



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DEL
POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO RS7412
EN PACIENTES CON DEGENERACIÓN MACULAR
RELACIONADA CON LA EDAD (DMRE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JUAN JOSÉ LEAL GARCÍA



DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ

ZIMBRÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 3 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 2.1 Degeneración Macular Relacionada con la Edad..... | 6 |
| 2.2 Factores de riesgo para la DMRE..... | 12 |
| 2.3 Apolipoproteínas y DMRE..... | 13 |
| 2.4 Polimorfismos de nucleótido único y DMRE..... | 17 |
| 2.5 Polimorfismo de nucleótido único rs7412..... | 18 |
| 2.6 Detección de polimorfismos de nucleótido único..... | 19 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 22 |
| 3.1 Pregunta de investigación..... | 22 |
| 3.2 Hipótesis..... | 22 |
| 3.3 Objetivos..... | 22 |
| 4. DISEÑO DE ESTUDIO..... | 22 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 23 |
| 5.1 Lugar de estudio y duración..... | 23 |
| 5.2 Consideraciones éticas..... | 23 |
| 5.3 BIOSEGURIDAD..... | 23 |
| 5.3 Población..... | 23 |

| | |
|---|----|
| 5.4 Criterios de Inclusión..... | 24 |
| 5.5 Criterios de exclusión..... | 24 |
| 5.6 Tamaño de la muestra..... | 25 |
| 5.7 Toma de muestras de pacientes y su procesamiento..... | 25 |
| 5.8 Recolección y análisis de los datos..... | 30 |
| 6. RESULTADOS..... | 30 |
| 6.1 Descripción estadística de la población..... | 30 |
| 6.2 Distribución de la DMRE en la población..... | 31 |
| 6.3 Descripción comparativa con controles..... | 32 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 34 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 39 |
| 9. REFERENCIAS..... | 40 |

1. Resumen

La degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) es la causa principal de ceguera en adultos mayores, pues es una patología degenerativa de la retina presente en adultos mayores a 50 años. Existe una relación entre esta enfermedad y la apolipoproteína E, en concreto con el polimorfismo de nucleótido único rs7412 de dicha proteína, sin embargo, la poca información respecto a la relación entre el SNP rs7412 de la apolipoproteína E2 (APOE2) y la DMRE, nos lleva a la realización de este proyecto. La prevalencia del SNP rs7412 no tiene una descripción para la población mexicana con degeneración macular relacionada con la edad, por lo que este ensayo se enfoca en la descripción de la presencia de dicho polimorfismo en una población con DMRE.

Las muestras fueron extraídas de pacientes de nacionalidad mexicana de edad mayor o igual a 50 años, mediante isopado bucal les fue extraído el DNA cromosómico y los SNP fueron genotipificados mediante la utilización de sondas Taqman® y, finalmente, los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva, obteniendo las medidas de tendencia central de la población, así como la prevalencia del SNP rs7412 para dicha población con DMRE.

Por último, se obtuvo que el SNP rs7412 en una población mexicana con DMRE se presenta en 375 por cada mil individuos, de acuerdo con las condiciones del estudio realizado. Los resultados obtenidos podrían sugerir una correlación positiva entre el polimorfismo y el desarrollo de la enfermedad, siendo, posiblemente, un factor de riesgo para la DMRE.

Finalmente, es necesario realizar estudios similares en una población mayor y de otras regiones del país para complementar estos resultados.

2. Marco Teórico

La degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) es la causa principal global de pérdida irreversible de visión en personas mayores de 60 años. La DMRE afecta la región macular de la retina, conllevando a una pérdida de la visión central (Nowak, 2006).

La retina es un conjunto de células excitables organizadas en capas, donde la actividad sinérgica de sus componentes deviene en la formación de imágenes complejas (Hoon, et al., 2014). Dentro de la retina podemos encontrar seis tipos de neuronas únicas de este tejido: fotorreceptores (donde ocurre la captación de fotones), células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células ganglionares, cuyos axones forman al nervio óptico que transmite la información a otras regiones del sistema nervioso central (SNC)(Purves, 2015).

En las regiones centrales de la retina de primates, como los humanos, se puede discriminar a la mácula, donde se observa una mayor cantidad de fotorreceptores que en el resto de la retina (en especial conos). En la región macular es donde se presenta la mayor agudeza visual, debido principalmente a la menor densidad de capas celulares por las que la luz debe pasar y así ser captada por los fotorreceptores, en comparación con otras secciones de la retina donde la luz debe atravesar más capas antes de ser captada por los fotorreceptores (Gerster, 1991).

En 2014, Wong y colaboradores estimaron por métodos de jerarquización Bayesiana que la prevalencia global de la DMRE era del 8.69 % en personas entre los 45-85 años de edad y previeron que para el 2020 habría 196 millones de casos y para el año 2040 habría 288 millones, mostrando, asimismo, variaciones en la prevalencia de la enfermedad, así como en el estado de progresión para diferentes etnias (Wong, et al., 2014).

2.1 Degeneración macular relacionada con la edad

DMRE temprana o seca.

La DMRE en estado temprano presenta drusas que son acumulaciones de componentes lipídicos y anormalidades en el epitelio retinal pigmentario (ERP). Sin embargo, en algunas escalas de clasificación la presencia de drusas pequeñas está relacionado con un signo normal de envejecimiento. En un estado tardío de DMRE podemos encontrar que ésta es clasificada en dos fenotipos; neovascular, húmeda o exudativa y no neovascular, seca o atrófica (Mitchell, et al., 2018) (Figura 1).

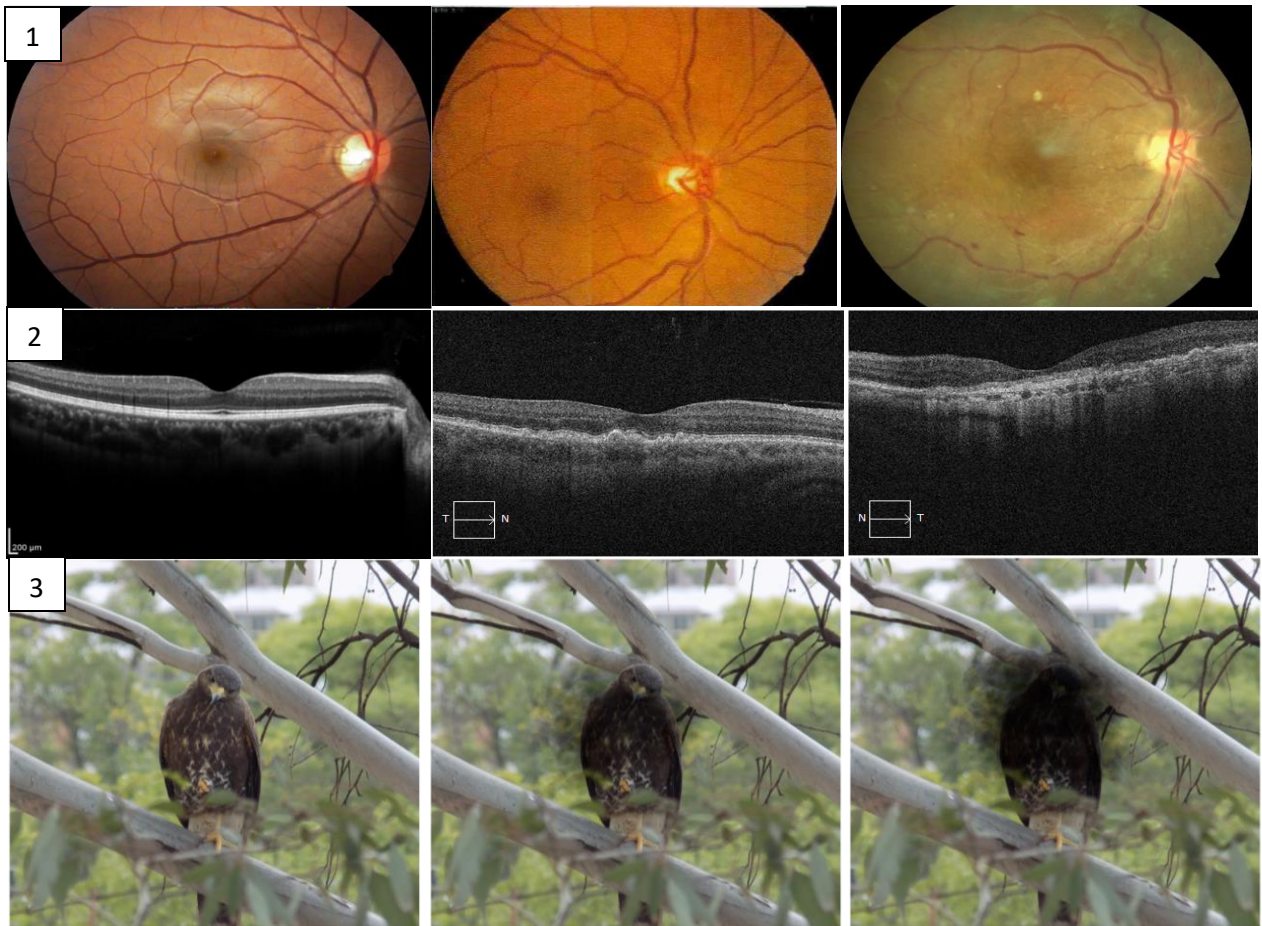


Figura 1: 1. Imágenes de fondo de ojo humano donde: Izq. Ojo sin DMRE, Centro. Ojo con DMRE de tipo seca donde se aprecian pequeños puntos de acumulación de lípidos sin alcanzar un gran tamaño ni vascularización, Der. Ojo con DMRE de tipo húmeda donde se aprecia una drusa de gran dimensión en el cuadrante superior a la mácula. 2. Imágenes de tomografía de coherencia óptica (OCT) donde se observa de izquierda a derecha: retina de paciente sin DMRE, paciente con DMRE de tipo seco y paciente con DMRE de tipo húmedo. 3. Imágenes ilustrativas sobre la pérdida progresiva de visión según progresa la DMRE (izquierda a derecha) (fotografía original).

En la degeneración macular relacionada con la edad de tipo seca encontramos que hay un adelgazamiento de la retina exterior, puede ser unifocal o multifocal o puede rodear la mácula central sin llegar a ella (Mitchell, et al., 2018), dicho adelgazamiento se produce debido a la degeneración del ERP consecuencia de la apoptosis progresiva de dicho tejido. La apoptosis puede deberse, entre otros factores, a la acumulación de lipofuscina

proveniente de una degradación incompleta de lípidos de membrana contenidos en las fagolisosomas de las células del ERP, cuya acumulación, finalmente, originará las drusas características de la enfermedad (Zajac-Pytrus, et al., 2015) (Figura 1). En pacientes crónicos la degeneración macular relacionada con la edad de tipo seca puede devenir a DMRE de tipo húmeda, progresión observada mas no obligada (Nowak, 2006).

DMRE Húmeda.

Por otro lado, la degeneración macular relacionada con la edad neovascular o de tipo húmeda consta de un complejo coroidal neovascularizante que se extiende hacia la región macular sub-retiniana (imagen 1), provocado por la secreción del factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) por parte de la retina. La pérdida de visión asociada con este tipo de DMRE es severa y ocurre, normalmente, en un período de tiempo corto (semanas o meses) (Ricci, et al., 2020). La presencia de fluido o hemorragia retinal, desprendimiento del epitelio retinal pigmentario, exudados duros y tejido cicatricial sub-retiniano también son características patológicas del tipo húmedo de DMRE (Mitchell, et al., 2018 & Nowak, 2006).

A su vez, la DMRE de tipo húmeda comprende tres categorías de neovascularización macular. La DMRE neovascular de tipo 1, donde se observa el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de la capa coriocapilar hacia el espacio sub-ERP, este tipo de degeneración macular tiene una variante que se puede encontrar, principalmente, en personas de origen asiático, la vasculopatía coroidal polipodal. La DMRE neovascular de tipo 2 se origina a partir de la coroides que recorre la membrana de Bruch y el ERP y proyecta

los haces vasculares hacia el espacio subretiniano. Por último, la DMRE neovascular de tipo 3, se origina a partir de la circulación retiniana (comúnmente del plexo capilar profundo) y se extiende hacia el área exterior de la retina, ésta también presenta una variante, la anastomosis retinal-coroidal, que se presenta como una conexión aberrante entre la circulación retinal y la coroidal (Spaide, et al., 2019).

Clasificación AREDS.

El “Eye-Related Eye Disease Study” (AREDS) fue un estudio de la severidad y evolución de la degeneración macular relacionada con la edad llevado a cabo entre los años 1992 y 1998 por 11 clínicas y 4757 participantes. El propósito principal del AREDS fue la obtención de una clasificación general y el establecimiento de una escala de severidad para la DMRE. Con base en lo anterior se obtuvieron seis categorías para la clasificación de la DMRE, estas consisten en: el diámetro de las drusas, desde 63 μm hasta 0.5 áreas de disco (DA), su posición respecto a una gradilla que divide la circunferencia del ojo, anomalías pigmentarias, ya sean despigmentaciones o hiperpigmentaciones, atrofia geográfica (zona de ausencia de ERP) y predominancia de drusas suaves indistintas. De estas categorías de clasificación se obtienen 9 niveles de severidad, desde aquellos sin la patología (retinas sanas) contenidos en el nivel 0 hasta el nivel 7 que sería de máxima severidad, el 8 se reservará a aquellos donde la gravedad es tal que no puede ser categorizada (Tabla 1) (Davis, et al., 2004).

| Grado | Tamaño de drusa | Área de drusa | Aumento de pigmentación | Despigmentación | Atrofia geográfica | Predominancia de drusas suaves indistintas |
|-------|-----------------|---------------|-------------------------|-----------------|--------------------|--|
| 0 | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna | Ninguna |

| | | | | | | |
|---|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
| 1 | Cuestionable | $\geq C-0, < C-1$ | Cuestionable | Cuestionable | Cuestionable | Cuestionable |
| 2 | $< C-0$ | $\geq C-1, < C-2$ | $< C-0$ | $< I-2$ | $< I-2$ | Presente, no predominante |
| 3 | $\geq C-0, < C-1$ | $\geq C-2, i < -2$ | $\geq C-0, < C-1$ | $\geq I-2, < O-2$ | $\geq I-2, < O-2$ | Predominante en 1 de 3 zonas |
| 4 | $\geq C-1, < C-2$ | $\geq I-2, < O-2$ | $\geq C-1, < C-2$ | $\geq O-2, < 0.5 AD$ | $\geq O-2, < 0.5 AD$ | 2 de 3 zonas |
| 5 | $\geq C-2$ | $\geq O2, < 0.5 AD$ | $\geq C-2 < O-2$ | $\geq 0.5, < 1.0 AD$ | $\geq 0.5, < 1.0 AD$ | 3 de 3 zonas |
| 6 | N/A | $\geq 0.5, < 1.0 AD$ | $\geq O-2$ | $\geq 1.0, < 2.0 AD$ | $\geq 1.0, < 2.0 AD$ | N/A |
| 7 | N/A | $\geq AD$ | Sin relación con DMRE | $\geq 2.0 AD$ | $\geq 2.0 AD$ | N/A |
| 8 | Imposible calificar | Imposible calificar | Imposible calificar | Imposible calificar | Imposible calificar | Imposible calificar |

Tabla 1. Escala de gravedad y progresión de pacientes con DMRE con base en la clasificación AREDS. Abreviaciones: N/A, no aplica; AD, área de disco; DMRE, degeneración macular relacionada con la edad (modificado de Davis, et al., 2004).

Diagnóstico.

El diagnóstico de la DMRE comúnmente se realiza por medio de consulta clínica, sin embargo, para la detección de daños maculares específicos es necesario el empleo de técnicas de imagenología auxiliares, en orden de tener un diagnóstico más preciso (Gheorghe, et al., 2015). De estas pruebas, las que más proveen información acerca de la progresión y el buen diagnóstico de la patología podemos destacar a la tomografía de coherencia óptica (OCT) y fluorescencia de fondo de ojo.

La tomografía de coherencia óptica es una de las principales técnicas auxiliares en el diagnóstico de DMRE, este recurso se basa en la tomografía óptica de difracción (ODT), donde se genera una imagen bidimensional no invasiva, producida por la propagación difusa de fotones, de la retina y ERP (Fercher, et al., 2003). La OCT permite la identificación

y caracterización de elementos propios de la enfermedad, de acuerdo con el tipo y etapa en la que esta se encuentre; en una etapa temprana permite la identificación de drusas, su forma y dimensiones, además, para la DMRE con neovascularización de coroides (CNV) puede observarse que para el tipo 1 (localizado entre la membrana de Bruch y el ERP) existe desprendimiento del epitelio pigmentario, acompañado comúnmente por fluido sub-retiniano y para el tipo 2 se presenta como material sub-retinal hiperreflectivo (SHRM) (Schmidt-Erfurth, et al., 2016).

Por otro lado, el fondo de ojo autofluorescente es una técnica para el diagnóstico de la DMRE basada en la emisión de luz azul (488 nm), está excita a sustancias ricas en lípidos tales como lipofuscinas, que luego es detectada tras pasar por dos filtros de 500 nm y 700 nm, mostrando las drusas como zonas de alta autofluorescencia (Ly, et al., 2017).

Tratamiento.

Las opciones de tratamiento para la DMRE son limitadas, estando enfocadas en detener el avance de la DMRE de tipo húmeda utilizando anti-VEGF's, lo cual ralentiza significativamente el crecimiento vascular, algunos de los más utilizados son: Ranibizumab, comercializado por Novartis, Aflibercept, comercializado por Bayer AG y Bevacizumab, comercializado por Roche (Hernández-Zimbrón, et al., 2018). Estos tratamientos son ampliamente utilizados para la DMRE de tipo húmeda; sin embargo, no tiene ningún efecto en cuanto a prevención de la enfermedad ni en tratamiento de la DMRE de tipo seca (Hernández-Zimbrón, et al., 2018), por lo que cada aportación a la dinámica de la

degeneración macular relacionada con la edad es fundamental para el desarrollo de tratamientos preventivos eficientes.

Etiología.

La patogénesis de la degeneración macular relacionada con la edad permanece poco clara, siendo de carácter multifactorial, donde la presencia e interacción de distintos factores devienen en el desarrollo de cambios en estructuras de regiones tales como la mácula, membrana de Bruch y el epitelio retinal pigmentario ERP (Nowak, 2006).

A pesar de la poca información que se tiene respecto a la patogénesis de la DMRE, la evidencia indica que los cambios en el ERP son parte fundamental del desarrollo de la enfermedad. El ERP consta de una monocapa de células pigmentadas que forman parte de la barrera hemato-retiniana, debido a que se encuentra ubicado entre la membrana de Bruch y los segmentos posteriores de los fotorreceptores.

El ERP tiene actividades fundamentales en el mantenimiento de los fotorreceptores de la retina, pues es parte del ciclo visual, al convertir el todo-*trans*-retinol a 11-*cis*-retinol, fagocita los segmentos externos de los fotorreceptores, además de tener actividades de transporte de nutrientes de la coroides a la retina y transporte de agua en sentido contrario, así como actuar como amortiguador de iones y lactato provenientes de la capa de fotorreceptores (Strauss, 2005).

Dentro de los agregados típicos de lipoproteínas en la membrana de Bruch y el espacio sub-ERP se ha encontrado que la mayoría de éstos no son de origen plasmático, apoyando a lo antes dicho en lo referente a un origen retinal de los lípidos, dentro de la variedad de éstos

se ha podido observar la presencia de colesterol, apolipoproteína B100 y fosfatidilcolina (Ebrahimi, et al., 2011). Relacionado con la presencia de lipoproteínas en los agregados se ha visto que algunos componentes implicados en la homeostasis de dichos lípidos modulan la susceptibilidad hacia la DMRE, tal es el caso de la apolipoproteína E (APOE) (Toops, et al., 2016).

2.2 Factores de riesgo para la DMRE

Edad.

El envejecimiento es el principal factor de riesgo hablándose de la DMRE, debido a que la estructura y actividad retiniana cambian según avanza la edad (Heesterbeek, et al., 2020). Asimismo, la presencia de drusas se considera un rasgo normal de envejecimiento, por lo tanto, la prevalencia de DMRE aumenta junto con la edad de la población, siendo que para la población menor a 55 años del 0.08% para DMRE seca y 0.14% para DMRE húmeda mientras que para mayores de 85 años aumenta a 7.54% para DMRE de tipo seca y de 8.49% para DMRE de tipo húmeda, un aumento considerable de la prevalencia (Lambert, et al., 2016).

Tabaquismo.

Se ha descrito ampliamente al tabaquismo como uno de los mayores factores de riesgo en la DMRE, este riesgo asociado puede observarse a partir de varios mecanismos que se ven alterados debido a la presencia de nicotina: el primero es la estimulación de la neovascularización a través de la producción de VEGF y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) , mientras que el segundo es el estrés oxidativo derivado de la producción

de óxido nítrico (NO), así como la acumulación de cadmio e hidroxiquinona (HQ) (Velilla, et al., 2013).

Factores genéticos.

A través de una gran cantidad de estudios se ha identificado que existe un componente genético, además de los componentes ambientales, que puede predisponer a un paciente a desarrollar DMRE. Dentro de dichos componentes genéticos se encuentran patologías hereditarias tales como las distrofias maculares de Best, Stargardt o Sorsby, similares a la DMRE. A partir de lo anterior, se ha visto que genes como el gen del transportador dependiente de ATP subfamilia A miembro 4 (*ABCA4*), cuya delección deviene en la distrofia macular de Stargardt también se presenta como un factor de riesgo para el desarrollo de la DMRE, así como *ABCA4*, podemos encontrar más candidatos que podrían formar parte importante de la predisposición genética a la DMRE, tales como los genes: CFH, CX3CR1, VEGF, EFEMP1, ACE, por mencionar algunos. (Patel, et al., 2008).

2.3 Apolipoproteínas y DMRE

Las apolipoproteínas son las lipoproteínas más abundantes en el plasma sanguíneo, siendo una de sus principales actividades el transporte de lípidos a los tejidos; debido a esto existe una gran variedad de apolipoproteínas sintetizadas en lugares varios y actuando de maneras distintas de acuerdo con su estructura (Mahley, et al., 1984).

En las células hepáticas se sintetiza la apolipoproteína B-100 (APOB-100), una molécula de 559 KDa, a la cual se unen triglicéridos y colesterol, formándose así lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), ésta viaja a través del plasma donde se encuentra con la

lipoproteínlipasa, presente en la superficie de las células endoteliales, las que hidrolizan y remueven triglicéridos, descomponiendo a la VLDL. Cuando el remanente de VLDL queda con pocos triglicéridos pasa a ser una lipoproteína de baja densidad (LDL) y posteriormente es removida de la circulación a su paso por el hígado en cuyas células se encuentra el receptor de LDL (Devaraj, et al., 2020).

El gen que codifica a APOB-100 también codifica a la lipoproteína B-48 (APOB-48), partícula de la mitad de tamaño de su contraparte APOB-100, únicamente de 265 KDa (Devaraj, et al., 2020). APOB-48 es sintetizada en el intestino delgado y, a diferencia de APOB-100, ésta no posee el dominio de unión al receptor LDL por lo que no participa en la formación de VLDL; sin embargo, APOB-48 es un elemento clave en la formación de quilomicrones en los enterocitos y su posterior secreción (Nakajima, et al., 2014).

Por otra parte, las apolipoproteínas A (APOA) se encuentran fundamentalmente asociadas a lipoproteínas de alta densidad (HDL), la cual comúnmente se relaciona con el transporte de lípidos tales como colesterol. El metabolismo de las HDL comienza en el hígado e intestino, donde APOA-I es sintetizada y liberada libre de lípidos al plasma, posteriormente en el plasma, obtiene fosfolípidos y colesterol de las membranas celulares por medio de una reacción mediada por ABCA. El colesterol presente en esta HDL en formación es esterificado por la lecitin-colesterol acetiltransferasa (LCAT) formando colesteril ésteres que, siendo hidrofóbicos, al interactuar con el agua plasmática se trasladan al núcleo de la HDL, formando así su núcleo hidrofóbico. Las HDL continúan con un remodelado posterior asociado a varios factores, uno de los cuales es la adición de fosfolípidos por acción de la

proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) a partir de moléculas de VLDL y quilomicrones, esto puede ocasionar una desestabilización de la partícula de HDL que resultaría en un intercambio de constituyentes con partículas ricas en apolipoproteína B (APOB) por medio de la colesterol éster transferasa (CETP) generando una HDL rica en triglicéridos (Van der Vorst, 2020).

Apolipoproteína E.

Otra apolipoproteína fundamental en el transporte y metabolismo de lípidos es la apolipoproteína E (APOE), punto focal de este estudio. La APOE es una glucoproteína de 34 KDa y 299 aminoácidos codificada en el cromosoma 19q13.32 (Li, et al., 2020). La APOE presenta dos dominios separados por una región bisagra, el dominio N-terminal que contiene los aminoácidos del 1-191 presenta la estructura de unión a receptor (aminoácidos 134-150 y Arg-172), y forma un haz de cuatro hélices antiparalelas y el dominio C-terminal que está conformado por los aminoácidos 225-299 y contiene la región mayor de unión a lípidos (aminoácidos 244-272) (Mahley, et al., 2009).

APOE interviene en una amplia variedad de procesos, de los cuales el metabolismo y transporte de lipoproteínas ricas en triglicéridos y colesterol es uno de los fundamentales (Marais, 2019). Sin embargo, podemos encontrar que APOE también tiene actividades vasculares en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BBB), agregación de plaquetas, y actividades inmunológicas en respuestas inflamatorias, donde influye incluso en la diferenciación de macrófagos hacia M2 y proliferación de linfocitos y células T cooperadoras (Marais, 2019).

La apolipoproteína E se puede observar en plasma, en linfa y en fluido cerebroespinal y ; es producida en su mayoría por hepatocitos y en menor proporción en otros tejidos tales como el cerebro, glándulas adrenales, testículos, piel, riñones, bazo, adipocitos y células como macrófagos. Dentro del sistema nervioso central (SNC) APOE es sintetizada principalmente por astrocitos; sin embargo, otras células gliales también son capaces de sintetizar dicha proteína, tales como glía de Bergmann, tenicitos, pituicitos y células de Müller de la retina (Huang & Mahley, 2014; Phillips, 2014). La APOE viaja asociada con tres partículas: quilomicrones procedentes del tubo digestivo, lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de alta densidad. Estas partículas son lipolizadas y la APOE presente en los residuos se une al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) que, a su vez, se une a la proteína relacionada con LDLR y al heparán sulfato proteoglicano (HSPG) en la superficie de los hepatocitos, quienes fagocitan los residuos lipídicos (Phillips, 2014).

Apolipoproteína E en el SNC.

El transporte de lípidos dentro del sistema nervioso central difiere del de la circulación periférica; dentro del SNC podemos encontrar principalmente APOA-I y APOE, asociadas con HDL's. APOE es sintetizada principalmente por astrocitos, sin embargo, se ha visto que la microglía también es capaz de sintetizar APOE en condiciones patológicas como en la enfermedad de Alzheimer o regiones con lesiones y las neuronas contienen una variante de mRNA de APOE distinta a la presente en astrocitos y hepatocitos (Mahley, 2016).

Isoformas de la apolipoproteína E.

Se han identificado tres variantes para la apolipoproteína E; APOE2, APOE3 y APOE4, cada una diferenciándose por su afinidad al receptor de lipoproteínas, siendo que APOE2 tiene una baja afinidad para el receptor de lipoproteínas de baja densidad, mientras que APOE4 presenta baja afinidad para el receptor de lipoproteínas de alta densidad (HDLR) (Levy, et al., 2015). La variación entre las tres proviene del cambio en un aminoácido en las posiciones 112 y 158: APOE2 contiene una cisteína en cada una de dichas posiciones, APOE4 contiene una arginina en cada una de estas posiciones y la variante más común APOE3 contiene una cisteína en la posición 112 y una arginina en la 158 (Li, et al., 2020).

2.4 Polimorfismos de nucleótido único y DMRE

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP's) son el tipo más común de variaciones genéticas que podemos encontrar, se estima que ocurre una vez cada 1,000 pb, esta variación se origina por la sustitución de un nucleótido por otro en el genoma (Shastry, et al., 2009).

Dentro de la paleta de factores genéticos encontrados que interactúan y tienen presencia en el desarrollo de la DMRE podemos encontrar polimorfismos de genes cuyo impacto puede presentarse como protector o puede propiciar la aparición de la enfermedad. Uno de los genes antes mencionados (ver Factores genéticos) es el ABCA4 que se sabe es un factor importante en la aparición de la distrofia macular de Stargardt, otra patología macular degenerativa; dentro de la gran variedad de polimorfismos que presenta el gen (Allikmets, et al., 1997), se ha visto que los SNP's G1961E c.5882 G>A y D2177N c.6529 G>A están asociados con un aumento en el riesgo de la DMRE (Zhang, et al., 2015). Dentro del

mismo grupo de proteínas, el transportador dependiente de ATP subfamilia A miembro 1 (ABCA1) presenta el polimorfismo rs1883025 g.31136 G>A que, al contrario de sus contrapartes en ABCA4, G1961E y D2177N, presenta un efecto protector ante la DMRE (Wang, et al., 2015).

El factor de complemento H también tiene un polimorfismo de nucleótido único CFH c.1204= (Y402H) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/16549/>) que aumenta el riesgo patológico a DMRE, de la misma manera la variante del gen ARMS2 c.205G>T (A69S) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/979/>) se identifica como un factor de riesgo, de manera similar a CFH Y402H (Jabbarpoor Bonyadi, et al., 2017). Asimismo, se han estudiado ampliamente los polimorfismos de VEGF, debido a su importancia como objetivo para tratamientos; sin embargo, los resultados han sido variados, puesto que algunos SNP's se muestran como factores de riesgo, mientras que otros no, dependiendo de la población en la que se realice el estudio (Barchitta & Maugeri, 2016; Gonçalves, et al., 2015).

2.5 Polimorfismo de nucleótido único APOE2 rs7412

Las tres variantes del gen APOE2 son consecuencia de dos polimorfismos de nucleótido único; rs429358 con un cambio T>C en la posición chr19:44908684(GRCh38.p13) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs429358?vertical_tab=true) y rs7412 con un cambio C>T en la posición chr19:44908822(GRCh38.p13) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7412?vertical_tab=true#frequency_tab), siendo ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 haplotipos diferentes para el gen APOE (Seripa, et al., 2011).

Evolutivamente, APOE4 es la variante primigenia de la apolipoproteína, seguida de la isoforma APOE3, producto de una mutación que originó al polimorfismo rs429358; por último, el alelo más reciente ϵ 2 surge de la mutación que da origen al polimorfismo rs7412, originando a la menos abundante isoforma APOE2 (Huebbe & Rimbach, 2017).

Relación entre el SNP rs7412 y la DMRE.

Se ha demostrado la presencia de las apolipoproteínas E en las drusas características de la DMRE, además de la expresión de los receptores a dichas proteínas en las células del ERP y en las neuronas (Toops, et al., 2015).

Estudios de prevalencia y de asociación presentan resultados contradictorios; sin embargo, la mayoría está de acuerdo en que el haplotipo ϵ 2 es un factor de riesgo en la progresión de la enfermedad (Xiyang, et al., 2017; Baird, et al., 2006; Viturino, et al., 2021; Liutkeviciene, et al., 2018), pues ϵ 2 presenta una menor afinidad a receptores para lipoproteínas de baja densidad (Levy, et al., 2015), además de esto, se ha demostrado en murinos que promueve la expresión de factores de transcripción tales como VEGF, que a su vez promueve la vascularización y es signo de DMRE húmeda (Sun, et al., 2020; Lee, et al., 2007); sin embargo, un trabajo reciente identifica al haplotipo ϵ 2 con un rol protector, pues es encontrado en mayor cantidad en individuos sin DMRE que en aquellos con DMRE (Fernández-Vega, et al., 2020).

2.6 Detección de polimorfismos de nucleótido único.

Debido a la extensa presencia de genes polimórficos y con ello al incesante descubrimiento de SNP's se han desarrollado técnicas de detección de estos cada vez más sofisticadas, sin

embargo, desde hace más de 20 años que existen técnicas de alto rendimiento para la localización e identificación de SNP's. En un principio las técnicas se basan en la amplificación de una secuencia específica del gen, donde se une una sonda corta, dentro de estos ensayos podemos encontrar algunos que, al unirse a su blanco, emiten energía a través de un fluoróforo, tal es el caso de las balizas moleculares, ligadura de oligonucleótidos marcados con colorante, minisequencia FRET y sondas TaqMan® (Landegren, et al., 1998).

El ensayo de nucleasa 5' o ensayo de sondas TaqMan® consta de una secuencia que reconoce a la secuencia de interés e hibrida entre los dos *primers* del PCR, esta secuencia tiene en su estructura dos fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda, además de tener una temperatura de hibridación ligeramente mayor, para que se mantenga unida cuando comience la etapa de extensión de los *primers*. Conforme a la dirección 5'-3' (forward primer) va polimerizando y alcanza la sonda, el marcador reportero (reporter dye) se desprende, sin embargo, la fluorescencia no se alcanza hasta que éste y el marcador inhibidor (quencher dye) no se encuentran en cercanía (Butler, 2012) (Figura 2).

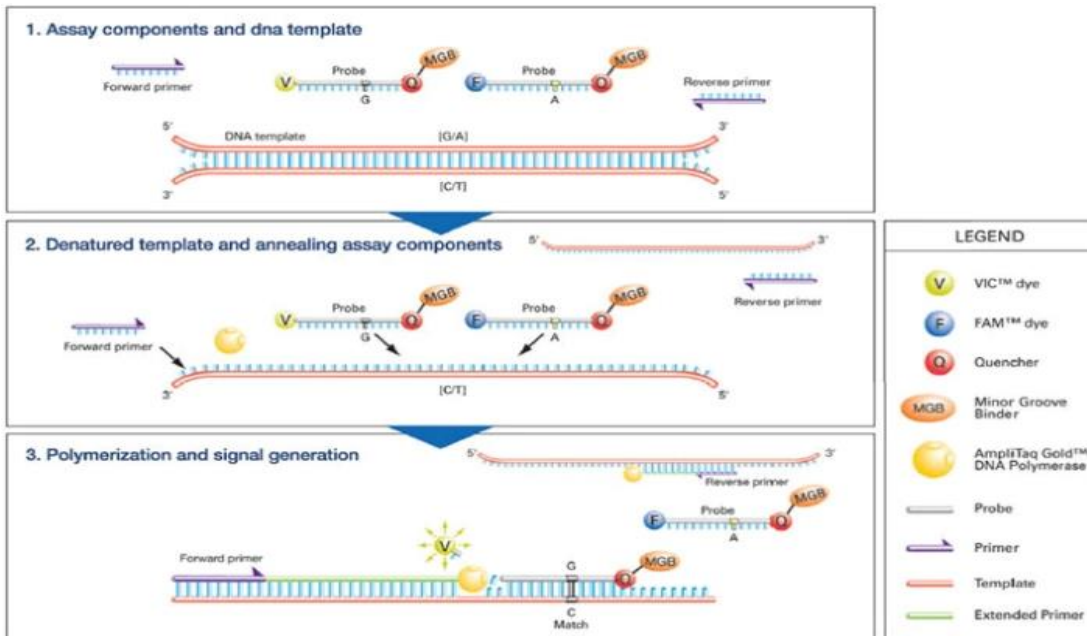


Figura 2. Imagen ilustrativa de la secuencia de procesos en el ensayo de sondas Taqman®, donde la primera imagen (1) ilustra los materiales necesarios para llevar a cabo el ensayo, la siguiente imagen (2) muestra la desnaturalización del DNA y unión a la secuencia de interés, por último (3) se muestra la polimerización y emisión de señal. A la derecha encontramos el cuadro de componentes de la sonda Taqman® (extraído de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>)

3. Planteamiento del problema

La degeneración macular relacionada con la edad es una enfermedad frecuente en personas de edad avanzada, aunado a lo anterior, sabemos que uno de los marcadores de esta patología es la acumulación de sustancias ricas en lipoproteínas. Así mismo, la presencia del transportador de lipoproteínas APOE y sus variantes correspondientes APOE2, APOE3 y APOE4 tienen un efecto demostrado sobre esta enfermedad. Alteraciones derivadas a mutaciones en estas lipoproteínas pueden derivar en el desarrollo temprano de la DMRE o bien tener un efecto protector.

La presencia del haplotipo $\epsilon 2$ derivado del SNP rs7412 se ha identificado como un factor de riesgo en la gran mayoría de estudios de prevalencia, de ahí surge la motivación por realizar un estudio de este tipo, con el propósito de identificar la prevalencia del SNP rs7412 y su posible rol de riesgo en la progresión de la DMRE para la población mexicana.

3.1 Pregunta de investigación

¿Cuál es la prevalencia del polimorfismo de nucleótido único rs7412 del gen APOE2 en una población mexicana con DMRE?

3.2 Hipótesis

El polimorfismo de nucleótido único rs7412 del gen APOE2 tendrá una prevalencia mayor al 10% en la población mexicana con DMRE.

3.3 Objetivos

Objetivo general: Determinar la prevalencia del polimorfismo de nucleótido único rs7412 del gen APOE4 en población mexicana con DMRE.

Objetivo particular: Describir las características patológicas de la DMRE en la misma población.

4. Diseño de estudio

Estudio prevalencia del polimorfismo rs7412, transversal y observacional en una población mexicana con DMRE.

5. Material y métodos

5.1 Lugar de estudio y duración

El estudio fue realizado en la Unidad de Investigación – Asociación para Evitar la Ceguera en México, Dr. Luis Sánchez Bulnes entre agosto del 2021 y enero del 2022.

5.2 Consideraciones éticas y/o carta de consentimiento bajo información

Todos los pacientes incluidos en el estudio entendieron, aceptaron y firmaron el consentimiento informado aprobado por los Comités de Ética e Investigación del hospital (COFEPRIS 17 CI 09 003 142) el 17 Jul 2018 con el número de protocolo INV-18-03. Para el desarrollo de este proyecto se tomaron en cuenta los principios de la declaración de Helsinki para investigación en humanos.

5.3. Bioseguridad

El riesgo biológico infeccioso por el manejo de muestras de sangre, se trabajó cumpliendo la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo para evitar la contaminación al medio ambiente y disminuir el riesgo para la salud humana.

5.4 Población

5.4.1 Unidad de observación

Pacientes con diagnóstico de degeneración macular relacionada con la edad seca (temprana o intermedia) o húmeda.

5.4.2 Universo

Pacientes con diagnóstico corroborado mediante clínica o imagen de degeneración macular relacionada con la edad.

5.4.3 Método de muestreo

Reclutamiento por conveniencia (convenience sampling).

5.4.4 Obtención de la población

Dentro del hospital de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México I.A.P se reclutaron pacientes atendidos que cumplieran con los criterios de inclusión, y cuya participación fuera únicamente voluntaria, durante el período comprendido a lo largo del año 2021.

5.5 Criterios de Inclusión

- 1.- Pacientes mexicanos cuya edad fuera igual o mayor a los 50 años
- 2.- Diagnóstico de degeneración macular relacionada con la edad temprana (seca o húmeda de acuerdo a la clasificación de la AREDS)
- 3.- Deseo por participar en el estudio y firma de conformidad al consentimiento informado

5.6 Criterios de exclusión

- 1.- Que el/la paciente tenga una edad inferior a los 50 años
- 2.- Que el/la paciente presente opacidad de medios que impida visualización de la retina (hialosis asteroidea densa, hemorragia vítrea, catarata brunesciente, opacidad corneal)
- 3.- Que el/la paciente presente diagnóstico de degeneración coroidomiópica
- 4.- Que el/la paciente presente diagnóstico de retinopatía hipertensiva
- 5.- Que el/la paciente presente algún tipo de uveítis

6.- Que el/la paciente presente algún deterioro cognitivo que imposibilite la valoración de polo posterior

7.- Que el/la paciente presente maculopatías de algún otro tipo

8.- Que el/la paciente presente retinopatía diabética proliferativa

5.7 Tamaño de la muestra

Se utilizó el programa EpiInfo para calcular el tamaño muestral para una población finita y para un diseño de prevalencia, con un poder deseado de 95%, un margen de error aceptable del 5%, una frecuencia alélica esperada de 7%, se requiere una muestra total de 99 muestras. Se obtuvo una muestra real de 56 individuos que cumplieron los criterios de inclusión.

5.8 Toma de muestras de pacientes y su procesamiento

Extracción de DNA.

El DNA genómico total fue extraído a partir del hisopado bucal realizado a los pacientes haciendo uso del Kit de purificación total QIAamp® DNA blood Mini Kit No. De catálogo 51104 (QIAGEN®), de acuerdo al protocolo manifestado por el fabricante.

Al primer tubo eppendorf® le fueron agregados 20µl de proteinasa K (600 miliunidades de absorbancia/ml (mAU/ml)), sobre las muestras recolectadas por hisopado bucal, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Después le fueron adicionados 200µl de bufer AL (Bufer de lisis), mezclándose en vórtex durante 15 segundos. La muestra se incubó durante 10 minutos a una temperatura de 56°C. Una vez pasado el tiempo la muestra fue

centrifugada a 8,000 RPM durante 40 segundos con el propósito de remover las gotas de las paredes del interior del tubo. Acto seguido, se adicionaron 200µl de etanol 100%, el volumen total en el algodón del hisopo fue recuperado y centrifugando nuevamente a 8,000 RPM por 40 segundos. Cuidadosamente, la muestra anterior fue colocada en una mini columna de centrifugado QIAamp®, y centrifugada a 8,000 RPM (Thermo Scientific 75002554 - Pico 21 Microcentrifuge) durante un minuto, se cambió el tubo de colección y se descartó el filtrado.

Posteriormente, se adicionaron 500µl de buffer AW1, cuya composición no se encuentra declarada en el manual y fue centrifugada a 8000 RPM por un minuto, una vez más se cambió el tubo de colección y se descartó el filtrado. Se adicionaron 500µl de buffer AW2, cuya composición no se encuentra declarada en el manual, y se centrifugó a 14,000 RPM durante 3 minutos. Finalmente, se descartó el filtrado y se adicionaron de 200-100µl de buffer AE. Se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 minutos para incrementar el rendimiento del DNA y la muestra se centrifugó a 8000 RPM durante un minuto. Una vez finalizado el proceso el filtrado se colocó en hielo y posteriormente fue determinada su concentración por espectrofotometría.

Cuantificación de DNA por espectrofotometría.

Las concentraciones del DNA purificado fueron determinadas por espectrofotometría. Se utiliza el equipo Gen5® (BioTek) y el software versión 3.04 para el análisis. Se colocaron 2µl de bufer AE (10 mM Tris-Cl. 0.5 mM EDTA; pH 9.0.) sobre el dispositivo Take3® (No. 289719)

(BIOTEK, CA, USA), que funciona como “cubeta” de cuarzo para la cuantificación de ácidos nucleicos en el espectrofotómetro CYTATION3® (BIOTEK, CA, USA), para ser leídos como blanco. Posteriormente, se colocaron 2µl de muestra por duplicado en el dispositivo Take3® y se procedió con la cuantificación en el espectrofotómetro antes mencionado.

Evaluación de integridad del DNA por gel de agarosa.

Fue utilizado con el propósito de valorar la integridad de DNA genómico y evaluar el éxito de la amplificación lograda por la PCR. Se calculó la concentración de agarosa requerida, que fue de 1x (referencia para evaluar DNA genómico), posteriormente se calculó la dimensión y el volumen del gel necesario para el tanque de electroforesis.

Continuando con lo anterior, en un matraz Erlen-Meyer de 200ml se colocaron 500 mg de agarosa de grado molecular marca Bioline® (No. De catálogo BIO-41025) en 50 ml de buffer TAE al 1X, y fue calentada para disolver la agarosa. Se permitió la polimerización de 10-30 minutos, cubriéndolo de corrientes de aire y polvo. Durante este tiempo se preparó el buffer TAE al 1X (Tris/Acetato/EDTA (TAE), 25X Liquid Concentrate, ultra puro, AMRESCO®, LLC. No. de catálogo e0796-1.6L) 1,000ml.

Después de transcurrido el tiempo se retiraron los sellos acrílicos del casete y se colocó dentro del tanque de electroforesis, se le agregó buffer TAE 1% hasta la línea de referencia. Posterior y cuidadosamente fue retirado el peine del gel para evitar romper los pocillos y así estuvieron preparados para cargarlos. De los carriles 2-43 se cargaron con 5µl de la muestra de DNA y se le adicionaron 2µl de 6X TriTrack DNA Loading Dye® (Thermo Scientific,

No. Lote 00752576), en el primer carril se colocó 3µl de 1Kb DNA Ladder (Axygen, No. lote M-DNA -1KB). El gel de electroforesis se corrió a 80 volts por 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, en un ambiente con luz tenue se sacó el casete y el gel se colocó en un contenedor con una disolución de SYBR® *Safe DNA gel stain* (Invitrogen, No lote 1880742) en buffer TAE, a una concentración 1:10,000, fue cubierto con aluminio y se dejó en agitación por 30 minutos. Por último, el gel fue colocado en un transiluminador de luz UV para la observación de las bandas de DNA.

Genotipificación.

Preparación de sonda TaqMan®.

El siguiente protocolo fue la genotipificación para rs7412 utilizando una sonda TaqMan® SNP Genotyping Assay (Número de catálogo C_904973_10, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Para su preparación primero se realizó la preparación de la sonda TaqMan®, que se encuentra a una concentración 40X y se requieren stocks a 20X. Es necesaria la dilución 1X del bufer TE, que tiene una composición 10-mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8.0, en agua libre de DNAsas, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. (Amresco, No catálogo M101-500G) y Tris-HCL® (US Biological, No. Lote T8650) y, posteriormente, se realizó un cálculo para obtener la molaridad requerida, siendo necesario diluir 0.1576g/100ml de Tris-HCL y 0.0372g/100ml de EDTA para la preparación del bufer. Después la solución fue filtrada en campana de extracción y se obtuvieron 3 stocks de la sonda TaqMan® para su almacenamiento a una concentración 1:1 a un volumen final de 50µl, y el cuarto stock se preparó a la misma concentración, pero a un volumen final de 12µl.

Los tubos obtenidos en el proceso anterior (preparación de sonda TaqMan®) fueron rotulados por números del 1 al 4 y almacenados los tres primeros a -20°C. y el cuarto se dejó para su utilización. Se realizó la solución stock para el total de muestras, de ahí se colocó una alícuota en los tubos eppendorf®, le fue adicionada agua libre de DNAsas y el DNA extraído.

Las muestras fueron centrifugadas a 8,000 RPM durante dos minutos, previo a la colocación de la placa en el equipo. Posteriormente el programa StepOne plus® Real-Time PCR (Applied Biosystems; USA).

se abrió en la computadora, se seleccionó la opción de “nueva corrida”, se le indicó la opción a realizar como “genotipificación”, se agregó la “pre-corrída” y se indicaron las temperaturas preestablecidas por fábrica.

Una vez que finaliza la lectura se seleccionó la opción de “analizar” y se obtuvieron los datos a través del uso del software StepOne Plus™ (Applied Biosystem, USA).

A continuación, se especifica la secuencia genómica analizada:

APOE E2

e2 (c.388T4C) NM 000041.2

rs7412(Homo sapiens)

CCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T]GCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGC

Cromosoma: 19:44908822

Gen: APOE

Consecuencia funcional: missense

Origen alélico:T(germline)/C(germline)

Significancia clínica: Patogénico

Validado por: 1000G, 2hit 2allele, cluster, frequency, hapmap

Frecuencia alélica menor global: T=0.0751/376

APOE E2_e2 (c.526C>T) NM 000041.2 (p.Arg176Cys)

Frecuencia alélica:

- GO-ESP 0.06631 (T)
- GMAF 0.07510 (T)
- ExAC 0.07182 (T)

5.9 Recolección y análisis de los datos

Los datos fueron recabados y ordenados utilizando como herramienta el software de hojas de cálculo de Microsoft Excel®, para su posterior análisis se recurrió al lenguaje de programación R y el software libre estadístico RStudio®, de ellos se obtuvieron los datos estadísticos poblacionales tales como: distribución poblacional de voluntarios por sexo y edad. Asimismo, de la población anteriormente mencionada se realizó un análisis de prevalencia del polimorfismo APOE rs7412. Posteriormente, se realizaron análisis descriptivos sobre la relación del SNP rs7412 y la edad de los individuos.

6. Resultados

6.1 Descripción estadística de la población

De los individuos muestreados, 56 cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales 13 son masculinos (~ 23%), mientras que 43 son femeninos (~ 77%) (figura 3 a). Sus edades se encuentran en el rango entre los 57 y 94.2 años de edad para el grupo femenino, con una media de 78.57 ± 8.65 años, por otra parte, dentro del grupo masculino las edades oscilan

entre 65.4 y 90.7 años de edad con una media de 77.58 ± 6.24 años. Las edades de los individuos, tanto masculinos como femeninos, presentan una distribución normal probada mediante test de Shapiro-Wilk ($p = 0.42$ para el grupo femenino y una $p = 0.94$ para el grupo masculino) (figura 3 b).

6.2 Distribución de la DMRE en la población

Por otro lado, la distribución del tipo de degeneración macular relacionada con la edad (Seca/Húmeda) se presenta como sigue: dentro del grupo femenino 33 presentan DMRE de tipo húmeda (~ 59%), mientras que 10 presentan DMRE de tipo seca (~ 18%), para el grupo masculino, 10 presentan DMRE de tipo húmeda (~ 18%), por otro lado únicamente 3 presentan DMRE de tipo seca (~ 5%) (figura 3 c). De la totalidad de individuos que cumplieron con los criterios de inclusión ($n=56$) 21 presentaron el polimorfismo de nucleótido único rs7412 (37.5%), es decir, 375 por cada mil individuos con DMRE presentan dicho polimorfismo. De estos; 8 (14.3%) fueron individuos masculinos y 13 (23.2%) fueron femeninos.

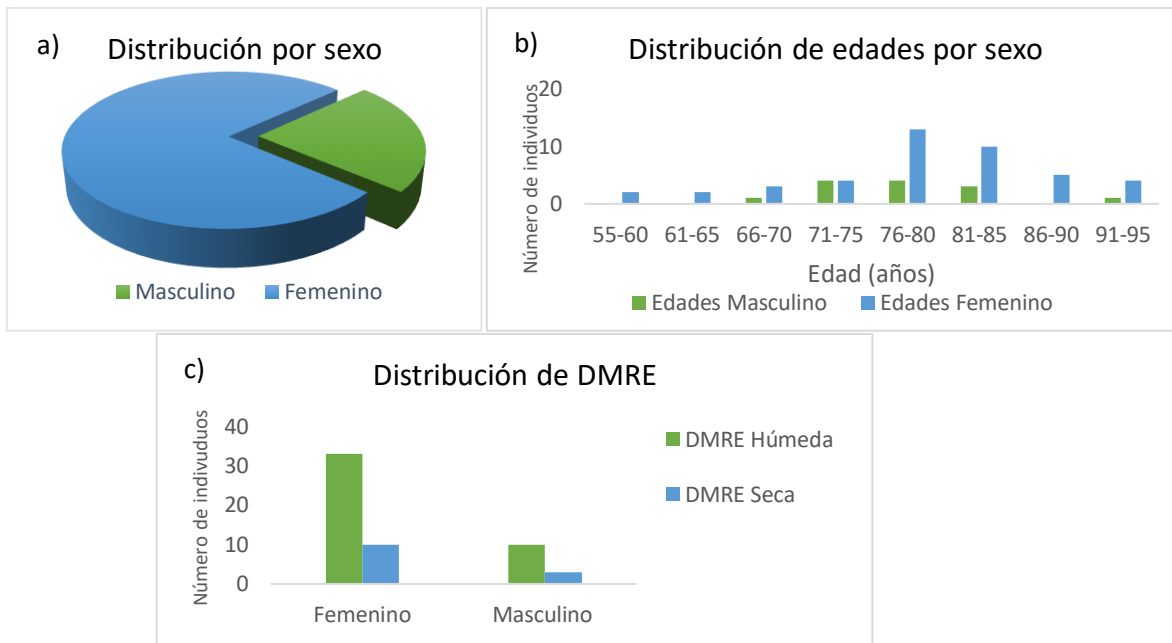


Figura 3. Descripción de la población, donde: a) representa la distribución por sexo, en azul femenino, en verde, masculino; b) distribución de la edad de los voluntarios según su sexo; c) distribución del tipo de DMRE según el sexo de los voluntarios, verde representa la DMRE de tipo húmeda, mientras azul representa la DMRE de tipo seca.

6.3 Descripción comparativa con controles

Haciendo uso de datos de detección del SNP rs7412 de voluntarios sin presencia de ningún tipo de retinopatía pero dentro del rango de edad presentado en los criterios de inclusión (n=20), junto con los pacientes que cumplieron con la totalidad de criterios de inclusión (n=56), fue posible realizar una descripción proporcional de la relación entre el tipo de DMRE, ordenados en tres categorías: sin DMRE, con DMRE de tipo seca y con DMRE de tipo húmeda y la presencia/ausencia del polimorfismo (Tabla 2).

| | | Mutación | | Proporción | |
|------|------------|----------|----------|------------|------------|
| | | Ausente | Presente | | |
| DMRE | Sin (0) | 7 | 13 | 0.09210526 | 0.17105263 |
| | Seca (1) | 9 | 4 | 0.11842105 | 0.05263158 |
| | Húmeda (2) | 26 | 17 | 0.34210526 | 0.22368421 |

Tabla 2. Población absoluta de individuos con presencia DMRE (Sin DMRE (0), DMRE de tipo seca (1) y DMRE de tipo húmeda (2)) y presencia del polimorfismo de nucleótido único rs7412 (n= 76) ("Mutación" en la tabla). Población relativa de la relación de individuos con distintos estados de DMRE y presencia/ausencia del SNP rs7412 ("Proporción" en la tabla).

Con base en los datos mostrados en la tabla 2 se puede observar que de la población muestreada de 76 individuos el 45% (34 individuos) presentan polimorfismo de nucleótido único rs7412, de estos, 62% (22 individuos) presentan algún tipo de DMRE.

De la población total (n=76) el 17% (13 individuos) presentan el polimorfismo sin haber desarrollado DMRE de ningún tipo, mientras que 22% (17 individuos) presentan DMRE de tipo húmeda sumado a la presencia del polimorfismo y 5% (4 individuos) presentan DMRE de tipo seca junto con el polimorfismo (Figura 4).

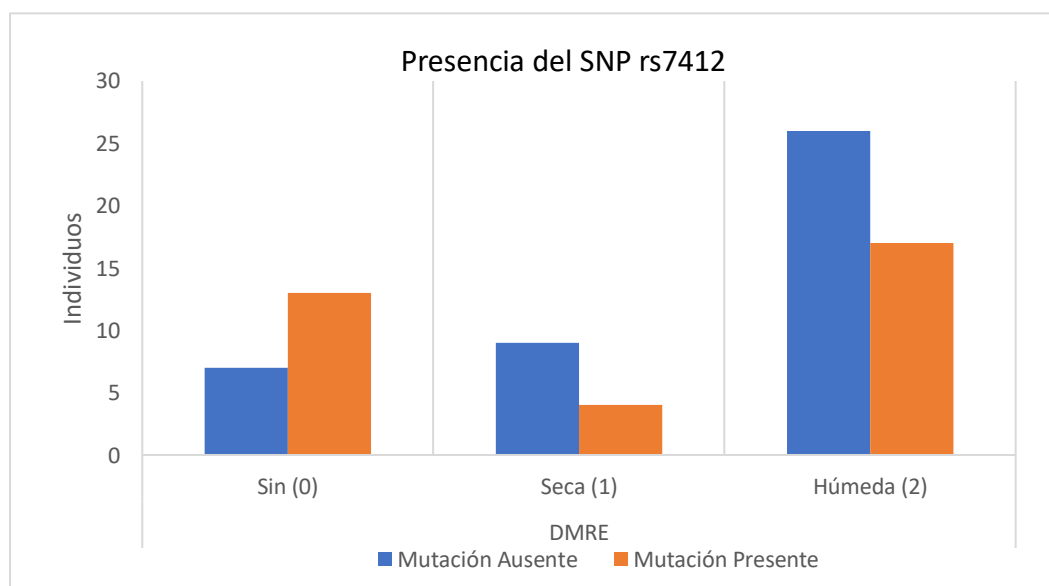


Figura 4. Representación gráfica de la tabla 2, donde se muestra en color naranja la presencia del SNP rs7412 (Mutación Presente) y en color azul la ausencia del SNP rs7412 (Mutación Ausente) para las tres categorías; sin DMRE (Controles; Sin (0)), con DMRE de tipo seco (Seca (1)) y con DMRE de tipo húmeda (Húmeda (2)).

Así mismo, de los datos anteriormente mencionados se realizó una comparación gráfica entre la presencia del polimorfismo y el tipo de DMRE que presentan los pacientes con los rangos de edades de los mismos (Figura 5).

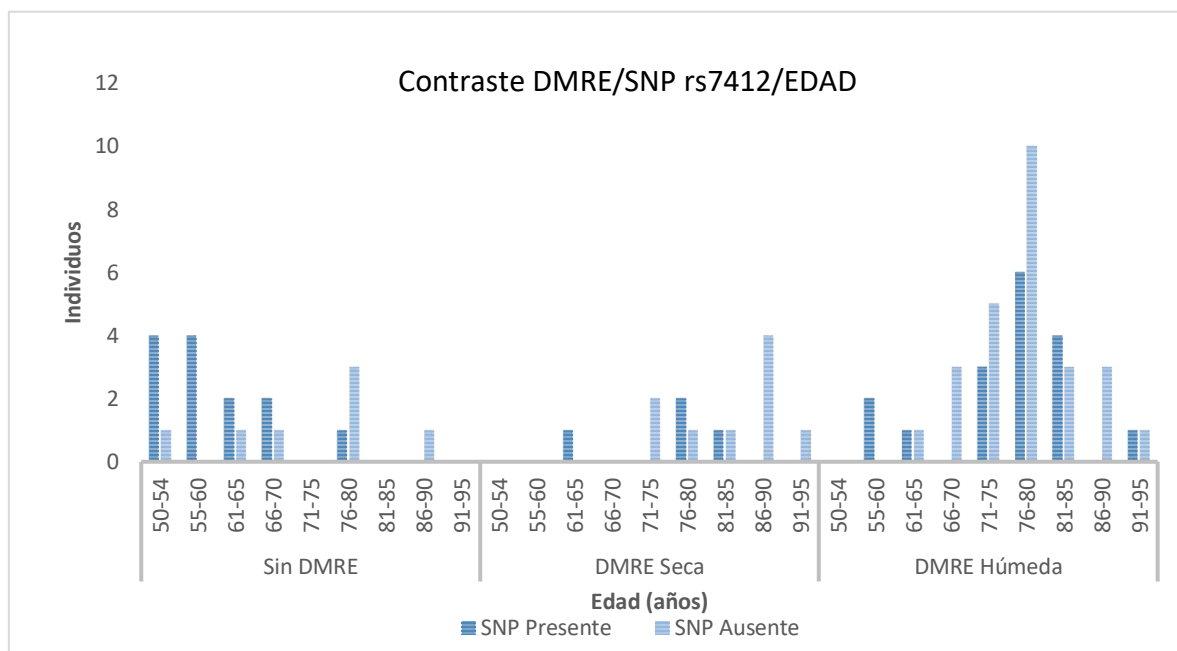


Figura 5. Distribución de individuos, contrastando la presencia y tipo de DMRE (Sin DMRE, DMRE seca y DMRE Húmeda) con la edad de los individuos (años) y la presencia del SNP rs7412 (SNP presente (azul oscuro), SNP ausente (azul pálido)).

7. Discusión

En la población mexicana, en su mayoría conformada por personas residentes de la Ciudad de México, tomada en cuenta para este estudio 77% de los individuos presentaron DMRE de tipo húmeda, mientras que el 23% restante presentaron DMRE de tipo seca. En 2020 Li Jeany y colaboradores realizaron un estudio de meta-análisis en la población europea, donde de las 15,324 muestras que analizaron con DMRE el 91% presentaron DMRE

temprana (seca) y 9% presentaron DMRE tardía (húmeda) (Li, et al., 2020), mientras que para una población brasileña Viturino y colaboradores reportan que de los 334 pacientes con DMRE, 40% presentaron el tipo seco y 60% el tipo húmedo (Viturino, et al., 2021), pudiendo notar un cambio importante en la prevalencia del tipo húmedo sobre el seco para las dos poblaciones latinoamericanas (la brasileña y la mexicana de este estudio) en contraste con la población europea (Viturino, et al., 2021).

Para una población mexicana con una extensión de 56 individuos que cumplieron los criterios de inclusión, 37.5% (375 individuos por cada mil) con degeneración macular relacionada con la edad presentan el polimorfismo de nucleótido único rs7412. En la población antes mencionada, Viturino y colaboradores describen la prevalencia del SNP rs7412 (que ellos mencionan como portadores del alelo $\epsilon 2$) es del 13.77% (alrededor de 138 individuos por cada mil) (Viturino, et al., 2021). Por otro lado, en una población lituana, Liutkeviciene y colaboradores reportan una frecuencia del 10% para el alelo $\epsilon 2$ (Liutkeviciene, et al., 2018) y para una población del norte de España, Fernández-Vega y colaboradores únicamente reportan una frecuencia del 4.6% para $\epsilon 2$ (Fernández-Vega, et al., 2020). Como podemos observar, existen diferencias con las poblaciones reportadas por dichos autores.

Salta a la vista la diferencia en la prevalencia del haplotipo $\epsilon 2$ en las diferentes poblaciones antes presentadas, pues en población mexicana analizada en este estudio encontramos una prevalencia 23.7% más alta que en la población brasileña, asimismo es 27.5% más que en la población lituana y, sorprendentemente, es 32.9% más que en la población española, lo cual va en contra a lo que podríamos pensar, pues la influencia española está muy presente

en la población mexicana. Sin embargo, lo anterior ha sido descrito para otro tipo de polimorfismos en población mexicana. Un estudio realizado por González-Salinas et al., 2017, demostró que para el polimorfismo del gen del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (gen involucrado en etapas húmeda de la DMRE), existe una frecuencia alélica similar a la reportada en población asiática (Gonzalez-Salinas, et al., 2017). Es decir, no necesariamente implica, que poblaciones latinas compartan frecuencias alélicas similares a poblaciones europeas.

Por otra parte, en un estudio realizado en población de Noruega se demostró una correlación entre el alelo $\epsilon 2$ y valores altos de proteína C reactiva (CRP), que es un marcador de inflamación común en pacientes con obesidad (Farup, et al., 2020). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) para el 2018 en México, el porcentaje de adultos mayores de 20 años con obesidad o sobrepeso alcanzó el 75.2%, pudiendo estar reflejado en la alta prevalencia de $\epsilon 2$ en nuestra población. Sin embargo, es necesario un estudio con más voluntarios, con el propósito puntual de verificar esta prevalencia y hacer también un análisis de correlación entre este haplotipo y la obesidad de pacientes con DMRE.

A pesar de no ser un estudio de casos y controles, debido a la poca población disponible para realizar un ensayo de esas características, se tomó la decisión de incluir un grupo control, debido a la importancia tener un punto de comparación y dejar abierta la posibilidad de, en un futuro, reclutar más voluntarios y voluntarias con tal de disponer de una población lo suficientemente grande para realizar un estudio más detallado y con

mayor poder estadístico. Sin embargo, el análisis descriptivo de dichos resultados, aunque limitado, es invaluable en el estudio de la progresión y patología de la DMRE.

Al analizar los datos producidos en este trabajo y consensados en la tabla 2 encontramos tres categorías (Sin DMRE (0), DMRE seco (1) y DMRE húmedo (2)), a su vez, estas se separan en dos grupos (SNP rs7412 presente y SNP rs7412 ausente). En la figura 4 se presentan los datos colectados en la tabla 2 y se puede observar una tendencia, en el grupo con SNP rs7412 ausente (azul) el cambio es positivo y creciente de la categoría sin DMRE a la categoría con DMRE seca y de esta a la categoría con DMRE húmeda. Por otro lado, en el grupo con SNP rs7412 presente (naranja) se puede observar un descenso en la cantidad de individuos con DMRE seca en comparación con la húmeda, volviendo a aumentar la cantidad de individuos de la categoría con DMRE seca a la categoría con DMRE húmeda. A partir de lo anterior podemos observar que el SNP rs7412, que produce al haplotipo $\epsilon 2$, podría presentar un efecto negativo en la progresión de la enfermedad, pues se encuentra poco en pacientes con un estado intermedio de DMRE, mientras que en aquellos con estados avanzados se encuentra en abundancia, lo que podría sugerir el efecto antes mencionado. Viturino y colaboradores discuten resultados similares (Viturino, et al., 2021), mientras que Liutkeviciene y su equipo también reportan que pacientes portadores de $\epsilon 2$ tienen mayor riesgo para desarrollar DMRE avanzado (Liutkeviciene, et al., 2018), por otro lado, en la población norhispana, Fernández-Vega y colaboradores asocian a $\epsilon 2$ un rol protector, pues encuentran una mayor frecuencia del polimorfismo en controles que en pacientes con DMRE de tipo húmeda (Fernández-Vega, et al., 2020), Xiyang y colaboradores, a través de un meta análisis, mencionan que este contraste entre el rol del haplotipo $\epsilon 2$

puede deberse a que éste es en menos frecuente presenta en la población, por lo que la precisión estadística se ve comprometida, sin embargo, en el mismo artículo asocian un efecto destructivo a APOE ϵ 2 (Xiyang, et al., 2017).

En un estudio de prevalencia de polimorfismos de APOE realizado en 2001 en una población mexicana de la Ciudad de México, Gamboa y colaboradores reportan una prevalencia del 3.2% para el alelo APOE2, no obstante, el reclutamiento fue realizado en escuelas públicas y privadas, obteniendo muestras de un personal joven o de mediana edad (39.8 ± 10.4 años para mujeres y 40.2 ± 9.4 años para hombres) (Gamboa, et al., 2001). Por otro lado, la isoforma APOE2 está demostrada como un factor protector a enfermedades cardiovasculares, debido a que se asocia principalmente a HDLs (Marais, 2019), teniendo mayor prevalencia en personas de avanzada edad, debido, probablemente, a la selección progresiva y desaparición del haplotipo ϵ 4 (Seripa, et al., 2011), de este modo es posible que nuestra población, al ser de edad avanzada, tenga una prevalencia mayor del haplotipo ϵ 2 comparada con la prevalencia en la población del estudio de Gamboa. Esto último indicaría que, mientras mayor sea la edad de la población analizada mayor será la prevalencia del polimorfismo rs7412 en ésta.

A partir de lo anterior, se decidió contrastar los cambios observados con las edades de los pacientes, con el propósito de examinar el comportamiento de los datos y contrastar la información adicional que supone el incluir el principal factor de riesgo para la DMRE, que es la edad. Con base en los resultados obtenidos se advierte que las edades de los pacientes sin DMRE y con el polimorfismo rs7412 se encuentra mayormente en el intervalo de 50-60 años de edad. Por otra parte, la población con el polimorfismo rs7412 y que presenta DMRE

de tipo húmeda se extiende principalmente en el intervalo de edad de 70-85 años de edad lo que podría sugerir que, para esta población mexicana, el polimorfismo de nucleótido único rs7412 puede ser un factor de riesgo acelerando la progresión de la enfermedad, pues no se encontró igualmente representado en pacientes con DMRE de tipo seca, como se esperaría en caso de que el SNP rs7412 no tuviera efecto protector ni de riesgo. Siendo consistente con lo mencionado por Seripa y colaboradores en el 2011, quienes discuten la mayor prevalencia de $\epsilon 2$ en personas de edad avanzada y lo atribuyen a la selección progresiva de éste en contra de $\epsilon 4$ (Seripa, et al., 2011).

8. Conclusiones

Como consecuencia de este trabajo se resalta la alta prevalencia de individuos con DMRE y polimorfismo rs7412 en esta población mexicana, en comparación con la prevalencia de dicho polimorfismo en poblaciones similares.

Segundo, es importante observar la distribución de individuos con el polimorfismo y de individuos sin el polimorfismo en la población con controles, pues se advierte una diferencia marcada, ya que individuos sin DMRE y aquellos con DMRE de tipo húmeda son los que presentaron mayor prevalencia de rs7412, lo que establecería al SNP rs7412 y, por lo tanto, al haplotipo $\epsilon 2$ como un factor de riesgo para la progresión de la degeneración macular relacionada con la edad. Para continuar con esta línea de pensamiento se sugiere dar seguimiento a los controles de este estudio, para observar un posible desarrollo y progresión acelerada de la DMRE en aquellos que presentaron el SNP rs7412.

Por último, con los precedentes sentados en este trabajo sería una acción recomendable el realizar un estudio más detallado, pudiendo ser uno de prevalencia si se contara con el

tamaño de población necesaria, asimismo podría contrastarse el factor de riesgo que presenta el SNP rs7412 con otros factores de riesgo ampliamente descritos tales como el tabaquismo.

9. Referencias

- Nowak J Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep* [Internet]. 2006 [cited 2021 Aug 4];58(3):353–63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16845209/>
- Hoon M. Okawa H. Della Santina L. *et al.* Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jan 25];42:44–84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24984227/>
- Purves D. *Neurociencia*, 5a edición. 5a ed. Madrid [etc.]: Editorial Médica Panamericana; 2015.
- Gerster H. Review: antioxidant protection of the ageing macula. *Age Ageing* [Internet]. 1991;20(1):60–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/ageing/20.1.60>
- Wong W L. Su X. Li X. *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal*. 2014 Feb 1;2(2):e106–16.
- Mitchell P. Liew P. Gopinath B. Wong T Y. Age-related macular degeneration. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2018 Sep 29 [cited 2021 Aug 3];392(10153):1147–59. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30303083/>
- Zajac-Pytrus H M. Pilecka A. Turno-Kręcicka A. *et al.* The Dry Form of Age-Related Macular Degeneration (AMD): The Current Concepts of Pathogenesis and Prospects for Treatment. *Adv Clin Exp Med* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 19];24(6):1099–104. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771984/>
- Ricci F. Bandello F. Navarra P. *et al.* Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Therapeutic Management and New-Upcoming Approaches. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Aug 19];21(21):1–40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33153227/>
- Spaide R F. Jaffe G J. Sarraf D. *et al.* Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data: Consensus on Neovascular Age-Related Macular Degeneration Nomenclature Study Group. *Ophthalmology*

[Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Aug 19];127(5):616–36. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31864668/>

Davis M D. Gangnon R E. Lee L Y. *et al.* The Age-Related Eye Disease Study Severity Scale for Age-Related Macular Degeneration: AREDS Report No. 17. Arch Ophthalmol [Internet]. 2005 Nov [cited 2022 Feb 17];123(11):1484. Disponible en: </pmc/articles/PMC1472813/>

Gheorghe A. Mahdi L. Musat O. AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. Rom J Ophthalmol [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Sep 2];59(2):74. Disponible en: </pmc/articles/PMC5712933/>

Fercher A F. Drexler W. Hitzenberger C K. *et al.* Optical coherence tomography - principles and applications. Reports Prog Phys [Internet]. 2003 Jan 20 [cited 2021 Sep 2];66(2):239. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0034-4885/66/2/204>

Schmidt-Erfurth U. Klirmscha S. Waldstein S M. *et al.* A view of the current and future role of optical coherence tomography in the management of age-related macular degeneration. EYE [Internet]. 2017;31(1):26–44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2016.227>

Ly A. Nivison-Smith L. Assaad N. *et al.* Fundus Autofluorescence in Age-related Macular Degeneration. Optom Vis Sci [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Sep 3];94(2):246. Disponible en: </pmc/articles/PMC5287441/>

Hernández-Zimbrón L F. Zamora-Alvarado R. Ochoa-De la Paz L. *et al.* Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 24];2018. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29484106/>

Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. Physiol Rev [Internet]. 2005 Jul [cited 2022 Jan 13];85(3):845–81. Disponible en: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00021.2004>

Ebrahimi K B. & Handa J T. Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration. J Lipids [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 25];2011:1–14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822496/>

Toops K A. Tan L X. & Lakkaraju A. Apolipoprotein E Isoforms and AMD. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Aug 18];854:3–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26427386/>

- Heesterbeek T J. Lorés-Mota L. Hoyng C B. *et al.* Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Sep 21];40(2):140–70 Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32100327/>
- Lambert N G. ElShemani H. Singh M K. *et al.* Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Sep 14];54:64–102. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156982/>
- Velilla S. García-Medina J J. García-Layana A. *et al.* Smoking and age-related macular degeneration: Review and update. *J Ophthalmol.* 2013;2013.
- Patel N, Adewoyin T, Chong N V. Age-related macular degeneration: a perspective on genetic studies. *Eye* 2008 226 [Internet]. 2007 May 11 [cited 2022 Jan 18];22(6):768–76. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/6702844>
- Mahley R W. Innerarity T L. Rall S C Jr. *et al.* Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* [Internet]. 1984 [citado el 15 de abril de 2022];25(12):1277–94. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6099394/>
- Devaraj S. Semaan J R. Jialal I. *Biochemistry, Apolipoprotein B.* 2022 [citado el 15 de abril de 2022]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30844166/>
- Nakajima K. Nagamine T. Fujita M Q. *et al.* Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv Clin Chem* [Internet]. 2014 [citado el 15 de abril de 2022];64:117–77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24938018/>
- van der Vorst E P C. High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. *Subcell Biochem* [Internet]. 2020 [cited 2021 Oct 11];94:399–420. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32189309/>
- Li Z. Shue F. Zhao N. *et al.* APOE2: protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer’s disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Oct 14];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33148290/>
- Mahley R W. Weisgraber K H. Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer’s disease to AIDS. *J Lipid Res* [Internet]. 2009 Apr [cited 2021 Oct 11];50(Suppl):S183. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111111/>
- Marais A D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Sep 1];51(2):165–76. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30598326/>

Huang Y. Mahley R W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2014;72 Pt A:3–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.025>

Phillips M C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2021 Sep 1];66(9):616–23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25328986/>

Mahley R W. Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Oct 11];36(7):1305–15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27174096/>

Levy O. Lavalette S. Hu S J. *et al.* APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *J Neurosci* [Internet]. 2015 Oct 7 [cited 2021 Aug 18];35(40):13568–76. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26446211/>

Li J Q. Welchowski T. Schmid M. *et al.* Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Mar 16];104(8):1077–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31712255/>

Shastry B S. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2009 [citado el 15 de abril de 2022];578:3–22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19768584/>

Allikmets R. Shroyer N F. Singh N. *et al.* Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* [Internet]. 1997 Sep 19 [cited 2021 Sep 23];277(5333):1805–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9295268/>

Zhang R. Wang L Y. Wang Y F. *et al.* (2015). Associations of the G1961E and D2177N variants in ABCA4 and the risk of age-related macular degeneration. *Gene*, 567(1), 51–57.

Wang Y. Wang M. Han Y. *et al.* Associations of the G1961E and D2177N variants in ABCA4 and the risk of age-related macular degeneration. *Gene* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2021 Sep 27];567(1):51–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25921964/>

Jabbarpoor Bonyadi M H. Yaseri M. Nikkhah H. *et al.* Comparison of ARMS2/LOC387715 A69S and CFH Y402H risk effect in wet-type age-related macular degeneration: a meta-analysis. *Int Ophthalmol* 2018 394 [Internet]. 2018 Feb 8 [cited

2022 Jan 18];39(4):949–56. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10792-018-0853-y>

Barchitta M. Maugeri A. Association between Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration: An Updated Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2016;2016.

Gonçalves F T. Cezario S M. Calastri M C. *et al*. Influence of VEGF-C936T genetic variant on age-related macular degeneration. *Arq Bras Oftalmol* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sep 29];78(5):290–4. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26466227/>

Seripa D. D’Onofrio G. Panza F. *et al*. The genetics of the human APOE polymorphism. *Rejuvenation Res* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2021 Aug 26];14(5):491–500. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21958003/>

Huebbe P. Rimbach G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. *Ageing Res Rev*. 2017 Aug 1;37:146–61.

Toops K A. Tan L X. Lakkaraju A. Apolipoprotein E Isoforms and AMD. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Aug 18];854:3–9. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26427386/>

Xiyang M. Wenbo W. Wangyi F. *et al*. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms with Age-related Macular Degeneration Subtypes: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Aug 26];48(4):370–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28889998/>

Baird P N. Richardson A J. Robman L D. *et al*. Apolipoprotein (APOE) gene is associated with progression of age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mutat* [Internet]. 2006;27(4):337–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20288>

Viturino M G M. Neto J M. Bajano F F. *et al*. Evaluation of APOE polymorphisms and the risk for age-related macular degeneration in a Southeastern Brazilian population. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Jan 20];246(10):1148–55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33467888/>

Liutkeviciene R. Vilkeviciute A. Smalinskiene A. *et al*. The role of apolipoprotein E (rs7412 and rs429358) in age-related macular degeneration. <https://doi.org/10.1080/1381681020181479429> [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2022 Mar 16];39(4):457–62. Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13816810.2018.1479429>

Sun Y. Song R. Ai Y. *et al.* APOE2 promotes the development and progression of subretinal neovascularization in age-related macular degeneration via MAPKs signaling pathway. Saudi J Biol Sci [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Aug 26];27(10):2770–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32994736/>

Lee S-J. Kim J H. Kim J H. *et al.*. Human apolipoprotein E2 transgenic mice show lipid accumulation in retinal pigment epithelium and altered expression of VEGF and bFGF in the eyes. J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2007 [citado el 16 de abril de 2022];17(6):1024–30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18050922/>

Fernández-Vega B. García M. Olivares L. *et al.* The association study of lipid metabolism gene polymorphisms with AMD identifies a protective role for APOE-E2 allele in the wet form in a Northern Spanish population. Acta Ophthalmol [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Mar 17];98(3):e282–91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31654486/>

Landegren U. Nilsson M. Kwok P-Y. Reading Bits of Genetic Information: Methods for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis. Genome Res [Internet]. 1998 Aug 1 [cited 2021 Oct 1];8(8):769–76. Available from: <https://genome.cshlp.org/content/8/8/769.full>

Butler J. Advanced Topics in forensic DNA Typing: Methodology. 1a ed. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Academic Press; 2011.

Gonzalez-Salinas R. Garcia-Gutierrez M C. Garcia-Aguirre G. *et al.* Evaluation of VEGF gene polymorphisms and proliferative diabetic retinopathy in Mexican population. Int J Ophthalmol [Internet]. 2017;10(1):135–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18240/ijo.2017.01.22>

Farup P G. Rootwelt H. Hestad K. APOE - a genetic marker of comorbidity in subjects with morbid obesity. BMC Med Genet [Internet]. 2020;21(1):146. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12881-020-01082-2>

Insp.mx. [citado el 16 de abril de 2022]. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_pr esentacion_resultados.pdf

Gamboa R. Vargas-Alarcón G. Medina-Urrutia A. *et al.* Influence of the apolipoprotein E polymorphism on plasma lipoproteins in a Mexican population. Hum Biol [Internet]. 2001 [cited 2022 Mar 31];73(6):835–43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11804199/>