



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

“Estudio de asociación genética del polimorfismo rs121908120 como factor de riesgo para el desarrollo de Queratocono”

TESIS

Que para obtener el grado en
Especialidad en Oftalmología

PRESENTA

David Lozano Giral

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz

Ciudad Universitaria, CDMX, 2019



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 DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| 1. Abstract | 3 |
| 2. RESUMEN | 3 |
| 3. ANTECEDENTES TEÓRICOS | 4 |
| 3.1 El Queratocono Como Enfermedad | 4 |
| 3.2 Epidemiología del Queratocono | 5 |
| 4.3 Fisiopatología del Queratocono | 5 |
| 3.4 Diagnóstico del Queratocono | 6 |
| 3.5 Biomecánica Corneal..... | 7 |
| 3.6 Aspectos y Estudios Genéticos | 8 |
| 3.6.1 Estudios de Ligamiento Para Queratocono..... | 9 |
| 3.6.2 Análisis de Genes Candidatos (Queratocono) | 10 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 11 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 12 |
| 6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 13 |
| 7. OBJETIVOS | 13 |
| 7.1 General..... | 13 |
| 7.2 Específicos | 13 |
| 8. METODOLOGÍA | 13 |
| 8.1 Diseño del Estudio..... | 13 |
| 8.2 Pacientes Y Controles | 13 |
| 8.3 Criterios de Inclusión (Casos)..... | 14 |
| 8.4 Criterios de Inclusión (Controles)..... | 14 |
| 8.5 Criterios de Exclusión (Casos)..... | 14 |
| 8.6 Criterios de Exclusión (Controles)..... | 15 |
| 8.7 Criterios de Eliminación (Casos y Controles)..... | 15 |
| 8.8 Análisis Genético Por Discriminación Alélica (rtPCR con Sondas Taqman)..... | 15 |
| 8.9 Análisis Estadístico | 17 |
| 9. CONSIDERACIONES ÉTICAS | 17 |
| 10. PRESUPUESTO | 17 |
| 11.1 Institución de salud pública vinculada | 18 |
| 11. Infraestructura Disponible en la Institución | 18 |
| 12. RESULTADOS | 18 |
| 12.1 Distribución de Datos (Casos y Controles)..... | 18 |
| 13.2 Concentración de ADN y Dilución..... | 20 |
| 12.3 Diseño De Sondas Taqman y Localización Genética | 20 |
| 12.4 Estandarización de rtPCR (Discriminación Alélica) | 22 |
| 12.5 Análisis Estadístico por medio de prueba de Chi-Cuadrada..... | 25 |
| 13. DISCUSIÓN | 27 |
| 14. CONCLUSIONES | 29 |
| 15. BIBLIOGRAFIA | 30 |

1. Abstract

The objective of the present study, is to report the genetic frequency of the variant *rs121908120* of WNT10A gene, which induces risk of presenting Keratoconus in a Mexican population. Recruitment of participants for the study was regulated individually by inclusion criteria (clinical diagnosis or family history of keratoconus for cases or individuals with no family history or clinical diagnosis of Keratoconus), followed by recollection of clinical data and blood samples. Genetic sequencing was employed along with allelic discrimination of WNT10A gene in a sample of 100 cases and 100 controls to report the polymorphisms frequency and establish if the variant can be used as a genetic marker for early detection programs for people who are at risk of developing Keratoconus. This is a transversal and descriptive study, where the was only one measurement made (genotyping) in individuals with clinical signs of the disease, and others without it. Genetic frequencies of the variant for cases and controls were compared and a statistical analysis was then made for this observed frequency in each study group to identify if this variant promotes risk of developing Keratoconus in our Mexican population.

2. RESUMEN

El Queratocono (QTC) es una patología relativamente frecuente que afecta aproximadamente a 1 por 2000 individuos en la población general, principalmente en edades tempranas. Se caracteriza por ser una ectasia corneal no inflamatoria, usualmente bilateral y relativamente común, descrita inicialmente en 1854 y que en la actualidad es una de las indicaciones más comunes de trasplante corneal. Típicamente se manifiesta en la pubertad y progresa hasta la tercera o cuarta década de la vida. La etiología del QTC no es totalmente conocida, sin embargo, algunos autores afirman que es una condición multifactorial que representa el final de una vía común de diferentes procesos patológicos; sin embargo, los casos familiares reportados son pocos, pero es evidente la participación de factores genéticos.

El QTC es una de las enfermedades oculares más discutidas, revisadas y menos comprendidas en la Oftalmología actualmente. En su mayoría, los casos de QTC son de tipo aislado; sin embargo, se han documentado modos de herencia autosómico recesivo, así como autosómico dominante con penetrancia reducida. Se ha documentado que los familiares directos de personas que sufren de QTC, tienen un elevado riesgo de padecer la enfermedad comparado con la población general. Dentro de las opciones de manejo, se encuentran los lentes aéreos, lentes de contacto y en casos avanzados el implante de anillos intraestromales,

procedimientos que algunas veces de forma parcial brindan, la corrección refractiva, sin detener con ello la progresión de la enfermedad, ocasionando que del 5 al 21% de los pacientes requieran un trasplante corneal en estados avanzados. 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, pruebas clínicas de variantes genéticas, tratamiento y manejo.

El objetivo del presente estudio es reportar la frecuencia de la variante genética *rs121908120* del gen *WNT10A* que confiere riesgo para desarrollar QTC y determinar si puede ser utilizada como marcador genético con la finalidad de establecer las bases para programas de identificación temprana de individuos con riesgo genético elevado de desarrollar esta complicación. El reclutamiento de 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 muestras de sangre para la extracción de DNA; se llevó a cabo una PCR inicial del gen a partir de DNA genómico, y posterior una secuenciación automatizada, haciendo un reporte de los resultados preliminares. Encontrando que el gen *WNT10A* juega un importante papel en la estabilidad corneal y que la variante genética *rs121908120* no es un factor de riesgo para el desarrollo de QTC en nuestra población mexicana.

3. ANTECEDENTES TEÓRICOS

3.1 El Queratocono Como Enfermedad

La palabra Queratocono (QTC) deriva del griego κέρατο- "cuerno, córnea" y κώνος "cono" y hace referencia a una condición patológica, clasificada dentro del grupo de las ectasias corneales [1]. Es una enfermedad progresiva, bilateral y generalmente asimétrica, existiendo una reducción de la resistencia mecánica de la córnea como característica principal [2]; la mayoría de los casos son de causa idiopática y resultan de un adelgazamiento no inflamatorio del estroma corneal [3].

Esta patología es responsable del deterioro progresivo de la visión, debido a cambios secundarios en la córnea que alteran su forma y producen un adelgazamiento y un debilitamiento biomecánico [4], el adelgazamiento suele ser central o paracentral inferior, con protrusión cónica central de la córnea, que produce el aumento progresivo de la curvatura, cursando con miopía y astigmatismo irregular principalmente en adolescentes y los síntomas empeoran durante la progresión de la enfermedad [5].

En 1854 John Nottingham, médico británico, describió con claridad esta patología y la diferenció de otro

tipo de ectasias corneales, reportándola como un tipo de “corneas cónicas” señalando sus características clásicas, entre las que incluye debilidad corneal y mala adaptación a lentes de contacto para corregir la ametropía [6]. En 1859 el cirujano británico William Bowman usó el oftalmoscopio para diagnosticar el queratocono y describió como graduar el ángulo en el espejo del instrumento para ver de la mejor manera la forma cónica de la córnea [7].

3.2 Epidemiología del Queratocono

Los reportes de incidencia y prevalencia varían significativamente, la prevalencia de la enfermedad oscila en rangos de 50 a 230 por cada 100.000 individuos a nivel mundial [8,9]. Otros describen una incidencia aproximada de 1 en 2000 en la población general y se puede detectar de manera incidental en casi el 5% de los pacientes con alta miopía que acuden a consulta interesados en cirugía refractiva [10,11]. Respecto a las estimaciones de prevalencia por sexo, hay quienes sostienen que afecta a ambos por igual, mientras que un estudio muestra que el riesgo relativo de padecer Queratocono sería de 2.34 veces superior en hombres que en mujeres [4].

4.3 Fisiopatología del Queratocono

Esta patología típicamente comienza en la pubertad y es de progresión variable hasta aproximadamente la tercera década de la vida, momento en el que su progresión disminuye o incluso se detiene. Puede afectar un ojo inicialmente, pero con frecuencia es bilateral con afección asimétrica, un ojo con mayor severidad que el otro. La pérdida visual ocurre primariamente por astigmatismo irregular y de forma secundaria por cicatrices corneales [3,12]. Entre el 12-20% de los individuos afectados pueden requerir trasplante corneal durante la segunda o tercera década de la vida [13,14]. Los hallazgos histopatológicos clásicos de las corneas humanas con queratocono, incluyen adelgazamiento estromal, depósitos de hierro en la membrana basal del epitelio y rupturas en la membrana de Bowman, se aprecian también en la biomicroscopía signos clínicos de la enfermedad como estrías de Vogt, anillo de Fleischer e hidrops Corneal, estos signos clínicos pueden variar dependiendo de la etapa de la enfermedad.

Los principales hallazgos reportados en córneas con Queratocono son alteraciones en la Membrana de Bowman, [2,15] la cual presenta rupturas en sitios donde es atravesada por terminales nerviosas, invadida por queratocitos provenientes del estroma anterior y por células epiteliales [16]. Los queratocitos son activados por las interleucinas liberadas por el epitelio induciendo la apoptosis, donde hay liberación de enzimas colagenolíticas; esto se convierte en un proceso crónico que va a dar origen a una pérdida más acentuada en el estroma anterior, derivando en un adelgazamiento localizado y progresivo del tejido corneal

[17].

Al evaluar estas corneas patológicas con microscopía confocal *in vivo*, sobresale una disminución en la densidad de los queratocitos en el estroma anterior y un espesor total adelgazado, en comparación con corneas normales. Estos cambios estructurales alteran la capacidad de respuesta de las corneas queratocónicas, generado por una debilidad estructural haciendo que la córnea como estructura integral, ceda ante factores tales como la presión intraocular [18]. El Queratocono es comúnmente un desorden aislado, sin embargo, se ha descrito que puede existir una asociación con algunas patologías como atopia (aumentado por el frote ocular que genera el trauma constante), Síndrome de Down, amaurosis congénita de Leber y prolapso de la válvula mitral. A pesar de las múltiples investigaciones clínicas y de laboratorio, sigue sin esclarecerse la etiología de la enfermedad. Algunos estudios clínicos sugieren un gran papel de la genética en su etiología.

Los cambios estructurales de las corneas con Queratocono, su capacidad alterada en respuesta a los daños oxidativos y la disminución del entrecruzamiento de las fibras de colágeno generan una debilidad arquitectónica, lo que sumado a las rupturas que se producen en la membrana de Bowman, favorecen la debilidad estructural de forma progresiva e irreversible [5], a partir de la cual su estructura cede ante factores intrínsecos y extrínsecos, llevando a valores de rigidez (histéresis) menores si se comparan con córneas sanas[19].

3.4 Diagnóstico del Queratocono

El diagnóstico se basa en la historia y la presencia de signos clínicos de la enfermedad que han sido descritos ampliamente, confirmándose actualmente con ayudas diagnósticas como la topografía corneal, que ha permitido la identificación de las formas incipientes de Queratocono, debido al fácil y completo estudio que esta realiza a la superficie de la córnea [20].

El grado de deformidad del tejido corneal puede variar significativamente, desde estadios en los que la córnea adquiere la típica forma del cono, hasta casos sutiles en los que muchas veces la valoración clínica y algunas de las ayudas diagnosticas con que se cuenta, no son capaces de detectar o lo incluyen en un rango denominado “QTC frustrado, subclínico” y las formas tempranas donde el cono puede pasar desapercibido, requiriendo la implementación de otras ayudas diagnósticas como el ORA (Ocular Response Analyzer, por sus siglas en inglés) que sumados a la topografía corneal hacen que la patología se haga evidente[21].

El Queratocono puede clasificarse topográficamente de acuerdo a:

- ❖ La severidad del poder en: Leve, moderado y severo.
- ❖ La localización del cono: Superior, central o inferior.
- ❖ La forma del cono: Oval, globoso, “pezón”

3.5 Biomecánica Corneal

La biomecánica de la córnea involucra el equilibrio y la deformación de un tejido sometido a cualquier fuerza [22]. Explora la función y estructura de la córnea e intenta establecer bases para predecir su respuesta dinámica ante situaciones fisiológicas y patológicas. La rigidez (histéresis) es un indicador de las propiedades visco elásticas de la córnea y hace referencia al grado de hidratación de esta, en tanto, el Factor de Resistencia Corneal habla de su resistencia total (Visco elástica-Mecánica).

Existen diferentes factores que determinan la estabilidad de la córnea y afectan su biomecánica; estos se pueden clasificar en intra y extracorneales e incluyen [23]:

- Factores Intracorneales:

- Espesor de la cornea
- Densidad y entrecruzamiento de las fibras de colágeno

- Factores Extracorneales:

- Presión intraocular
- Presión atmosférica
- Tensión ejercida por el músculo ciliar
- Tensión ejercida por los músculos extra-oculares
- Tensión ejercida por los párpados

Los Factores intracorneales son los relacionados con la estructura corneal, la cual posee la elasticidad y características necesarias para soportar las presiones ejercidas por los factores extracorneales, manteniendo de este modo su curvatura estable y sus cualidades ópticas [24]. Esto se debe en gran parte al espesor corneal, pero sobre todo a la especial disposición, densidad y entrecruzamientos de las fibras de colágeno del estroma [25]. El estroma representa el 90% del espesor corneal y está compuesto por agua, glicosaminoglicanos y fibrillas de colágeno acomodadas en láminas, extendidas de limbo a limbo formando una malla [26]. Cuando la córnea se somete a compresión o estiramiento, reorganiza sus láminas e incrementa su elasticidad hasta llegar a un nuevo estado de equilibrio [27, 28].

De los factores extracorneales quizás el más importante es la Presión Intraocular (PIO), la cual ejerce su fuerza sobre la cara interna de la córnea; mientras que la presión atmosférica hace lo mismo por su cara externa, pero según estudios realizados, no es de relevancia. Otros de estos factores son los párpados, los músculos extraoculares, (indirectamente a través de sus inserciones esclerales) y el músculo ciliar que durante la acomodación produce un acortamiento del diámetro corneal e induce un cambio de curvatura equivalente a 0,60-0,72 dioptrías [29].

3.6 Aspectos y Estudios Genéticos

El abordaje cotidiano de esta entidad generalmente se basa en aspectos clínicos y quirúrgicos que promueven la detención o la corrección de complicaciones relacionadas. En la época moderna, la detección de patrones hereditarios y sus manifestaciones por medio de estudios Genéticos han permitido conocer mejor su etiología, así como la probabilidad de padecer la enfermedad.

En su mayoría, los casos de QTC son de tipo aislado, es decir, es posible que se presente sin antecedentes familiares de la enfermedad, sin embargo, se han documentado modos de herencia autosómico recesivo, así como autosómico dominante con penetrancia reducida [30-33]. También se ha reportado que los familiares directos de personas con QTC, tienen un mucho mayor riesgo de padecer la enfermedad que la población general [34,35]. Los gemelos monocigotos muestran una mayor concordancia de QTC y mayor similaridad fenotípica [36], lo cual hace evidente el fuerte papel que juegan los componentes genéticos en el fenotipo de esta enfermedad, apoyando de esta manera también el papel hereditario en esta patología. Los factores genéticos son altamente influyentes en la mayoría de las patologías oculares comunes, incluyendo: Glaucoma, degeneración macular relacionada a la edad, catarata, retinopatía diabética y errores refractivos. En años recientes ha incrementado significativamente el descubrimiento de genes relacionados a enfermedades debido a los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y a los meta-análisis de gran poder. El descubrimiento de genes ha motivado también a la investigación traduccional dirigida hacia el desarrollo de estudios de búsqueda de causales y terapias génicas optimizadas y personalizadas [37].

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, pruebas clínicas de variantes genéticas, tratamiento y manejo. El objetivo del presente estudio es reportar la frecuencia de la variante genética *rs121908120* del gen *WNT10A* que confiere riesgo para desarrollar QTC y establecer si puede ser utilizada como marcador genético con la finalidad de establecer las bases para programas de identificación temprana de individuos con riesgo genético elevado

de desarrollar esta complicación. Se llevó a cabo un estudio transversal y descriptivo, en el cual se hizo una sola medición (genotipificación) en sujetos con criterios clínicos de QTC. Se compararon las frecuencias de la variante genética de los individuos enfermos y de los individuos sanos por medio de Discriminación Alélica (rtPCR). A partir de la frecuencia observada en cada uno de los grupos en estudio se realizó un análisis estadístico que permitió identificar si la variante confiere riesgo de desarrollar esta enfermedad.

La búsqueda científica de genes involucrados en QTC ha sido llevada a cabo utilizando predominantemente el abordaje de genes candidatos, los cuales requieren conocimiento de los mecanismos patogénicos detrás de QTC. Sin embargo, el diseño de estudios de casos y controles es generalmente utilizado y es apropiado para la detección de genes mayores y menores. Diversas vías y procesos se han visto fuertemente implicados en QTC. El pensamiento actual en el campo de la genética molecular es que el tamaño de los efectos de estos factores genéticos sea probablemente modesto, aunque se ha postulado la existencia de genes mayores involucrados en QTC. Consecuentemente, estudios individuales tienden con mayor frecuencia a obtener resultados inconsistentes y en ocasiones conflictivos, ^{por} lo que se ha empleado también el uso de meta análisis para discernir los pocos genes que pudieran tener evidencia suficiente para su asociación con el QTC.

3.6.1 Estudios de Ligamiento Para Queratocono

El análisis de ligamiento es una herramienta eficiente para la elaboración de mapas de loci genéticos asociados a una enfermedad. A la fecha se han realizado 17 mapas de loci genómicos para QTC, lo cual hace evidente que existe un alto grado de heterogeneidad genética en esta enfermedad [38]. Desafortunadamente solo tres de estos loci, 5q21, 5q32 y 14q11, se han logrado replicar independientemente [39]. Sin embargo, por medio de la utilización de este abordaje en “pedigríes” extensos, se han identificado dos genes potencialmente asociados al queratocono (*MIR184* y *DOCK9*).

En otro estudio a una familia con QTC de origen ecuatoriano, Gajecka y sus colegas identificaron una región de 5.59 Mb en el cromosoma 13q32, que consta de 25 genes [40]. La secuenciación de ocho genes candidatos dio lugar a la identificación de una variación nueva c.2262A>C (*Gln745His*) en el gen (*DOCK9*; OMIM 607325) [40]. El gen *DOCK9* se expresa en la córnea y es responsable de la activación específica de *CDC42*, una proteína-G. Aunque no es claro el mecanismo por el cual esta mutación provoca QTC, es bien sabido que la mutación se localiza en el dominio *DHRI*, el cual se encarga de la unión de fosfolípidos y puede afectar la incorporación de la proteína a la membrana, siendo “posiblemente dañino” [41].

3.6.2 Análisis de Genes Candidatos (Queratocono)

Ha sido difícil identificar los factores de riesgo genéticos para QTC debido a la etiología tan compleja que confiere la enfermedad. Entre los abordajes actualmente utilizados para identificar los componentes genéticos en familias con sospecha de formas dominantes de QTC, el análisis de genes candidatos se ha empleado para estudiar las cohortes de la enfermedad. En base a las características biológicas de la enfermedad, los genes candidatos se predicen según las funciones biológicas conocidas y patrones de expresión de relevancia para la enfermedad [42].

Recientemente, se han reportado mutaciones asociadas a QTC en el gen *VSKI* en cohortes Neo Zelandesas y Chinas (43), sin embargo, estudios realizados en poblaciones del sur de la India, Irán y Grecia no mostraron asociación significativa entre estas mutaciones en *VSKI* y la susceptibilidad para presentar QTC [44-45].

Un estudio en población polaca, tuvo como resultado que los polimorfismos de base única (SNP's) rs8177178 y rs8177179 en el gen de transferrina se asocian al QTC. Esto sugiere un potencial involucro de los errores en la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo en la patogénesis de esta enfermedad. También se estudió la participación del gen *RAD51* que codifica para una proteína involucrada en la recombinación homóloga y la reparación de hebras de doble hélice que se sabe está involucrado en la vía del estrés oxidativo, encontrándose variantes que se asocian con el riesgo de desarrollar esta enfermedad [46].

Los análisis de genes candidatos han sido de particular eficacia en el estudio de enfermedades multifactoriales complejas, y nos permiten identificar incluso efectos genéticos pequeños, utilizando grandes cohortes de casos y controles. Estudios similares se emplean comúnmente para QTC en diferentes poblaciones, haciendo énfasis en genes potencialmente involucrados en desarrollo cráneo facial y ocular, matriz extra celular, colágenos, apoptosis y vías relacionadas al estrés oxidativo [47].

WNT-10A es un gen localizado en la región cromosómica 2q35. La familia *WNT* incluye genes que están relacionados estructuralmente, los cuales codifican proteínas de señalización para procesos biológicos y del desarrollo como ligandos, receptores de membrana, efectores intracelulares y antagonistas. Estas proteínas han sido reportadas y se han visto implicadas en la oncogénesis, así como en varios procesos de desarrollo, incluyendo regulación celular durante la embriogénesis. Este gen se expresa principalmente en las líneas celulares de leucemia promielocíticas y Linfoma de Búrkitt. También se ha observado una fuerte co-expresión tanto de *WNT10A* como del gen *WNT6* en líneas celulares de cáncer colorectal. La sobreexpresión de este gen podría jugar un importante papel en la carcinogénesis, mediante la activación de la vía de

señalización de *WNT*-beta-catenina-*TCF* [48]. El grosor corneal central es un endofenotipo del QTC que es altamente hereditario y se estima que 95% de la varianza fenotípica se debe a factores genéticos. Se han realizado estudios de asociación de genoma completo utilizando el grosor corneal central, que han logrado identificar variantes comunes (i.e. frecuencia alélica menor (FAM) >5%); Sin embargo, estos estudios generalmente ignoran el gran grupo de variantes exónicas con una FAM baja.

En un estudio realizado en 2015, se realizó un análisis de asociación de exoma completo utilizando grosor corneal central y una muestra de 1029 individuos de un estudio poblacional en Australia occidental, el cual identificó una variante exónica de genoma completo rs121908120 en el gen *WNT10A*, encontrándose a 437 kb de un gen previamente asociado con grosor corneal central (*USP37*). Se muestra en un análisis condicional que la variante de *WNT10A* es responsable de la señalización previamente identificada en *USP37*. Este hallazgo se replicó en muestras independientes del estudio gemelar adolescente de Brisbane, el Estudio ocular gemelar en Tasmania y el estudio de Rotterdam, posteriormente realizándose una genotipificación de la variante *rs121908120* en 621 casos de QTC comparando las frecuencias con una muestra de 1680 controles sin previo análisis del registro gemelar de Queensland. Se identificó que rs121908120 aumenta el riesgo dos veces de padecer QTC (odds ratio 2.03, $P = 5.41 \times 10^{-5}$) [49].

La Discriminación Alélica es el proceso por el cual se detectan en una muestra dos variantes de la secuencia de único nucleótido (SNP). Los SNPs son variaciones en un punto determinado de la secuencia nucleotídica de dos individuos. Se trata de la variación más abundante en los genomas y se considera polimorfismo cuando la variación afecta a más del 1% de la población. Al momento esta estrategia podría funcionar para detectar variantes en el gen *WNT10A* como posibles factores de riesgo para desarrollar QTC [47-49].

4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han realizado diversos estudios genéticos para contribuir al entendimiento de las enfermedades oculares. Sin embargo, la etiología genética de enfermedades como el QTC no es totalmente conocida, por lo que es necesario identificar genes y variantes génicas (polimorfismos) que estén relacionados con la enfermedad y que indiquen susceptibilidad de los individuos a padecer dicha enfermedad. A pesar de los muchos intentos, se han podido identificar variantes potencialmente patogénicas en muy pocos casos de pacientes con diagnóstico de QTC, por lo que existe un gran campo de estudio para la identificación de mutaciones y genes causales.

La identificación y asociación de factores genéticos como el polimorfismo *rs121908120* del gen *WNT10A*

asociados a QTC así como su frecuencia, será de gran trascendencia para comprender mejor los mecanismos que llevan al desarrollo de esta alteración corneal. Debido a que la mayoría de los casos se presentan de manera esporádica, tradicionalmente ha sido difícil el estudio genético de esta enfermedad, sin embargo, en los casos familiares es claro que existe un factor genético que explica la recurrencia de la enfermedad, por lo que el estudio molecular de estas familias ofrece grandes ventajas para la posible identificación de genes asociados al QTC. Tal asociación de un polimorfismo permitiría la instauración de una prueba sencilla, accesible y confiable que permita identificar, de manera pre-sintomática, a sujetos mexicanos 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. El estudio de los polimorfismos genéticos se lleva a cabo cada vez más en diferentes cohortes poblacionales. A partir de los datos generados del estudio de los polimorfismos se han logrado entender de mejor manera los mecanismos de susceptibilidad a diversas enfermedades hereditarias. Con el desarrollo de nuevas metodologías y estrategias de estudio a nivel de ADN y celular, se espera que los estudios de asociación aceleren el entendimiento de enfermedades relacionadas con ciertos genes, y nos ayuden a establecer la relevancia de un polimorfismo en el contexto funcional de una enfermedad. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para identificar los polimorfismos funcionales que afecten o regulen la expresión genética. Por otra parte, es necesario estudiar el papel del medio ambiente y su influencia en los polimorfismos genéticos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El QTC tiene una predisposición genética significativa que contribuye a los cambios estructurales de las corneas de los individuos afectados, generando de esta forma una capacidad alterada en respuesta a los daños oxidativos que con la disminución del entrecruzamiento de las fibras de colágeno producen una debilidad arquitectónica, teniendo como consecuencia rupturas que se producen en la membrana de Bowman las cuales favorecerán la debilidad estructural de forma progresiva e irreversible. Diversas regiones genéticas con susceptibilidad genética se han implicado en esta patología y se conoce que la heterogeneidad genética tiene un mayor impacto que los efectos patológicos relacionados a un gen específico para el desarrollo y progresión del QTC. Por esta razón, la identificación de factores y regiones genéticas como la variante *rs121908120* del gen *WNT10A* que aún no han sido estudiadas y que permitan reconocer sujetos con riesgo de desarrollar QTC, lograra identificar a aquellos con riesgo elevado a desarrollar esta complicación a edades más tempranas.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre la variante *rs121908120* del gen *WNT10A* y el riesgo de desarrollar QTC en una muestra de pacientes mexicanos en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”?

7. OBJETIVOS

7.1 General

Determinar la asociación de la variante *rs121908120* en el gen *WNT10A* y el riesgo a desarrollar QTC en una muestra de pacientes mexicanos en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”

7.2 Específicos

- Identificar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *rs121908120* del gen *WNT10A* en un grupo de individuos mexicanos con QTC.
- Identificar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *rs121908120* del gen *WNT10A* en un grupo de individuos no afectados.
- Establecer si existe una asociación de la variante *rs121908120* con el riesgo a desarrollar QTC en la población mexicana.

8. METODOLOGÍA

8.1 Diseño del Estudio

Se trata de un estudio transversal y descriptivo en el cual se realizó una sola medición (genotipificación) en sujetos con criterios clínicos de QTC. Se compararon las frecuencias de la variante genética de los individuos enfermos y de los individuos sanos. A partir de la frecuencia observada en cada uno de los grupos en estudio se realizó un análisis estadístico que permitió identificar si la variante confiere riesgo de desarrollar esta enfermedad.

8.2 Pacientes Y Controles

El estudio se llevó a cabo en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, Institución que recibe un considerable número de pacientes con QTC diariamente, con lo que la obtención de la muestra fue asegurada. Se incluyeron al menos 100 pacientes mexicanos mestizos (por lo menos 2 generaciones de

ascendientes nacidos en México) con criterios de diagnóstico estrictos para QTC y el mismo número de controles sanos. La identificación de los casos y controles se hizo por al menos un especialista en Córnea del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. Una vez identificados los sujetos con los criterios de inclusión, se le informó detalladamente sobre las características del estudio y se le solicitó la firma de un consentimiento informado (Anexo A) para participar en el estudio.

El diagnóstico de QTC se basó en una examinación clínica y una videoqueratografía para análisis de patrones que indiquen abombamiento y ectasia corneal con protrusión central de la córnea en cualquier estadio de la enfermedad. La examinación clínica incluyó biomicroscopía con lámpara de hendidura, retinoscopía bajo cicloplejia y evaluación de fondo de ojo. La biomicroscopía con lámpara de hendidura se utilizó para identificar el adelgazamiento del estroma corneal, estrías de Vogt’s o un anillo de Fleischer. Se realizó una examinación retinoscópica bajo dilatación pupilar para determinar la presencia o ausencia de signos de retro-iluminación de QTC como el signo de la gota de aceite y entrecruzamiento del reflejo rojo. El análisis de la videoqueratografía se llevó a cabo en ambos ojos bajo modelamiento topográfico corneal.

Se consideró a un sujeto con diagnóstico de QTC si presentó al menos un signo clínico de la enfermedad y por confirmación del mapeo videoqueratográfico de un patrón asimétrico y un re direccionamiento del eje radial por encima y por debajo del meridiano horizontal (AB/SRAX). El antecedente clínico de Queratoplastia Penetrante fue también suficiente para la inclusión.

8.3 Criterios de Inclusión (Casos)

- Sujetos con diagnóstico clínico de QTC (casos esporádicos y familiares) realizado por especialista en córnea del Instituto de Oftalmología “Conde Valenciana”.
- Sujetos con QTC que acepten realizarse el estudio genético y firmen la hoja de consentimiento informado.

8.4 Criterios de Inclusión (Controles)

- Sujetos mayores de 40 años de edad sin diagnóstico clínico o antecedentes familiares de QTC, ya que esta enfermedad se presenta exclusivamente a edades tempranas.
- Sujetos que acepten realizarse el estudio genético y firmen la hoja de consentimiento informado.

8.5 Criterios de Exclusión (Casos)

- Sujetos que se nieguen a participar en el estudio.

- Pacientes con QTC asociado a otras alteraciones corneales.

8.6 Criterios de Exclusión (Controles)

- Sujetos que se nieguen a participar en el estudio.

8.7 Criterios de Eliminación (Casos y Controles)

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

8.8 Análisis Genético Por Discriminación Alélica (rtPCR con Sondas Taqman)

Una vez aceptada su participación, a cada sujeto se le extrajo una muestra de 4mL de sangre periférica por medio de punción venosa que sirvió para la extracción del ADN genómico, procedimiento que realizamos los médicos de la unidad de investigación del instituto “Conde de Valenciana”. La extracción de ADN genómico se realizó según el protocolo automatizado para el QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el kit “QIAamp DNA Mini” (Qiagen, Hilden, Germany). Una vez obtenido el ADN genómico, éste se cuantificó en un equipo Nanodrop. Posterior a la cuantificación del ADN extraído a partir de sangre periférica, se continuó con la dilución de las muestras para su posterior análisis por medio de PCR en Tiempo Real (Discriminación Alélica). Se realizaron diluciones de aproximadamente 10ng de ADN en 10 µL de solución con H₂O libre de nucleasas y se rotularon los nuevos tubos Eppendorf con el número asignado a cada una de las muestras.

Para la realización del ensayo de Discriminación Alélica (rtPCR), se diseñó una sonda Taqman específica para el SNP *RS121908120* del gen *WNT10-A* y se utilizaron reactivos Thermo Science para las reacciones. Se procedió a colocar PCR Master Mix y la sonda Taqman en hielo y se rotulo la placa del termo-ciclador. Se realizó la mezcla de reacción tomando en consideración la concentración de la sonda. Se utilizaron los siguientes reactivos: Universal Master Mix 225.0 µL, sonda Taqman 11 µL y H₂O grado Biol Mol 295.0 µL . Se mezclaron los reactivos 4 veces por pipeteo y se dio un pulso en la picofuga. Posteriormente se alicuotaron 61 µL de la mezcla de la reacción en tubos de 0.6ml. Se dispensaron 5 µL de la mezcla de reacción a cada muestra con una pipeta multicanal Eppendorf y se homogeneizo por pipeteo. Se colocó la placa con las muestras en la centrifuga Allegra 25R asegurándose de eliminar las burbujas de aire en las reacciones. Se llevaron a cabo 1 HOLD de 95°C por 10:00 minutos, 40 ciclos de 92°C por 15 segundos, 60°C por 1:00 minuto y por último 1 HOLD de 4°C. Se colocó un Pad sobre la placa y se introdujo al equipo GeneAmp PCR System 9700 siguiendo el programa para Taqman: 1 HOLD de 95°C por 10:00 minutos, 40

ciclos de 92°C por 15 segundos, 60°C por 1:00 minuto y un HOLD de 4°C. Al finalizar el termociclado se retiró el Pad y se hizo una lectura de punto final (Discriminación Alélica) en el equipo 7900 Fast Real Time PCR System. En la computadora se utilizó el programa SDS V2.2.2 y la aplicación *Allelic Discrimination*. Se seleccionó la opción set up y se ingresó el nombre de cada una de las muestras, se seleccionaron marcadores y detectores correspondientes y se utilizó la opción *Post Read* para el análisis de los resultados. Posteriormente se retiró la placa con las muestras y se guardó el ensayo en la carpeta del usuario (disco duro) en donde se archivaron los resultados de cada muestra. Una vez realizada la discriminación alélica de cada una de las muestras de los casos y controles, se realizó una selección aleatoria de algunas de las muestras para la verificación del polimorfismo y su confirmación de resultados vía secuenciación Genética tipo Sanger la cual se describe a continuación.

Inicialmente se realizó la amplificación por PCR de una región cercana al polimorfismo *rs121908120*. La reacción se llevó a cabo utilizando el Kit “KAPA2G Fast HotStart Ready Mix” (Kapabiosystems, USA), cada reacción de 25 µL conteniendo 12.5 µL de 2X KAPA2G Fast HotStart Ready Mix, 50 ng de ADN genómico, 0.5 µL de cada oligonucleótido sentido y anti sentido para cada uno de los exones (previa exclusión de las regiones intrónicas a través del programa ENSEMBLE). La reacción siguió los siguientes pasos: una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de una desnaturalización a 95°C por 15 seg, una alineación a la temperatura media (T_m) de cada par de oligonucleótidos por 15 seg y una extensión a 72°C por 30 seg repetido por 30-35 ciclos, terminando con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, la banda correspondiente al amplificado (pb) se cortó para la recuperación del ADN amplificado utilizando el kit “Minielute” (Qiagen, Hilden, Germany).

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 escindieron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Promega) o el método de unión a sílica (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 procedió a la secuenciación nucleotídica directa de los productos de PCR. La secuenciación directa automatizada de los amplicones de PCR se llevó a cabo con el kit de secuenciación “BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reacción de secuenciación de 20 µL contenía 4 µL de Ready

Reaction Premix, 2 μ L de BigDye Sequencing Buffer, 3.2 pmol de oligonucleótido y 10 ng de ADN amplificado. La reacción siguió los siguientes pasos: iniciar una desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineación a 50°C por 15 seg y terminación a 60°C por 4 min repetido por 25 ciclos. Estos productos se limpiaron utilizando columnas de sephadex g-50 y se re suspendieron en formamida para su lectura. La verificación del polimorfismo en algunas muestras podrá realizarse también por discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real.

8.9 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante chi cuadrada para variables categóricas y para confirmar que exista equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control; se calcularon razón de momios con intervalos de confianza del 95% y un nivel Alfa de 0.05 y se consideraron valores mayores a 1 como de riesgo para QTC. Se utilizó el programa "Prysm" (ver 10.0) para los cálculos estadísticos (consultar sección de resultados).

19. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El documento de consentimiento informado se le presento a cada uno de los pacientes (sin excepción) que cumplan con los criterios previamente establecidos (consultar ANEXO A). Se explicó al momento el procedimiento de la toma de muestra con sus riesgos y complicaciones. Se dio a conocer el uso de la información y la confidencialidad de datos. Se respondieron todas las dudas previo a la firma del consentimiento. Este protocolo de estudio se apega a las normas establecidas por el Comité Científico y de Ética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, así como del Comité de Investigación y ética de la Universidad Anáhuac y normas nacional e internacionales.

El consentimiento informado y su proceso cumplió con leyes y regulaciones aplicables en México, D.F. Los pacientes otorgaron su consentimiento para los estudios de ADN mediante la firma de una Carta de Información y Consentimiento, la cual cumple con lo establecido por la Ley General de Salud en sus Capítulos 21 y 22 (ANEXO A).

10. PRESUPUESTO

La investigación fue financiada por el Fondo de Investigación del Patronato “Fundación Conde de Valenciana” bajo el rubro “Identificación de variantes genéticas asociadas a enfermedades causantes de discapacidad visual”. El presente estudio tuvo un costo aproximado de 400,000.00 pesos de los cuales 90% se utilizaron en compra de reactivos y consumibles y 10% para el pago de servicios externos.

11.1 Institución de salud pública vinculada

La totalidad del proyecto se realizó en las instalaciones del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” IAP (RENIECYT 097).

11. Infraestructura Disponible en la Institución

En el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” existen los equipos necesarios para la realización del proyecto como son: Lámparas de hendidura para la revisión oftalmológica, equipo para la extracción de ADN y para la amplificación del gen por PCR, así como el equipo necesario para su posterior secuenciación nucleotídica y análisis.

12. RESULTADOS

12.1 Distribución de Datos (Casos y Controles)

Del total de 100 muestras de ADN de casos utilizados para este estudio, 45 (45%) muestras fueron de sujetos masculinos y 55 (55%) de sujetos femeninos, lo cual fue favorable ya que la distribución de sexo es suficientemente homogénea con ligera tendencia hacia el sexo femenino (Tabla 1).

| Género | Casos |
|--------------|-------------|
| Mujeres | 55% |
| Hombres | 45% |
| Total | 100% |

Tabla 1. Base de datos de casos con diagnóstico clínico de QTC. Del total de las muestras de casos, 55 son femeninos y 45 masculinos. Se mantiene anonimidad de los sujetos incluidos en los casos.

De las 100 muestras de ADN de controles utilizados para este estudio, 38 (38%) muestras fueron de sujetos masculinos y 62 (62%) de sujetos femeninos, lo cual fue también favorable ya que la distribución de sexo es suficientemente homogénea, una vez más con ligera tendencia hacia el sexo femenino (Tabla2).

| Género | Controles |
|--------------|-------------|
| Mujeres | 62% |
| Hombres | 38% |
| Total | 100% |

Tabla 2. Registro de sujetos controles sanos, dividido por género. Del total de las muestras de casos, 62 fueron femeninos y 38 masculinos. Se mantiene anonimidad de los sujetos incluidos como controles.

Se obtuvo la media de edad de los casos y controles para su representación en una gráfica de barras para mejor visualización. (Figura 1)

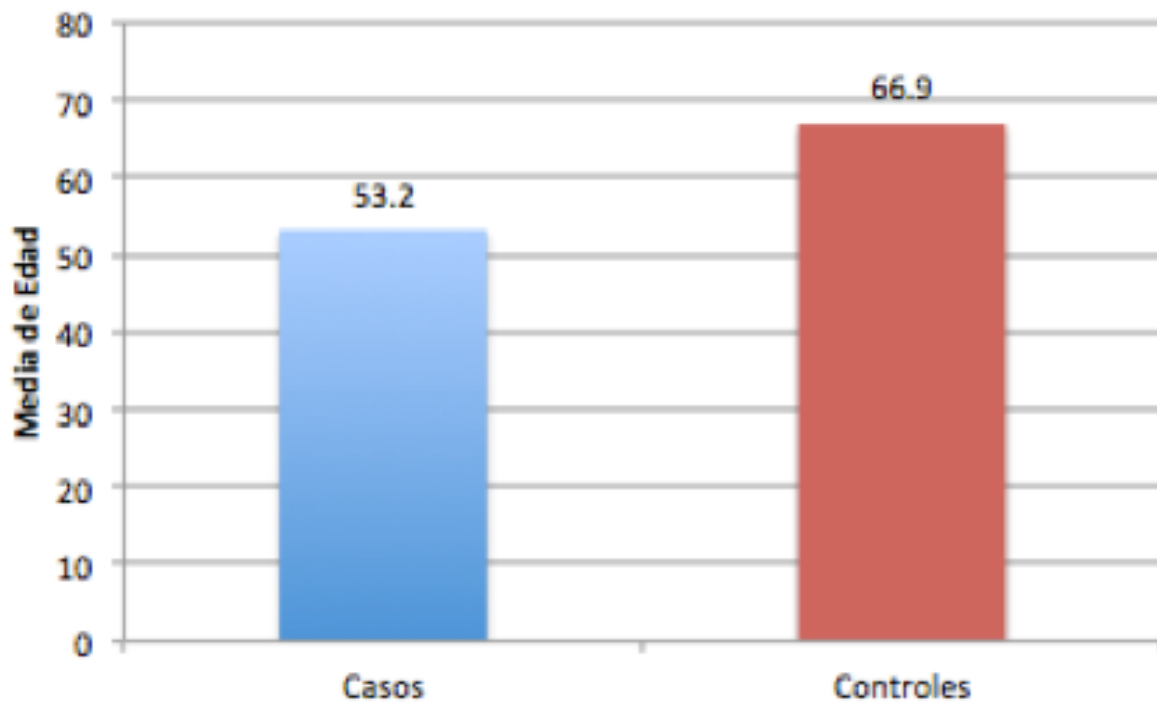


Figura 1. Media de edad de los dos grupos representada en números enteros.

MEDIA DE EDAD (Muestra de 100 casos de QTC)

➤ 53.2 años de edad

MEDIA DE EDAD (Muestra de 100 de controles)

- 66.9 años de edad

13.2 Concentración de ADN y Dilución

Se obtuvo la media de las concentraciones de ADN del grupo de casos y del grupo control para asegurar su calidad y se representó en una gráfica de barras para su mejor visualización. (Figura 2

MEDIA DE CONCENTRACIÓN DE ADN (100 muestras de casos de QTC)

- 43.24 ng/dl (ADN)

MEDIA DE CONCENTRACIÓN DE ADN (100 muestras de controles)

- 58.7 ng/dl (ADN)

Se llevó a cabo una dilución de cada una de las muestras de ADN de los casos para obtener una concentración homogénea en un volumen final de 10 μ L, en donde parte del contenido de la alícuota será ADN y el resto del volumen será H₂O. Las alícuotas se hicieron en tubos tipo Eppendorf con capacidad total de 2 ml.

Se realizó una dilución de cada una de las muestras de ADN de los controles, para obtener una concentración homogénea en un volumen final de 10 μ L, en donde parte del contenido de la alícuota será ADN y el resto del volumen será H₂O. Las alícuotas se hicieron en tubos tipo Eppendorf con capacidad total de 2 ml.

12.3 Diseño De Sondas Taqman y Localización Genética

Se localizó el gen *WNT10A* en la base de datos ENSEMBL para la visualización de las regiones intrónicas y exónicas, para poder así delimitar la región de la variante. El gen se conforma por 11,645 pares de bases nucleotídicas incluyendo los intrones 1-4. (Figura 2)

| | | | | | | |
|-----------------|-------------|-------------|---|---|-------|--|
| Intron 1-2 | 218,881,109 | 218,882,160 | | | 1,052 | gtgagccctcacctcatgctccgcc.....ccactccaccccatatgtctgcag |
| ENSE00000922345 | 218,882,161 | 218,882,423 | 2 | 1 | 263 | GTCAGCACCCAATGACATTCTGGACCTCCGCGCCCGGAGCCCTGCTCAATGCCAA CACAGTGTGCTAACATTGCCAGGCTGAGCCGGCGGCGATGGAGGTGTGTGCGTCA CCTGATGTGGCTGCTCAGCCATACAGGGCATCCAGATCCCATCCAGGAATGCCAACA CCAATTCAGGACCAGCCCTGGAACCTCAAGCCTGGAGACTCGCAACAAGAGCCCTTA TGAAGTCCCATCTTCAGCAGAG |
| Intron 2-3 | 218,882,424 | 218,889,983 | | | 7,560 | gtagctgccccctcaccctgcccct.....atggttctgggtctttaaccacag |
| ENSE00000922346 | 218,889,984 | 218,890,363 | 1 | 0 | 380 | GTTTCGAGAGACCCCTTTTGCCTACGCCATCGCAGCAGCTGCCGTGGTGCACCCGRT CCAAATGCTGTGCCCTGGGCAAACTGAAGCCTGTGGCTGCAAGCTCCCGGCGAGGGG AGGAGGCGCTTCGGTAGGAAGCTGCACCGCTTACAACCTGGATGCACCTGCAGCGTGGTA AGGCCTGAGCCATGGGGTCCCGAACACCCAGCCCTCCACAGCCAGCCAGGCCCTGC AGGACTCCTGGGAGTGGGGCGCTGCAGCCCCACATGGGCTCCCGGAGCGCTTTCTTA AGGACTTCTGGACTCCGGAGCCTCACAGAGACATCCACCGGAGAAAGAGGCTTCACA ACAACGAGTTGGAGGCAG |
| Intron 3-4 | 218,890,364 | 218,892,773 | | | 2,410 | gtgagagccccaccctgggtctgc.....ccctcacggtgcctcctccgcag |

Figura 2. Delimitación del gen WNT10A incluyendo exones e intrones en la base de datos ENSEMBL.

Posteriormente se llevó a cabo el diseño de sondas Taqman específicas para el SNP *rs121908120* del gen *WNT10A*. Se delimitó la secuencia que engloba la variante (A/T) para corroborar la congruencia con el polimorfismo y se obtuvo un número de catálogo. La localización genética del polimorfismo rs121908120 se encuentra en el cromosoma 2 y consta de una sustitución de una Alanina por una Timina. (Figura 3)

| | | | |
|------------------------------------|---|---------------------|----------------|
| SNP ID: | rs121908120 | Assay ID | C_150623636_10 |
| Gene | ▼WNT10A | Size | S: 188uL; 40X |
| Gene Name | wingless-type MMTV integration site family, member 10A | Availability | Made To Order |
| Set Membership: | | Catalog # | 4351379 |
| Chromosome Location: | Chr.2: 219755011 - 219755011 on NCBI Build 37 | List Price | Contáctenos |
| Polymorphism: | A/T, Transversion Substitution | | Your Price |
| Context Sequence [VIC/FAM]: | CTTCGGGGAGCGCTTTTCTAAGGAC[A/T]TTCTGGACTCCCGGGAGCCTCACAG | | |

Figura 3. Diseño de sondas Taqman para Discriminación Alélica por rtPCR. Número de catálogo, ID de ensayo y localización nucleotídica específica de la variante A/T.

Una vez diseñadas las sondas Taqman para la realización de Discriminación Alélica por rtPCR, se registro

la localización del gen, sus alelos, el tipo de variante y sus asociaciones con transcritos y otros fenotipos. (Figura 4)


| | |
|--------------------------------|---|
| Alleles | <u>T/A</u> Ancestral: T Ambiguity code: W |
| Location | Chromosome 2:218890289 (forward strand) View in location tab |
| Co-located | with HGMD-PUBLIC CM094237 ; dbSNP rs121908120 (T/A) |
| Most severe consequence | Missense variant See all predicted consequences [Genes and regulation] |
| Evidence status ⓘ |  |
| HGVS names ⊕ | This variant has 4 HGVS names - click the plus to show |
| About this variant | This variant overlaps 4 transcripts and is associated with 2 phenotypes . |

Figura 4. Registro de información genética del polimorfismo *rs121908120* y sus asociaciones fenotípicas en base de datos.

12.4 Estandarización de rtPCR (Discriminación Alélica)

En la estandarización de la PCR en tiempo real, se determinó la especificidad de los cebadores utilizados. Como control positivo se empleó una muestra de un sujeto con QTC (caso) y como control negativo la muestra de un sujeto sano. La sensibilidad de la PCR en tiempo real se determinó utilizando como muestras positivas 100 muestras de ADN de casos en tubos Eppendorf con diluciones seriadas con volumen total de 10 μ L y agua libre de nucleasas y como muestras negativas se utilizaron las 100 muestras de ADN de sujetos control.

Locus Track es una aplicación basada en la web, que crea representaciones visuales de resultados de GWAS (Genome Wide Association Study) regionales e integra anotaciones específicas del usuario junto con otras funciones como LD (linkage disequilibrium) y genes dentro de la región de interés. El LD hace referencia a la asociación no randomizada de alelos en diferentes loci o regiones genéticas. Se dice que el loci se encuentra en LD cuando la frecuencia de asociación de sus diferentes alelos es mayor o menor de lo que se esperaría si el loci fuera independiente y asociado al azar (Figura 5).

Funciones Principales:

- Creación de plots de GWAS regionales en un panel tipo locus zoom.
- Exposición de genes dentro de una región junto con la orientación de sus hebras transcritas, sus exones e intrones (Panel Inferior).

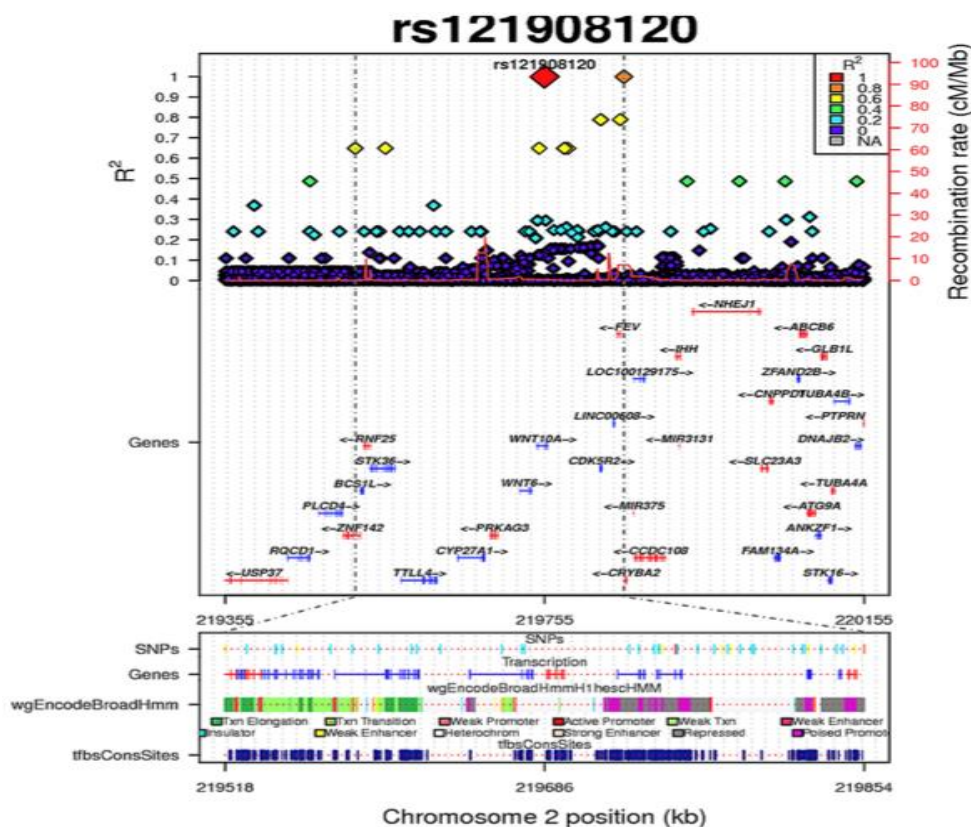


Figura 5. Plot de LocusTrack que muestra las variantes dentro de la región rs121908120 (± 400 Kb). El eje izquierdo muestra la extensión de disequilibrio de ligación de cada variante con rs121908120. Las líneas punteadas representan la región del panel inferior. El panel inferior muestra SNP's con un alto disequilibrio de ligación (r^2) con el mismo código de color que el panel superior. La sección "Genes" representa las regiones transcritas del gen; wgEncodeBroadHMM hace referencia al estado de segmentación de cromatina de las "Human Stem Cells"; tfbsConsSites muestra regiones con conservación de factores de transcripción.

Para estandarizar la prueba de rtPCR para los casos y controles posterior a la dilución de las muestras, se llevó a cabo la secuenciación genética del gen WNT10A por el método de Sanger (ver materiales y métodos) de 4 muestras de sujetos con QTC (casos) y 4 muestras de sujetos sanos (controles) para identificar secuencias de sujetos heterocigotos y homocigotos para la variante (Figura.6,7); lo cual sirvió como referencia para los resultados de rtPCR. Por medio de la identificación de secuencias heterocigotas y homocigotas, pudimos analizar las muestras sometidas a rtPCR confiablemente, ya que por medio de la secuenciación Sanger pudimos estar seguros que los resultados que observamos en las plantillas del equipo de rtPCR eran en efecto confiables. Posteriormente se introdujeron al equipo de rtPCR, sets consecutivos de 36 muestras, dentro de las cuales 34 fueron casos o controles respectivamente, 1 control negativo (Reacción sin ADN) y 1 muestra de uno de los pacientes previamente analizados por secuenciación Sanger para referencia. Una vez concluida cada corrida en el equipo, se procedió a recabar los datos los cuales fueron anotados en una bitácora para su posterior análisis estadístico. Inicialmente se sometieron los 100 casos de QTC a rtPCR y después los 100 controles para llevar un mejor control del estudio (Figura 8.)

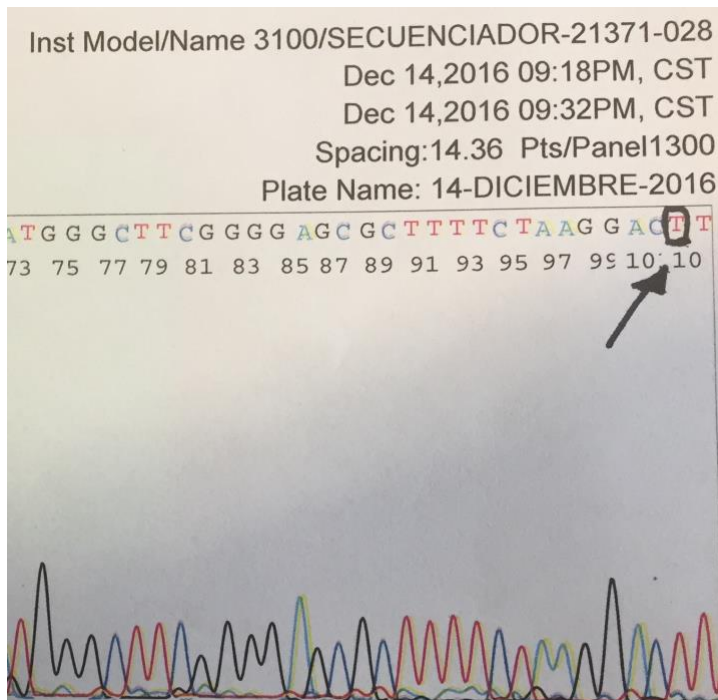


Figura. 6 Electroferograma de secuenciación en 5'-3'(Forward) por técnica Sanger para la visualización y confirmación de la región genética de interés. La variante polimórfica *rs121908120* representa un cambio A/T, en donde en este caso se observa la presencia de una Timina (T), indicando que esta secuencia es de tipo Wild Type o normal.

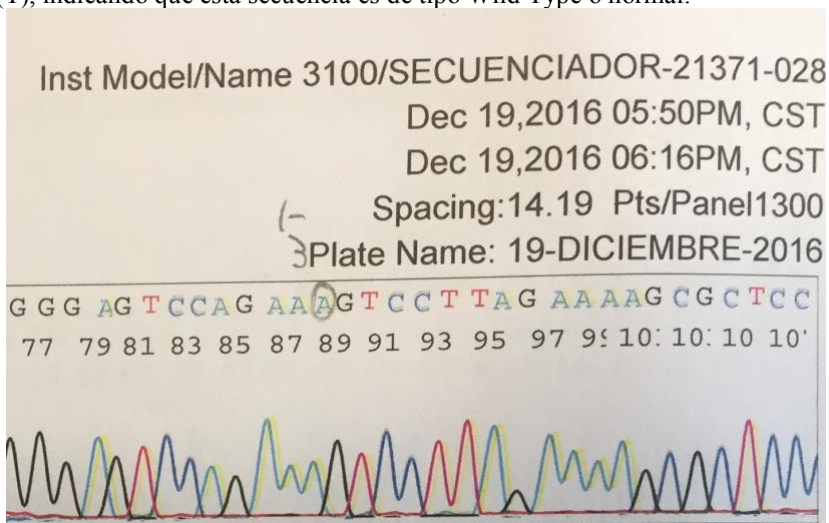


Figura. 7 Electroferograma de secuenciación en 3'-5'(Reverse) por técnica Sanger para la visualización de la región genética de interés. La variante polimórfica *rs121908120* representa un cambio A/T, en donde en este caso se observa la presencia de una Timina (T), indicando que esta secuencia es de tipo Wild Type o normal.

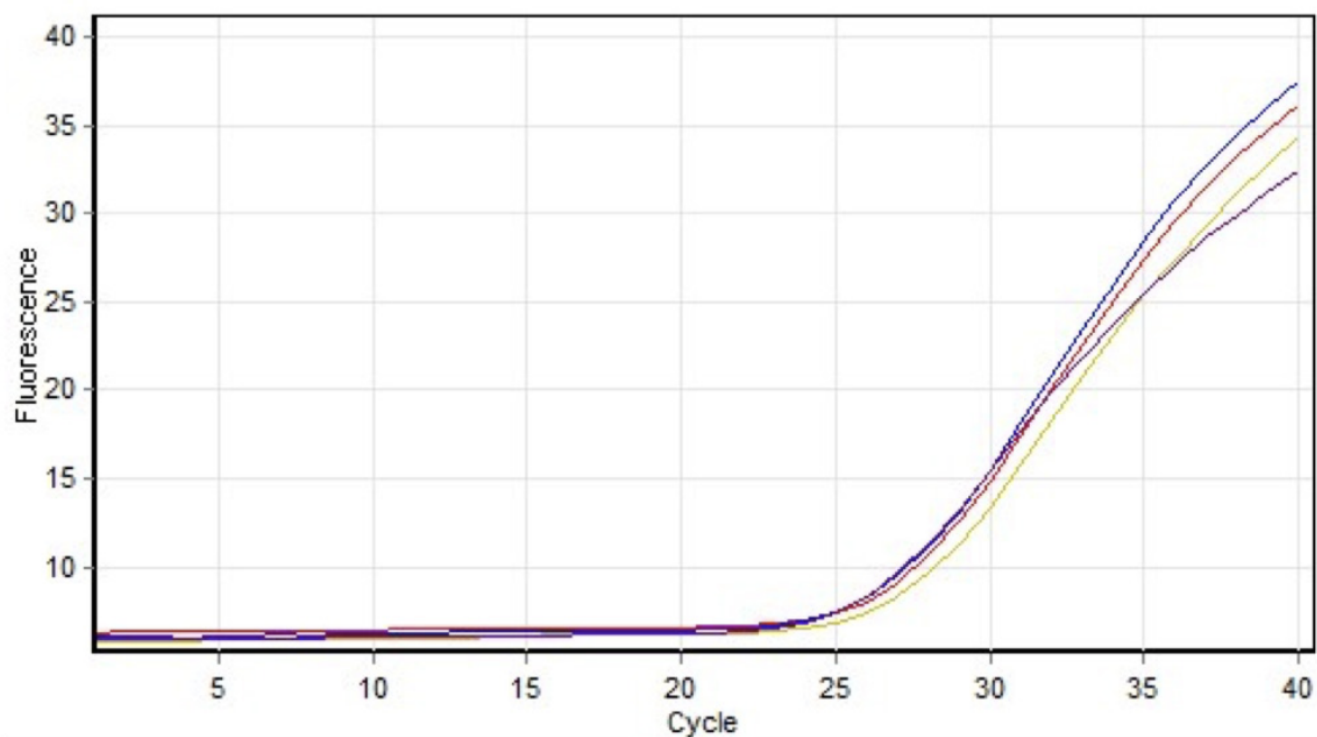


Figura. 8 análisis de corrida de muestras en rtPCR. La línea roja horizontal representa el corte (Threshold) de las reacciones, todo por debajo de la línea roja horizontal fue tomado como negativo o (wild type) y todo lo que este por arriba, en este caso la curva azul punteada, fue recabado como heterocigoto para la variante en estudio.

12.5 Análisis Estadístico por medio de prueba de Chi-Cuadrada

Se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando el software "Prysm", en donde se realizó una prueba de chi cuadrada para variables categóricas y para confirmar que exista equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control; se calcularon razón de momios con intervalos de confianza del 95% y un nivel Alfa de 0.05 y se consideraron valores mayores a 1 como de riesgo para QTC (Tabla 5.)

| Statistical Analysis | Data 1 |
|---|--------------------------|
| Chi-square | Cases and Control groups |
| Chi-square, df | 5.4, 86 |
| P value | 1 |
| P value summary | ns |
| One- or two-sided | NA |
| Statistically significant? (alpha<0.05) | No |
| Data analyzed | Allelic Discrimination |
| Number of rows | 87 |
| Number of columns | 2 |

Tabla 5. Análisis estadístico realizado en el programa "Prysm" en donde se llevó a cabo una prueba de chi-cuadrada. El

resultado de la prueba no fue estadísticamente significativo.

Del total de las muestras de los casos, 7 sujetos fueron heterocigotos para la variante *rs121908120* y 80 fueron wild type o normales. En el grupo control, 14 muestras fueron heterocigotos y 82 fueron wild type, lo cual indico previo al análisis estadístico que había más sujetos portadores de la variante polimórfica en el grupo control que en los casos, por lo cual pudimos inferir que el análisis sería poco o nulamente significativo.

| GRUPO DE ESTUDIO | HOMOCIGOTO (WT) | HETEROCIGOTO (A/T) |
|------------------|-----------------|--------------------|
| CASOS | 80 | 7 |
| CONTROLES | 82 | 14 |

Tabla 6. Representación visual de los resultados de discriminación alélica (rtPCR) para casos y controles.

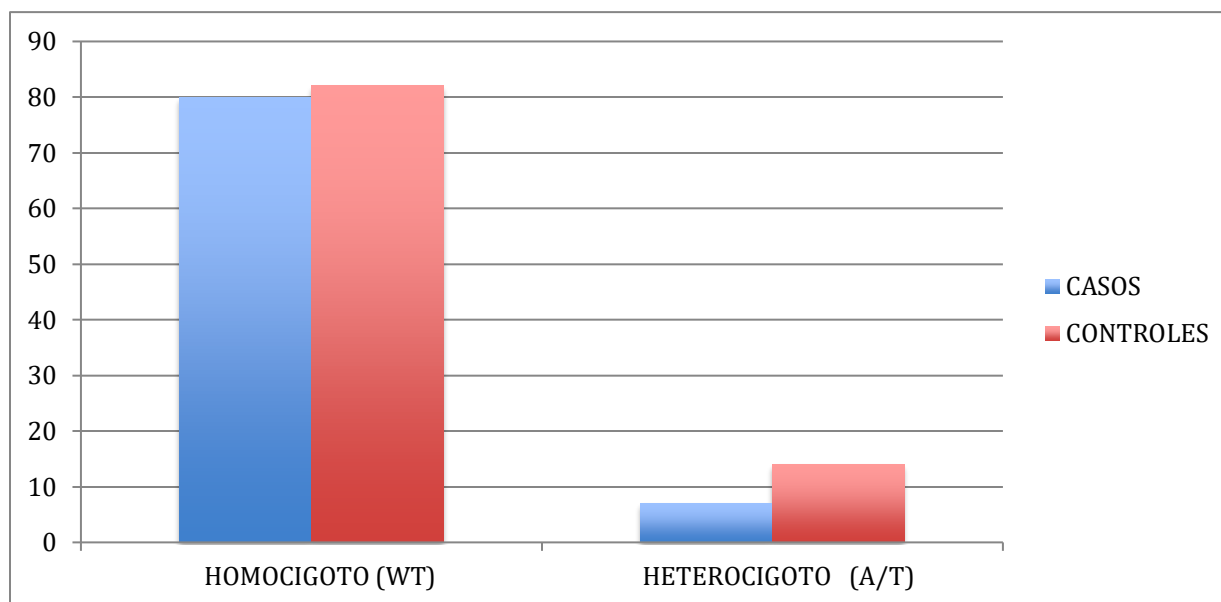


Figura 9. Representación gráfica de la distribución de los resultados de discriminación alélica (rtPCR) para ambos grupos. Se observa mayor cantidad de resultados polimórficos o heterocigotos en el grupo control.

En la computadora se utilizó el programa SDS V2.2.2 y la aplicación *Allelic Discrimination*. Se seleccionó la opción set up y se ingresó el nombre de cada una de las muestras, se seleccionaron marcadores (fluorocromos verde y amarillo) y detectores correspondientes para la variante A/T y se utilizó la opción *Post Read* para el análisis de los resultados. Posteriormente se retiró la placa con las muestras y se guardó el ensayo en la carpeta del usuario (disco duro) en donde se archivaron los resultados de cada muestra.

13. DISCUSIÓN

WNT10A pertenece a la familia de genes WNT, la cual se conforma por genes estructuralmente relacionados que codifican moléculas de señalización que se han visto implicadas en la oncogénesis y en diversos procesos como la regulación del ciclo y patrones celulares presentes durante la embriogénesis [50,51]. Existen estudios que han demostrado que el ciclo celular del endotelio corneal se mantiene por las vías de señalización de genes Hedgehog y WNT específicamente [53,54]. El endotelio corneal es responsable del mantenimiento del transporte de fluidos y solutos hacia el estroma corneal, el cual representa el 90% del grosor de la córnea. Una densidad celular disminuida puede tener impacto en la regulación de fluidos, teniendo como consecuencia la inflamación estromal y cicatrización por exceso de fluidos [55,56], lo cual se ha descrito también como una complicación del QTC [57]. La fuerte asociación del gen WNT10A y del polimorfismo analizado (OR2.3), con riesgo a desarrollar QTC es indicativo que el polimorfismo pudiera tener relación a ciertas razas y fenotipos específicos. Los resultados negativos en los casos y controles pudiera sugerir que existen diferentes regiones dentro del gen WNT10A que codifican para distintas proteínas capaces de alterar la función corneal en presencia de variantes o mutaciones puntuales.

El epitelio corneal es una capa extremadamente delgada compuesta de tejido epitelial que cubre la parte anterior de la córnea y solamente unos cuantos estudios han descrito los cambios estructurales en el epitelio corneal en ojos con QTC [43]. Las células epiteliales de la córnea se renuevan constantemente a partir de células de la rama límbica (Limbal Stem Cells (LSC)) para poder así mantener la transparencia necesaria para la transmisión de luz. Una deficiencia de LSC's puede provocar que la córnea se convierta en un epitelio de piel queratinizada o no transparente [54]. El análisis molecular de las vías de señalización del grupo WNT en células del limbo corneal ha demostrado que *WNT2*, *WNT6*, *WNT11* y *WNT16B* se encuentran sobre expresadas en la región límbica, mientras que la expresión de *WNT3*, *WNT7A*, *WNT7B* y *WNT10A* está sobre-regulada en el centro de la córnea (epitelio corneal maduro) [53]. En base a esto, en el presente estudio se examinó la distribución de los valores-p de los genes WNT y los SNP's que se encuentran dentro de ellos. Pudimos observar que en conjunto estos genes tienden a tener valores-p pequeños, pero poco o nulamente significativos.

La fuerte asociación que se ha encontrado entre las alteraciones del gen WNT10A y el QTC, proporcionan mayor evidencia a su posible papel en la estabilidad de la córnea. Además, existen estudios que indican que las mutaciones en WNT10A son también factor de riesgo para displasia ectodérmica incluyendo odontonycho-dermato displasia [53]. Este síndrome se asocia a anormalidades de la piel, así como de las estructuras derivadas de la epidermis como los son el pelo, dientes, uñas, lengua y las glándulas sudoríparas. El pelo que incluye a las pestañas se torna típicamente delgado. Las manifestaciones oculares incluyen epifora crónica, fotofobia y queratitis. Otras enfermedades que muestran adelgazamiento corneal como característica clínica principal engloban alteraciones del tejido conectivo y ontogénesis imperfecta, por lo que la señalización de WNT es esencial para mantener la densidad ósea y la homeostasis en el tejido conectivo [55].

El estudio de los polimorfismos genéticos se lleva a cabo cada vez más en diferentes cohortes poblacionales. A partir de los datos generados del estudio de los polimorfismos se han logrado entender de mejor manera los mecanismos de susceptibilidad a diversas enfermedades hereditarias. Con el desarrollo de nuevas metodologías y estrategias de estudio a nivel de ADN y celular, se espera que los estudios de asociación aceleren el entendimiento de enfermedades relacionadas con ciertos genes, y nos ayuden a establecer la relevancia de un polimorfismo en el contexto funcional de una enfermedad. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para identificar los polimorfismos funcionales que afecten o regulen la expresión genética. Por otra parte, es necesario estudiar el papel del medio ambiente y su influencia en los polimorfismos genéticos. Tomando esto en cuenta, se han demostrado asociaciones de diversos genes con enfermedades, que son potencializados en consecuencia a diferentes condiciones ambientales. Es necesario un nuevo entendimiento de la biología de las enfermedades comunes para ligar, de una manera más completa, genotipos individuales a fenotipos complejos. El Proyecto Internacional del HapMap (proyecto que desarrolla un mapa de haplotipos del genoma humano) busca proveer muchas de las herramientas que actualmente son necesarias en el estudio del genoma humano. Un estudio en población polaca, tuvo como resultado que los polimorfismos de base única (SNP's) rs8177178 y rs8177179 en el gen de transferrina se asocian al QTC. Esto sugiere un potencial involucro de los errores en la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo en la patogénesis de esta enfermedad. También se estudió la participación del gen *RAD51* que codifica para una proteína involucrada en la recombinación homóloga y la reparación de hebras de doble hélice que se sabe está involucrado en la vía del estrés oxidativo, encontrándose variantes que se asocian con el riesgo de desarrollar esta enfermedad. En un estudio realizado en 2015, se realizó un análisis de asociación de exoma completo utilizando grosor corneal central y una muestra de 1029 individuos de un

estudio poblacional en Australia occidental, el cual identifico una variante exónica de genoma completo rs121908120 en el gen *WNT10A*, encontrándose a 437 kb de un gen previamente asociado con grosor corneal central (*USP37*). [46].

En nuestro estudio, demográficamente se encontró una ligera tendencia hacia el sexo femenino en ambos grupos de estudio (casos 55% y controles 62%), sin embargo, esto pudiese haber influido en los resultados de discriminación alélica y secuenciación genética, pudiendo indicar tendencias polimórficas ligadas al sexo femenino. La calidad y concentración de las muestras fue eficiente para la realización de las reacciones de rtPCR y para la visualización del amplificado genético. El diseño de sondas Taqman y la estandarización de la prueba de discriminación alélica se llevaron a cabo efectivamente y se pudo garantizar la calidad, viabilidad y fiabilidad del estudio para las muestras.

14. CONCLUSIONES

Podemos concluir, que nuestros hallazgos indican que el gen *WNT10A* juega un importante papel en la estabilidad corneal, y que la variante genética *rs121908120* no es un factor de riesgo para el desarrollo de QTC en nuestra población mexicana. También, esto no proporciona resultados sugestivos de la asociación de los genes *WNT* y su expresión en distintos tejidos oculares, indicando que se podría ampliar el tamaño de la muestra o utilizar un mejor mapeo de variantes para detectar su asociación en cohortes mexicanas, pudiendo así detectar pacientes que pudiesen ser tratados precozmente con tratamientos como riboflavina o lentes de contacto rígidos y prevenir así la aparición o desarrollo de queratocono. Debemos tomar en cuenta que existen múltiples variables genéticas y ambientales que influyen directamente en el desarrollo de Queratocono en poblaciones orientales y Neo Zelandesas, por lo que la ampliación de la muestra pudiera concluir si una variante es suficiente para generar la enfermedad o si existe mayor viabilidad en el estudio de múltiples variantes en conjunto.

Los análisis de genes candidatos han sido de particular eficacia en el estudio de enfermedades multifactoriales complejas, y nos permiten identificar incluso efectos genéticos pequeños, utilizando grandes cohortes de casos y controles. Estudios similares se emplean comúnmente para QTC en diferentes poblaciones, haciendo énfasis en genes potencialmente involucrados en desarrollo craneo facial y ocular, matriz extra celular, colágenos, apoptosis y vías relacionadas al estrés oxidativo [47].

15. BIBLIOGRAFIA

1. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ: Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology* 1994, 101:439-447.
2. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1980; 31:435–441
3. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984;28: 293–322.
4. Seiler T, Koufala K, Richter G. Iatrogenic keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 1998; 14:312–317
5. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998; 42:297–319.
6. Arffa R (1997). *Grayson's Diseases of the Cornea.* Chap. 17. Mosby
7. Brown D. Research Overview National Keratoconus Foundation.
8. Lembach RG. Use of contact lenses for management of keratoconus. *Ophthalmol Clin N Am* 2003; 16(3):383–394.
9. Ali_o JL, Shabayek MH. Corneal higher order aberrations: a method to grade keratoconus. *J Refract Surg* 2006; 22: 539–545
10. Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology: A systemic approach*, 3rd edition. Butterworth-Heinemann, (1994) Oxford.
11. Kabat A and Sowka J. How to deal with dystrophies and degenerations. *Review of Optometry* 1999; 136 (11): 60-71.
12. *Ophthalmology*, Vol. VIII. Part2. Diseases of the Outer Eye, Cornea and Sclera. London: Henry Kimpton, 1965:964–74.

13. Wagner H, Barr JT, Zadnik K. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) study: methods and findings to date. *Cont Lens Anterior* 32.
14. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, et al. Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology* 2006;113:1633–8.
15. Sherwin T, Brookes NH, Loh IP, Poole CA, Clover GM. Cellular incursion into Bowman's membrane in the peripheral cone of the keratoconic cornea. *Exp Eye Res* 2002; 74: 473-482.
16. Brookes NH, Loh IP, Clover GM, Poole CA, Sherwin T. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res* 2003; 515-524.
17. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res* 1999; 69: 475-581.
18. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study(a). *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 689-695.
19. Alio JL, Claramonte PJ, Caliz A, Ramzy MI. Corneal modeling of keratoconus by conductive keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31:190–197.
20. Maguire LJ, Bourne WM. Corneal topography of early keratoconus. *Am J Ophthalmol* 1989; 108: 107-112.
21. Wilson SE, Klyce SD. Screening for corneal topographic abnormalities before refractive surgery. *Ophthalmology* 1994; 101: 147-152.
22. Fung YC. *Biomechanics: The mechanical properties of living tissues*. New York: Springer-Verlag; 1981; 221.
23. Torres Rm, Merayo-Llodes J, Jaramillo M, Galvis V. Corneal Biomechanics. *Arch Soc Esp Oftalmol* v.80 n.4 Madrid abr. 2005
24. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957; 136: 263-286.

25. Meek KM, Blamires T, Elliott GF, Gyi TJ, Nave C. The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study. *Curr Eye Res* 1987; 6: 841-846.
26. Pepose JS, Ubels JL. La Cornea. In: Hart WM. Adler Fisiología del Ojo. IX ed. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1994; 35-40.
27. Shin TJ, Vito RP, Johnson LW, McCarey BE. The distribution of strain in the human cornea. *J Biomech* 1997; 30: 497-503.
28. Jayasuriya AC, Ghosh S, Schneinbeim JI, Lubkin V, Bennett G, Kramer P. Study of piezoelectric and mechanical anisotropies of the human cornea. *Biosens Bioelectron* 2003; 18: 381-387.
29. Yasuda A, Yamaguchi T, Ohkoshi K. Changes in corneal curvature in accommodation. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1297-1301.
30. A. E. Hughes, D. P. Dash, A. J. Jackson, D. G. Frazer, and G. Silvestri, "Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 44, no. 12, pp. 5063–5066, 2003.
31. Y. Wang, Y. S. Rabinowitz, J. I. Rotter, and H. Yang, "Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 93, no. 5, pp. 403–409, 2000.
32. H. Tynismaa, P. Sistonen, S. Tuupane et al., "A locus for autosomal dominant keratoconus: linkage to 16q22.3-q23.1 in Finnish families," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 43, no. 10, pp. 3160–3164, 2002.
33. Bisceglia, P. de Bonis, C. Pizzicoli et al., "Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive loci," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 50, no. 3, pp. 1081–1086, 2009.
34. 5] R. H. Kennedy, W. M. Bourne, and J. A. Dyer, "A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus," *American Journal of Ophthalmology*, vol. 101, no. 3, pp. 267–273, 1986.

35. Y. S. Rabinowitz, "The genetics of keratoconus," *Ophthalmology Clinics of North America*, vol. 16, no. 4, pp. 607–620, 2003.
36. S. J. Tuft, H. Hassan, S. George, D. G. Frazer, C. E. Willoughby, and P. Liskova, "Keratoconus in 18 pairs of twins," *Acta Ophthalmologica*, vol. 90, no. 6, pp. e482–e486, 2012.
37. Majewski J, Schwartzenruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*. Sep; 2011 48(9):580–589. [PubMed: 21730106]
38. K.P.Burdon and A.L.Vincent, "Insights into keratoconus from a genetic perspective," *Clinical and Experimental Optometry*, vol. 96, no. 2, pp. 146–154, 2013.
39. L. Bisceglia, P. de Bonis, C. Pizzicoli et al., "Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive loci," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 50, no. 3, pp. 1081–1086, 2009.
40. M. Gajecka, U. Radhakrishna, D. Winters et al., "Localization of a gene for keratoconus to a 5.6-Mb interval on 13q32," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 50, no. 4, pp. 1531–1539, 2009.
41. M. Czugala, J. A. Karolak, D. M. Nowak et al., "Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus," *European Journal of Human Genetics*, vol. 20, no. 4, pp. 389–397, 2012.
42. Vincent AL, Jordan C, Sheck L, Niederer R, Patel DV, McGhee CN. Screening the visual system homeobox 1 gene in keratoconus and posterior polymorphous dystrophy cohorts identifies a novel variant. *Molecular vision*. 2013; 19:852–860. [PubMed: 23592923]
43. Wang Y, Jin T, Zhang X, et al. Common single nucleotide polymorphisms and keratoconus in the Han Chinese population. *Ophthalmic genetics*. Sep; 2013 34(3):160–166. [PubMed: 23289806]
44. Verma A, Das M, Srinivasan M, Prajna NV, Sundaresan P. Investigation of VSX1 sequence variants in South Indian patients with sporadic cases of keratoconus. *BMC research notes*. 2013; 6:103. [PubMed: 23506487]
45. Dehkordi FA, Rashki A, Bagheri N, et al. Study of VSX1 mutations in patients with keratoconus in southwest Iran using PCR-single-strand conformation polymorphism/heteroduplex analysis and sequencing method. *Acta cytologica*. 2013; 57(6):646–651. [PubMed: 24107477]

46. Wojcik KA, Synowiec E, Jimenez-Garcia MP, et al. Polymorphism of the transferrin gene in eye diseases: keratoconus and fuchs endothelial corneal dystrophy. *BioMed research international*. 2013; 2013:247438. [PubMed: 24350254]
47. Khaled K. Abu-Amero, Abdulrahman M. Al-Muammar and Altaf A. Kondka., Genetics of Keratoconus: Where Do We Stand? *Journal of Ophthalmology Volume 2014, Article ID 641708*
48. Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M (May 2001). "WNT10A and WNT6, clustered in human chromosome 2q35 region with head-to-tail manner, are strongly coexpressed in SW480 cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283** (4): 798–805
49. Cuellar-Partida G¹, Springelkamp H², Lucas SE³, Yazar S⁴, Hewitt AW⁵, Iglesias AI², Montgomery GW. WNT10A exonic variant increases the risk of keratoconus by decreasing corneal thickness. *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 1;24(17):5060-8. doi: 10.1093/hmg/ddv211. Epub 2015 Jun 5.
50. Nakatsu, M.N., et al., *Wnt/beta-catenin signaling regulates proliferation of human cornea epithelial stem/progenitor cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(7): p. 4734-41.
51. Nusse, R., *Wnt signaling and stem cell control*. Cell Res, 2008. **18**(5): p. 523- 7.
52. Ouyang, H., et al., *WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis*. Nature, 2014. **511**(7509): p. 358-61.
53. Hirata-Tominaga, K., et al., *Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 through the regulation of hedgehog and Wnt pathway*. Stem Cells, 2013. **31**(7): p. 1396-407.
54. Meek, K.M., et al., *Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma*. Eye (Lond), 2003. **17**(8): p. 927-36.
55. Srinivas, S.P., *Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium*. Optom Vis Sci, 2010. **87**(4): p. E239-54.
56. Fan Gaskin, J.C., D.V. Patel, and C.N. McGhee, *Acute corneal hydrops in keratoconus - new perspectives*. Am J Ophthalmol, 2014. **157**(5): p. 921-8.
57. Reinstein, D.Z., T.J. Archer, and M. Gobbe, *Corneal epithelial thickness profile in the diagnosis of keratoconus*. J Refract Surg, 2009. **25**(7): p. 604-10.



**CONSENTIMIENTO
INFORMADO
PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN
MÉDICA***

Título del protocolo:

““Estudio de asociación genética del polimorfismo rs121908120 como factor de riesgo para el desarrollo de Queratocono”

Investigador principal: Dra. Beatriz Buentello Volante

Lugar donde se realizará el estudio: Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Las personas con queratocono tienen un alto riesgo de ser sometidos a procedimientos quirúrgicos invasivos como el trasplante de córnea. Por lo que se le invita a participar en este estudio con la finalidad de buscar un marcador genético que pueda utilizarse para realizar una prueba rápida que indique si las personas con ciertas variantes genéticas tienen o no un riesgo elevado para desarrollar queratocono.

2. OBJETIVO DEL Estudio

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos:

Identificar si la variante polimorfa *rs121908120* en el gen *WNT10A* confiere riesgo elevado para desarrollar queratocono y que puedan ser utilizadas como marcadores genéticos con la finalidad de establecer las bases para programas de identificación temprana de individuos con riesgo genético elevado de desarrollar esta complicación y con ello establecer programas de intervención orientados a disminuir el número de personas con esta complicación.

3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos, antecedentes médicos y sobre todo oftalmológicos. Se le realizará una revisión oftalmológica completa, tomando su agudeza visual y revisando el fondo de ojo para saber si cuenta con hemorragias dentro de la retina o edema. Su participación consiste en una toma de 4mL de sangre venosa y esta toma no representa ningún riesgo para mi salud, más que la posible formación de un pequeño moretón en el área de punción. El material genético que se extraiga de mi muestra de sangre será utilizado para este estudio y podrá ser almacenarlo para futuras investigaciones. También se me ha informado que en cualquier momento puedo retirar mi consentimiento para participar en esta investigación y que esto no afectará mi tratamiento actual o la calidad en la atención que recibo en la institución.

4. MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio solo se le tomará la muestra de sangre mencionada y como ya se le informo solo se puede presentar un moretón que no tiene riesgo a la salud.

En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, favor de acudir a la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” con la Dra. Beatriz Buentello V. quien a su vez le contestará sus dudas o lo referirá con algún medico especialista si requiere atención inmediata.

5. BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido ya que podrá realizarse una prueba que indique si tienen o no riesgo a desarrollar queratocono.

6.- ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y/o aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos y beneficios. Si requiere ampliar información sobre su participación en el estudio puede comunicarse al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 54421700 ext. 3212 con la Lic. Edith Romero Chávez
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- No recibirá pago por su participación
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la
- Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

| | | |
|---|--------------|---------------------|
| Firma del participante o del padre o tutor | Fecha | No. Teléfono |
|---|--------------|---------------------|

Testigo 1

| | | |
|---------------|-------------------|--------------|
| Nombre | Parentesco | Fecha |
|---------------|-------------------|--------------|

Domicilio _____

No. Telefónico: _____

Testigo 2

| | | |
|---------------|-------------------|--------------|
| Nombre | Parentesco | Fecha |
|---------------|-------------------|--------------|

Domicilio _____

No. Telefónico: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

No. Telefónico

Fecha

*** Este Consentimiento Informado ha sido aprobado por unanimidad en el Comité de Ética en Investigación de nuestro Instituto, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.**