding
EFEMP1-004	ENST00000439193	572	ENSP00000408195	119	Protein coding
EFEMP1-006	ENST00000440439	559	ENSP00000398345	106	Protein coding
EFEMP1-005	ENST00000429909	558	ENSP00000389319	87	Protein coding
EFEMP1-011	ENST00000452337	552	ENSP00000399480	62	Protein coding
EFEMP1-009	ENST00000421664	547	ENSP00000405686	52	Protein coding
EFEMP1-007	ENST00000424207	339	ENSP00000398387	27	Protein coding
EFEMP1-010	ENST00000497698	604	No protein product	-	Processed transcript
EFEMP1-013	ENST00000452161	563	No protein product	-	Processed transcript
EFEMP1-012	ENST00000480016	588	No protein product	-	Retained intron







EFEMP1 es una glucoproteína extracelular que se expresa ampliamente en todo el cuerpo durante el desarrollo embrionario y también en tejidos adultos. Se encuentra descrita en las siguientes bases de datos: HGNC Symbol, EntrezGene, MIM disease, UniProtKB Gene Name, Orphanet, WikiGene, MIM gene, UniGene y ArrayExpress.

Su locus se ubica en 2p16, contiene 12 exones, de los cuales solo 11 son exones codificantes y codifica para una proteína de 493 aminoácidos (aa); tiene 3,024bp (*base pair*, por su equivalencia en inglés- pares de bases) con un peso molecular de 55kDa. La secuencia de la proteína contiene un péptido señal con cinco arreglos en tándem de dominios EGF precedidos por un dominio modificado de EGF y un dominio C-terminal de tipo fibulina (39). La microscopía electrónica de la fibulina 3 la muestra como una estructura de tipo bastón con un glóbulo al final. La fibulina 3 existe como monómeros en condiciones fisiológicas y está altamente conservada entre diferentes especies, tiene un 92-94% de aminoácidos idénticos en el humano,

rata y ratón (Figura 4) (20, 31, 39).

Figura 4. Estructura de la fibulina 3 o *EFEMP1* (32).



	Péptido señal
	Dominio de anafilotoxina
	Módulo tipo EGF
	Módulo con inserción tipo EGF
	Segmento adjunto a EGF
	Módulo de tipo fibulina

Durante el desarrollo embrionario y fetal se expresa en el mesénquima, dando lugar a hueso y estructuras cartilaginosas, por lo que también es importante para el desarrollo esquelético, la talla y el crecimiento celular. En adultos, *EFEMP1* se distribuye en todos los tejidos, se expresa en el bulbo olfatorio y desde ahí migra hacia el sistema nervioso central (SNC) y ojo. Se expresa altamente por el endotelio y por la membrana basal de las células endoteliales. En ojo se encuentra en la membrana de Bruch, una estructura de doble membrana que consiste en el EPR y la membrana del endotelio coroideo con fibras de colágeno entrelazadas con fibras elásticas. Interactúa con el inhibidor de tejido metaloproteinasa 3 (TIMP-3), colágena XVIII/endostatina, antígeno X codificado por el virus de hepatitis B y el monómero de la elastina, la tropoelastina. Estas interacciones contribuyen a la integridad de la membrana basal y la ECM como las fibras elásticas de la membrana. *EFEMP1* estimula la expresión de TIMP-1 y TIMP-3 pero inhibe la expresión y actividades de la matriz metaloproteinasa MMP-2, MMP-3, MMP-9 y la

angiogenesis (20).

- **Mutaciones del gen *EFEMP1* en Enfermedad de Drusen**

Hasta el momento se sabe que *EFEMP1* tiene 12 mutaciones de tipo variación en el sitio donante de *splicing*, 17 mutaciones de cambio de marco de lectura, 62 mutaciones en el sitio de *splicing*, 196 variantes sinónimas, 4 variantes en la secuencia codificante, 129 variantes en 5'UTR, 4,000 variantes en regiones intrónicas, 87 variantes no codificantes y 297 mutaciones por cambio de sentido (39).

Se sabe que la mutación de cambio de sentido R345W, tiene el número de identificación rs121434491 con ubicación en 2: 56,093,102-56,151,274; cuyos alelos son G/A, la clase de mutación es SNP y además es de tipo somática; los aminoácidos involucrados son R/W, las coordenadas de los aminoácidos son 345, en PolyPhen tiene un puntaje de 0.254 (es una herramienta que predice la variación del efecto en la función de la proteína basada en las consideraciones físicas y comparativas de la secuencia, ver material y métodos). El puntaje significa que los valores positivos indican que la mutación es rara y poco o nada frecuente en la familia proteica, además que por medio del puntaje también se puede saber cómo se afecta el producto proteico en el mapa de Ramachandra (40, 41, 42).

Es decir, el cambio de una arginina por triptofano en la posición 345 (Arg345Trp), causa la Enfermedad de Drusen, en la cual basta con tener un alelo mutado para que el individuo presente la degeneración macular y la transmita a su descendencia independientemente del sexo. Además, basta con que una variante en la secuencia

cambie, una o más bases para que resulte en un aminoácido distinto pero con la longitud de secuencia conservada.

Los estudios indican que la mutación conocida R345W conlleva a una aparente deficiencia en la secreción y por tanto acumulación de la proteína EFEMP1 principalmente en el retículo endoplásmico (RE) (43).

Se ha identificado que la mutación conocida R345W se encuentra en muchas genealogías, lo que sugiere que esta mutación proviene de un ancestro común y tal vez la mayor parte de los casos de Enfermedad de Drusen se derivan de éste. Puesto que se ha observado que comparten varios haplotipos que se encuentran de 1 a 3cM de la región D2S2251 a D2S378 y de D6S2258 y D6S1644 de la región de *EFEMP1*, lo que confirma la teoría del efecto fundador aún en familias no relacionadas (44, 45, 46) y que existen algunas genealogías identificadas como Enfermedad de Drusen pero han sido mapeados en 6q14. Este locus se encuentra adyacente al gen de distrofia de conos y bastones (*CORD7*) y al gen de la distrofia de Carolina del Norte (*NCMD*) los cuales se han identificado como Enfermedad de Drusen de tipo dominante. Sin embargo, estos casos son más consistentes con la distrofia de Carolina del Norte y fueron mal diagnosticados como Enfermedad de Drusen (45, 46, 47, 48). Así mismo, se sabe existe heterogeneidad genética (es decir, el mismo cuadro clínico puede tener diferentes causas genéticas) en la Enfermedad de Drusen (21) donde se refiere que el 70% de las familias estudiadas y el 6% de los pacientes con Enfermedad de Drusen esporádico presentaron la mutación conocida R345W, mientras que en el resto de las familias y pacientes esporádicos no se detectó otra mutación, sin embargo, existe sospecha de que el

promotor esté involucrado generando una mutación también de tipo autosómica dominante en este locus (49). Existen estudios que demuestran que hay familias con la Enfermedad de Drusen pero que no presentan dicha mutación, lo que sostiene que un resultado negativo para la mutación conocida no excluye el diagnóstico clínico (29). Se ha reportado también que en estudios moleculares de sujetos con enfermedades retinales hereditarias en el 33.3% se encontró una mutación de cambio de sentido, identificando una mutación adicional en dicho gen 399C → a G133G. Por lo que se hace énfasis en la utilidad de los estudios genéticos moleculares en enfermedades retinales para la sospecha, detección y diagnóstico temprano, así como la identificación de portadores o bien confirmar o descartar una mutación familiar (44, 45, 48, 50).

- **Patogenia de la Enfermedad de Drusen**

La mutación conocida de R345W ocurre en el quinto dominio de repetido EGF de la fibulina 3 y es hasta ahora la responsable de causar la Enfermedad de Drusen. El mecanismo molecular aún no está descrito por completo, pero los estudios muestran que la proteína tiene un mal plegamiento que provoca su acumulación en el EPR y la membrana de Bruch (43).

No se detecta *EFEMP1* en la membrana de Bruch ni en la coroides de la retina normal, pero sí en enfermedad causando la Enfermedad de Drusen (49). Lo que se sabe es que la expresión de *EFEMP1* causa un aumento en los niveles del factor vascular endotelial, la chaperona en el RE, la proteína reguladora de glucosa 78 (BiP), que en conjunto indican un mal plegamiento de la proteína (43). Las

variaciones dentro de este gen resultan en un mal plegamiento o en ausencia de plegamiento que causa una pobre secreción de la misma y por tanto acúmulo. La alteración en la secreción provoca una acumulación aberrante de la proteína, depósito y retención dentro de las células. Cabe notar, que los agregados de una proteína defectuosa son una característica común entre las enfermedades degenerativas (10).

Además, los estudios en inmunohistoquímica en retina normal muestran que EFEMP1 se expresa de manera predominante en la capa de la fibra del nervio y de los fotorreceptores. Sin embargo, en retinas enfermas se observa acumulación de la fibulina 3 por debajo del EPR ocasionando la formación y el patrón de drusas, lo cual no se observa en retina sana (48).

En el 2007 se encontró que la mutación R345W provoca depósito de material en membrana de Bruch y en el EPRs provocando degeneración macular y ceguera. Sin embargo, a la fecha se sabe que tanto heterocigotos y homocigotos de R345W pueden desarrollar depósitos en el EPR a edades tan tempranas descritas como los 4 años de edad (50, 51) por lo que es necesario su escrutinio desde la edad pediátrica.

- **Tratamiento**

A ciencia cierta y a la fecha no existe tratamiento para evitar la progresión y menos para la cura definitiva de la Enfermedad de Drusen. Se ha propuesto el uso de terapia con láser para ayudar a mejorar la visión y disminuir el calibre de los depósitos de drusas en el EPR (51).

La Secretaría de Salud afirma que en nuestro país existen 700,000 individuos con ceguera, de los cuales el 50% se debe a catarata senil, el 20% a DM, el 15% a glaucoma, el 6% a distrofias retinianas, el 5% a miopía degenerativa y el 4% a malformaciones. Sin embargo, el INEGI en el 2000 establece que del 100% de discapacidad en México, el 26% se debe a discapacidad visual siendo un 16% en niños, 33% en adultos jóvenes y 48.7% en adultos mayores. El Servicio de Oftalmología del Hospital de Especialidades de CMNSXXI en el 2012 reportó que el 95% de la ceguera se debe a retinopatía diabética, glaucoma y catarata, y sólo el 5% a otros padecimientos. Sin embargo, el Hospital de Pediatría atiende menores hasta con un 10% de ceguera por factores genéticos (datos no publicados). Así mismo el Servicio de Oftalmología del Hospital de Especialidades afirma que “el factor de riesgo más importante es la herencia...” (52).

Justificación y planteamiento del problema

Aún se desconoce la incidencia y frecuencia de la Enfermedad de Drusen en México. Sólo existen dos reportes de microftalmos posterior con retinitis pigmentosa, foveosquiasis y drusas en el nervio óptico y una revisión de la literatura en México donde no especifica si los sujetos de estudio son mexicanos pero surge la duda que sea un error innato del metabolismo debido a la acumulación de drusas y el plegamiento alterado de la proteína (53, 54). Debido a que es el primer estudio del gen en población mexicana se considera como estudio piloto y por lo tanto este proyecto senta bases para sustentar el inicio del estudio de este gen en nuestra población. Por tal motivo se decide empezar con un estudio piloto descriptivo para obtener el primer acercamiento a este fenómeno o condición, así mismo se enfatizará en las características que afectan a la población de estudio. Todo lo anterior con el fin de poder generar una hipótesis para continuar con la misma línea de investigación en los próximos años. Cabe especificar que el presente estudio se enfocará primeramente en el análisis de los exones codificantes del gen.

Además, la importancia de su estudio radica en que es un diagnóstico diferencial de la distrofia macular dependiente de edad, lo que la ubica en las enfermedades que tienen impacto en la salud pública del país pues causan discapacidad visual a edad temprana. Se sabe que existen al menos más de dos casos familiares con Enfermedad de Drusen en el Servicio de Oftalmología Pediátrica por lo que se estima pueden existir más casos en dicho servicio que se encuentren sub diagnosticados o bien bajo otro diagnóstico; lo cual para una entidad tan poco frecuente y debido a su rareza de presentación se considera relevante su estudio.

La Enfermedad de Drusen es una distrofia retiniana que provoca ceguera causada por mutaciones en el gen *EFEMP1*. No existen estudios que hayan investigado alteraciones moleculares de la entidad en nuestro país por lo que el reconocimiento del análisis del gen y la identificación de su espectro mutacional en una muestra de la es de gran importancia para establecer protocolos más eficientes de diagnóstico molecular. Por lo tanto, la relevancia del proyecto consiste en la secuenciación de las regiones codificantes del gen en individuos y sus familiares con el padecimiento con el fin de identificar posibles mutaciones no descritas y hacer la distinción en aquellos sujetos que presentan disminución de la agudeza visual y aún más asintomáticos debido a su corta edad, pues se sabe el pronóstico a largo plazo es desfavorable y una detección temprana es brindar una oportunidad al individuo. Por lo tanto, consideramos importante apoyar y sustentar la opinión de los expertos e iniciar el estudio genético y molecular así como su escrutinio en edad pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNSXXI.

Pregunta de investigación

En un estudio piloto de sujetos mexicanos con agudeza visual disminuida de causa desconocida, ¿cuáles son las mutaciones específicas de los exones codificantes del gen *EFEMP1* en enfermedad de Drusen?

Objetivos

- **Objetivo primario**
 - En un estudio piloto describir el espectro mutacional de las regiones codificantes del gen *EFEMP1* en Enfermedad de Drusen en sujetos mexicanos del Servicio de Oftalmología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

- **Objetivos secundarios**
 - Identificar a los sujetos con la enfermedad en la muestra de estudio que serán captados en CMNSXXI del Servicio de Oftalmología del Hospital de Pediatría por medio de secuenciación automatizada y posterior análisis *in silico*.
 - Identificar el tipo y distribución de mutaciones en los sujetos estudiados, ya sea el único en la familia o bien la familia completa.
 - Realizar correlación del fenotipo-genotipo de los casos.

Material y métodos

Población de estudio:

- **Diana**
- Sujetos del Hospital de la UMAE de Pediatría del SMNSXXI, IMSS que hayan acudido a atención médica y/o consulta del servicio de

Oftalmología Pediátrica del Centro Médico Nacional Siglo XXI en los últimos 5 años.

- Accessible
- Sujetos del Hospital de la UMAE de Pediatría del SMNSXXI, IMSS que hayan acudido a atención médica y/o consulta del servicio de Oftalmología Pediátrica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, referidos de cualquier nivel de atención que presenten datos clínicos compatibles con enfermedad de Drusen.

Tamaño de la muestra

- Partiendo que se trata de un estudio piloto se realizará muestreo no probabilístico de casos consecutivos, revisión de hojas de consulta diarias y registros del archivo del Servicio de Oftalmología Pediátrica del CMNSXXI de los últimos 5 años.

Criterios de no inclusion

- Cirugía previa por cualquier motivo
- Error innato del metabolismo
- Antecedente de trauma y avitaminosis.
- Antecedente de glaucoma, catarata o enfermedad crónica degenerativa.
- Agudeza visual normal.
- Antecedente de uso concomitante de medicamentos asociados con patología retiniana como tamoxifeno y cloroquina, tratamiento previo

intraocular como inyección intravítrea, fotocoagulación o láser micropulsado.

Criterios de eliminación

- Sujetos en los que la muestra de DNA no sea suficiente para el estudio.
- Sujetos que no accedan a una nueva muestra.
- Sujetos que no puedan ser localizados nuevamente.

VARIABLES DE ESTUDIO

VARIABLES DE INTERÉS	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	CLASIFICACIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Espectro mutacional	Rango de posibles mutaciones de un gen; a nivel de ADN: sustitución, de sentido equivocado, inserción o deleción. 55, 56	Las mutaciones se determinan comparando los resultados de la secuenciación con el <i>wild type</i> descrito en ensembl.org	Cualitativa nominal	Sustitución Deleción Inserción Sin alteración De sentido equivocado Sin sentido Polimorfismo
Genotipo	Es la información genética que posee un organismo en forma de ADN, por lo general el genoma de una especie incluye numerosas variaciones o polimorfismos en muchos de sus genes. El genotipo indica las variaciones específicas en un individuo. 55,57, 58	El genotipo se determinará comparando los resultados de la secuenciación nucleotídica del gen EFEMP1 de cada sujeto de estudio con la secuencia <i>wild type</i> publicada.	Cualitativa nominal	Homocigoto recesivo Heterocigoto Heterocigoto compuesto Sin alteración
VARIABLES DESCRIPTORAS	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	CLASIFICACIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Edad	Tiempo en años que ha vivido una persona desde su nacimiento. 59	Se registrará la edad en años cumplidos al momento de la inclusión.	Cuantitativa continua	Años
Sexo	Es el conjunto de las peculiaridades que caracterizan los individuos de una especie dividiéndolos en	Se registrará el sexo declarado por el sujeto en el momento de la inclusión.	Cualitativa dicotómica	Masculino Femenino

	masculinos y femeninos. 60			
Presencia de la enfermedad	Alteración más o menos grave de la salud. 59	Presencia de características clínicas de la enfermedad de Drusen (incluye todos los nombres alternos de la entidad).	Cualitativa dicotómica	Presente (+) Ausente (-)
Tiempo de diagnóstico evolución de la enfermedad	Determinar el carácter de una enfermedad mediante el examen de sus signos. 59	Identificación de la naturaleza de la enfermedad de Drusen mediante la observación de sus signos y síntomas característicos descritos.	Cuantitativa continua	Años
Lugar de origen	Que trae su origen de algún lugar, lugar de nacimiento del individuo. 59	Una de las 32 entidades federativas donde nació el individuo.	Cualitativa nominal	Entidad federativa
Agudeza visual	Es la capacidad de percibir con nitidez y precisión cualquier objeto de su entorno, producto de la integración anatómica y funcional del sistema óptico visual, mácula, vías visuales y las regiones de la corteza cerebral encargadas de su correcta interpretación. 59	Identificación de la agudeza visual con base en las tablas de Snellen, se indica en forma de fracción; donde el numerador corresponde a la distancia de contemplación real y el denominador expresa la distancia a la que un individuo con visión normal sería capaz de leer las letras correspondientes de la tabla de Snellen. Por tanto cuanto mayor sea el denominador, tanto peor es la visión	Cualitativa continua	20/20

Descripción general del estudio

Diseño y participantes

Se incluyeron por muestreo consecutivo de los sujetos con diagnóstico de drusas o enfermedad de Drusen, visión baja no secundaria a glaucoma, trauma, catarata, déficit vitamínico o enfermedad degenerativa, discromatopsia, escotomas, fotofobia, metamorfopsia, atrofia óptica, atrofia del nervio óptico, leucoma, neovascularización, alteración en el EPR, desprendimiento de retina y alteración o degeneración macular sin causa aparente de cualquier edad y género del Servicio de Oftalmología del Hospital de Pediatría CMN SXXI; además de haber identificado posibles candidatos por medio de las hojas de consulta de los últimos 5 años y del archivo muerto. El estudio se apegó a los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética. Todos los participantes firmaron un documento que garantiza el consentimiento informado.

El estudiante de maestría solicitó a los padres y/o tutores de los sujetos que cumplieron con los criterios de selección el consentimiento informado y/o asentimiento informado, al igual que a los padres y/o tutores y hermanos para la realización de los siguientes procedimientos:

1. Interrogatorio directo de datos demográficos (edad, género y lugar de origen).
2. Autorización para la toma de muestra de sangre periférica de 5ml para extracción de ADN genómico y secuenciación en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, IAP.

3. Utilización de los datos obtenidos y de los resultados del estudio molecular para el proyecto de investigación.

Los datos obtenidos del interrogatorio se registraron en la hoja de captura correspondiente. Como parte habitual de la atención clínica, durante la exploración para agudeza visual y fondo de ojo se otorgaron los datos necesarios para tratamiento y uso de lentes correctivos a los familiares que lo ameritaron. La exploración clínica se realizó en el Hospital de Pediatría CMNSXXI por medio de la Dra. Claudia Hernández Galván quien realizó la correlación clínica y determinó en caso necesario la fluorangiografía (FAG) y/o electrooculograma (OCT).

Procedimientos

Se estudiaron cuatro familias, de las cuales tres fueron familias mexicanas y un probando de descendencia alemana. De las tres familias mexicanas, dos presentaron casos en dos generaciones consecutivas; la familia alemana únicamente el probando aceptó entrar al estudio. A los participantes se les realizó exploración física que incluyó agudeza visual (tablas de Snellen); previa dilatación pupilar para examinar fondo de ojo con lámpara de hendidura, FAG y OCT. Las imágenes de OCT se obtuvieron utilizando el aparato 3D OCT-1000 (Topcon, Tokuo, Japan). El instrumento utiliza un espectómetro de Fourier que produce cortes seccionales B e imágenes volumétricas 3-D a una velocidad de 25,000 A / segundo. Se obtuvo un escaneo en cada ojo estudiado; la resolución axial fue de 7 μm y una resolución longitudinal de 10 μm , la longitud de escaneo fue de 6mm.

Análisis mutacional de *EFEMP1*

Extracción de DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el protocolo semiautomatizado *Quickgene system (Fujifilm, Japan)*.

- Pasos a temperatura ambiente (15-25°C)
- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente
- Calentar a 56°C para precalentar las muestras
- Equilibrar el buffer AE o agua destilada a temperatura ambiente

- Protocolo
- Verter 20 µl de proteinasa K en el fondo de un tubo de 1.5ml
- Agregar 200 µl de sangre total en el tubo de 1.5ml
- Agregar 200 µl de buffer AL a la muestra y pasar por el vortex durante 15 segundos.
- Incubar a 56°C por 10 minutos
- Centrifugar brevemente el tubo de 1.5ml para remover las burbújas
- Agregar 200 µl de etanol a la muestra y pasar por el vortex durante 15 segundos.
- Pasar la mezcla a una columna en un tubo colector de 2ml, cerrar y centrifugar a 6,000-8,000rpm durante 1 minuto.
- Abrir la columna y agregar 500 µl de buffer AW1 sin mojar el fondo o la cuenca, tapar y centrifugar a 14,000rpm durante 3 minutos.
- Abrir la columna y agregar 500 µl de buffer AW2 sin mojar el fondo o la cuenca, tapar y centrifugar a 14,000rpm durante 3 minutos
- Pasar el contenido de la columna a un tubo colector nuevo de 2ml, descartar el previo y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- 11 Pasar el centrifugado a un tubo nuevo de 1.5ml y descartar el anterior, agregar 200 µl de buffer AE e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 8,000rpm durante 1 minuto.

Primers

Los primers se obtuvieron a partir de la secuencia del gen reportada en ensembl.org (*ENSG00000115380*) y se diseñaron para ajustar las condiciones de acuerdo con

Exon	Pares de bases Forward	#AxT	Tm	Pares de bases Reverse	#AxT	Tm	Pares de bases del exón
3	F TCGCTTGTGCTCACTGCTAA	10x10	54.6°C	R CTCAGCAGAGTATAGCCCAA	10x10	54.6°C	273
4	F TTGGGCTATACTCTGCTGAG	10x10	54.6°C	R TGGCAACAATCCTTGTGCT	10x9	51.7°C	228
5	F CTGTCCTGTCTGTGTATTATACC	12x11	58.1°C	R ACGAGGTGCACCTGGGCAAAA	10x11	57.1°C	544
6	F GCTTAAGAAGTGCCAAAATGGAGG	13x11	58.5°C	R GCTACCACTCTCAAAGAAAC	11x11	55.2°C	307
7	F CTAGATAATGCTTCTCAGAGAATGC	15x10	57.2°C	R TTGCTGAAGGGAAGTCGATGG	10x11	57.1°C	450
8	F GTCAGCAGATGACGTAGGTA	10x10	54.6°C	R AGAATCCCATGGGTAAGCG	10x10	54.6°C	341
9	F CCAAAGTAGTGGTGCACAAAC	11x10	55.1°C	R CTCTGTCTCTTCTGGCTA	10x10	54.6°C	240
10-11	F CCTTGCAAACAGAATCTGCCA	10x11	57.1°C	R GCCTTACACAATGCCTACAC	10x10	54.6°C	589
11	F ATGGCGGCTCCGTTGTTATC	10x11	57.1°C	R CTATCAGATCGGATGCTCATG	11x10	55.2°C	237
12	F AAGAAGGGACCAAGTAGTGG	10x10	54.6°C	R GGGTGAGTGACAGTATAGAG	10x10	55.2°C	441

la humedad y temperatura del sitio de trabajo.

Condiciones para PCR:

H2O	Polimerasa: kappa	DNA (50-200ng)	Oligo F	Oligo R
Aforar a 15µl	7.5 µl	Según la concentración de cada muestra	0.3 µl	0.3 µl

95°C	95°C	Tm	72°C	72°C	4°C	Tiempo total
3 min	15 seg	15seg	15seg	7min	∞	
Inicio	Elongación por 40 ciclos			Fin		1:20h

Gel de agarosa: para analizar los productos de PCR

- 40ml de buffer TAE 1x
- 0.6mg de agarosa (concentración de 1.5%)
- 0.4µl de bromuro de etidio
- Verter la mezcla en la cámara y dejar secar por 20 minutos
- Agregar TAE 1x en frío a la cámara
- 1er pozo: 4µl de track it o ladder (escalera de peso molecular)
- Agregar 1 µl de acarreador a cada muestra y resuspender
- Poner las muestras en el resto de los pozos y cerrar la cámara

Cámara de electroforesis	90 mV	500 mA°	50 minutos
--------------------------	-------	---------	------------

Purificación de DNA a partir de gel de agarosa por medio de Qiaex II Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

- Obtener banda del amplificado de 400ng aprox en tubo eppendorf 1.5
- Adicionar 500 µl de buffer QG
- Incubar a 56°C por 10 minutos, hasta disolver el gel
- Pasar contenido del tubo a columna con tubo colector, centrifugar 1 min por 14,000rpm

- Adicionar 500 µl de buffer QG y centrifugar 1 min por 14,000rpm
- Descartar centrifugado
- Centrifugar columna vacía 1 min por 14,000rpm
- Lavar con 500 µl de buffer PE y centrifugar 1 min por 14,000rpm
- Descartar centrifugado
- Lavar con 500 µl de buffer PE y centrifugar 1 min por 14,000rpm
- Centrifugar columna vacía 1 min por 14,000rpm
- Pasar columna a tubo limpio eppendorf de 2.5ml
- Agregar 25 µl de agua previamente precalentada a 55°C por 5 min y centrifugar 1 min por 14,000rpm
- Electroforesis para cuantificar DNA

Secuenciación directa automatizada del gen *EFEMP1*

Se realizó secuenciación directa automatizada del gen mediante “*BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)*. Todas las muestras fueron analizadas en un secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y las secuencias *wild-type* de EFEMP1 fueron comparadas de manera manual.

PCR BigDye

H2O	DNA	BD	Buffer	Oligo F ó R	Tiempo
-----	-----	----	--------	-------------	--------

Aforar a 10 μ l	Entre 10 y 20ng/ μ l	0.5 μ l	3.5 μ l	0.5 μ l	2:20h
---------------------	-----------------------------	-------------	-------------	-------------	-------

Purificación Big Dye

- Colocar columnas con cephadex en tubos colectores y centrifugar a 2,800rpm por 3 min
- Descartar el sobrenadante del tubo colector
- Colocar en tubo de 1.5ml la columna
- Agregar al producto 10 μ l de H₂O y pasar a la columna de cephadex y centrifugar a 2,200rpm por 2min
- Retirar columna
- Liofilizar
- Resuspender con 20ml de formamida
- Desnaturalizar a 95°C por 5 min y pasar a hielo
- Secuenciar

Análisis estadístico

- No fue posible realizar un análisis descriptivo mediante frecuencias simples y porcentajes de las mutaciones encontradas, así como de las predicciones funcionales detectadas.

- No se encontró una frecuencia alélica consenso ya que todos los casos resultaron iguales a la secuencia wild type reportada.

Consideraciones éticas

El protocolo de investigación fue evaluado por el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud con número de Registro R-2014-3603-2. El presente estudio y los procedimientos se apegan al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, así como con la declaración de Helsinki y sus enmiendas de acuerdo con los siguientes apartados:

- a) **Riesgo de la investigación.** Debido a que es un estudio con riesgo mayor al mínimo por las implicaciones del diagnóstico en menores de edad se realiza carta de consentimiento informado y asentimiento. Se declara que por ningún motivo el objetivo del estudio se encuentra relacionado con pruebas de paternidad. En el caso de los menores de edad el resultado se le proporcionará al padre o tutor del menor, se explicará el mismo, así como el asesoramiento genético, en caso de que el padre o tutor decida que el menor de edad puede conocer el resultado, entonces será evaluado por la Psicóloga Gabriela Galicia Rojas del servicio de Genética Médica de la UMAE de Pediatría para saber si es candidato o no a saber el diagnóstico.
- b) **Posibles beneficios.** El sujeto de estudio no recibió ningún beneficio directo de su participación, sin embargo, los resultados del proyecto permitirán un aporte al conocimiento y descripción de la enfermedad en nuestro país; se

puede considerar beneficio el conocer el resultado del estudio molecular, ya que en este caso el diagnóstico clínico difiere del molecular.

- c) **Posibles riesgos.** Prácticamente no existieron riesgos, puesto que la única intervención de los investigadores de toma de muestra por punción venosa.
- d) **Balance riesgo-beneficio.** No existe un beneficio directo para el participante sino para la sociedad en relación con la obtención de información necesaria para una decisión diagnóstico terapéutica que podría influir en el pronóstico de los pacientes con esta patología y permitir más adelante la identificación de sujetos que potencialmente pueden beneficiarse del diagnóstico.
- e) **Confidencialidad.** Los investigadores se comprometen a resguardar los datos obtenidos de los sujetos de investigación, todos serán anónimos; para ello las hojas de recolección de datos confidenciales fueron identificadas con un número de folio consecutivo que corresponde con los datos confidenciales del sujeto y solo el tutor y el alumno de maestría tuvieron acceso a los mismos. Los datos de identificación fueron única y exclusivamente utilizados para el fin de la investigación y los investigadores se comprometen a no establecer ningún contacto con los sujetos de estudio o sus familiares.
- f) **Consentimiento informado.** La alumna de maestría (que no forma parte del grupo de los médicos tratantes de los sujetos de estudio) fue la encargada de entrevistarse con los sujetos de investigación para solicitar el consentimiento informado y explicar a detalle los procedimientos antes de la toma de muestra.
- g) **Selección de participantes.** Todos los sujetos participantes son o fueron derechohabientes del IMSS y se realizó muestreo consecutivo por criterios de modo que todos tuvieron la posibilidad de participar.

- h) **Conflictos de interés.** No existen conflictos de interés por parte de ninguno de los miembros del equipo de investigación en este proyecto.

Resultados

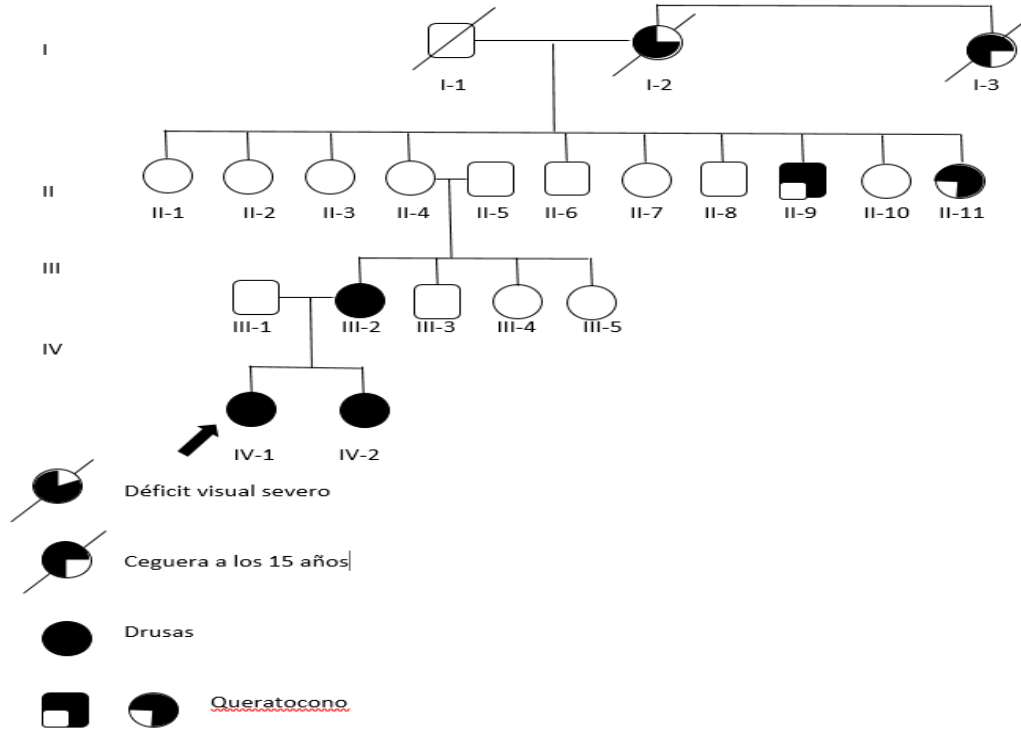
De enero del 2015 a enero del 2016 se identificaron un total de 100 pacientes con drusas o enfermedad de Drusen, visión baja no secundaria a glaucoma, discromatopsia, escotomas, fotofobia, metamorfopsia, atrofia óptica, atrofia del nervio óptico, leucoma, neovascularización, alteración en el EPR, desprendimiento de retina y alteración o degeneración macular sin causa aparente de cualquier edad y género mediante su búsqueda en hojas de registro de consulta diaria y revisión del expediente clínico para confirmar el diagnóstico de identificación. Se eliminaron y excluyeron del estudio a 96 individuos, quedando 4 sujetos con los siguientes diagnósticos: drusas, escotoma y atrofia del nervio óptico. Se consultaron los expedientes y se contactó a la familia del probando. A continuación, se describen los casos estudiados.

Familia 1

En este pedigrée se identificaron tres individuos (Figura 5) sintomáticos clínicamente compatibles con drusas (III-2, IV-1 y IV-2). El probando (IV-1) es una mujer de 19 años, hija de un matrimonio no consanguíneo originarios de Durango y residentes de la CDMX; que inició sintomatología a los 9 años de edad con escotoma y disminución de la AV progresiva. Inició uso de lentes a los 5 años, tras su revisión clínica oftalmológica se le otorgó el diagnóstico de drusas encontrando

lo siguiente en la exploración de fondo de ojo: Ojo derecho (OD) lesiones blanquecinas en región temporal a la mácula; FAG las lesiones blanquecinas presentan múltiples puntos hiperfluorescentes por transmisión coroidea temporal a la mácula que se extienden en arcada vascular inferior y peripapilar; Ojo izquierdo (OI) lesiones blanquecinas temporales; FAG puntos hiperfluorescentes temporales a la mácula que se extienden al sector peripapilar. La hermana mayor (IV-2) de 22 años de edad inició uso de lentes a los 10 años por disminución de la agudeza visual progresiva, OD y OI lesiones temporales en mácula. FAG OD-OI con puntos que se extienden hacia la región peripapilar. La madre del probando (III-2) inició uso de lentes a los 6 años por disminución de la agudeza visual progresiva, a los 8 años se le diagnostica queratocono. OD y OI: cambios pigmentarios en polo posterior y área macular, atrofia del EPR y lesiones en la mácula. FAG OD-OI lesiones blanquecinas en región temporal a la mácula, múltiples puntos hiperfluorescentes por transmisión coroidea en área temporal que se irradian sobre arcada vascular inferior y se extienden al sector peripapilar.

Figura 5. Familia 1

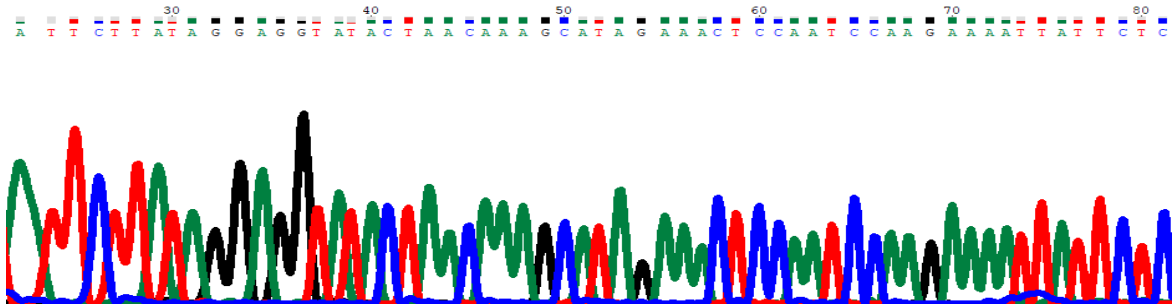


Fotos clínicas



A) Fotografía de fondo de ojo derecho en la que se observa papila naranja con drusa en borde nasal, resto del borde del disco bien definida, excavación 30%, resto sin alteraciones. B) fotografía aneritra del mismo ojo.

El electroferograma muestra secuencias sin cambios, igual a la silvestre reportada en ensambl.

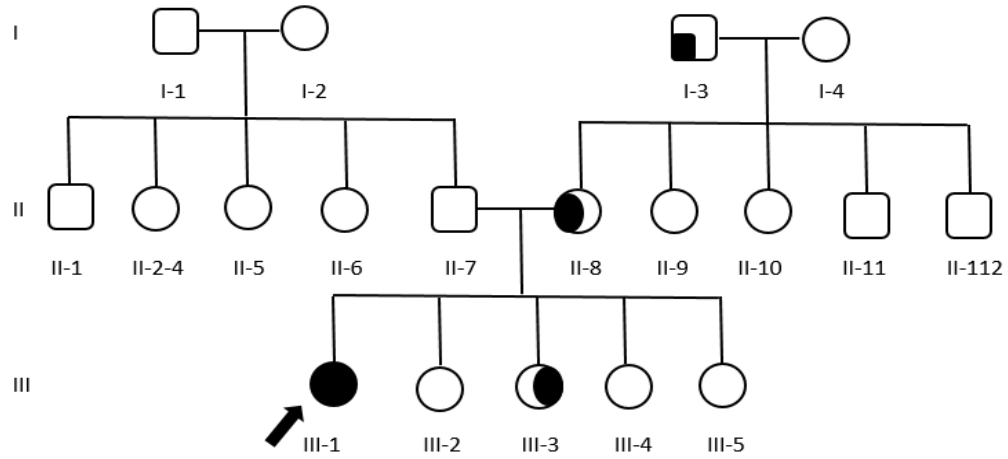


Familia 2.

En este pedigree se identificaron cuatro individuos (Figura 6) sintomáticos clínicamente compatibles con drusas (II-8, III-1, III-3 y III-4). El probando (III-1) es una mujer de 20 años, hija de un matrimonio no consanguíneo originarios de Michoacán y residentes de la CDMX; los padres portan los mismos apellidos pero a la inversa, son de poblados distintos y niegan ancestros en común. El probando inició sintomatología a los 8 años de edad con escotoma y disminución de la AV progresiva en ojo izquierdo. Inició uso de lentes a los 9 años, tras su revisión clínica oftalmológica inicial se otorgó el diagnóstico de drusas encontrando lo siguiente en la exploración de fondo de ojo: OD sin alteraciones. OI a través de medios claros en el sector nasal de la papila neoformación blanca sobre vasos emergentes de papila de aproximadamente 0.25 de diámetro papilar que sobresale del plano papilar hacia la cavidad vítrea con forma redondeada. FAG OD de características normales. OI

foto sin medio de contraste de la neoformación tiene pseudohiperfluorescencia, la cual se acentúa en las fases arteriovenosa temprana y tardía con medio de contraste (Figura 7). La madre del probando (II-8) de 45 años refiere no usar lentes aunque sí le han sido prescritos en previas ocasiones, inició sintomatología en la adolescencia con disminución de la agudeza visual. FO ambos ojos (AO): se observa a través de medios claros nervio óptico de forma, tamaño, color y bordes de aspecto normal, emergencia de vasos central. OD creciente coroidea discreta en temporal. OI creciente coroidea discreta temporal y nasal con retina de polo posterior con tortuosidad venosa leve. FAG AO tanto en fases arteriovenosas tempranas como tardías del estudio se observa pseudo hiperfluorescencia en el área creciente coroidea, resto sin alteraciones (Figura 8). Hermana mayor de 22 años de edad (III-3) que inició sintomatología a los 18 años de edad con escotoma intermitente. FO AO a través de medios claros se observa papila de ambos ojos de características normales. FAG OD de características normales. OI en fases arteriovenosas tempranas y tardías se observa microaneurisma paramacular superior, sin otras alteraciones (Figura 9). El resto de las hermanas (III-2, III4 y III-5) fueron exploradas sin encontrar datos de lesiones o características anormales.

Figura 6. Familia 2







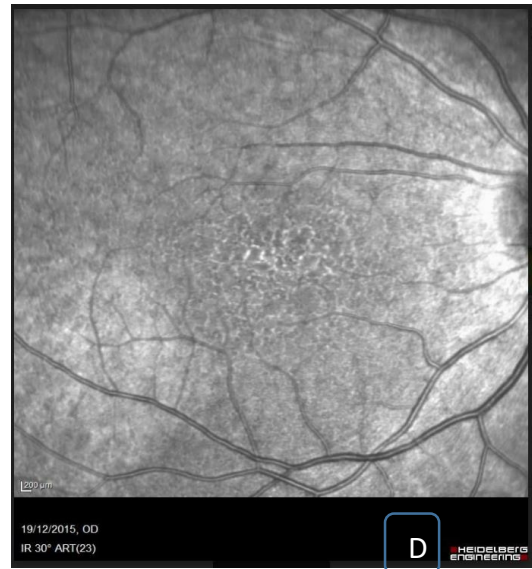
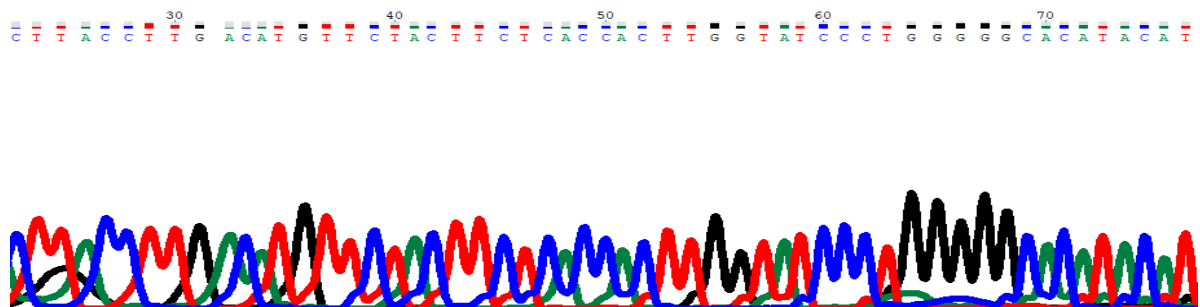
-  Catarata izquierda
-  Tortuosidad venosa
-  Drusas
-  Aneurisma

Figura 7.



C) Mácula con cambios pigmentarios, con presencia de hipo e hiperpigmentacion y patrón parcialmente poligonal. D) OCT Macular: Muestra despegamientos drusenoides del EPR confluentes con distorsión en la alineación de los fotoreceptores. Membrana de Bruch y capas internas conservadas.

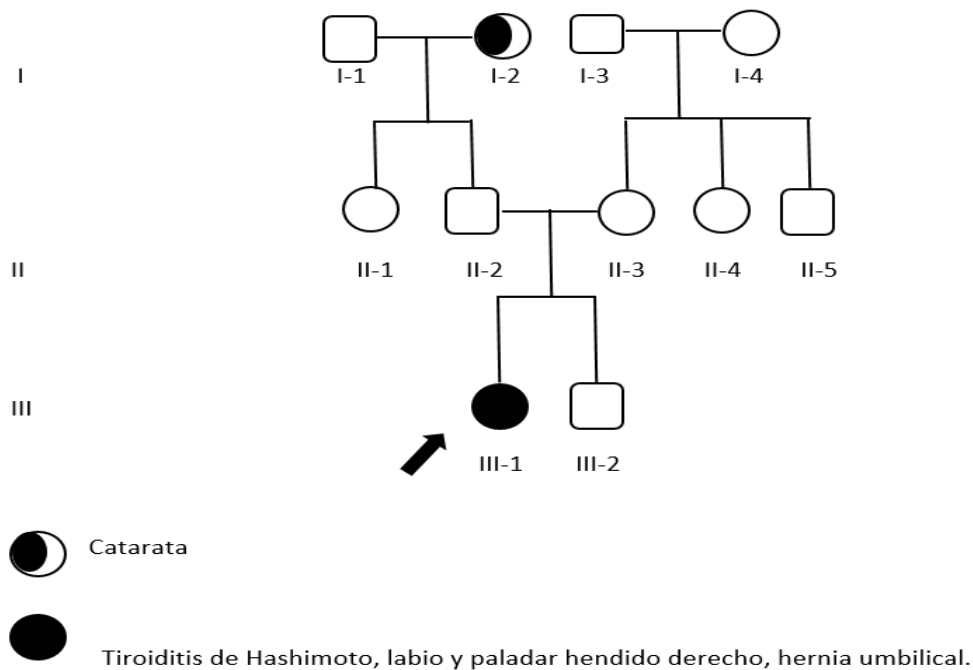
El electroferograma muestra secuencias sin cambios, igual a la silvestre reportada en ensambl.



Familia 3.

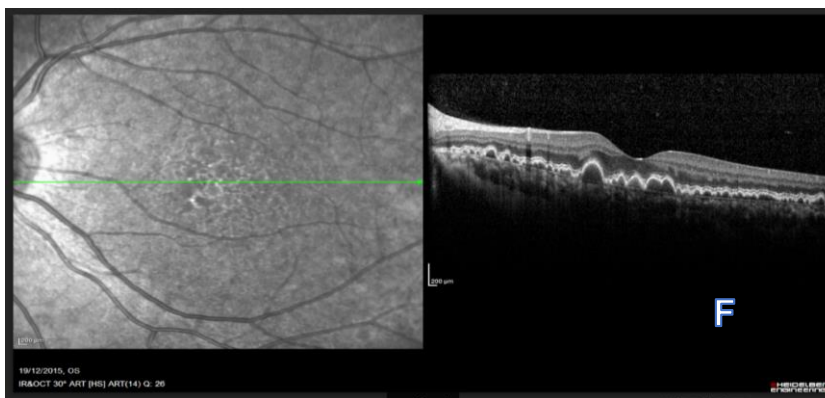
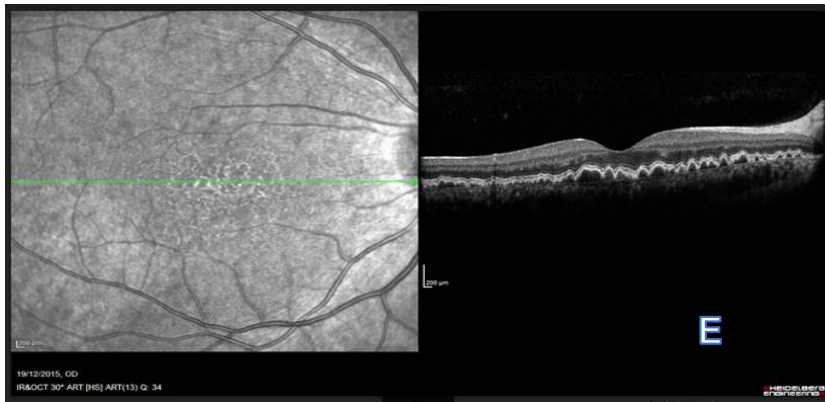
En este pedigrée se identificó a un sujeto (Figura 6) sintomático clínicamente compatible con drusas (II-8, III-1, III-3 y III-4)). El probando (III-1) es una mujer de 21 años, hija de un matrimonio no consanguíneo, rama paterna originarios de Alemania, rama materna originarios de España, ella y sus padres radican en Cuernavaca, Morelos. Inicia sintomatología a los 15 años con metamorfopsias de predominio derecho, en Morelos fue diagnosticada como probable distrofia retiniana por drusas. A la exploración se observan drusas blandas en ambos ojos en fóvea y parafovea y perifovea.

Figura 6. Familia 3

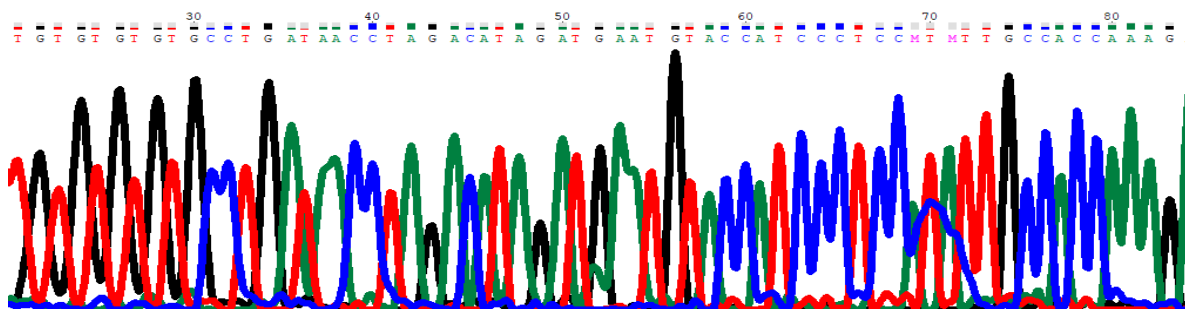


La OCT (tomografía de coherencia óptica con corte horizontal en zona foveal) en ojo derecho (E) y en ojo izquierdo (F) se observa irregularidad en el trayecto de las capas externas de retina a expensas de ondulamiento del epitelio pigmentado de la

retina con presencia de hiperreflectividad subyacente compatible con múltiples despegamientos drusenoides en dicha zona, se observa también línea de fotorreceptores íntegra.

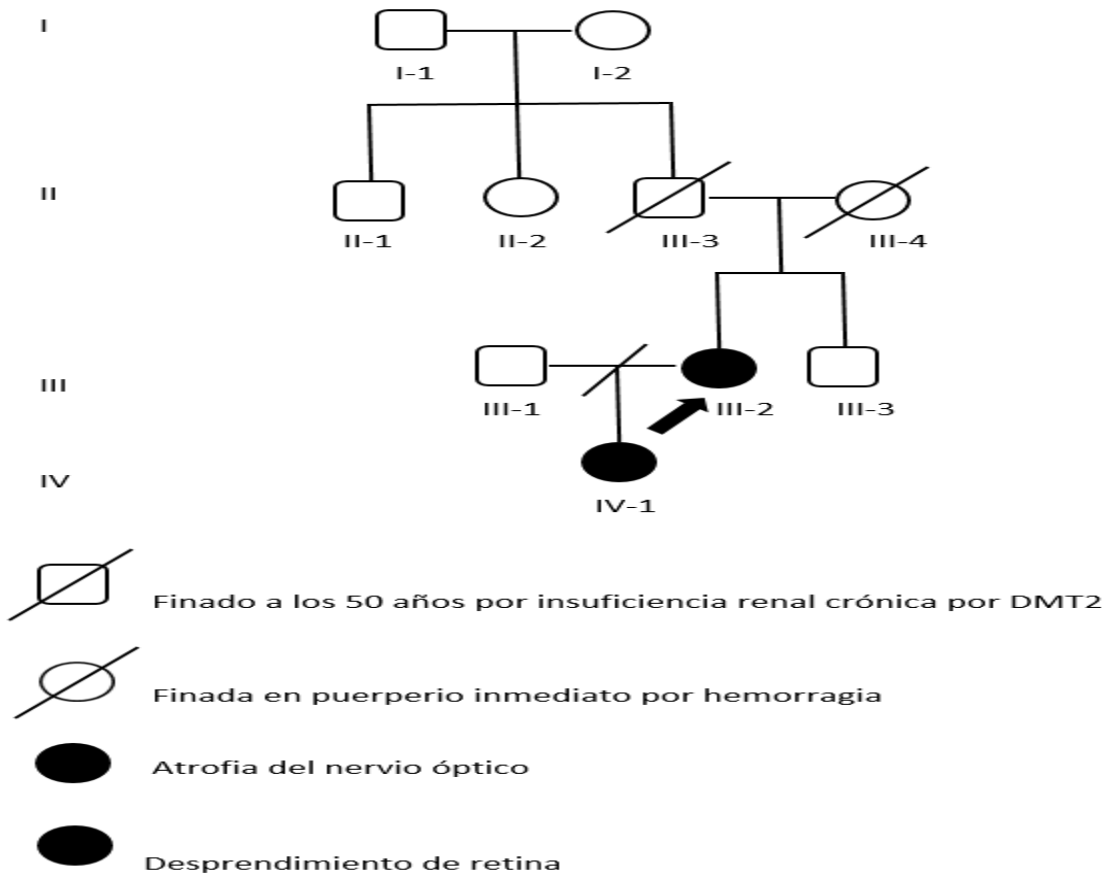


El electroferograma muestra secuencias sin cambios, igual a la silvestre reportada en ensambl.

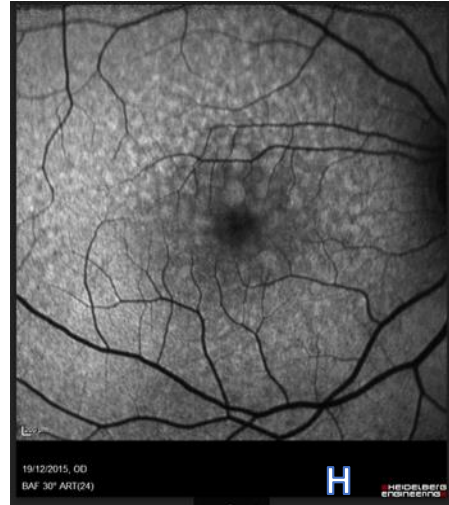
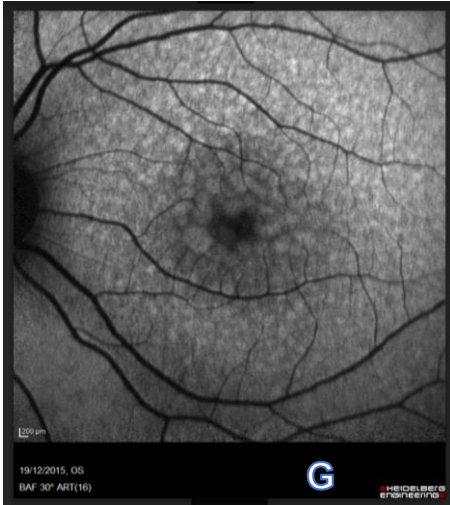


Familia 4.

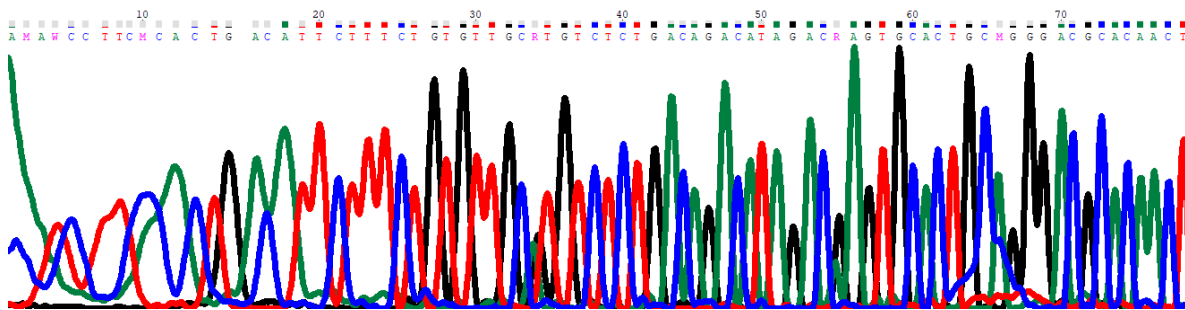
El último pedigree conformado por el probando III-2, una mujer de 23 años de edad hija de padres no consanguíneos, madre finada durante el puerperio inmediato, padre finado por por insuficiencia renal secundaria a DMT2, sin más antecedentes familiares. El probando refiere disminución de la agudeza visual desde los 15 años, siendo diagnosticada como atrofia del nervio óptico a los 17 años.



Las imágenes por autofluorescencia en ambos ojos (ojo derecho G) y (ojo izquierdo H) correspondientes a la zona macular donde se observa el trayecto de los vasos con adecuado caliber, los cuales emergen del nervio óptico, además de presencia de puntos hipoautofluorescentes difusos no confluentes de distintos tamaños en zona macular.



El electroferograma muestra secuencias sin cambios, igual a la silvestre reportada en ensambl.



Discusión

El resultado para la identificación de la mutación reportada y conocida fue negativo en todos los sujetos. Así mismo, tampoco se encontró ningún polimorfismo o cambio en la secuencia de los sujetos estudiados.

En el 2003 se propuso que existe heterogeneidad genética, donde en teoría existen más de una mutación distinta en el mismo gen que origina la enfermedad, en el mismo año se lograron estudiar 10 familias, de la cuales solamente el 6% de los sujetos presentaron la mutación conocida R345W, mientras que en el resto de los sujetos no se detectó otra mutación, surgió entonces la sospecha de que el promotor estuviera involucrado generando así una mutación en el mismo locus. Con base en ambas teorías: a) heterogeneidad genética y b) mutaciones en regiones promotoras y con el fin de resolver ambas interrogantes; heterogeneidad genética y mutaciones en otras regiones que no fueran exones, los primers para este estudio fueron específicamente diseñados con secuencias que incluyen regiones tanto intrónicas como del promotor sin embargo, los resultados no mostraron alteración a este nivel cuando se compararon las secuencias obtenidas de cada individuo con la secuencia “wild type” o silvestre reportada en ensembl.org.

Cabe destacar que existen estudios que con individuos clínicamente afectados con drusas que no presentan la mutación conocida, pero presentan una mutación descrita hasta en el 33% de los individuos, la cual también provoca un cambio de sentido en el gen, siendo 399C → a G133G, sin embargo, esta mutación tampoco

fue encontrada en la muestra estudiada cuando fue comparada con la secuencia “wild type”.

Se sabe que la población mexicana comparte hasta un 6% de genes de población asiática, existe un estudio de China del Norte donde se reporta la incidencia de drusas en el nervio óptico de 1:1,000 adultos jóvenes sin embargo las secuencias de la muestra estudiada fue negativa comparada con la secuencia “wild type” conocida.

Uno de los casos estudiados cuenta con ascendencia europea, clínicamente con drusas sugerentes de la enfermedad en cuestión pero a nivel molecular sus secuencias no fueron distintas al wild type reportado.

Por otro lado, los ojos estudiados fueron en su mayoría de mujeres y solamente un varón aceptó participar, por lo que se pensó en herencia y/o alteración de tipo mitocondrial, pues se sabe que existen alteraciones mitocondriales que afectan a las células del epitelio pigmentario de la retina y que éstas influyen de manera directa en el fenotipo celular y viabilidad de los fotorreceptores. Aun cuando solo se ha demostrado disfunción mitocondrial en glaucoma y retinopatía diabética, se sabe que la propia disfunción mitocondrial afecta el estrés oxidativo que está asociado directamente con enfermedades retinianas como Síndrome Kearns-Sayre, Síndrome de Neuropatía, Atrofia Óptica Dominante, Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber, Ataxia y Retinitis Pigmentosa, Retinitis Pigmentosa, distrofia de conos y bastones y enfermedad de Stargardt. No obstante, los casos estudiados no

mostraron datos sugerentes de alteración mitocondrial a nivel ocular ni sistémico. Las únicas distrofias maculares mencionadas por alteración mitocondrial son la enfermedad de Stargardt; pero la revisión oftalmológica clínica completa no reveló ningún dato de ella en los casos estudiados.

Por ende, las siguientes dos patologías también están influidas por alteración mitocondrial además del gen causal que cada una tiene; la distrofia de conos y bastones (*CORD7*) y la distrofia macular de Carolina del Norte (NCMD). La distrofia macular de Carolina del Norte se puede presentar en individuos jóvenes y con sintomatología similar, también produce drusas pero es originada por otro gen en otro locus distinto; no obstante, la revisión oftalmológica no fue sugerente para ella, aunque con un resultado negativo para *EFEMP1* pudiera ser útil contrastarlo con su principal diagnóstico diferencial.

Una buena propuesta y como posibilidad factible es realizar secuenciación de nueva generación (también conocida como secuenciación masiva paralela o secuenciación de siguiente generación) ya que a diferencia de la secuenciación convencional Sanger proporciona una resolución para detectar variantes de pequeño tamaño y su limitante es solo poder realizar entre 96 a 384 reacciones en paralelo. Por otro lado, la ventaja de realizar secuenciación de siguiente generación es el potencial que tiene para detectar todos los tipos de variación genómica incluyendo SNPs (variantes de nucleótido único por sus siglas en inglés) y pequeñas indels, cambios en el número de copia (CNV), variantes estructurales y nuevas inserciones.

Por otro lado, también sería factible realizar secuenciación del exoma completo ya que ésta permite revelar que el fenotipo observado no corresponde al fenotipo esperado característico de la enfermedad.

Conclusiones

La misma naturaleza de la enfermedad dificulta su estudio no obstante, la atención y el abordaje clínico es integral. Es necesario estudiar este tipo de patología ya que se desconoce la frecuencia de presentación en nuestro país además de que el factor etiológico en este caso sigue siendo una interrogante. Realizar secuenciación de siguiente generación es una alternativa viable para investigar el origen y causa de la patología en cada caso.

Referencias

1. Boletín Oficial del Estado. 2007. Núm 159. Ley de Investigación Biomédica
2. Lee Rowen. Gene Structure and Organization ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES & 2005. Institute for Systems Biology, Seattle, Washington, USA
3. Kimitsuna Watanabe. Genetic Code: Introduction. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES © 2002, University of Tokyo, Tokyo, Japan
4. Ossowski S, Schneeberger K, et al. "The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in *Arabidopsis Thaliana*." *Science (New York, N.Y.)* 327:5961 (2010): 10.1126/science.1180677. *PMC*.
5. Alan F Wright. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES & 2005, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, UK.
6. Strom PS, Gorin MB, et al. Evaluation of autosomal dominant retinal unaffected cohort suggests rare or private often be benign. *Molecular Vision* 2013; 19:980-985.
7. Tuo J, Bojanowski CM, et al. Genetic factors of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23(2): 229–249.
8. Base de datos de genes humanos y fenotipos, de libre acceso, editado y autorizado por el Instituto de Medicina Genética McKusick-Nathans, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Johns Hopkins, disponible en: OMIM online mendelian inheritance in man <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
9. Piguet B, Haimovici R, et al. Dominantly inherited drusen represent more than one disorder: A historical review. *Eye* (1995) 9, 34-41.
10. Hendrik PN, et al. An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Molecular Vision* 2007; 13:196-205.
11. Pfriem M, et al. Unsuccessful surgical excision of optic nerve drusen. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2011) 249:1583–1585
12. Im, L. Herndon, LW. Optic Nerve Head Drusen and Glaucoma. *Glaucoma Today.* Jan/Feb 2005; 13-18.
13. Arnaiz-Villena A, et al. The Origin of Amerindians and the Peopling of the Americans According to HLA Genes: Admixture with Asian and Pacific People. *Curr Genomics.* 2010. 11(2):103-114.
14. Vargas-Alarcon G, et al. Origin of Mexican Nahuas (Aztecs) according to HLA genes and their relationships with worldwide populations. *Mol. Immunol.* 2007;44:747-755.
15. You QS, et al. Prevalence of optic disc drusen in an adult Chinese population: the Beijing Eye Study. *Acta Ophthalmol.* 2009 Mar;87(2):227-8.
16. Tartelin EE, et al. Molecular genetic heterogeneity in autosomal dominant drusen. *J Med Genet* 2001;38:381–384
17. Michaelides M, et al. Maculopathy Due to the R345W Substitution in fibulin-3: Distinct Clinical Features, Disease Variability, and Extent of Retinal Dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3085-3097.
18. Rozet JM, et al. Les dystrophies maculaires héréditaires. *J Fr Ophtalmol.*, 2005; 28, 1, 113-124.
19. Narendran N, et al. Analysis of the EFEMP1 gene in individuals and families with early onset drusen. *Eye* 2005;19,11-15.
20. Zhang Y, et al. Focus on Molecules: Fibulin-3 (EFEMP1). *Exp Eye Res.* 2010 March ; 90(3): 374–375.
21. Gerth C, et al. Retinal microstructures in patients with EFEMP1 retinal dystrophy evaluated by Fourier domain OCT. *Eye* 2009;23(2): 480-483.

22. Marmorstein L. Association of *EFEMP1* with malattia leventinese and age macular degeneration: a mini-review. *Ophthalmic Genet.* 2004(3):219-26.
23. Yates JR, et al. Genetic susceptibility to age related macular degeneration. *J Med Genet* 2000;37:83–87.
24. Paulus TVM, et al. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:1474–85.
25. Chang MY, et al. Optic Disc Drusen in Children. *Surv Ophthalmol.* 2016; 61(6): 745-758.
26. Ding X, et al. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 2009;28(1):1–18.
27. Green Richard W. Histopathology of age-related macular degeneration. *Molecular Vision* 1999;5:27.
28. Crabb JW, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99(23):14682–14687.
29. Booij JC, et al. A new strategy to identify and annotate human RPE-specific gene expression, manuscript in preparation. *PLoS ONE* 5(5):e9341.
30. Booij JC, et al. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in Retinal and Eye Research* 29 (2010) 1–18.
31. Argraves WS, et al. Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO reports* 4, 1127–1131 (2003).
32. Argraves WS, et al. (1990) Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J. Cell Biol.*1990;(111):3155–3164.
33. Gunter K, et al. Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of Fibulin-1-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(20):7025-7034.
34. Chaudhry SS, et al. Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. *Hum. Mol. Genet.*, 2001;10:835–843.
35. Timpl R, et al. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003,4:479–489.
36. Lotery AJ, et al. A single *EFEMP1* mutation associated with both Malattia Leventinese and Drayton honeycomb retinal dystrophy. *Nature Genet.* 1999;22(2): 199–202.
37. Blackburn J, et al. Transcriptional Regulation and Expression of the Dominant Drusen Gene *FBLN3 (EFEMP1)* in Mammalian Retina. *IOVS*, November 2003, Vol. 44, No. 11
38. Mullins RF, et al. Fibulin-5 Distribution in Human Eyes: Relevance to Age-Related Macular Degeneration. *Exp Eye Res.* 2007;84(2):378-380.
39. Base de datos libre y gratuita entre EMBL – EBI y el Instituto Sanger de Fideicomiso que desarrolla un sistema de software que produce y mantiene automáticamente anotaciones en genomas de vertebrados y eucariotes. Disponible en: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens
40. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>
41. http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/appendix_a
42. Ramensky V, et al. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30(17):3894-3900 (2002)
43. Hulleman JD, et al. Compromised mutant *EFEMP1* secretion associated with macular dystrophy remedied by proteostasis network alteration. *Molecular Biology of the Cell.* 2011
44. Gregory CY, et al. The gene responsible for autosomal dominant Drayton's honeycomb retinal dystrophy (DHRD) maps to chromosome 2p16. *Hum Mol Genet.* 1996 Jul;5(7):1055-9.
45. Kniazeva M, et al. A new locus for dominant drusen and macular degeneration maps to chromosome 6q14. *Am J Ophthalmol.* 2000;130:197–202.
46. Heon E, et al. Linkage of autosomal dominant radial drusen (malattia leventinese) to chromosome 2p16-21. *Arch Ophthalmol.* 1996;114(2): 193–8.

47. Gregory CY, et al. The gene responsible for autosomal dominant Doyme's honeycomb dystrophy (DHRD) maps to chromosome 2p16. *Hum Mol Genet.* 1996;7:1055–9.
48. Pearce WC. Genetic aspects of Doyme's honeycomb degeneration of the retina. *Am Hum Genet.* 1967;31:173–80.
49. Michaelides M, et al. The genetics of inherited macular dystrophies. *J Med Genet* 2003;40:641-650.
50. Downs K, et al. Molecular testing for hereditary retinal disease as part of clinical care. *Arch Ophthalmol.* 2007 Feb;125(2):252-8
51. Lenassi E, et al. Laser clearance of drusen deposit in patients with autosomal dominant drusen (p.Arg345Trp in EFEMP1). *Am J Ophthalmol.* 2013 Jan;155(1):190-8.
52. www.imss.gob.mx/comunicacion/comunicados2012/.../135_DOC.doc (última revision noviembre 15 2016)
53. Ayala-Ramirez R, et al. A new autosomal recessive syndrome consisting of posterior microphthalmos, retinitis pigmentosa, foveoschisis, and optic disc drusen is caused by a *MFRP* gene mutation. *Molecular Vision* 2006; 12:1483-9
54. Ayala-Ramirez R, et al. A Novel Mutation Confirms *MFRP* as the Gene Causing the Syndrome of Nanophthalmos–Reninitis Pigmentosa–Foveoschisis–Optic Disk Drusen. *Am J Ophthalmol* 2008;146:323-328.
55. Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Hopkin, Karen; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter (2014). *Essential Cell Biology* (4 ed.). New York, NY: Garland Science. p. 659. *ISBN 978-0-8153-4454-4*.
56. Allaby, Michael, ed. (2009). *A dictionary of zoology* (3rd ed.). Oxford: Oxford University Press. *ISBN 9780199233410. OCLC 260204631*
57. "Genotype definition - Medical Dictionary definitions". *medterms.com*.
58. Wilkie AOM. Dominance and Recessivity Andrew. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES & 2005*, doi: 10.1038/npg.els.0005475
59. Sitio Web. Diccionario de la Lengua Española [Internet]. Available from:<http://buscon.rae.es/drae/html/cabecera.htm>
60. Haag ES (2007). «Why two sexes? Sex determination in multicellular organisms and protistan mating types». *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18: 348-9