

**Maestría en Ciencias Médicas**

**Facultad de Medicina**

**UNAM**

**Sede: Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”**

**Departamento: Genética**

**Título: “Análisis Molecular del Gen ABCA4 en Pacientes con Enfermedad de Stargardt (Distrofia Macular Retiniana Juvenil)”**

**Alumno: Oscar Francisco Chacón Camacho**

**Tutor: Dr. en C. Juan Carlos Zenteno Ruíz**

**Periodo: 1º de Marzo 2010 - 29 de Febrero 2012**

**México, D.F. a de junio de 2012**

## INDICE

Agradecimientos

Resumen

Antecedentes

Generalidades de distrofias retinianas hereditarias

Enfermedad de Stargardt

Antecedentes y cuadro clínico

Histopatología

Genética

Gen *ABCA4*(*ABCR*)

Mutaciones de *ABCA4* en enfermedad de Stargardt y otras distrofias retinianas

Transportadores con caja de unión a ATP (ATP-binding cassette, ABC)

Patogenia de la enfermedad de Stargardt

Diagnóstico de la enfermedad de Stargardt

Terapia génica en modelos animales de enfermedad de Stargardt

Justificación

Planteamiento del Problema

Pregunta de Investigación

Objetivos

Objetivo primario

Objetivos secundarios

Tipo y diseño de estudio

Variables de interés

Espectro mutacional

Genotipo

Selección de la muestra

Muestreo

Tamaño de muestra

Criterios de inclusión

Criterios de exclusión

Criterios de eliminación

Material y métodos

Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica

Determinación de la concentración y pureza del DNA obtenido

Amplificación por PCR del gen *ABCA4*

Secuenciación automatizada de los productos de PCR

Análisis de predicción funcional de mutaciones

Cronograma de actividades

Aspectos éticos

Factibilidad y recursos humanos

Recursos humanos

Recursos Físicos

Recursos Financieros

Resultados

Normalización de la metodología

Geles de agarosa en electroforesis

Secuenciación nucleotídica del gen *ABCA4* en 30 pacientes con enfermedad de Stargardt

Análisis de secuenciación nucleotídica de casos familiares

Análisis de secuenciación nucleotídica de casos esporádicos

Criterios para validar una mutación de sentido equivocado en el gen *ABCA4* como patógena en casos de enfermedad de Stargardt

Validación de mutaciones nuevas

Polyphen

Tabla general con todas las variantes genéticas identificadas por paciente

Distribución del espectro mutacional en la proteína ABCA4 en pacientes mexicanos

Distribución de las mutaciones de 30 pacientes con enfermedad de Stargardt dentro de la República Mexicana

Discusión

Referencias

## Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Juan Carlos Zenteno por toda la enseñanza, tiempo, dedicación y profesionalismo que me ha brindado durante esta maestría, durante la cual el tiempo paso volando sin darme cuenta y he aprendido con pasión que el trabajo de laboratorio de la mano con la clinica es el complemento más perfecto para um buen genetista

A todos mis maestros del CMN siglo XXI IMSS y del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana por todo lo que he aprendido, porque al final de estos dos años más que la culminación de una tesis, me siento feliz por tener otra perspectiva en el área de la medicina y su relación con la investigación.

Gracias a toda mi familia Chacón-Camacho y Granillo-Alvares por su apoyo durante no solo durante los momentos felices, sino también difíciles, porque los involucre en mi trabajo

A mis compañeros de trabajo, especialmente a Bety y Margarita, quienes desinteresadamente durante cada duda que he tenido siempre están para resolver mis ignorancias en esta área.

Le agradezco al CONACYT por su apoyo económico durante mi periodo de realización de la Maestría de Ciencias Médica.

Le agradezco a la Unidad de Investigación y al Patronato del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana su apoyo constante

Un especial agradecimiento a mi esposa Mariella. Primero por soportarme durante estos 2 años ya que le he dedicado bastante tiempo a esta tesis. Segundo, porque me ha ayudado y acompañado muchos días, noches y sobre todo fines de semana en el laboratorio,

estoy seguro que aunque diga que no le gusta mucho esto de andar pipeteando, ya también le ha tomado cariño. Y tercero, te amo.

Me prometo una cosa, esto aún no se acaba, continuaré.

## RESUMEN

**Introducción.** La enfermedad de Stargardt es una distrofia retiniana autosómica recesiva, tiene una prevalencia de 1 en 8000-10000 en la población y es reconocida como la causa más común de distrofia macular juvenil hereditaria. Típicamente, inicia temprano en la edad escolar o adolescencia y se caracteriza por una disminución rápida, gradual y bilateral de la agudeza visual, aparición de escotomas centrales, discromatopsia, fotofobia y el desarrollo de “flecks” amarillos-naranjas alrededor de la mácula y/o en la periferia media. La enfermedad es causada por mutaciones en el gen *ABCA4* que está localizado en el cromosoma 1. Este gen está compuesto por 50 exones que codifican una proteína que pertenece a la familia de transportadores ABC que tiene funciones críticas en el metabolismo de los fotorreceptores. A la fecha, más de 600 variantes genéticas en el gen *ABCA4* se han reportado en todo el mundo. En este trabajo, nosotros describimos el primer análisis molecular del gen *ABCA4* en sujetos mexicanos con enfermedad de Stargardt.

**Métodos.** Veinte y dos casos esporádicos y 8 familiares fueron incluidos en este estudio. Todos los probandos tuvieron una exploración oftalmológica completa incluyendo fondo de ojo, fluorangiografía y electroretinograma. Se obtuvieron muestras de sangre a través de venopunción y el DNA genómico fue extraído. Posteriormente, se llevó a cabo amplificación por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) de los 50 exones y uniones exón-intrón del gen *ABCA4*, utilizando pares de primers derivados de la secuencia *ABCA4*. Los productos de la PCR fueron purificados y directamente secuenciados utilizando el método de BigDye terminator. DNA de 75 individuos controles fueron analizados para validar las mutaciones nuevas (de sentido equivocado).

**Resultados.** Veinte y cinco de 30 probandos tuvieron AL menos una mutación en el gen *ABCA4*: 8 pacientes fueron homocigotos, 12 fueron heterocigotos compuestos y 5

heterocigotos. De 30 variantes patogénicas encontradas, 24 fueron de sentido equivocado, 2 sin sentido, 2 deleciones sin desplazamiento del marco de lectura, 1 inserción con desplazamiento del marco de lectura y una mutación de *splice*. Fueron identificadas 12 mutaciones nuevos no reportadas internacionalmente.

**Discusión.** Se realizó el primer estudio y análisis molecular del gen *ABCA4* en sujetos mexicanos con enfermedad de Stargardt. Dos alelos mutados fueron encontrados en 67% de los pacientes, mientras en 17% de los casos solo se identificó una mutación. Un total de 30 diferentes mutaciones fueron identificadas, 12 de las cuales son nuevas. La mayoría de las variantes son sustituciones y causan mutaciones de sentido equivocado. La mutación más frecuente en la población de estudio fue G818E; mientras el exón más afectado fue el número 38. En conclusión, nuestro estudio permitió establecer el espectro mutacional del gen *ABCA4* en población mexicana lo cual será relevante para futuros pacientes estudiados con esta enfermedad y será la base para estudios de terapia génica relacionada con esta enfermedad.



## ANTECEDENTES

### GENERALIDADES DE DISTROFIAS RETINIANAS HEREDITARIAS

Las distrofias de la retina son un grupo de enfermedades genéticas caracterizadas por la degeneración y atrofia de capas o células retinianas específicas. Constituyen la causa más común de deficiencia visual hereditaria y tienen una prevalencia estimada de 1 en 1500-2000 sujetos en la población general (1). Las distrofias retinianas hereditarias presentan una gran variación en sus características fenotípicas y esto puede deberse a mutaciones en diferentes genes, diferentes mutaciones en un mismo gen, variabilidad en el genoma en el que un gen mutante es expresado o a la modulación del fenotipo por factores ambientales. Además, el diagnóstico preciso puede dificultarse por los cambios retinianos que suceden durante la progresión de la enfermedad (2). En años recientes, las técnicas de análisis genético molecular han revolucionado la comprensión de las bases biológicas moleculares de las distrofias retinianas hereditarias (3).

Las distrofias retinianas se clasifican de acuerdo a su evolución clínica en estacionarias o progresivas y al sistema de fotorreceptores (conos o bastones) que está principalmente afectado. Los conos operan durante condiciones de luz brillante (fotópicas) y proporcionan la visión tricrómica en color, mientras que los bastones funcionan en la oscuridad (escotópica). La región macular localizada en el centro de la retina es rica en conos y se encarga de maximizar la visión detallada, en tanto que la región periférica es dominada por los bastones que proporcionan un campo de visión adecuado y detección de movimiento (3,4).

**Distrofias Retinianas de bastones o periféricas:** Las alteraciones que afectan primariamente el sistema de bastones como la retinitis pigmentosa y la coroideremia se

presentan inicialmente con ceguera nocturna (nictalopia) y pueden progresar hasta causar pérdida sustancial del campo visual periférico. Sin embargo, la visión central está preservada, al menos hasta etapas tardías de la enfermedad. Estas enfermedades se clasifican como distrofias periféricas (5-9).

**Distrofias retinianas de conos o centrales:** Las alteraciones primarias del sistema de conos (distrofias de conos) se manifiestan inicialmente con pérdida de la agudeza visual central (visión borrosa) y de la visión al color y no afectan significativamente la visión periférica a menos que el sistema de bastones se encuentra también afectado (distrofias cono-bastón). Algunas enfermedades afectan a ambos sistemas de fotorreceptores en la zona especializada central de la retina, estas enfermedades son llamadas distrofias maculares (4,10-11). Dentro de este grupo, la enfermedad de Stargardt o distrofia macular juvenil es la alteración más común.

**Distrofias retinianas sindrómicas:** Aunque la mayoría de pacientes con una distrofia retiniana tienen una degeneración retiniana sin asociación a anomalías extraoculares, existen algunas formas de distrofia retiniana sindrómicas en las que la degeneración retiniana progresiva se acompaña de alteraciones sistémicas. En algunos casos, estas formas sindrómicas son causadas por defectos metabólicos conocidos y por lo tanto permiten conocer las bases fisiopatológicas de la alteración retiniana. Durante la evaluación de un paciente con distrofia retiniana, el clínico debe estar alerta acerca de posibles signos fenotípicos acompañantes que permitan la identificación de entidades sindrómicas bien definidas. Tal es el caso de la hipoacusia en el síndrome de Usher, la polidactilia y obesidad en el síndrome de Bardet-Biedl, y la ptosis y oftalmoplegia progresiva en el síndrome de Kearns-Sayre, entre otros (7-8, 12-15).

## ENFERMEDAD DE STARGARDT

**ANTECEDENTES Y CUADRO CLINICO.** En 1909, el oftalmólogo alemán Karl Bruno Stargardt describió por primera vez una enfermedad de transmisión hereditaria autosómica recesiva en 7 pacientes pertenecientes a 2 familias que presentaban pérdida visual bilateral en las 2 primeras décadas de la vida. En etapas tempranas, el fondo de ojo era normal pero evolucionaba hacia atrofia macular asociada con manchas pequeñas amarillentas profundas perimaculares (16). Cincuenta años más tarde, Rosehr revaloró a dos de los pacientes originales de Stargardt y demostró que presentaban buena función periférica (17). En 1963, Franceschetti describió un cuadro similar en que las manchas amarillentas se extendían hacia la retina periférica y al que denominó *Fundus Flavimaculatus* (18). Actualmente, los términos *fundus flavimaculatus* (FF) y enfermedad de Stargardt se usan para nombrar un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios de la retina con herencia autosómica recesiva ocasionados por mutaciones en un mismo gen, denominado *ABCA4* (19-21). Se ha reconocido que hasta el 2% de la población puede portar mutaciones en este gen (entre afectados y heterocigotos sanos), lo que hace que sea la segunda enfermedad hereditaria de la retina más frecuente solo después de la retinitis pigmentosa (22).

La enfermedad de Stargardt/*fundus flavimaculatus* es una distrofia retiniana con una frecuencia estimada de 1/10000 individuos y que se caracteriza por la presencia de “*flecks*” blancos-amarillentos (figura 1) a nivel del epitelio pigmentado de la retina que pueden estar concentrados en la fovea (enfermedad de Stargardt) o dispersas por toda la retina periférica con involucro macular mínimo (*fundus flavimaculatus*) (4,11). Es considerada la distrofia macular juvenil hereditaria más común y la severidad de la deficiencia visual depende del grado de afectación macular (23). La enfermedad de Stargardt se presenta típicamente en la

infancia tardía o adolescencia temprana, generalmente entre los 6 y los 20 años de edad. Se manifiesta frecuentemente con una pérdida rápida de la agudeza visual, en un lapso de pocos meses. Los “*flecks*” foveales originan atrofia macular a medida que la enfermedad progresa y resultan en una visión central severamente disminuida, generalmente asociada a un registro de 20/200 de agudeza visual (24). La variedad de *fundus flavimaculatus* tiende a presentarse más tardíamente y con frecuencia se asocia con preservación de la visión central (24). La fluorangiografía en ambas enfermedades se caracteriza por una coroides oscura que resulta del bloqueo de la fluorescencia coroidea normal por depósitos de lipofuscina en el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Este signo se considera patognomónico de la enfermedad y se observa desde la primera fase del estudio denominada fase coroidea a pocos segundos de iniciada la angiografía . Se observa en un 65-85% de los pacientes con enfermedad de Stargardt (25).

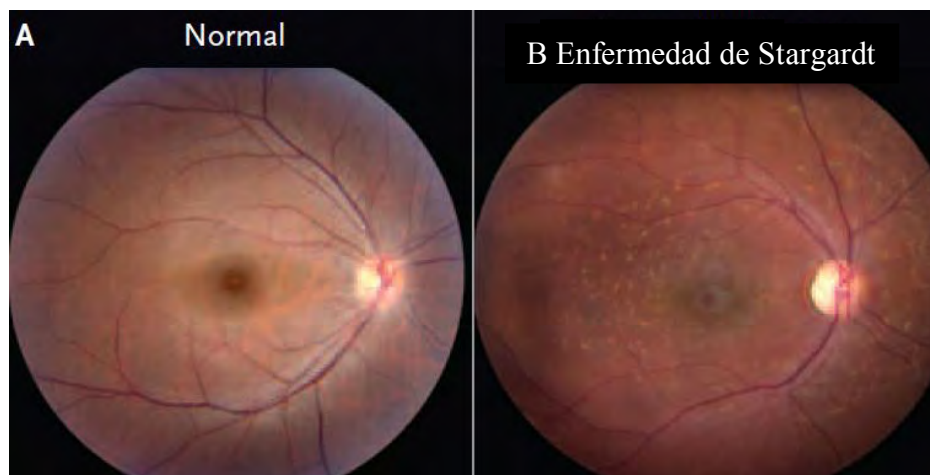


Figura 1. A Fotografía de fondo de ojo normal. B Fotografía de fondo de ojo en un paciente con enfermedad de Stargardt. Se observan los flecks (manchas amarillas-blanquecinas) característicos de la enfermedad.

Actualmente se considera que el *Fundus Flavimaculatus* y la enfermedad de Stargardt son la misma enfermedad, aunque la última representa un estado más avanzado y

extendido de almacenamiento de lipofuscina y de daño a nivel del EPR. En los últimos años se han propuesto varias subclasificaciones para la enfermedad de Stargardt y la mayoría de éstas tomen en cuenta las características funduscópicas y de los hallazgos fluorangiográficos. En función de estas dos características la enfermedad de Stargardt se subdivide en 4 grupos (26-30):

1. **Fondo de ojo color bronce y silencio coroideo.** Es el estadio más precoz de la enfermedad de Stargardt y del fundus flavimaculatus. El fondo de ojo es prácticamente normal excepto por el excesivo pigmento en el EPR a nivel macular, lo que produce el color bronce y que oscurece los detalles de fondo en la coroides (18, 26-30).
2. **Maculopatía atrófica con o sin “*flecks*” amarillentos.** Es lo que clásicamente se ha llamado Enfermedad de Stargardt. Inicialmente la pérdida de EPR puede ser tan mínima que en algunos pacientes sólo se pone de manifiesto con el estudio fluorangiográfico. El fondo color bronce y el silencio coroideo pueden no ser evidentes en la primera década de la vida. Sin embargo, más tarde aparecen las lesiones amarillentas y el almacenamiento de lipofuscina. El grado y el patrón de la zona de atrofia en el área macular varían importantemente y no siempre se correlacionan con el grado de pérdida visual. Es muy común que aparezca un patrón macular en ojo de buey (“*bull's eye*”) y en estos casos puede asociarse a escotoma anular, que permite conservar agudezas visuales hasta la edad de 40 años (30). Estas áreas de atrofia macular son siempre más evidentes angiográficamente. Si el número de lesiones amarillentas y el área de atrofia son extensos, el silencio coroideo puede no ser evidente en el polo posterior, pero suele estar preservado en

el área peripapilar. Estos pacientes pueden desarrollar en ocasiones cambios excéntricos a nivel del EPR que incluyen hipertrofia, hiperplasia, metaplasia fibrosa y atrofia. Ocasionalmente también pueden desarrollar neo-vascularización coroidea (subretiniana) y cicatrices disciformes en la mácula (30). La prueba de visión de colores normalmente muestra una discromatopsia rojo-verde leve (31). Muchos pacientes presentan un alargamiento del tiempo para adaptarse a la oscuridad. Los hallazgos de electroretinografía (ERG) convencional generalmente son normales o discretamente alterados por una prolongación de la onda b (32-33). Sin embargo, el ERG multifocal es capaz de revelar amplitudes subnormales correspondientes al campo visual central aún en estadios tempranos. Algunos pacientes desarrollan fotofobia y evidencia electroretinográfica de distrofia de conos (33-34).

3. **Maculopatía atrófica con signos y síntomas tardíos de retinitis pigmentosa.** Los datos clínicos son similares a los del grupo 2, pero en edades más tardías de la vida aparecen signos y síntomas de retinitis pigmentosa, incluyendo nictalopia, pérdida difusa de pigmento del EPR, estrechamiento de los vasos retinianos y anomalías del ERG fotópico y escotópico. Se considera que estos pacientes padecen realmente una distrofia de conos y bastones producida por mutaciones severas en el gen *ABCA4* (35-37).
4. **Flecks amarillentos no asociadas a atrofia macular.** Es el cuadro clínico descrito por Franceschetti y conocido como *Fundus Flavimaculatus* (21). Estos pacientes pueden tener lesiones amarillentas centrales y paracentrales con mínima evidencia angiográfica o fundoscópica de atrofia del EPR entre estas lesiones. La agudeza visual puede ser normal si el centro de la fovea no está afectado por una de estas lesiones, aunque muchos pacientes tienen un gran *fleck* en la foveola y agudeza

visual disminuida. En la FAG suele observarse el “silencio coroideo”. En ausencia de información del resto de la familia y cuando no existe evidencia clara del “silencio coroideo”, puede ser muy difícil diferenciar el *fundus flavimaculatus* de una distrofia en patrón.

## **HISTOPATOLOGIA**

La histopatología en las etapas tempranas de enfermedad de Stargardt indica que los *flecks* característicos y el silencio coroideo resultan del depósito de gránulos del pigmento lipofuscina en las células del EPR. A medida que progresa la enfermedad, se presenta degeneración del EPR y pérdida de fotorreceptores (38-39).

La lipofuscina es un desecho indigerible intracelular que es resistente a la degradación enzimática lisosomal (40). En el EPR esta sustancia forma cuerpos intracitoplasmáticos compuestos de lípidos autofluorescentes que son el resultado de intermediarios indigeribles formados durante la degradación de la membrana de los segmentos externos de los fotorreceptores (41). La acumulación de lipofuscina en el EPR es paralela a la densidad de fotorreceptores y correlaciona con la actividad metabólica del EPR con respecto a la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (40). De este modo, las tasas más altas de formación de lipofuscina ocurren en la mácula y especialmente en la región perifoveal. Los niveles elevados de este compuesto ocasionan degeneración del fotorreceptor y el cuadro clínico de la enfermedad de Stargardt (40).

La lipofuscina se encuentra presente en retinas normales e incrementa su concentración con la edad. Sin embargo, la cantidad de lipofuscina encontrada en retinas

con la enfermedad de Stargardt es 2-5 veces mayor que los controles de la misma edad (42).

## GENETICA

La enfermedad de Stargardt se transmite hereditariamente con un patrón autosómico recesivo y estos casos se deben a mutaciones en el gen *ABCA4* (por sus siglas en inglés *ATP-binding Cassette transporter Retina gene*, subfamilia A, miembro 4 o *ABCA4*), localizado en el locus STGD1 en el cromosoma 1p13-p21 (43-44). El gen *ABCA4* codifica una proteína transportadora ABC específica de retina denominada “proteína rim” (RmP) que juega un papel fundamental en el ciclo de retinoides entre el fotorreceptor y el EPR (44).

Se han descrito algunos casos de enfermedad de Stargardt con transmisión autosómica dominante y en algunas familias se ha demostrado que mutaciones en el gen *ELOVL4* son responsables de esta forma de la enfermedad (STDG3) (45). Además, se han descritos otros 2 loci relacionados con variantes dominantes de la enfermedad (“*Stargardt-like*”) en 13q (STGD2) y en 4p (STGD4) (46-47) pero se desconocen los genes relacionados a estas formas poco frecuentes.

## GEN ABCA4 (ABCR)

En 1997 se identificó el gen responsable para la enfermedad de Stargardt. Estudios de ligamiento iniciales mapearon el gen de Stargardt-Fundus flavimaculatus a la región 1p13-p21 (48,49). Otros estudios de ligamiento refinaron la localización del gen a 2 centimorgans entre los marcadores polimórficos DIS406 y DIS236 (50). Finalmente, Allikmets *et al*, realizaron la clonación posicional en esta región candidata e identificaron al



gen *ABCA4* como el responsable de la enfermedad (37). El gen *ABCA4* está constituido por 50 exones que codifican un RNAm de 8 Kb y que se traduce en una proteína de 2273 amino ácidos denominada Rim (RmP) (51-53).

## MUTACIONES DE ABCA4 EN ENFERMEDAD DE STARGARDT Y OTRAS DISTROFIAS RETINIANAS HEREDITARIAS

Hasta la fecha se han descrito más de 600 mutaciones distintas en el gen *ABCA4* en pacientes con la enfermedad de Stargardt/fundus flavimaculatus. Estos cambios en la secuencia están distribuidos a lo largo de todo el gen y corresponden en su mayoría a mutaciones de sentido equivocado (54-55). Ciertos alelos mutantes parecen ser comunes y tener una frecuencia alta en ciertas poblaciones, muy probablemente a causa de un efecto “fundador” (56-57).

Además de la enfermedad de Stargardt, las mutaciones en *ABCA4* pueden originar también distrofia de conos y bastones tipo 3 autosómica recesiva (AR) (35,36,58-67) y retinosis pigmentaria tipo 19 (36, 61-63, 68-73); de hecho, recientemente se ha evidenciado que mutaciones en este gen pueden ser la mayor causa de distrofia de conos y bastones AR ya que hasta 65% de los pacientes con este fenotipo pueden presentar mutaciones de este gen (35).

El gen *ABCA4* también está implicado en la patogénesis de la degeneración macular relacionada a la edad (DMRE). Allikmets *et al.*, estudiaron la hipótesis original que *ABCA4* es un locus dominante para susceptibilidad a DMRE examinando a 1218 pacientes no relacionados con esta enfermedad y los compararon con sujetos controles. Ellos identificaron que los cambios G1961E and D2177N fueron encontrados en 40 pacientes (3.4%) y solamente en 13 sujetos control (0.95%). Esas diferencias fueron estadísticamente

significativas ya que el riesgo de DMRE se elevó aproximadamente 3 veces en portadores de la variante D2177N y aproximadamente 5 veces en portadores de G1961E (74,75). Sin embargo, otros grupos no han podido replicar estos hallazgos (72-74). Es difícil inferir la patogenicidad de mutaciones heterocigotas en el gen *ABCA4* debido a que la frecuencia de portadores en la población general es elevada y fluctúa entre 2-3% (76-78); no obstante, debido a su función primordial en la retina, se sugiere que mutaciones heterocigotas en el gen *ABCA4* pueden predisponer al desarrollo de DMRE.

Van Driel *et al.*, han propuesto un modelo denominado de actividad residual que intenta correlacionar los hallazgos entre el fenotipo y el genotipo en enfermedades retinianas causadas por mutaciones en *ABCA4*. Este modelo establece que los diferentes fenotipos son el resultado de una variedad de combinaciones de mutaciones que originan deficiencias leves, moderadas y/o severas en la función de la proteína codificada por este gen. En otras palabras, la severidad de la enfermedad podría ser explicada por la cantidad de actividad residual de RmP asociada a los genotipos mutantes de *ABCA4*. Por ejemplo, dos mutaciones severas originan una retinitis pigmentosa por ausencia de actividad de RmP; una mutación severa y otra moderada resultan en una actividad mínima de RmP, lo que produciría una distrofia de conos y bastones; pacientes con una mutación severa y una leve o dos mutaciones moderadas resultarían en una enfermedad de Stargardt (figura 2). Este modelo termina por proponer que un paciente con un alelo “silvestre” y otro mutado incrementarían el riesgo para el desarrollo de DMRE (30, 37).

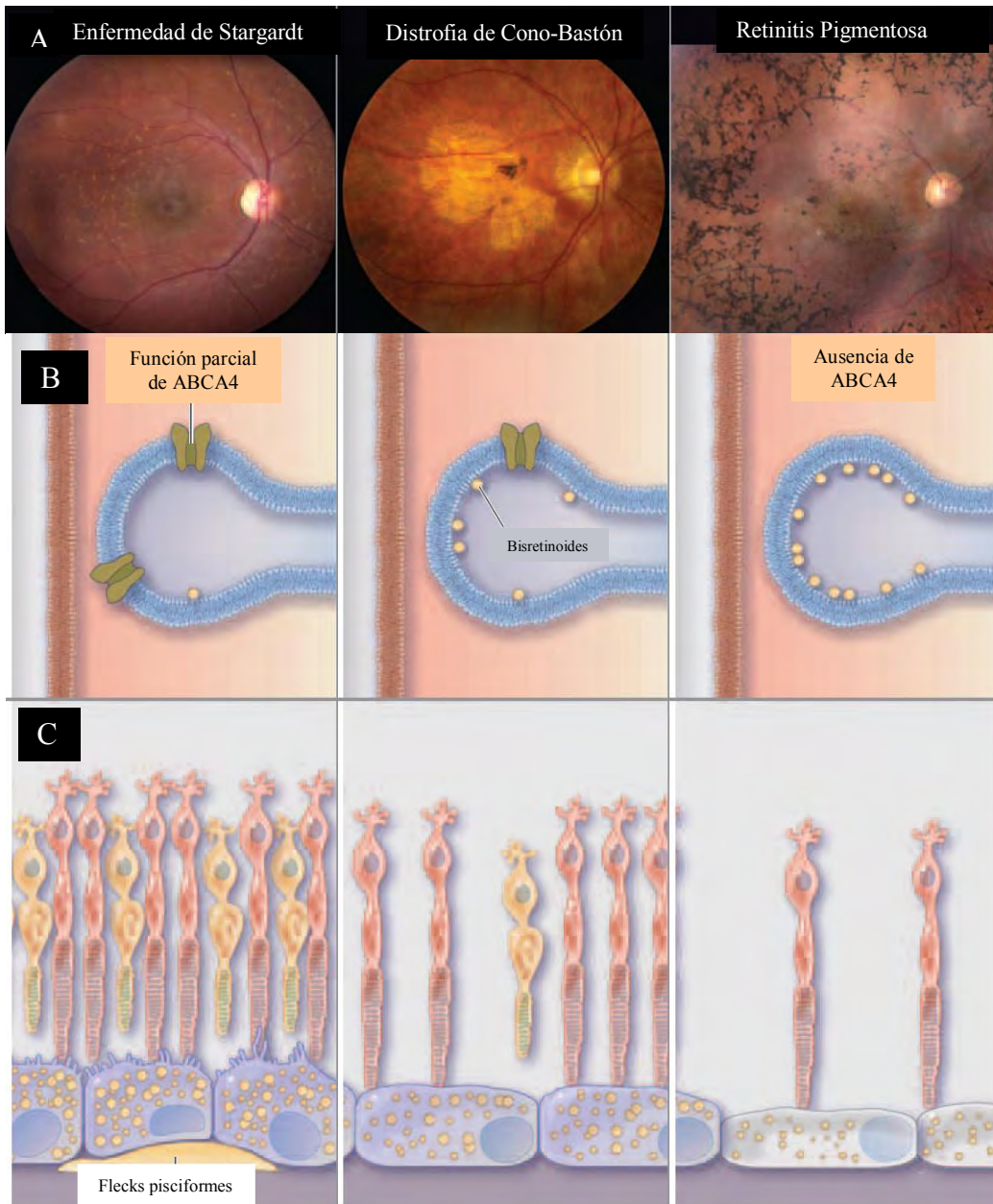


Figura 2. A. Fotografías de fondo de ojo en enfermedad de Stargardt, distrofia de cono-bastón y retinitis pigmentosa. B. Modelo de la actividad residual en las enfermedades antes mencionadas. Se muestra los efectos de la función disminuida de ABCA4 y la acumulación de metabolitos de la vitamina A (bisretinoides) (símbolos amarillos) sobre el lado interno del disco del segmento externo de los fotorreceptores. En la enfermedad de Stargardt hay reducción leve de la función en Abca4 con escasa formación de bisretinoides; pérdida de la función moderada en la distrofia de conos-bastones con acumulación intermedia de bisretinoides y pérdida completa de la función en la retinitis pigmentosa con acumulación máxima de bisretinoides. C. Efectos histopatológicos de la reducción de la actividad de ABCA4. En la enfermedad de Stargardt la tasa de formación de bisretinoides en el segmento externo es lento y los fotorreceptores no son directamente dañados. Se acumula escaso material debajo del EPR y forma los flecks. En la distrofia de cono-bastón hay moderada pérdida de conos primero y después de bastones, y en retinitis pigmentosa hay completa pérdida de conos y bastones con una evolución más rápida (Modificado de: Sheffield et al. *Genomic and the Eye*. *N Engl J Med*. 2011; 364: 1932-42 (79).

Ciertos alelos mutados causantes de la enfermedad de Stargardt, como G863A, A1038V y G1961E parecen ser más comunes y pueden estar presentes en varias poblaciones, presumiblemente a causa de un efecto fundador (56,57). No obstante, para la mayoría de las poblaciones las mutaciones son únicas y no reiterativas. En Italia, Simonelli et al., en los años 2000 y 2005, estudiaron 11 y 18 familias, respectivamente. En ambos estudios la mutación más comúnmente encontrada fue G1961E. Esta mutación también es una de las más frecuentes en diversos estudios realizados en Estados Unidos, donde hasta un 10% de los pacientes con enfermedad de Stargardt de origen blanco la presentan (21, 76). Rivera et al. en el 2000 en población alemana estudiaron 144 pacientes con esta enfermedad y encontraron 3 alelos frecuentes G1961E (20.5%), A1038V (12.7%) y 2588G>C (10.2%) (78). En 2002, Fukui et al estudiaron 10 pacientes japoneses con enfermedad de Stargardt no encontrándose reiteración de mutaciones (68). September et al. en 2004 en población sudafricana estudiaron 64 pacientes con esta distrofia macular encontrando que C1490Y (30%), L2027 (13%), R602W (9%) y V256 slice (8%) fueron las variantes más frecuentes (80). En 2004, Özgüi et al. en población turca estudiaron 5 pacientes con enfermedad de Stargardt encontrando diferentes variantes no reiterativas entre los enfermos (81). Rosenbert et al. en 2007, reportaron N965S como la variante patogénica más frecuente de ABCA4 en población danesa (82). En población española, Valverde et al. (2007) encontraron 2 cambios frecuentes, 2888del G y R943Q, en 60 familias con retinopatías severas (62). Aguirre-Lamban et al. (2009) estudiaron 23 familias con enfermedad de Stargardt también en población española e identificaron que la mutación R1129L fue la más frecuente ya que se identificó en 8% del total de los alelos mutados (61). En 2009, Maia-Lopes et al. estudiaron 21 familias portuguesas e identificaron una variante patogénica común (L11P), presente en 19% de las familias (83).

En 2003, Jaakson et al., encontraron un tasa de detección de mutación alélica en 55-65% en pacientes con STGD1 usando únicamente microarreglos (89). En combinación con un método de detección convencional de mutaciones, el éxito de detección mutacional se sitúa entre el 70-80%. En este estudio, la mayoría de las mutaciones identificadas fueron del tipo heterocigotas compuestas (89).

#### TRANSPORTADORES CON CAJA DE UNIÓN A ATP (ATP-BINDING CASSETTE, ABC)

Los transportadores ABC son proteínas encontradas ubicuamente desde las bacterias hasta los humanos. Son una familia de múltiples proteínas que utilizan la energía del ATP para trasladar una variedad de moléculas a través de las membranas celulares. Entre la familia de transportadores ABC humanos, se han clasificado 7 subfamilias de acuerdo a su estructura (ABC A-G). Dentro de estas subfamilias se han identificado 48 subtipos específicos de transportadores ABC (90).

Todos los transportadores ABC comparten una arquitectura molecular común, ya que poseen 2 mitades simétricas, cada una constituida por un dominio de unión a nucleótido (ATP-binding cassette; NBD), un dominio transmembranal (TMD), formado típicamente por 6 asas transmembranales y un dominio extracelular (EDC) (figura 3) (91).

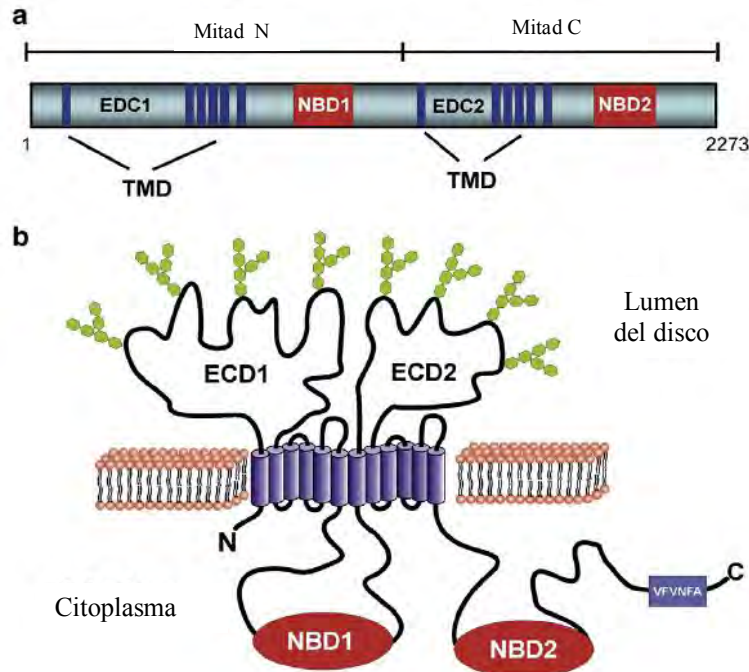


Figura 3. Características estructurales del transportador ABCA4 (modificado de Molday RS et al. The role of the photoreceptor ABCA4 in lipid transport and Stargardt disease macular degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 179: 573-583) (92).

En eucariontes, los transportadores ABC están localizados en la membrana plasmática y en las membranas de compartimentos intracelulares tales como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los endosomas, los peroxisomas y la mitocondria. Estos transportadores utilizan ATP para acarrear sustratos (péptidos, lípidos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, iones, conjugados de glutatión y xenobióticos) a través de las membranas celulares por lo cual son conocidas como ATPasas de “tráfico” ya que regulan el transporte de varios sustratos e hidrolizan ATP en ADP y  $P_i$  (93,94).

Los transportadores ABC están involucrados en una variedad de enfermedades humanas hereditarias entre las que se encuentran la enfermedad de Tangier o deficiencia familiar de HDL (ABCA1), la deficiencia de surfactante neonatal (ABCA3), la enfermedad de Stargardt, la distrofia de conos-bastones y la retinosis pigmentaria (ABCA4), la ictiosis (ABCA12), la colestasis intrahepática familiar (ABCB4, ABCB11), el síndrome de Dubin-Johnson (ABCC2), el pseudoxantoma elasticum (ABCC6), la fibrosis quística (ABCC7), la hipoglucemia hiperinsulinémica de la infancia (ABCC8), la adrenoleucodistrofia (ABCD1) y la  $\beta$ -sitosterolemia (ABCG5, ABCG8) (95).

## **PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE STARGARDT**

El gen *ABCA4* codifica una proteína transportadora ABC específica de retina conocida como RmP que consiste de dos dominios transmembranales cada uno con seis segmentos hidrofóbicos y dos dominios de unión a ATP altamente conservados (85). Estudios iniciales demostraron que RmP se expresaba exclusivamente en los discos de los segmentos externos de los bastones; sin embargo, recientemente también se ha identificado expresión en los conos (96).

La proteína es fundamental en el ciclo metabólico de retinoides entre los fotorreceptores y el EPR. En la cascada de foto-transducción, un fotón de luz es capturado por la rodopsina en el segmento externo del fotorreceptor dirigiendo a la isomerización de 11-cis retinal a todo-trans retinal. Entonces, todo-trans retinal se disocia de la molécula de rodopsina activada y entra al espacio intradiscal donde se combina con fosfatidiletanolamina (PE) para formar N-retinilideno-PE (N-RPE). RmP funciona como una transportador dependiente de ATP que transporta N-RPE fuera del espacio intradiscal hacia el citoplasma del segmento externo del fotorreceptor. Ahí, el todo-transretinal es reducido a todo-trans retinol y es transportado al RPE donde es reconvertido en 11-cis retinal (92). En ausencia de una proteína RmP funcional, el N-RPE se acumula en el espacio intradiscal y sus niveles elevados favorecen la condensación secundaria de N-RPE con todo-trans retinal para formar N retinilideno-N-retinil-PE (A2PE), el cual es hidrolizado para formar N-retinilideno-N-retinil-etanolamina (A2E) (97). A2E es uno de los mayores componentes de lipofuscina en el EPR y es un producto tóxico para las células de este tejido. Se ha propuesto que A2E tiene un efecto inhibitorio sobre las hidrolasas de lípidos o en el tráfico de éstos, de tal forma que enlentece la habilidad del EPR para realizar



su papel fagocítico. Con el tiempo, A2E resulta en un declive en las funciones del EPR y posteriormente en la muerte del fotorreceptor (figura 4) (98).

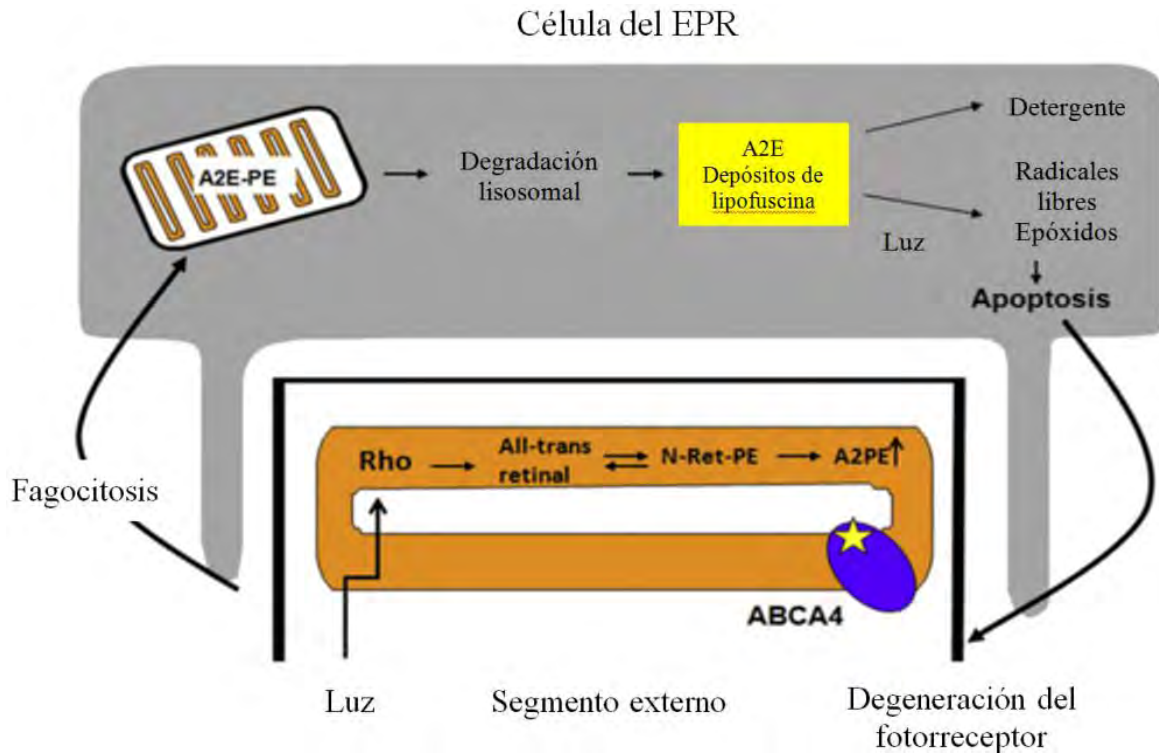


Figura 4. Modelo de degeneración del fotorreceptor mediada por ABCA4 en la enfermedad de Stargardt. La pérdida de la función parcial o completa del transportador ABCA4 debido a mutaciones en el gen ABCA4 resulta en acumulación de metabolitos de la vitamina A en el segmento externo de los fotorreceptores. El segmento externo sufre fagocitosis por las células adyacentes del EPR y es degradado por enzimas lisosomales. Como parte de este proceso se forma lipofuscina la cual se acumula en las células de este EPR. La lipofuscina dispara la apoptosis dentro de este epitelio. La pérdida de esta células resulta también en muerte de los fotorreceptores y pérdida de la visión. (modificado de Molday RS et al. The role of the photoreceptor ABCA4 in lipid transport ABCA4 in lipid transport and Stargardt disease macular degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 179: 573-583) (92).

## **DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE STARGARDT**

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Stargardt se realiza por la sintomatología y las características funduscópicas de la mácula descritas anteriormente. Estudios como la FAG y el ERG son de apoyo para dicho diagnóstico.

La FAG implica un seguimiento fotográfico del paso de la fluoresceína a través de las circulaciones retiniana y coroidea. Una FAG de buena calidad requiere una dilatación pupilar adecuada. La fluoresceína se inyecta vía endovenosa rápidamente, posteriormente se toman fotografías con intervalos aproximados de 1 segundo, entre 5 y 25 segundos después de la inyección. Como se mencionó anteriormente, la FAG en la enfermedad de Stargardt muestra una coroides oscura debido al depósito de lipofuscina dentro del EPR; las retinas con atrofia muestran una lesión en “tiro al blanco”(99-100).

El ERG es un registro de un potencial de acción producido por la retina cuando es estimulada por luz intensa adecuada. El registro se realiza mediante un electrodo activo introducido en una lente de contacto situado sobre la córnea y un electrodo de referencia sobre la frente del paciente. El potencial entre los dos electrodos se amplifica y se representa la respuesta como ondas bifásicas “a” y “b”. En la enfermedad de Stargardt los ERG suelen ser normales (100,101).

## **TERAPIA GENICA EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD DE STARGARDT**

La terapia génica es un tratamiento de enfermedades basado en la introducción de material génico dentro de las células blanco del cuerpo. Esta terapia tiene una gran promesa para el tratamiento de las enfermedades del ojo, como es visto por su eficacia en modelos animales y recientemente en humanos. En efecto, el ojo y la retina son particularmente apropiados para la terapia génica debido a que son fácilmente accesibles, por su pequeño tamaño y estructura encerrada para usar dosis génicas o vectoriales bajas para lograr un efecto terapéutico y por las uniones estrechas entre las capas de la retina y la barrera hemática retinal que confiere al ojo un status inmunológico privilegiado para no generar una respuesta inmunológica para cualquier componente vector o transgen. (102-103). Recientemente, Kong *et al*, han realizado algunos estudios con un gran éxito en modelos animales de enfermedad de Stargardt con el uso de terapia génica con lentivirus lo que promete muy pronto el tratamiento en humanos (104).

## **JUSTIFICACION**

La distrofia retiniana de Stargardt es una enfermedad hereditaria con variaciones fenotípicas intra e interfamiliares y varios grados de atrofia macular. Representa un 7% de todas las distrofias retinianas y es la distrofia macular juvenil más frecuente con una prevalencia de 1 en 10000 individuos (105). En México, Zenteno *et al*, en un estudio genético-molecular preeliminar analizaron algunos exones del gen *ABCA4* en pacientes con enfermedad de Stargardt sin identificar mutaciones dentro de las secuencias estudiadas (84). Debido a la gran heterogeneidad de mutaciones en *ABCA4*, las mutaciones pueden encontrarse en cualquier parte de las secuencias codificantes o en las uniones exón-intrón de este gen. El estándar de oro en la actualidad es la secuenciación nucleotídica de la totalidad del gen (50 exones). En Latinoamérica no se ha realizado el análisis del gen *ABCA4* en pacientes con enfermedad de Stargardt. Este estudio estará encaminado a la identificación por primera vez del espectro mutacional de *ABCA4* en un grupo de pacientes Mexicanos con Enfermedad de Stargardt.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La enfermedad de Stargardt es la distrofia macular juvenil hereditaria más frecuente y es causada por mutaciones en el gen *ABCA4*. No existen estudios que hayan investigado las alteraciones moleculares responsables de la enfermedad de Stargardt en pacientes de nuestro país. El reconocimiento de estas mutaciones es de gran importancia para la delineación del espectro mutacional en poblaciones específicas, para su comparación interétnica y para establecer protocolos más eficientes de diagnóstico molecular.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son las mutaciones específicas del gen ABCA4 que causan enfermedad de Stargardt en un grupo de pacientes Mexicanos con este padecimiento?

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRIMARIO**

- Identificar el espectro mutacional del gen *ABCA4* responsable de la enfermedad de Stargardt en un grupo de pacientes diagnosticados en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Identificar los alelos que con mayor frecuencia causan la enfermedad en un grupo de pacientes del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana.
- Describir el espectro mutacional observado en este grupo de pacientes con el descrito en pacientes pertenecientes a otros grupos étnicos.

## **TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO**

- Transversal descriptivo.

## **VARIABLES DE INTERES**

### **1. ESPECTRO MUTACIONAL**

**Definición conceptual:** La variación heredada del genoma es la piedra angular de la genética humana y médica. Un segmento de DNA que ocupa una posición particular o localización sobre un cromosoma es un locus. Si el segmento contiene un gen, ese segmento de DNA es el locus para ese gen. Las variantes alternativas de la información de

un gen son llamados alelos. Para muchos genes, hay un alelo único prevalente, presente en la mayoría de los individuos, y se denomina alelo silvestre o común. La otra versión de gen son los alelos variantes o mutantes que difieren del alelo silvestre por la presencia de una mutación, un cambio permanente en la secuencia de nucleótidos del DNA. Un conjunto dado de alelos en un locus o grupo de loci en un cromosoma es referido como un haplotipo (106).

El término mutación es utilizado en la genética médica en dos sentidos: algunas veces para indicar un cambio genético nuevo que no ha sido previamente conocido en una familia, y algunas veces para indicar un alelo mutante causante de enfermedad (106).

La descripción de los distintos tipos de mutación (espectro mutacional) se hará atendiendo a su causa a nivel molecular en el DNA: mutaciones por sustitución, por inserción y por deleción; o por su efecto sobre la secuencia de la proteína sintetizada: mutaciones silenciosas, mutaciones no silenciosas (mutaciones de sentido equivocado, mutaciones que cambian el marco de lectura, mutaciones que no cambian el marco de lectura, mutaciones con terminación prematura de la proteína o mutaciones con terminación retrasada (107).

- Mutaciones por sustitución: consiste en el reemplazo de un nucleótido en una posición de la secuencia ocupada originalmente por otro; dicho de otro modo, un cambio de una sola base (o nucleótido).
- Deleción: consiste en la pérdida de uno o más nucleótidos de una secuencia.
- Inserción: es la introducción de uno o varios nucleótidos adicionales en una secuencia.

- Mutaciones de sentido equivocado: La sustitución de una base origina un nuevo codón (tripleto de nucleótidos) que codifican para un aminoácido diferente (107).
- Mutaciones que cambian el marco de lectura: consiste en que la inserción o deleción de nucleótidos, que origina un desfaseamiento en la secuencia normal de tripletes en los que debe ser traducido el RNAm. En consecuencia, la proteína incorpora aminoácidos erróneos y frecuentemente un codón de terminación prematuro.
- Mutaciones que no cambian el marco de lectura: la inserción o deleción de 3 pares de bases en el DNA (o múltiplos de 3), aunque añade o elimina algún aminoácido a la proteína, no cambia el marco de lectura, por lo que el resto de la secuencia aminoacídica es normal (107).
- Mutaciones con terminación prematura de la proteína: algunas mutaciones no afectan a la secuencia de aminoácidos codificados, sino que la sustitución, la inserción o la deleción de uno o varios nucleótidos tiene como efecto la aparición de un codón de terminación o de paro (UAA, UAG, UGA).
- Mutaciones con terminación retrasada: la mutación puede eliminar un codón de paro, sustituyéndolo por uno que codifica un aminoácido.

**Definición operacional:** las mutaciones se determinarán comparando los resultados de la secuenciación nucleotídica del gen *ABCA4* en DNA de los pacientes con la secuencia silvestre publicada.

**Clasificación de la variable:** Cualitativa

**Escala de la variable:** nominal:

1. Por alteración en los nucleótidos

- 1.1 Sustitución

- 1.2 Delección
- 1.3 Inserción
- 2. Por efecto de la mutación en la proteína
  - 2.1 Mutación de sentido equivocado
  - 2.2 Mutación que cambia el marco de lectura
  - 2.3 Mutaciones que no cambian el marco de lectura
  - 2.4 Mutaciones con terminación prematura de la proteína
  - 2.5 Mutaciones con terminación retrasada

## **2. GENOTIPO (HOMOCIGOTO, HETEROCIGOTO, HETEROCIGOTO COMPUESTO)**

**Definición conceptual:** Una enfermedad de un único gen (mendeliana o monogénica) es aquella que es determinada por alelos en un solo locus. Cuando una persona tiene un par de alelos idénticos en un locus codificado en el DNA nuclear, es homocigota (recesiva cuando ambos alelos están mutados); mientras que cuando los alelos son diferentes, es heterocigoto. El término heterocigoto compuesto es usado para describir un genotipo en el cual los 2 alelos de un locus específico presentan mutaciones distintas. Estos términos pueden ser aplicados a individuos o a genotipos (106).

**Definición operacional:** El genotipo se determinará comparando los resultados de la secuenciación nucleotídica del gen *ABCA4* en DNA de cada paciente con la secuencia silvestre publicada.

**Clasificación de la variable:** Cualitativa



**Escala de la variable:** nominal:

1. Homocigoto recesivo
2. Heterocigoto
3. Heterocigoto compuesto

**SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

Muestreo

Se realizó un muestreo consecutivo de los casos que acudieron a consulta del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana.”

Tamaño de muestra

Se incluyeron todos los casos índices (propósitos) con diagnóstico clínico de enfermedad de Stargardt que fueron captados en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” en el periodo de enero de 2005 - diciembre 2011. Desde que inicio el protocolo (marzo de 2010) hasta el final del mismo (febrero de 2012), 12 pacientes fueron registrados con Enfermedad de Stargardt en nuestra Institución. El resto de los pacientes fueron tomados del registro hospitalario (con fechas desde 2005 a 2011).

## **CRITERIOS DE INCLUSION**

- Sujetos con diagnóstico clínico, electroretinográfico y fluorangiográfico de enfermedad de Stargardt (casos esporádicos y familiares autosómicos recesivos) realizado por especialistas del servicio de Retina del Instituto de Oftalmología “Conde de valenciana”
- Sujetos que acepten realizarse el estudio genético y firmen la hoja de consentimiento informado

## **CRITERIOS DE EXCLUSION**

- Sujetos con enfermedad de Stargardt familiar con transmisión autosómica dominante.
  - Familias con múltiples miembros afectados con un patrón verticalizado del árbol genealógico y por lo menos 3 generaciones involucradas
  - Ausencia de silencio coroideo

## **CRITERIOS DE ELIMINACION**

- Casos aislados en los que la transmisión hereditaria de la enfermedad sugiera un tipo de herencia distinto al autosómico recesivo (pacientes captados como aislados y que con el tiempo hayan manifestado familiarmente un patrón de herencia distinto al autosómico recesivo).
- Sujetos en los que la muestra de DNA no sea suficiente para el estudio, no accedan a una nueva muestra o no puedan ser localizados nuevamente.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **EXTRACCION DE DNA GENOMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA**

Cada sujeto participante otorgó su permiso para el estudio genético mediante la firma de una carta de Información y Consentimiento Informado. Se obtuvieron 2 ml de sangre por punción venosa en cada sujeto a partir de la cual se aisló el DNA genómico mediante el kit *Quickgene DNA Whole Blood (DB-S, FujiFilm Co.)*. Brevemente, Se colocaron 30 µl de solución EDB (proteasa) en un microtubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se agregó 250 µl de sangre total (se recomendó el uso de sangre total) y 250 µl de solución LDB (buffer de lisis). Inmediatamente se mezcló el tubo 5 veces invirtiéndolo de arriba hacia abajo, se agitó con vórtex a máxima velocidad durante 15 segundos y se centrifugó durante unos segundos. La muestra se incubó a 56°C durante 2 minutos y posteriormente se agregaron 250 µl de etanol al 99%. Se repitió la agitación con vórtex durante 15 segundos y la muestra se centrifugó unos segundos.

El aislamiento de DNA se realizó dentro de los siguientes 30 minutos. Se transfirió el lisado dentro del “cartucho” del sistema automático de aislamiento de ácidos nucleicos QuickGene-810 (se vació todo el contenido del microtubo en el cartucho) y se procedió a la extracción automatizada. El DNA genómico obtenido se resuspendió en un volumen aproximado de 200µl. Se almacenó la muestra a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

## **DETERMINACION DE LA CONCENTRACION Y PUREZA DEL DNA OBTENIDO**

Se determinó la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitirá evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se considerarán adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se realizaron electroforesis en geles de agarosa de cada muestra de DNA obtenida para verificar que no existiera degradación de este ácido nucleico. La concentración de DNA obtenida se determinó por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/ $\mu$ l.

## **AMPLIFICACION POR PCR DEL GEN *ABCA4***

El análisis molecular del gen *ABCA4* consistió en amplificación por PCR y secuenciación nucleotídica automatizada. Se efectuó la amplificación por PCR de cada uno de los exones y de las uniones exón/intrón de este gen (50 exones) a partir del DNA de los sujetos afectados con la enfermedad y de sus familiares cuando estuvieron disponibles. Se utilizaron pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal de cada exón y que se muestran la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los 50 exones del gen ABCA4.

No de EXON	SECUENCIA	Pb	T.a (°C)
1F	AGCCAGAGGGCGCTCTTAACG	203	58.7
1R	GTTTATTTGCTCCACACCTC		52.5
2F	TAGCACCCTGAACTTTCTCT	191	53.2
2R	AAGGCCCAGACCAAAGTCTC		56.6
3F	CCTGCTTGGTCTCCATGAC	249	56.0
3R	ACGTGAAGGGGTGTGCAAC		56.0
4F	GCTATTTCTTATTAATGAGGC	260	52.0
4R	CCAACTCTCCCTGTTCTTTC		54.6
5F	GACCATTTCCTTCAAC	230	53.9
5R	AGGCTGGGTGCTTCCCTC		57.6
6F	CCTGTCGCCATGTAACACAA	345	54.6
6R	AGGAATCACCTTGCAATTGG		52.5
7F	TGCCTATGTGTGTATATACC	218	50.5
7R	TAAGTGGGGTAAATGGTGG		51.7
8F	GAGCATTGGCCTCACAGCAG	360	58.7
8R	TTAACCAACATGAGAGGCC		51.7
9F	AAGCAATGGGGAGTTTCTGT	287	52.5
9R	GATGTGCTACCAGGAAG		49.8
10F	GACACAACCAAAGTTCTCTCT	301	55.8
10R	TGATCTAACTCCAATAGCG		49.5

11F	CTAAGCAGAGCAGTACTG	314	56.0
11R	ACTTGACTTGCTAAGGGAG		51.7
12F	AGTTGAGTCTTTGCAGTTGG	306	52.5
12R	CTGACTTTGGAGAAATGAG		52.5
13F	GAGGTGTGAGTGAGCTATCC	280	56.6
13R	CCCATTAGCGTGTCATGG		53.1
14F	CCTCTACCAGGTACAGAGC	329	56.0
14R	GGGAAAGGAACCAAAGTATTC		58.1
15F	AGGCTGGTGGGAGAGAGC	407	57.6
15R	AGTGGACCCCCTCAGAGG		57.6
16F	CTGTTGCATTGGATAAAAGGC	330	53.2
16R	GATGAATGGAGAGGGCTGG		56.0
17F	CTGCGGTAAGGTAGGATAGGG	232	59.1
17R	CACACCGTTTACATAGAGGGC		57.1
18F	CCTCTCCCCTCCTTTCCTG	279	58.2
18R	GTCAGTTTCCTAGGCTTC		50.8
19F	TGGGGCCATGTAATTAGGC	322	53.9
19R	TGGGAAAGAGTAGACAGCCG		52.5
20F	ACTGAACCTGGTGTGGGG	325	55.4
20R	TATCTCTGCCTGTGCCAG		56.0
21F	GTAAGATCAGCTGCTGGAAG	346	54.6
21R	GAAGCTCTCCTGCTCCAAGC		58.7
22F	AGGTACCCCCACATTGCC	201	55.4

22R	AGCCCAGCCCAGGAGACT		57.6
23F	TGCTGTACACCCTTTACCAAC	346	55.2
23R	TAGCCATGTCTGGAGTGGCA		56.6
24F	AGGGAGAGGCTGTCATGGAA	226	56.6
24R	TGCATCACAACAGGACACAC		54.6
25F	GGTAACCTCACAGTCTTCC	379	53.9
25R	GGGAACGATGGCTTTTTGC		53.9
26F	CAAAACAGAGCTTGGGTTAG	191	52.5
26R	ACTTTCGAGATGGAACTTGG		52.5
27F	GCTACCAGCCTGGTATTTTCATTG	493	59.8
27R	GTTATAACCCATGCCTGAAG		52.5
28F	CCACCAGGGGCTGATTAG	409	55.4
28R	GGCAGATACATTAAGTTCC		49.5
29F	AGGCTCTGAGTTGCATGATG	241	54.6
29R	CTGCCATCTTGAACCCACC		49.5
30F	GTCAGCAACTTTGAGGCTG	314	53.9
30R	ACTCAGGAGATACCAGGGAC		56.6
31F	TATAAGTCCTCAAGTTCCAGG	198	53.2
31R	AATATCTTCTACAGGGAGCC		52.5
32F	GAAAGTTAACGGCACTGCT	185	51.7
32R	CATGGCTGTGAGGTGTGC		55.4
33F	TTCATGTTTCCCTACAAAACCC	265	53.9
33R	CATGAGAGTTTCTCATTTCATGG		53.9

34F	GCTTAACTACCATGAATGAG	275	50.5
34R	ATTCCTTGCTAGATTCAGC		50.5
35F	GCAGCGTCTCAGATGTCCTC	284	58.7
35R	CGGTGGTGAGAATCCTCTCA		56.6
36F	GTATCTTCTCCTCCTTCTGC	305	54.6
36R	ACACACAAGCTCCACCTTG		53.9
37F	TTGCAGAGCTGGCAGCAG	226	55.4
37R	CCACCAGGCTTCTCTCAG		56.0
38F	GGAATGGAATGTGGA ACTCC	252	54.6
38R	CACATACTCTACTATCCTAC		50.5
39F	TGCTGTCCTGTGAGAGCATC	268	56.6
39R	TCCCAGCTTTGGACCCAG		55.4
40F	AGGTCTGTGGGGTGAGCTG	236	58.2
40R	TCTGGATGCCCTGAGCTGC		58.2
41F	TGGAAGAGAGGTCCCATGGA	261	56.6
41R	GCAACATCATGCCAACTG		50.8
42F	ATGTCAATATGTAACCTCCT	237	48.4
42R	AGAGCTGATGTTCCGGAAGCC		56.6
43F	CTTACCCTGGGGCCTGAC	277	57.6
43R	CTCAGAGCCACCCTACTATAG		57.1
44F	TAGCTCTATGGTCATCCCT	289	51.7
44R	TTCTCATCTCCAAGAGAATGC		53.2
45F	GTTTGGGGTGTTTGCTTGTC	257	54.6



45R	ACCTATTTCCCAACCCAAGAG		57.6
46F	TGTCAGCTCATCCTCCACAG	258	56.6
46R	GAGGTGAGCAGGAGAGGATT		56.6
47F	TCACATCCCACAGGCAAGAG	228	56.6
47R	AGGTGGATCCACAGAAGGC		56.0
48F	GATTACCTTAGGCCCAACC	366	53.9
48R	ACACTGGGTGTTCTGGACC		56.0
49F	GTGTAGGGTGCTGTTTTCC	220	53.9
49R	AAGCCCAGTGAACCAGCTGG		58.7
50F	CTAAAAGTAGTACAGCATC	547	47.7
50R	GGAGCTATGCACCCATCTAA		54.6

**Pb:** pares de bases del amplicón resultante; **T.a:** temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos; F: sentido; R: antisentido

Cada reacción de amplificación de PCR tuvo un volumen final de 15  $\mu$ l que contenía 7.5  $\mu$ l de HotStarTaq DNA polimerasa (compuesta por buffer de PCR 10x que contiene 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM de cada dNTP y 2.5 unidades de DNA polimerasa HotStarTaq), de 50-100 ngs de DNA genómico (volumen variable), 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido) y agua bidestilada c.b.p. 15  $\mu$ l. Se utilizó un programa de temperaturas que incluyó 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos (Tabla 1) y 1

min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final.

Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pares de bases (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 silica (Qiagen).

La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinó por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

## **SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

A partir de cada amplificado se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de los 50 exones de ABCA4. Cada reacción de 10 µl incluyó 2 µl del reactivo BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxionucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl<sub>2</sub> y la enzima ampliTaQ polimerasa; además se agregó 1 µl del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 µM, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR purificado y agua bidestilada para un volumen final de 10 µl. Para esta reacción de PCR se utilizó un

programa de 25 ciclos de termociclaje que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 µl de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min en un termociclador. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararon con las secuencias silvestres del gen *ABCA4* (*ENST00000370225*) para identificar posibles mutaciones.

Cuando se identificaron mutaciones potenciales no descritas previamente en la literatura, se descartaron que ésta corresponda a un polimorfismo benigno mediante el análisis de al menos DNA de 75 sujetos (150 alelos) sin la enfermedad procedentes del Banco de DNA de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.

## **ANALISIS DE PREDICCIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES**

Las mutaciones nuevas identificadas como responsables de la enfermedad fueron analizadas mediante el programa de computación Polyphen (**polymorphism phenotyping**, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) (Anexo 1) (108-110).

### **POLYPHEN (=Polymorphism Phenotyping) (105-107)**

Es una herramienta que predice el posible impacto de un aminoácido sustituido en la estructura y función de una proteína humana. Esta predicción se basa en reglas sencillas

empíricas que son aplicadas a la secuencia filogenética y la información estructural que caracteriza la sustitución.

La mayoría de las variaciones humanas están representadas por los SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) y muchos de ellos son causantes de diferencias fenotípicas entre los humanos. Este programa se centra específicamente en SNPs no-sinónimos (*nsSNP*), por ejemplo SNPs localizados en regiones codificantes y resultan en la variación en los productos proteicos de genes. El impacto de esas variantes alélicas sobre la estructura/función proteica puede ser predicha por el análisis del alineamiento de secuencias y estructuras proteicas tridimensionales que el programa ofrece.

PolyPhen predice que un nsSNP es:

- a) Probablemente perjudicial: apoya con alta confianza que la proteína está afectada en función o estructura.
- b) Posiblemente perjudicial: supone que la función o estructura de la proteína está dañada.
- c) Benigna: carece de cualquier efecto fenotípico.
- d) Desconocida: cuando en algunas ocasiones raras, la carencia de datos no permite al programa hacer una predicción

## **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

El estudio tuvo una duración aproximada de 2 años. Ver anexo 1.

## **ASPECTOS ETICOS**

Este protocolo de estudio se apegó a las normas establecidas por el Comité Científico y de Ética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, así como normas nacionales e internacionales. El protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación y Bioética Institucionales con número de Registro **CC-09-2010**. Se realizó, registró y reportó en cumplimiento de los principios de las buenas prácticas clínicas (BPC). 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 DNA 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 2).

De acuerdo a la ley general de salud en su título segundo capítulo 17 apartado segundo, nuestro estudio se consideró una investigación con riesgo mínimo.

## **FACTIBILIDAD Y RECURSOS HUMANOS**

### **RECURSOS HUMANOS**

- Investigador principal, investigadores y biólogos moleculares del Departamento de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.
- Departamento de Retina del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” que cuenta con médicos subespecialistas certificados en esta área quienes apoyaron con el diagnóstico clínico y la interpretación de los estudios de gabinete (FAG y ERG) de los pacientes con enfermedad de Stargardt.

## RECURSOS FISICOS

- El estudio se realizó en el Departamento de Genética y la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”

## RECURSOS FINANCIEROS

- El estudio de este protocolo de investigación tuvo el apoyo económico del Fondo de Investigación del Patronato del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.

## **RESULTADOS**

Se estudiaron 30 propósitos, que incluyeron 8 casos familiares y 22 aislados. Del total de casos, 18 fueron masculinos y 12 femeninos. Se identificó antecedente de matrimonio consanguíneo en solamente 7 familias.

### **NORMALIZACION DE LA METODOLOGIA**

Se realizó normalización de la metodología en 5 propósitos (2 casos esporádicos y 3 casos familiares) con enfermedad de Stargardt. Inicialmente, se amplificaron cada uno de los 50 exones del gen *ABCA4* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. A continuación, cada producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1.5% donde se corroboró la amplificación adecuada de los fragmentos génicos de acuerdo a su longitud en pares de bases. Posteriormente, se purificaron los fragmentos obtenidos por PCR y se realizó una segunda PCR utilizando nucleótidos modificados (Big Dye terminator). Finalmente, los productos de esta nueva reacción fueron purificados y se procedió a la secuenciación nucleotídica automatizada.

## GELES DE AGAROSA EN ELECTROFORESIS (DNA 1014)

Como ejemplo, se muestran únicamente los productos de PCR en geles de agarosa obtenidos de la amplificación en DNA del paciente #1014 (exones 1 a 49).

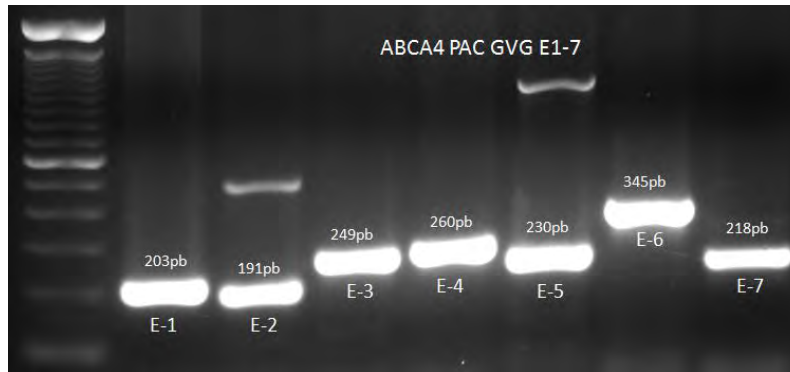


Figura 5. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas de amplificación de los productos de PCR correspondientes a los exones 1 al 7 del gen ABCA4 (E1 a E7). Los números sobre cada banda representan la longitud en pares de bases de cada exón. El primer carril corresponde al marcador de 100 pares de bases.

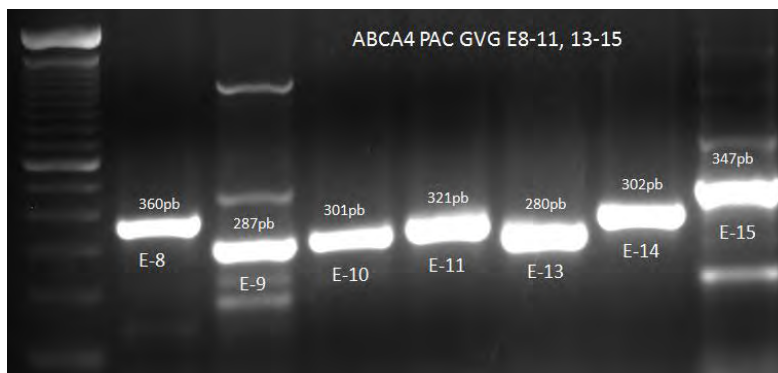


Figura 6. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas de amplificación de los productos de PCR correspondientes a los exones 8-11 y 13 al 15 del gen ABCA4. Los números arriba de cada banda representan la longitud en pares de bases de cada exón. El primer carril corresponde al marcador de 100 pares de bases.



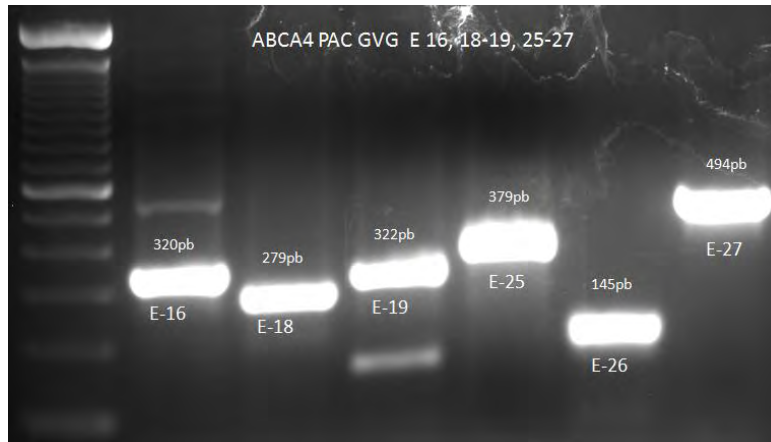


Figura 7. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas de amplificación de los productos de PCR correspondientes a los exones 16, 18-19 y 25 al 27 del gen ABCA4. Los números arriba de cada banda representan la longitud en pares de bases de cada exón. El primer carril corresponde al marcador de 100 pares de bases.

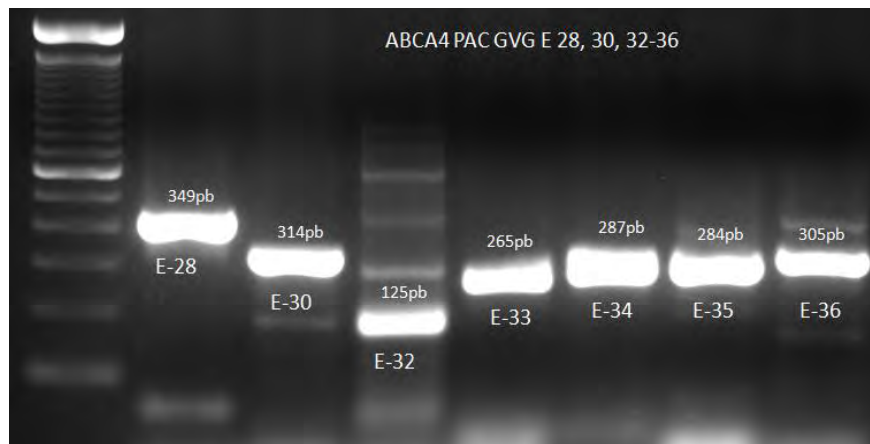


Figura 8. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas de amplificación de los productos de PCR correspondientes a los exones 28, 30 y 32 al 36 del gen ABCA4. Los números arriba de cada banda representan la longitud en pares de bases de cada exón. El primer carril corresponde al marcador de 100 pares de bases.

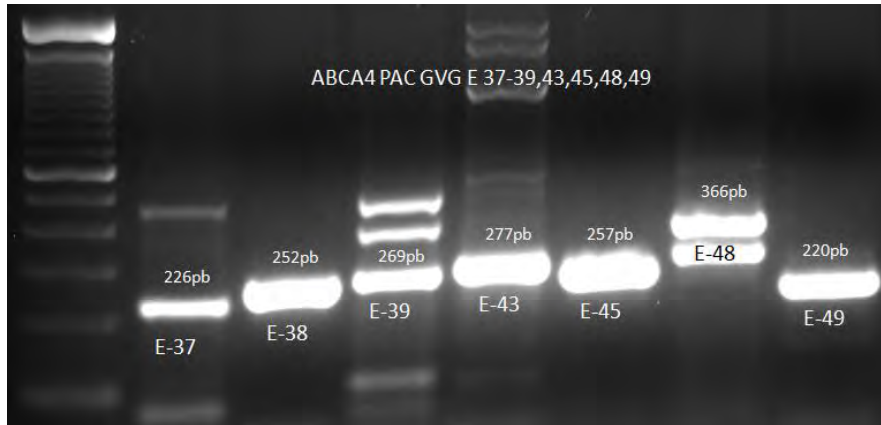


Figura 9. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas de amplificación de los productos de PCR correspondientes a los exones 37 al 39, 43, 45 y 48 a 49 del gen ABCA4. Los números arriba de cada banda representan la longitud en pares de bases de cada exón. El primer carril corresponde al marcador de 100 pares de bases.

## SECUENCIACION NUCLEOTÌDICA DEL GEN *ABCA4* EN 30 PACIENTES CON ENFERMEDAD DE STARGARDT

Después de realizar la secuenciación nucleotídica de los 50 exones del gen *ABCA4* en el DNA de los 30 sujetos incluidos en este estudio, se identificaron un total de 30 mutaciones (tabla1). La descripción de las alteraciones moleculares identificadas son descritas por alelo (tabla 2 y figura 10), por genotipos (tabla 3 y figura 11), por presentación familiar o esporádica (tabla 4 y figura 12), por efecto nucleotídico en el DNA (tabla 5 y figura 13) y por efecto de la mutación en la proteína (tabla 6 y figura 14).

Tabla 2

# DE ALELOS AFECTADOS	# DE CASOS
2 ALELOS MUTANTES	20
1 ALELO MUTANTE	5
SIN ALELOS MUTANTES	5
TOTAL	30

Figura 10

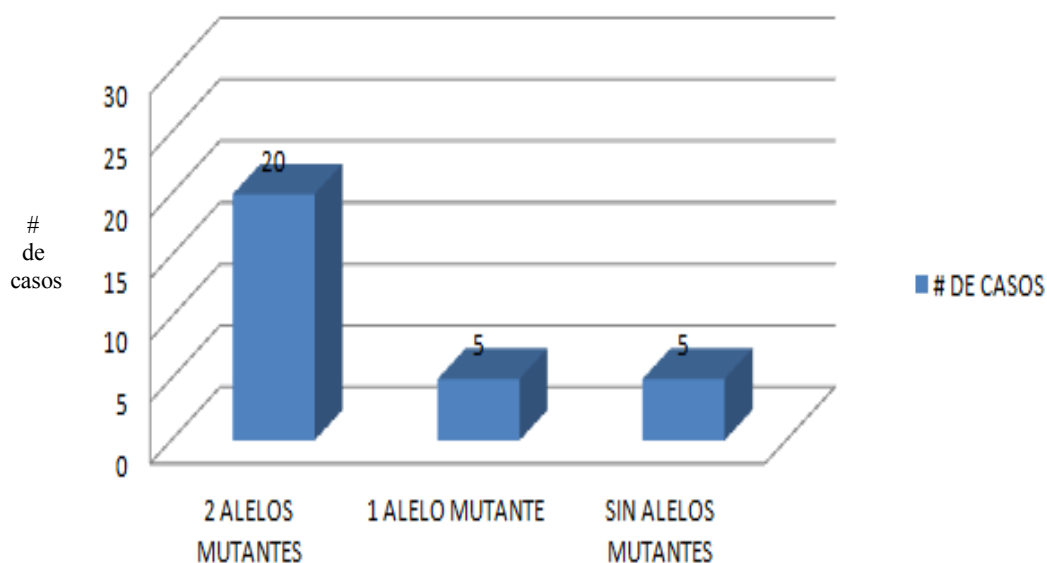


Tabla 3

GENOTIPO	# DE CASOS
Homocigoto	8
Heterocigoto compuesto	12
Heterocigoto	5
Sin mutaciones	5
Total	30

Figura 11

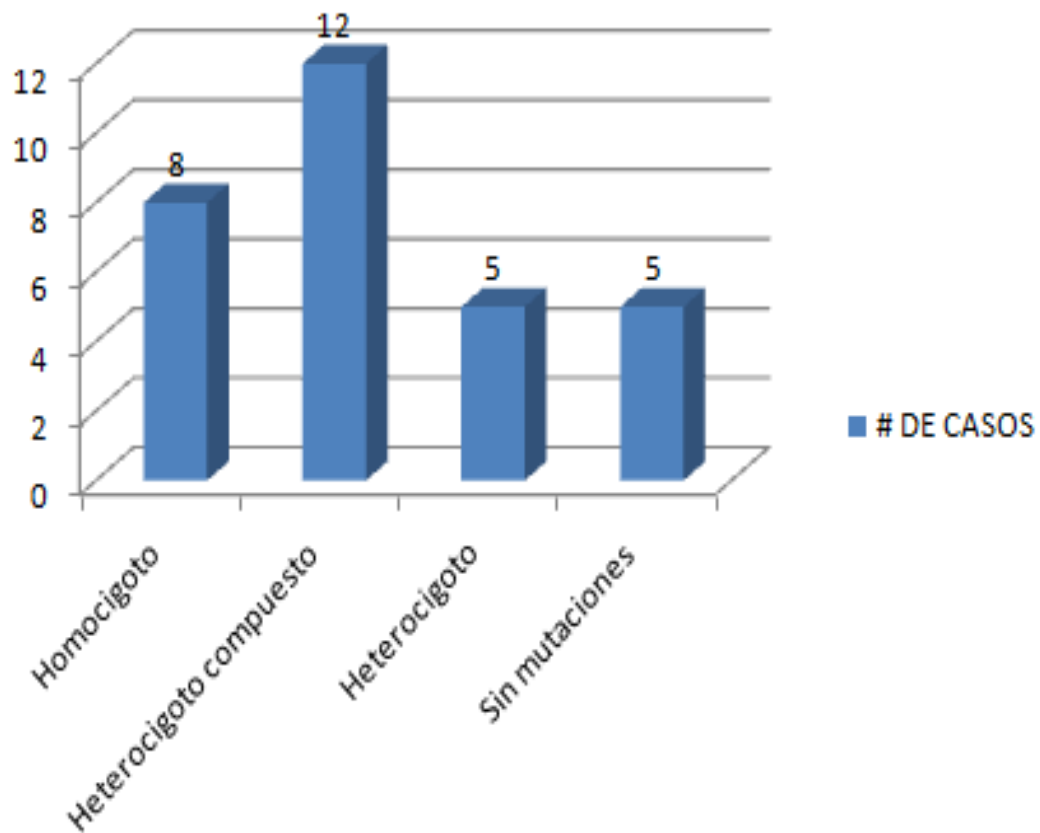


Tabla 4

CASOS	HOMOCIGOTO	HETEROCIGOTO COMPUESTO	HETEROCIGOTO	SIN MUTACIONES	TOTAL
FAMILIARES	2	3	0	3	8
ESPORADICOS	6	9	5	2	22

Figura 12

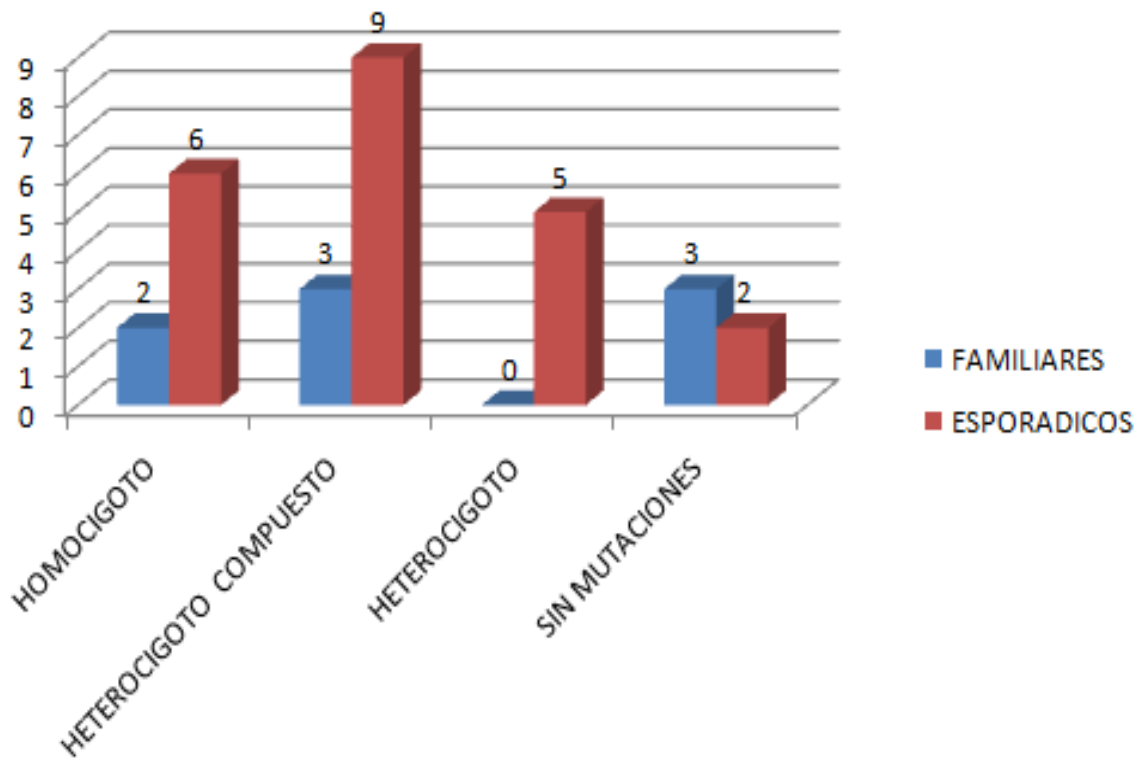


Tabla 5

TIPO DE MUTACION	NUMERO DE MUTACIONES
SUSTITUCION	27
DELECCION	2
INSERCION	1
TOTAL	30

Figura 13

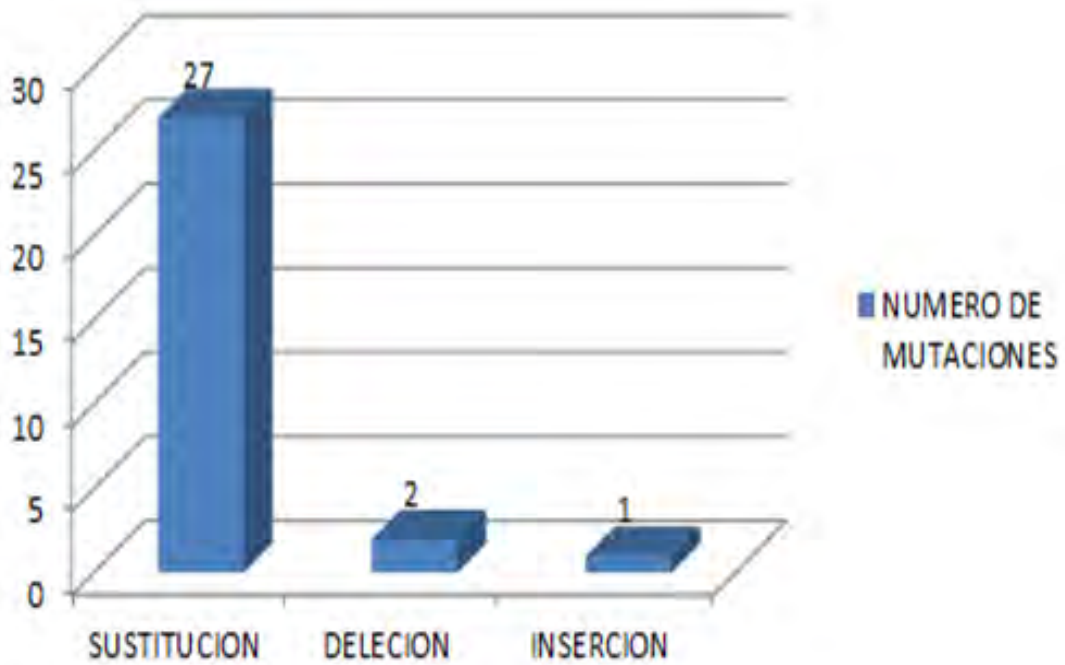
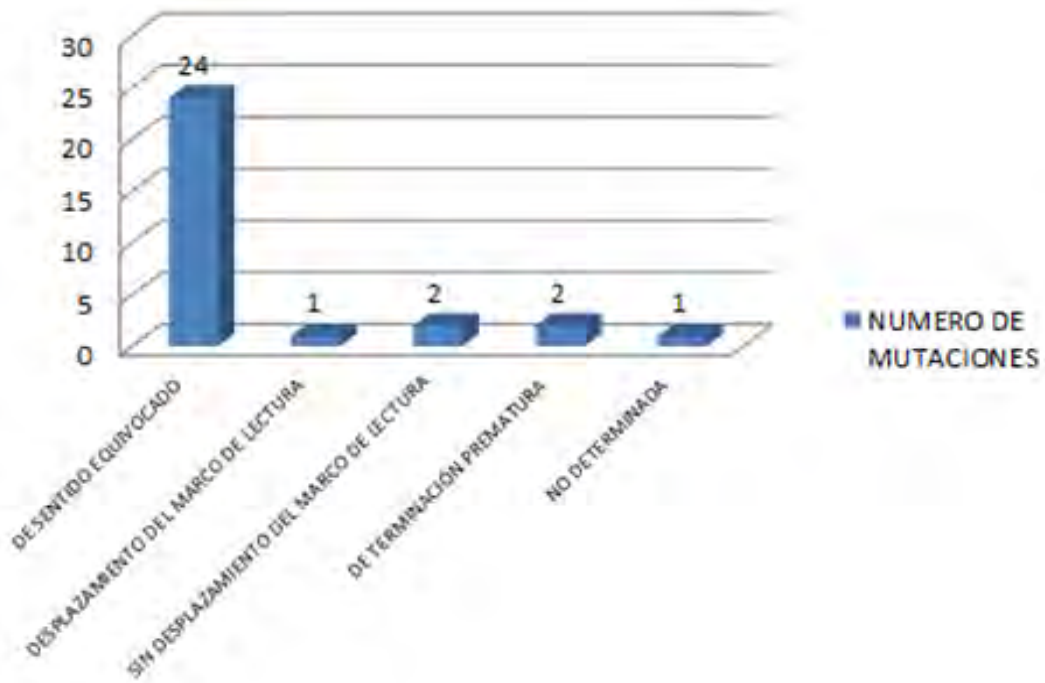


Tabla 6

TIPO DE MUTACION NO SILENCIOSA	NUMERO DE MUTACIONES
DE SENTIDO EQUIVOCADO	24
DESPLAZAMIENTO DEL MARCO DE LECTURA	1
SIN DESPLAZAMIENTO DEL MARCO DE LECTURA	2
DE TERMINACIÓN PREMATURA	2
Splicing	1
TOTAL	30

Figura 14



## ANALISIS DE SECUENCIACION NUCLEOTIDICA DE CASOS FAMILIARES

### FAMILIA 1 (PACIENTES DNA 269 y 433)

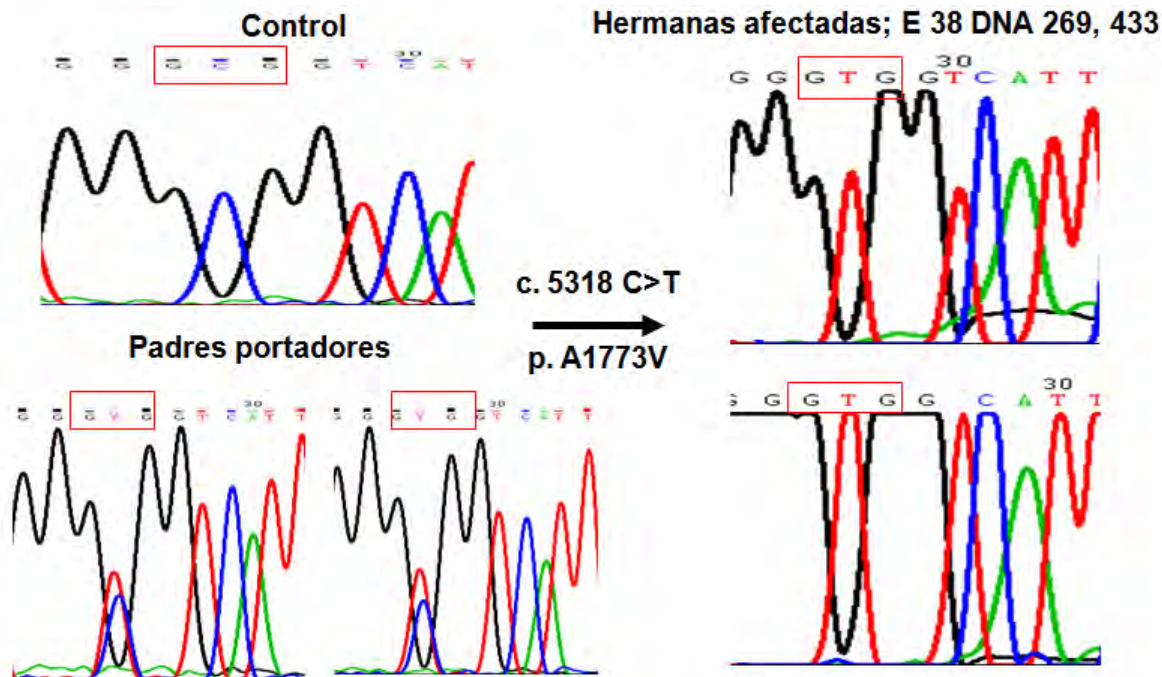


Figura15. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA de los pacientes 269 y 433 en el exón 38. Panel superior izquierdo: control. Panel inferior izquierdo: padres portadores de la mutación Panel superior derecho DNA 269; Inferior izquierdo DNA 433. En los paneles derechos se muestra una mutación homocigota en el exón 38 del gen *ABCA4* que sustituye una citosina (C) por timina (T) en el nucléotido 5318 (c. 5318 C>T). Este cambio predice una mutación de sentido equivocado de alanina(A) a valina (V) en el aminoácido 1773 (p. A1773V) de la proteína Rim.

En la familia 1, se identificó una mutación p.Ala1773Val en estado homocigoto (figura 11). Esta mutación ha sido descrita en dos poblaciones con resultados no concluyentes en ambas (111,112); por lo que se analizaron 200 alelos de controles sanos. Ninguno presentó la mutación al utilizar la enzima de restricción *ACII* y secuenciación nucleotídica.



## FAMILIA 2 (PACIENTES 290 y 720)

En esta familia no se logró identificar ninguna mutación patogénica en el gen *ABCA4*.

## FAMILIA 3 (PACIENTES 376 y 377)

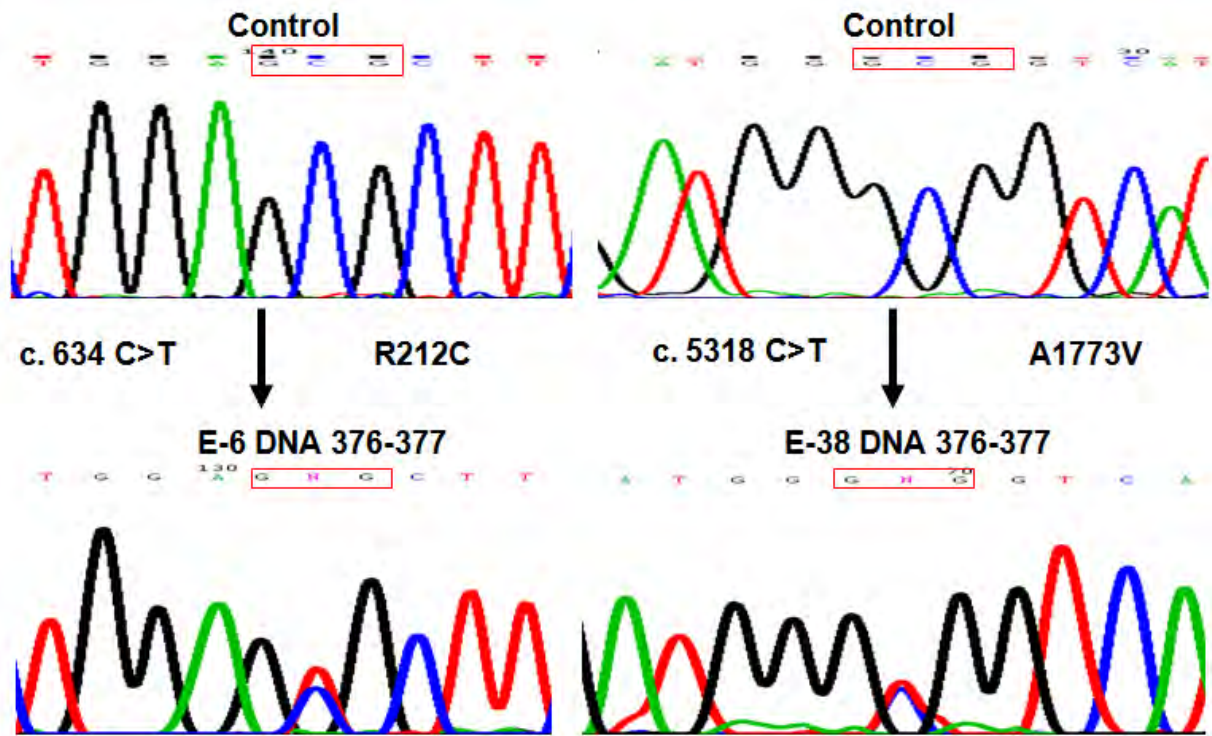


Figura 16. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA de los pacientes DNA 376 y 377 en los exones 6 (derecha) y 38 (izquierda). Panel superior DNA control exones 6 y 38; panel inferior: DNA 376 exones 6 y 38. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 6 y 38 del gen *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 6 se sustituye una citosina (C) por Timina (T) en el nucleótido 634 (c. 634 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a Cisteína (C) en el aminoácido 212 (p. R212C) de la proteína Rim. En el exón 38 se sustituye una Guanina (G) por una Timina (T) en el nucleótido 5318 (c. 5318 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Alanina (A) a Valina (V) en el aminoácido 1773 (p. A1773V) de la proteína Rim. Se identifica un heterocigoto compuesto. Se encuentra estado portador en la madre para el exón 38, mientras que en el exón 6 es sana. Al padre no fue posible realizarle estudio debido a que falleció hace algunos años. No se muestra electroferograma de E6 de la madre portadora

#### FAMILIA 4 (PACIENTES 1163 y 1922)

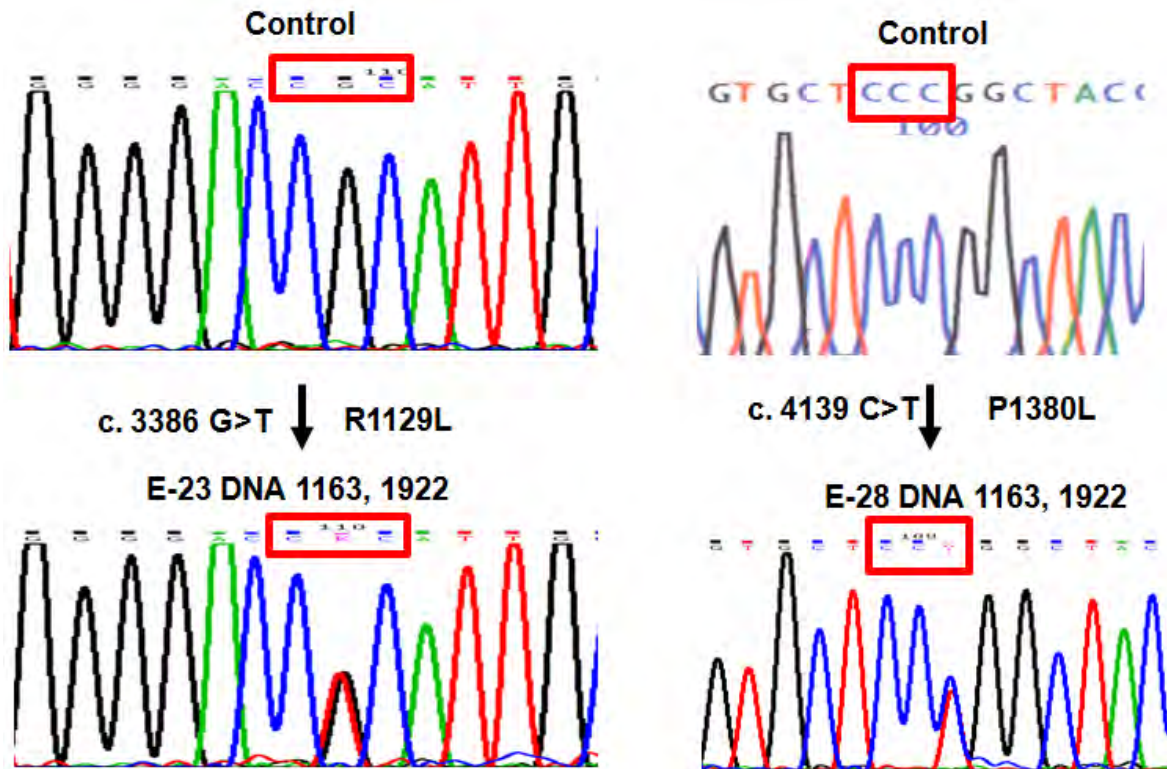


Figura 17. Secuencia nucleotídica parcial del gen ABCA4 en DNA de los pacientes DNA1163 y 1922 en los exones 23 y 28. Panel superior DNA control exones 23 y 28; panel inferior: DNA 1163 exones 6 y 38. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 23 y 28 del gen ABCA4; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 23 se sustituye una guanina (G) por una Timina (T) en el nucleótido 3386 (c. 3386 G>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a Leucina (L) en el aminoácido 1129 (p. R1129L) de la proteína Rim. En el exón 28 se sustituye una Citosina (C) por una Timina (T) en el nucleótido 4139 (c.4139 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Prolina (P) a Leucina (L) en el aminoácido 1380 (P1380L) de la proteína Rim. Se identifica un heterocigoto compuesto. No se muestra secuencia parcial de paciente DNA 1922, se encontró misma alteración. Padres no disponibles a la fecha.

#### FAMILIA 5 (PACIENTES 2255 y 2296)

El estudio molecular en esta familia no logró determinar mutaciones en el gen ABCA4.

## FAMILIA 6 (PACIENTES 2409 y 2410)

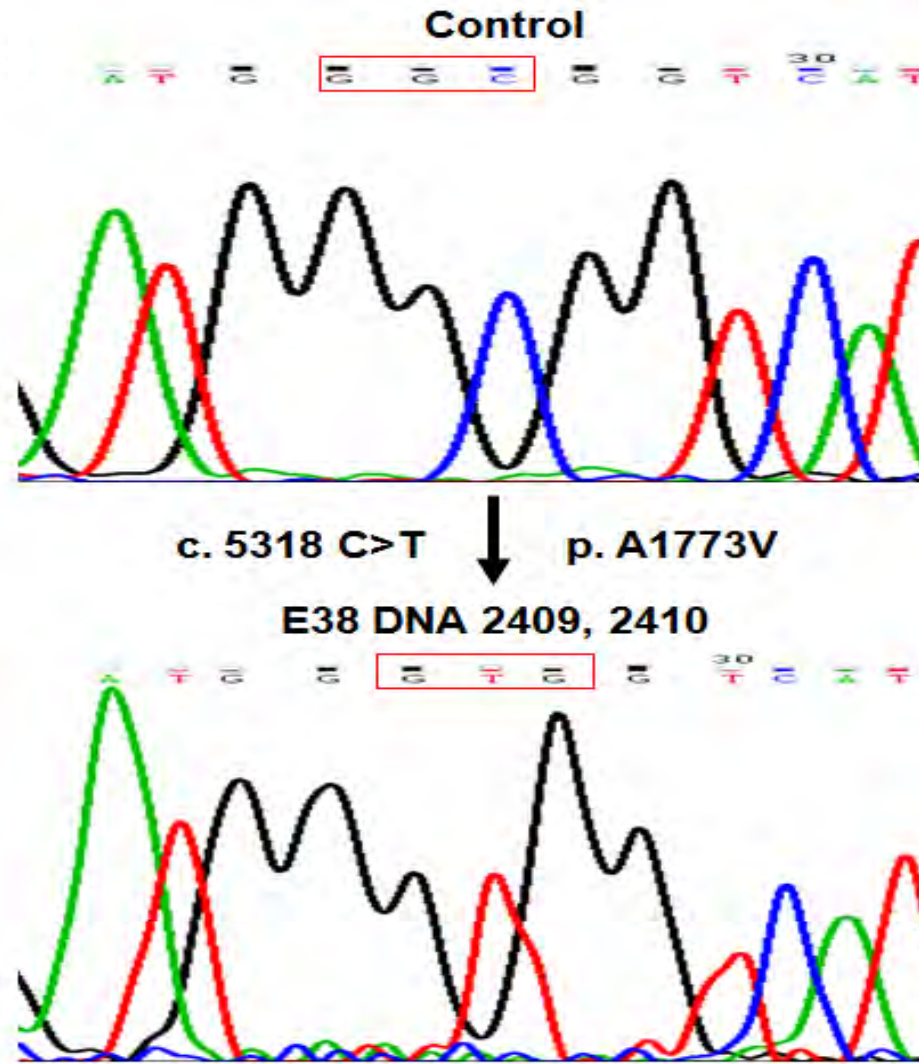


Figura 18. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA de los pacientes DNA 2409 y 2410 en el exón 38. Panel superior: control. Panel inferior DNA 2409. Se muestra una mutación homocigota en el exón 38 del gen *ABCA4* que sustituye una citosina (C) por timina (T) en el nucleótido 5318 (c. 5318 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de alanina(A) a valina (V) en el aminoácido 1773 (p. A1773V) de la proteína Rim. No se muestra paciente DNA 2410, donde se encontró misma alteración. Los padres son portadores de la mutación (no mostrado).

### FAMILIA 7 (PACIENTE 1298)

En este paciente no se identificaron mutaciones patogénicas en el gen *ABCA4*.

### FAMILIA 8 (PACIENTE 793)

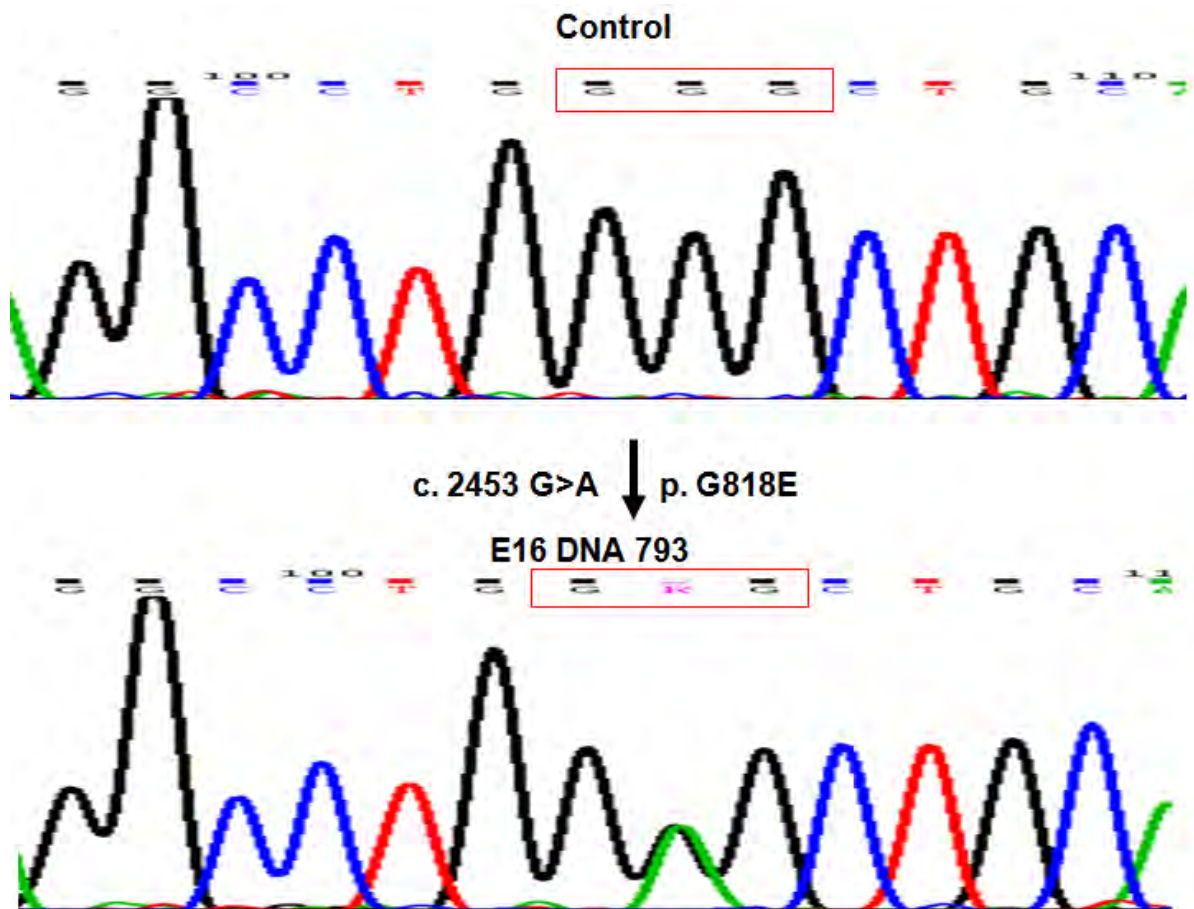


Figura 19. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA en el pacientes DNA 793 en el exón 16. Panel superior: control. Panel inferior DNA 793. Se muestra una mutación heterocigota en el exón 16 del gen *ABCA4* que sustituye una guanina (G) por adenina (A) en el nucléotido 2453, lo que produce una mutación de sentido equivocado de glicina (G) a ácido glutámico (E) en el aminoácido 818 de la proteína Rim (p.G818E). Hermana con la misma mutación.



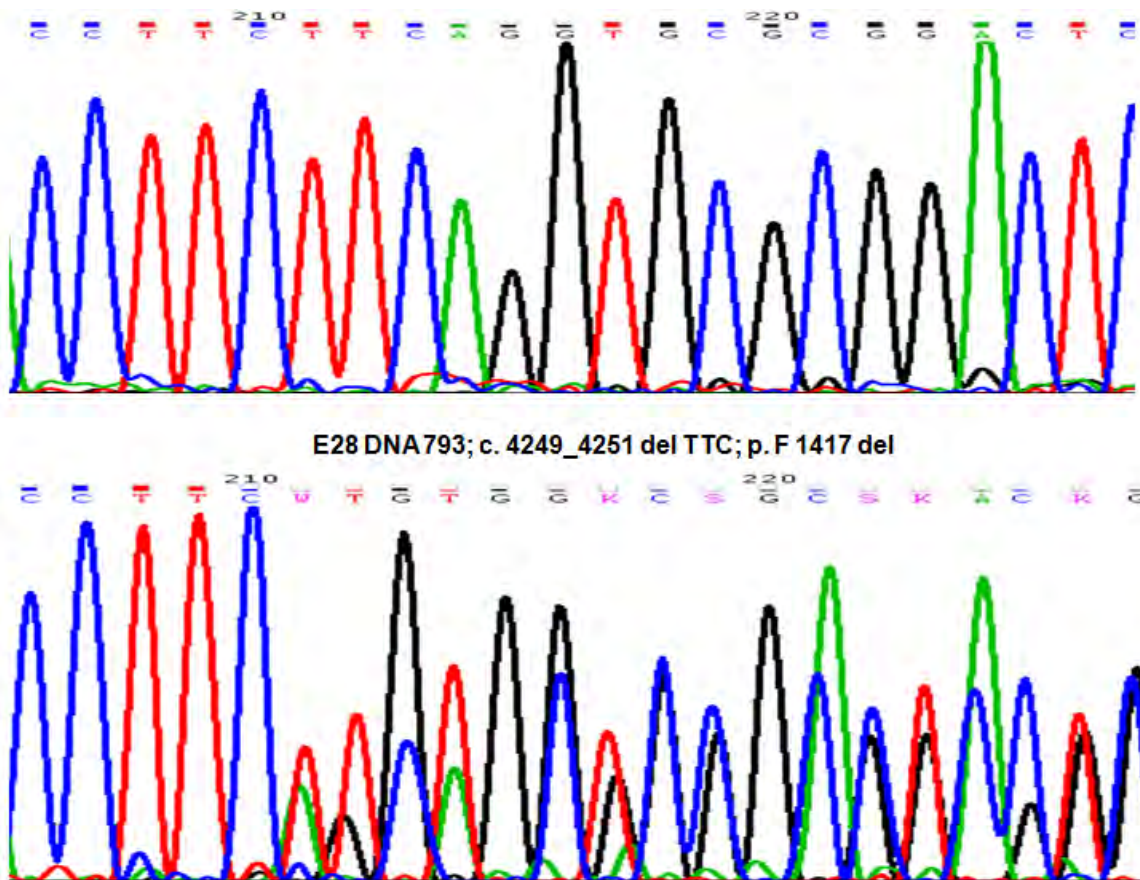


Figura 20. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del pacientes DNA 793 en el exón 28. Panel superior: control. Panel inferior secuencia paciente DNA 793. Se muestra una mutación heterocigota en el exón 28 del gen *ABCA4* donde hay solapamiento de secuencias. Se determina una delección de 3 pb c. 4249\_4251 del TTC (c. 4249\_4251 del TTC) que donde se deleciona p. F1417 del de la proteína Rim. Hermana con la misma mutación.

## ANÁLISIS DE SECUENCIACION NUCLEOTIDICA DE CASOS ESPORÁDICOS

### CASO ESPORÁDICO 1 (PACIENTE 279)

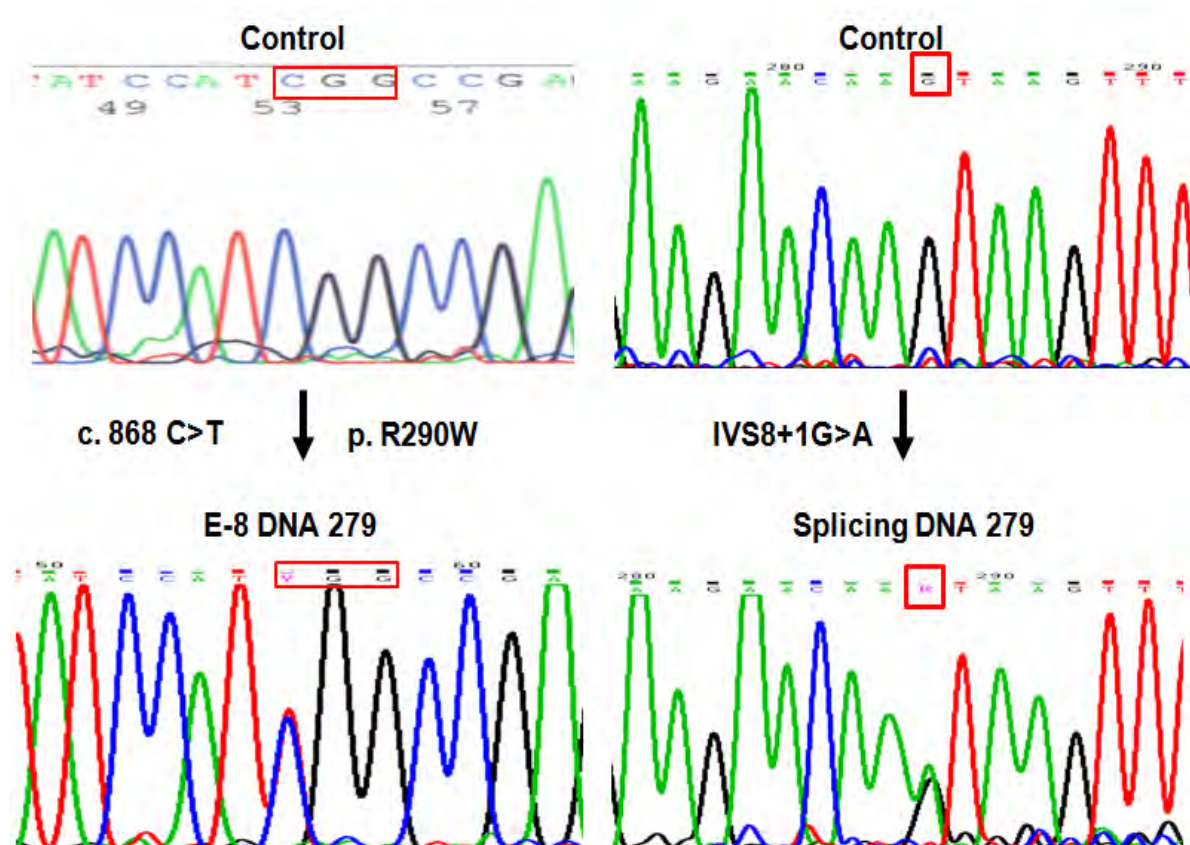


Figura 21. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 279 en el exón 8 (derecha) y la unión exón-intrón 8. Panel superiores: DNA control; panel inferior: DNA 279 exones 8 y unión exón-intrón 8. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 8 y unión exón-intrón 8 *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 8 se sustituye una citosina (C) por Timina (T) en el nucleótido 868 (c. 868 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a Triptofano (W) en el aminoácido 290 (p. R290W) de la proteína Rim. En la unión exón-intrón 8 se sustituye una Guanina (G) por una Timina (T) en la posición 1 del splicing (IVS8+1G>A), que produce un desplazamiento del marco de lectura. Las dos mutaciones identificadas originan heterocigocidad compuesta. Padres no disponibles.

## CASO ESPORÁDICO 2 (PACIENTE 289)

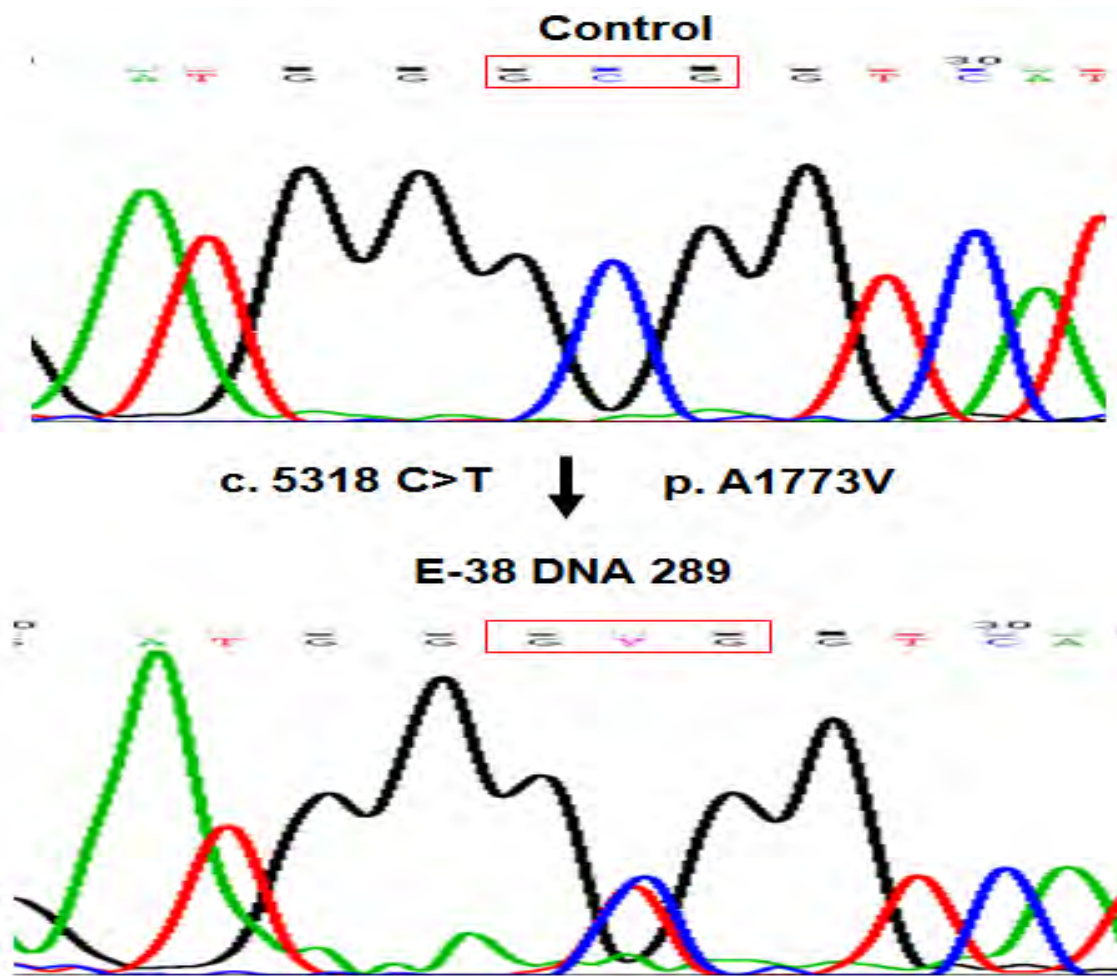


Figura 22. Secuencia nucleotídica parcial del gen ABCA4 en DNA del paciente DNA 289 en el exón 38. Panel superior DNA control; panel inferior: DNA 289. Se muestra una mutación puntual heterocigota en el exón 38 del gen ABCA4 que sustituye una Citosina (C) por una Timina (T) en el nucleótido 5318 (c. 5318 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Alanina (A) a Valina (V) en el aminoácido 1773 (p. A1773V) de la proteína Rim. Se confirma la madre portadora para la mutación. Padre sano para este cambio.

### CASO ESPORÁDICO 3 (PACIENTE 1014)

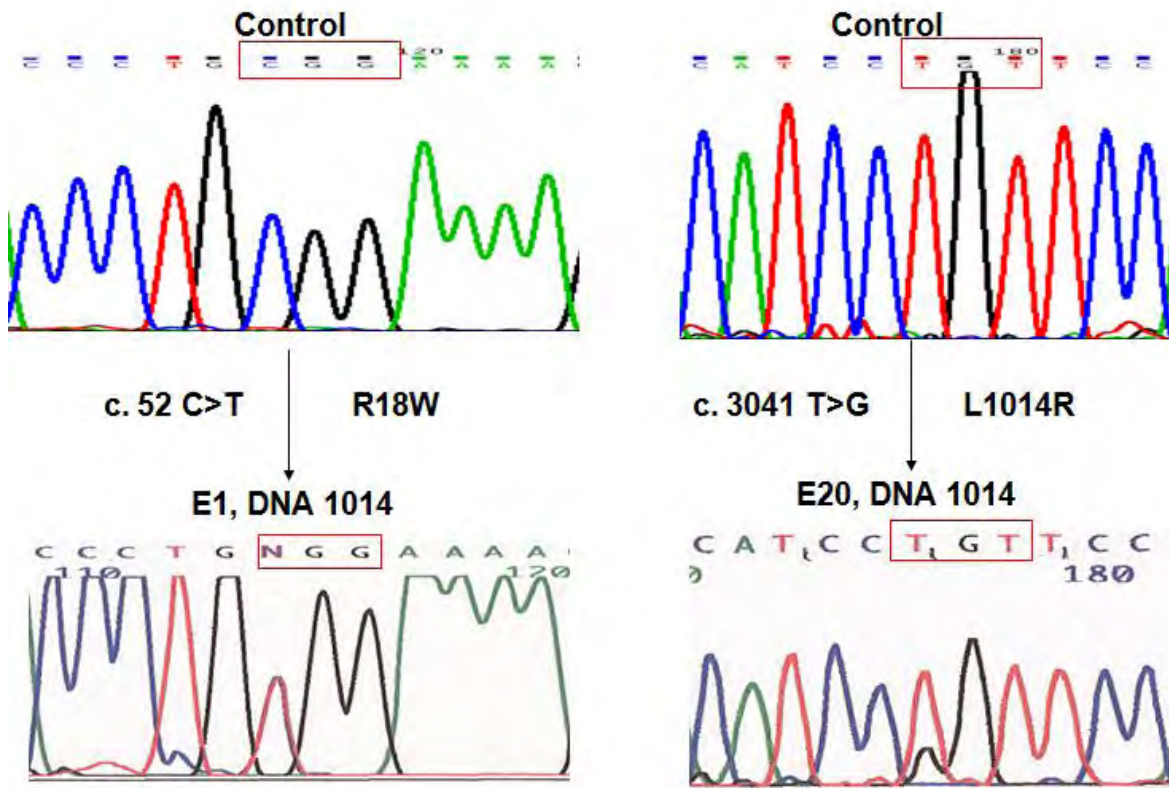


Figura 23. Secuencia nucleotídica parcial del gen ABCA4 en DNA del paciente DNA 1014 en los exones 1 y 20. Panel superiores: DNA control; panel inferior: DNA 1014 exones 1 y 20. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 1 y 20 del gen ABCA4; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 1 se sustituye una citosina (C) por Timina (T) en el nucleótido 52 (c. 52 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a Triptofano (W) en el aminoácido 18 (p. R18W) de la proteína Rim. En el exón 20 se sustituye una Timina(T) por una Guanina (G) en el nucleótido 30141 (c. 3041 T>G), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Leucina (L) a Arginina (R) en el aminoácido 1014 (p. L1014R) de la proteína Rim. No se muestra en la figura la mutación heterocigota c. 6764 G>T (S2255I) en el exón 49. Mutaciones en el exones 1 y 49 se presentaron en el padre. La madre no fue portadora para ninguna de las mutaciones. Proponemos la mutación del exón 20 como “*de novo*”.



## CASO ESPORÁDICO 4 (PACIENTE 1015)

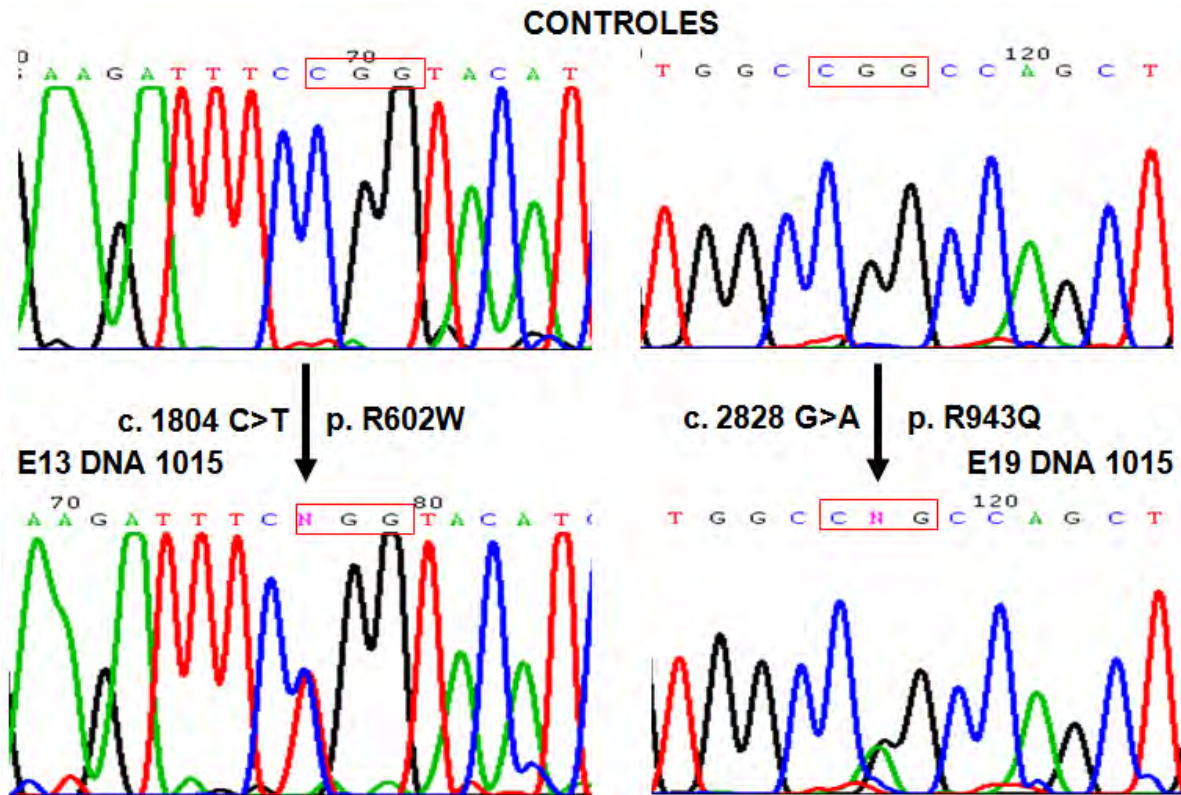


Figura 24. Secuencia nucleotídica parcial del gen ABCA4 en DNA del paciente DNA 1015 en los exones 13 y 19. Panel superiores: DNA control; panel inferior: DNA 1015 exones 13 y 19. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 13 y 19 del gen ABCA4; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 13 se sustituye una citosina (C) por Timina (T) en el nucleótido 1804 (c. 1804 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a Triptofano (W) en el aminoácido 602 (p. R602W) de la proteína Rim. En el exón 19 se sustituye una Guanina (G) por una Adenina (A) en el nucleótido 2828 (c. 2828 G>A), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a Glutamina (Q) en el aminoácido 943 (p. R943Q) de la proteína Rim. No se agrega en la figura la mutación heterocigota c. 2453 G>A (G818E) en el exón 16. Tampoco se muestran los estados portadores de los padres (padre portador de mutaciones en exones 13 y 19; madre portadora de la mutación en el exón 16).

## CASO AISLADO 5 (PACIENTE 1128)

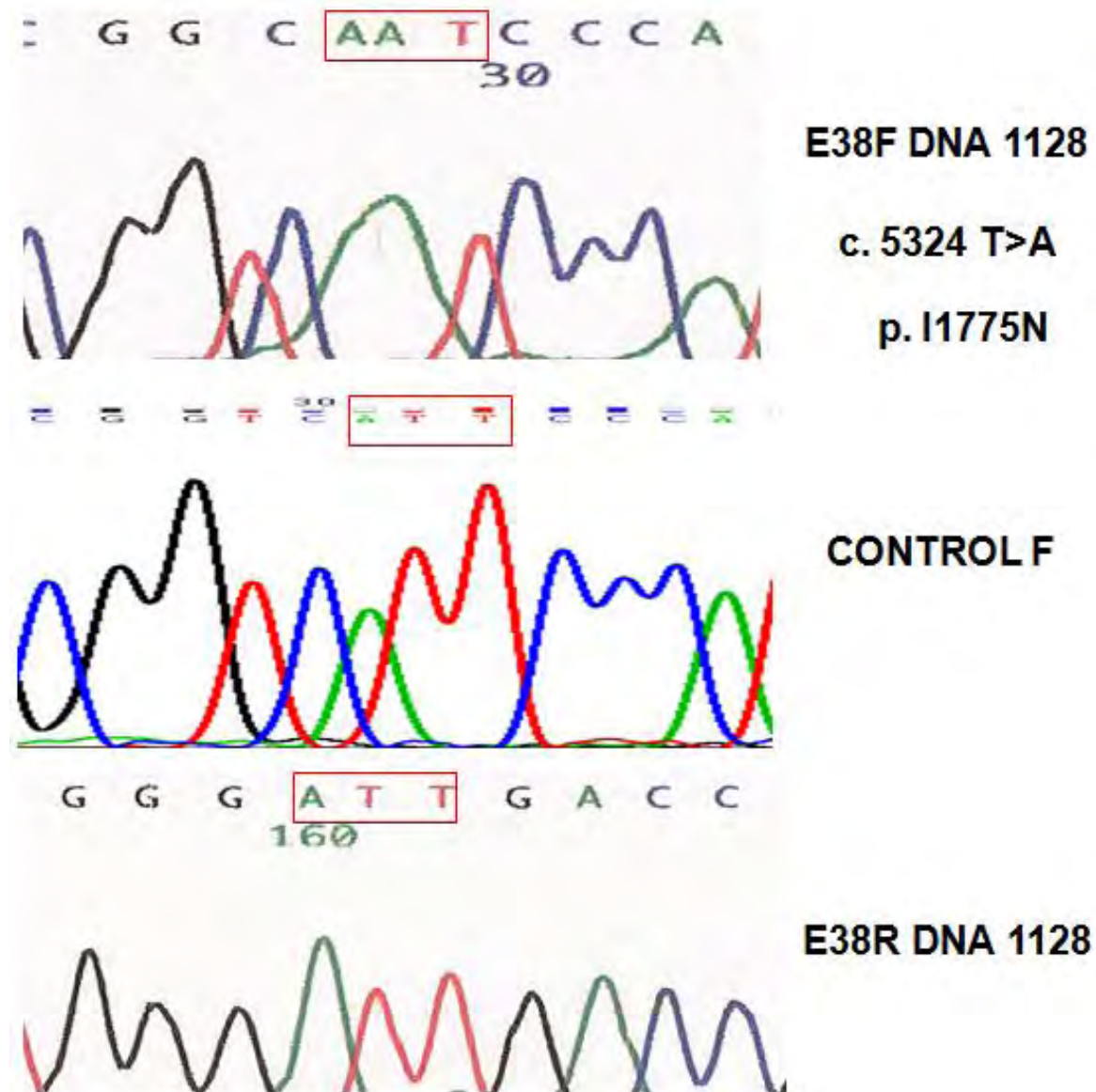


Figura 25. Secuencia nucleotídica parcial del gen ABCA4 en DNA del paciente DNA 1128 en el exón 38. Panel superior e inferior DNA 1128 exón 38. Panel medio: control. En panel superior secuencia forward (F) de DNA 1128 mostrando la mutación puntual homocigota donde hay un cambio de Timina (T) a Adenina (A) en el nucleótido 5324 (c. 5324 T>A); dicha mutación causa una mutación de sentido equivocado de Isoleucina (I) a Asparagina (N) en el aminoácido 1775 (p. I1775N) de la proteína Rim. Panel inferior secuencia reverse (R) del paciente DNA 1128 mostrando la misma mutación en sentido reverse. Padres son portadores para dicha mutación (no mostrado en esta figura).

### CASO AISLADO 6 (PACIENTE 1173)

No se determinaron mutaciones patogénicas en el gen *ABCA4*.

### CASO AISLADO 7 (PACIENTE 1963)

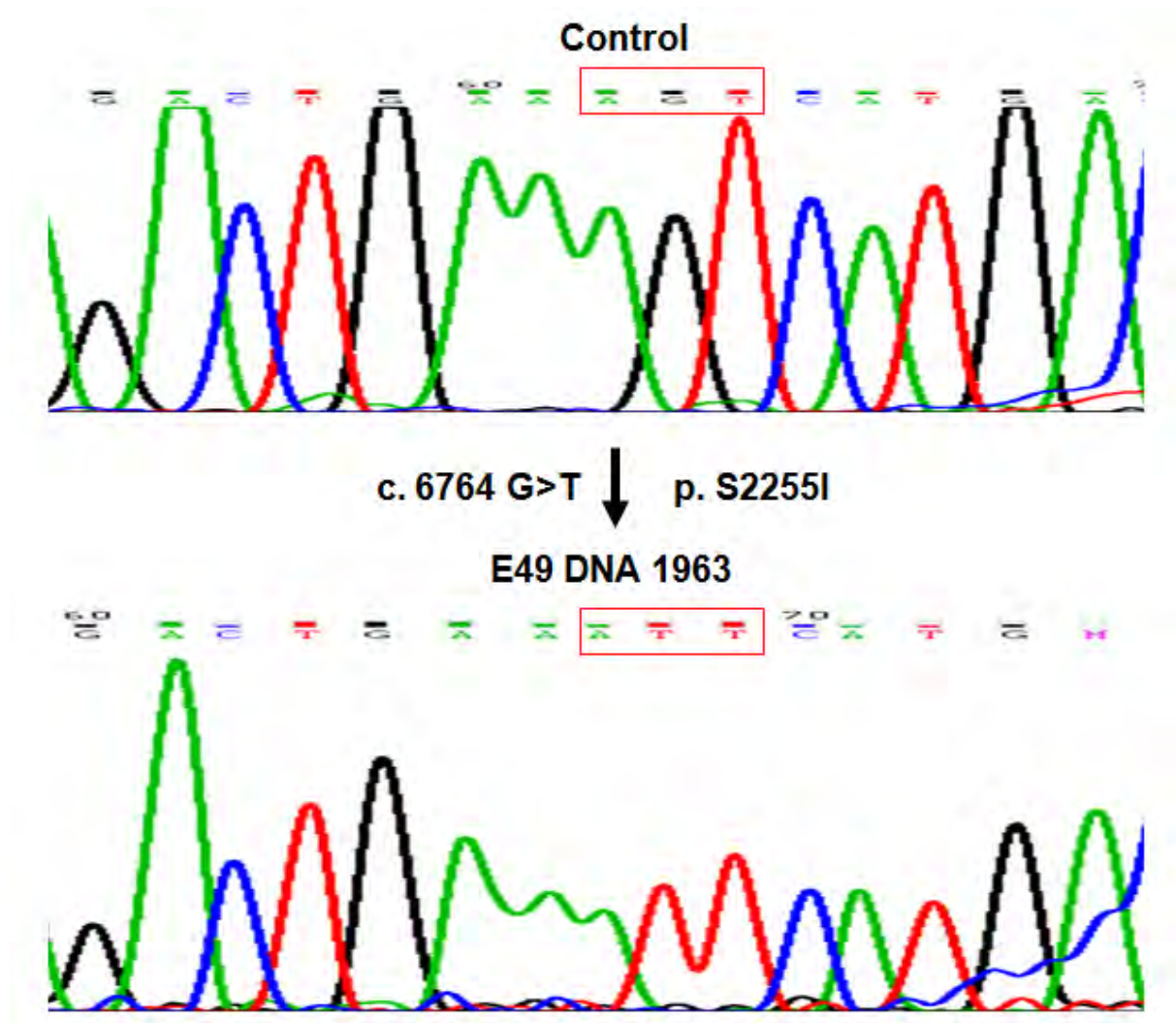


Figura 26. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 1963 en el exón 49. Panel superior DNA control; panel inferior: paciente DNA 289. Se muestra una mutación puntual homocigota en el exón 49 del gen *ABCA4* que sustituye una Guanina (G) por una Timina (T) en el nucleótido 6764 (c. 6764 G>A), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Serina (S) a Isoleucina (I) en el aminoácido 2255 (p. S2255I) de la proteína Rim. Padres finados.



## CASO AISLADO 8 (PACIENTE 1388)

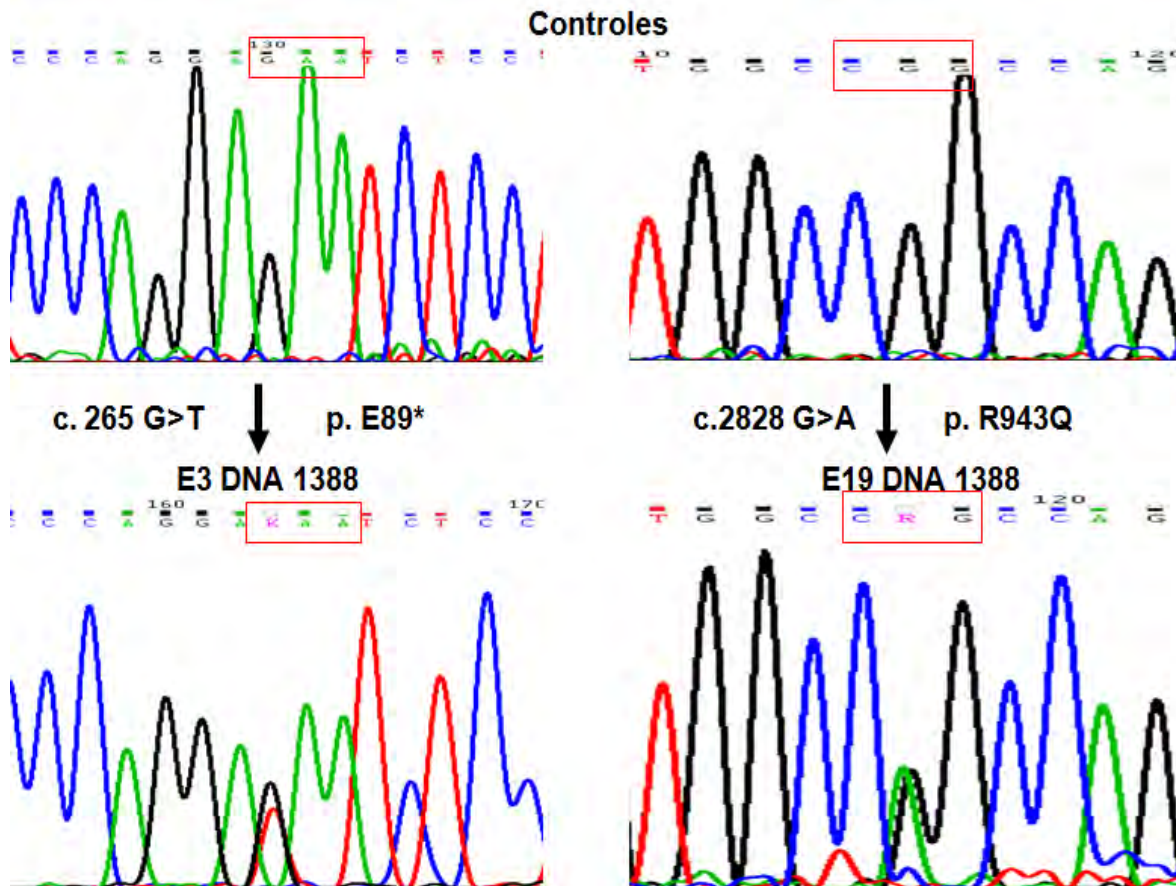


Figura 27. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente 1388 en los exones 3 y 19. Panel superiores: DNA control; panel inferior: DNA 1388 exones 13 y 19. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 3 y 19 del gen *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 3 se sustituye una guanina (G) por timina (T) en el nucleótido 265 (c. 265 G>T), lo que produce una mutación sin sentido en el aminoácido 89 (p. 89\*) de la proteína Rim. En el exón 19 se sustituye una Guanina (G) por una Adenina (A) en el nucleótido 2828 (c. 2828 G>A), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a Glutamina (Q) en el aminoácido 943 (p. R943Q) de la proteína Rim. No se agrega en la figura la mutación homocigota c. 5603 A>T (N1868I). Padres no disponibles.

## CASO AISLADO 9 (PACIENTE 2090)

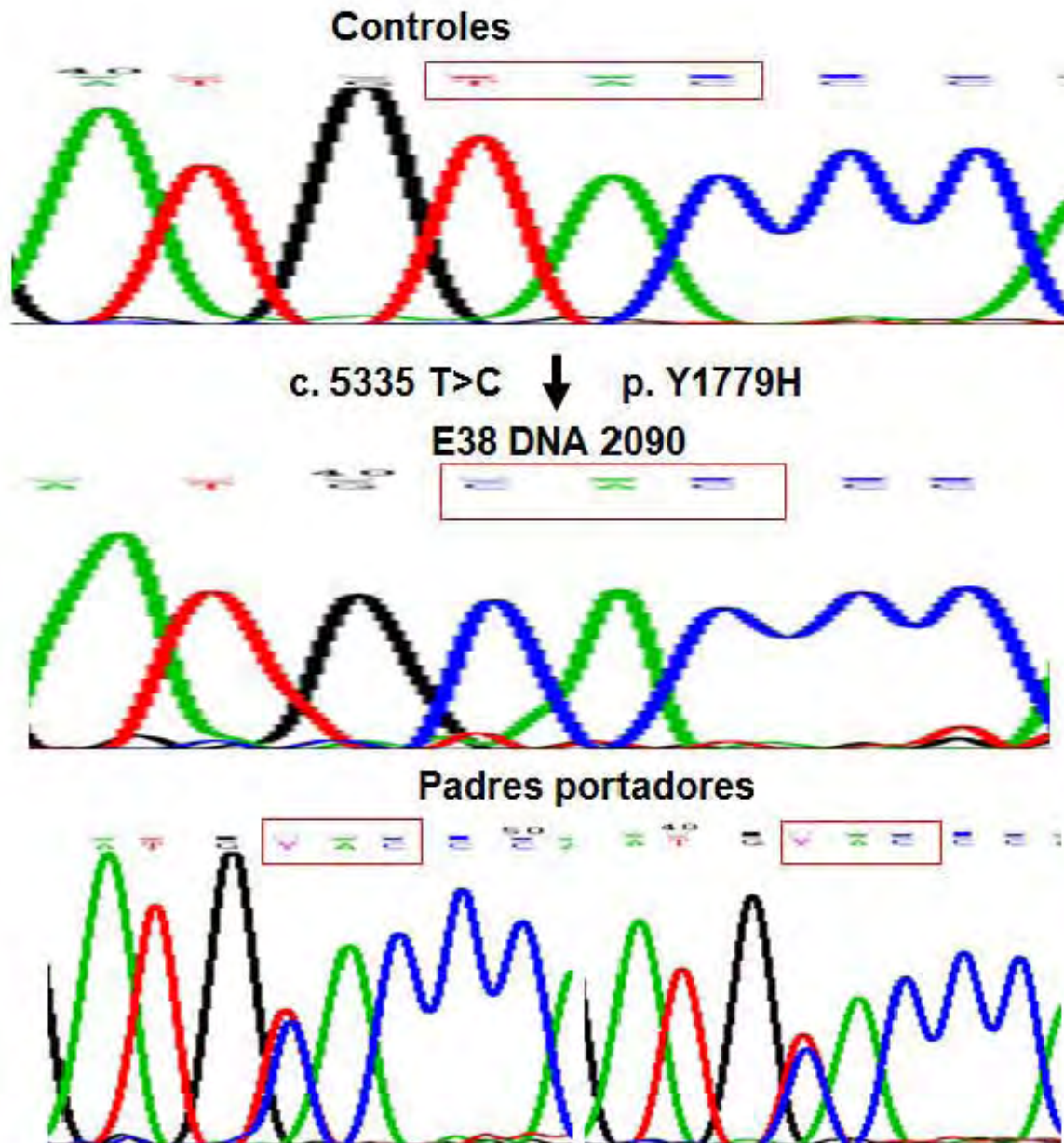


Figura 28. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 2090 en el exón 38. Panel superior DNA control; panel medio: paciente DNA 289; panel inferior: padres portadores. Se muestra una mutación puntual homocigota en el exón 38 del gen *ABCA4* que sustituye una Timina (T) por una Citosina (C) en el nucleótido 5335 (c. 5335 T>C), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Tirosina (Y) a histidina (H) en el aminoácido 1779 (p. Y1779H) de la proteína Rim.

## CASO AISLADO 10 (PACIENTE 2008)

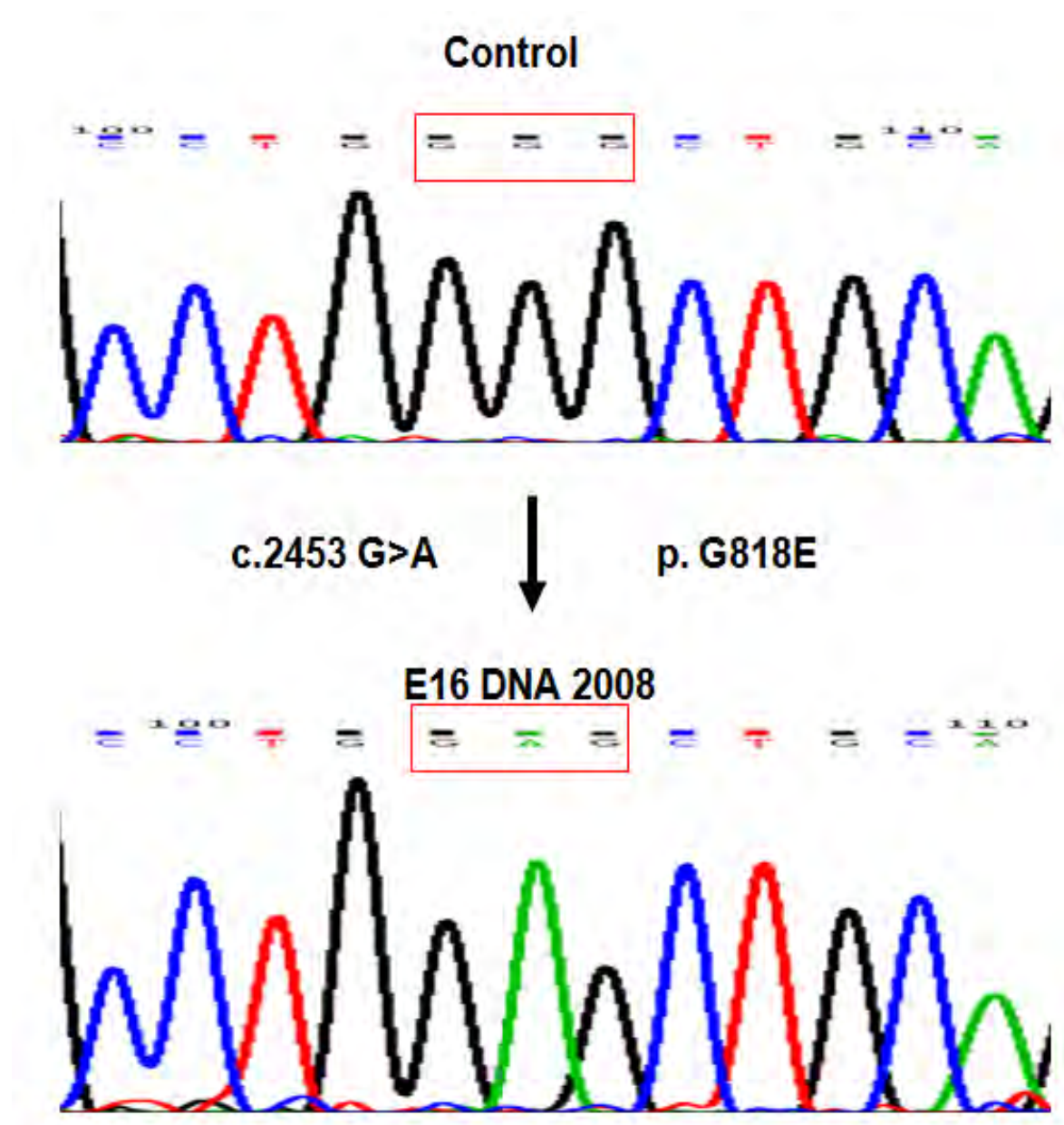


Figura 29. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 2008 en el exón 16. Panel superior DNA control; panel inferior: paciente DNA 2008. Se muestra una mutación puntual homocigota en el exón 16 del gen *ABCA4* que sustituye una Guanina (G) por una Adenina (A) en el nucleótido 2453 (c. 2453 G>A), lo que produce una mutación de sentido equivocado de glicina (G) a ácido glutámico (E) en el aminoácido 818 (p. G818E) de la proteína Rim.



## CASO AISLADO 11 (PACIENTE 1967)

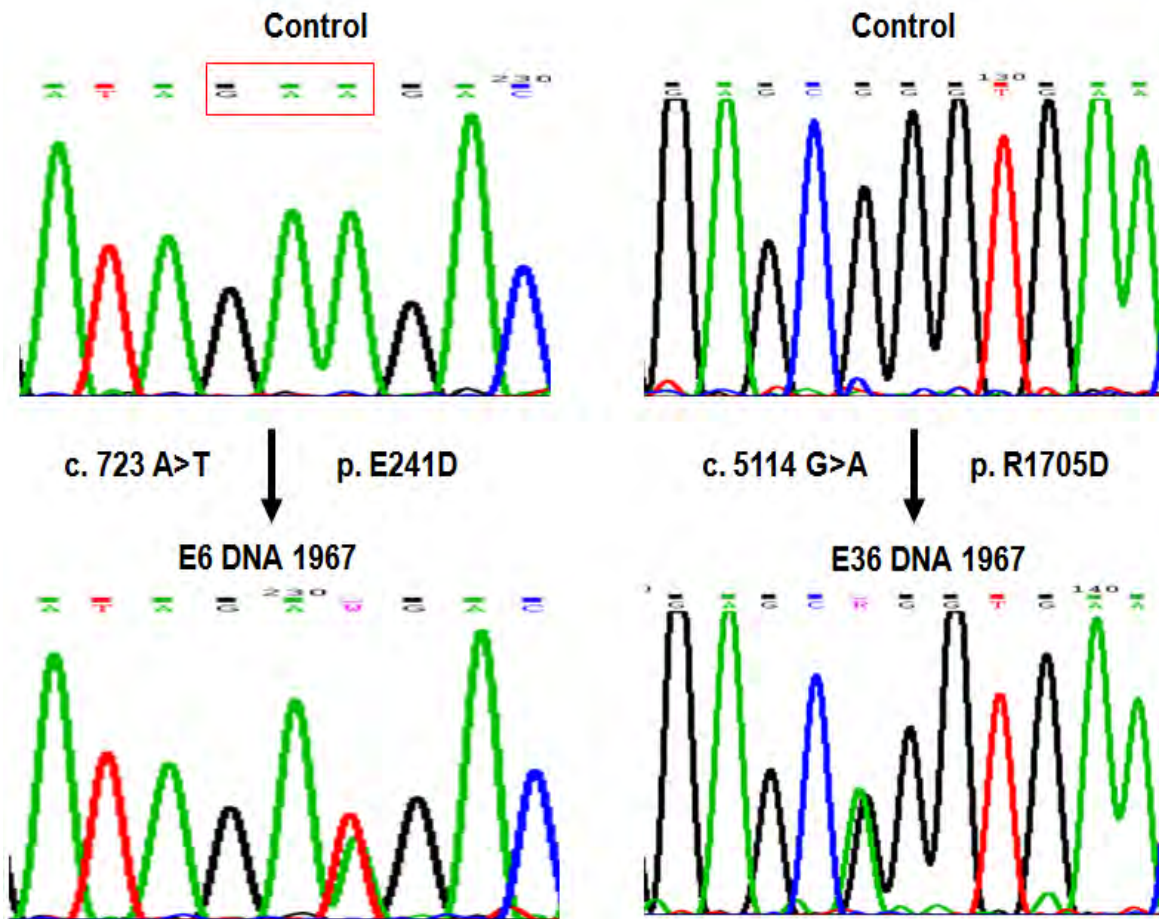


Figura 30. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente 1967 en los exones 6 y 36. Panel superiores: DNA control; panel inferior: DNA 1388 exones 13 y 19. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 6 y 36 del gen *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 6 se sustituye una adenina (A) por timina (T) en el nucleótido 723 (c. 723 A>T), lo que produce una mutación de sentido alterado que cambia un ácido glutámico (E) por un ácido aspártico (D) en el aminoácido 241 (p. E241D) de la proteína Rim. En el exón 36 se sustituye una Guanina (G) por una Adenina (A) en el nucleótido 5114 (c. 5114 G>A), lo que produce una mutación de sentido equivocado de Arginina (R) a ácido aspártico (D) en el aminoácido 1705 (p. R1705D) de la proteína Rim. Ambos padres fueron portadores (padre, mutación en el exón 6; madre, mutación en el exón 36).

CASO AISLADO 12 (PACIENTE 2310)

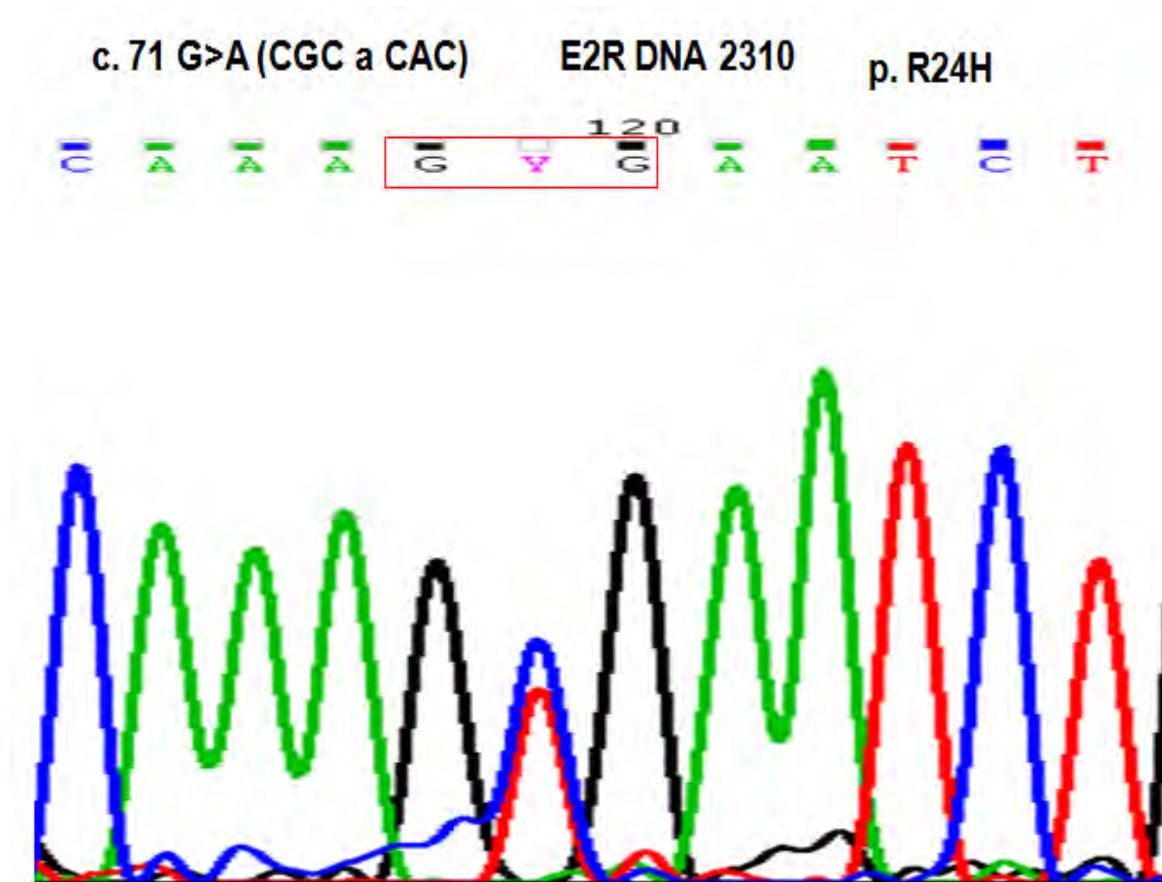


Figura 31. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 2310 en el exón 2. Se muestra una mutación puntual heterocigota en el exón 2 del gen *ABCA4* que sustituye una Guanina (G) por una Adenina (A) en el nucléotido 71 (c. 71 G>A), lo que produce una mutación de sentido equivocado de arginina (R) a ácido histidina (H) en el aminoácido 24 (p. R24H) de la proteína Rim.



### CASO AISLADO 13 (PACIENTE 1777)

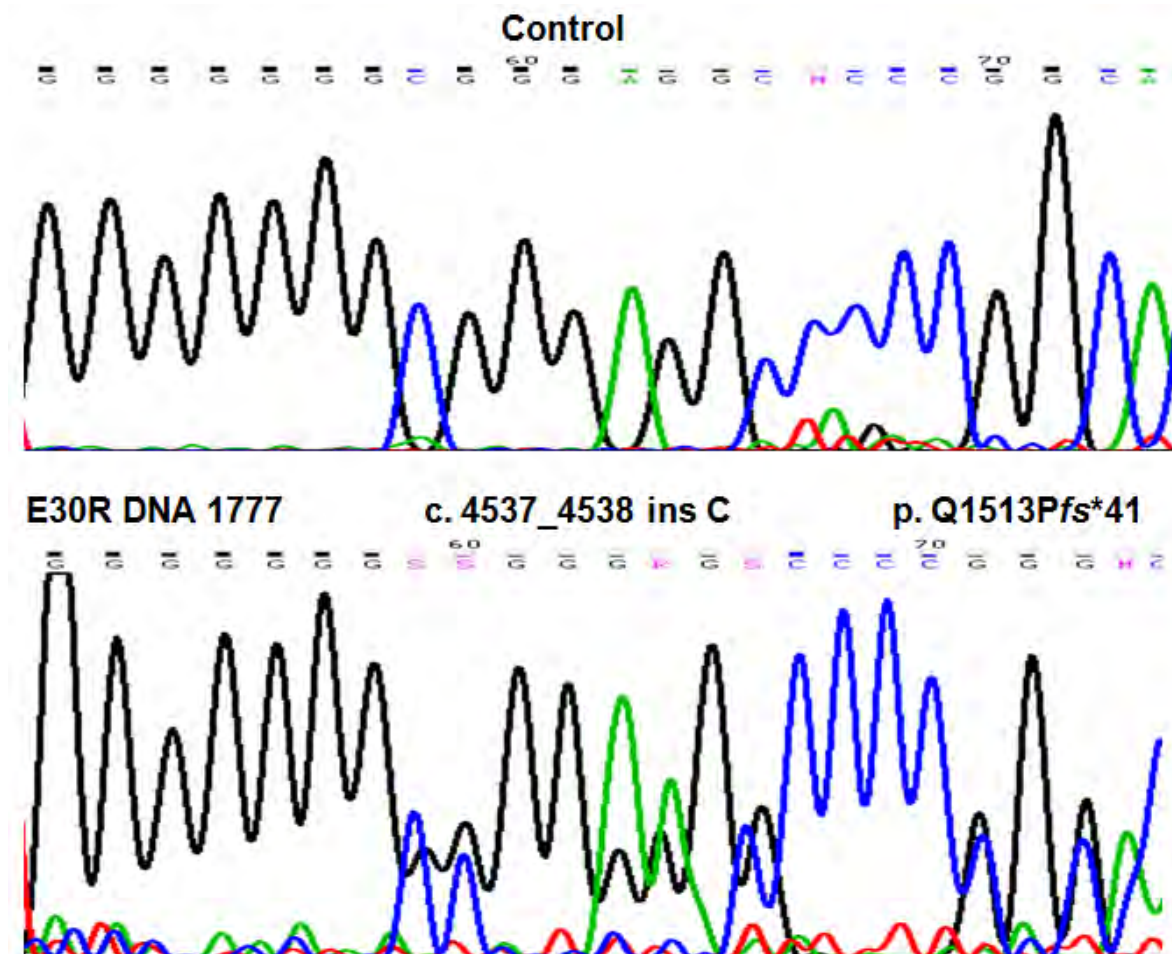


Figura 32. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 1777 en el exón 30. Panel superior: control (reverse). Panel inferior secuencia paciente DNA 1777 (reverse). Se muestra una mutación heterocigota en el exón 30 del gen *ABCA4* donde hay sobreposición de secuencias. Se determina la inserción de 1 pb c. 4537\_4538 ins C que produce una proteína truncada 41 codones río abajo (p. Q1513Pfs\*41).

## CASO AISLADO 14 (PACIENTE 2367)

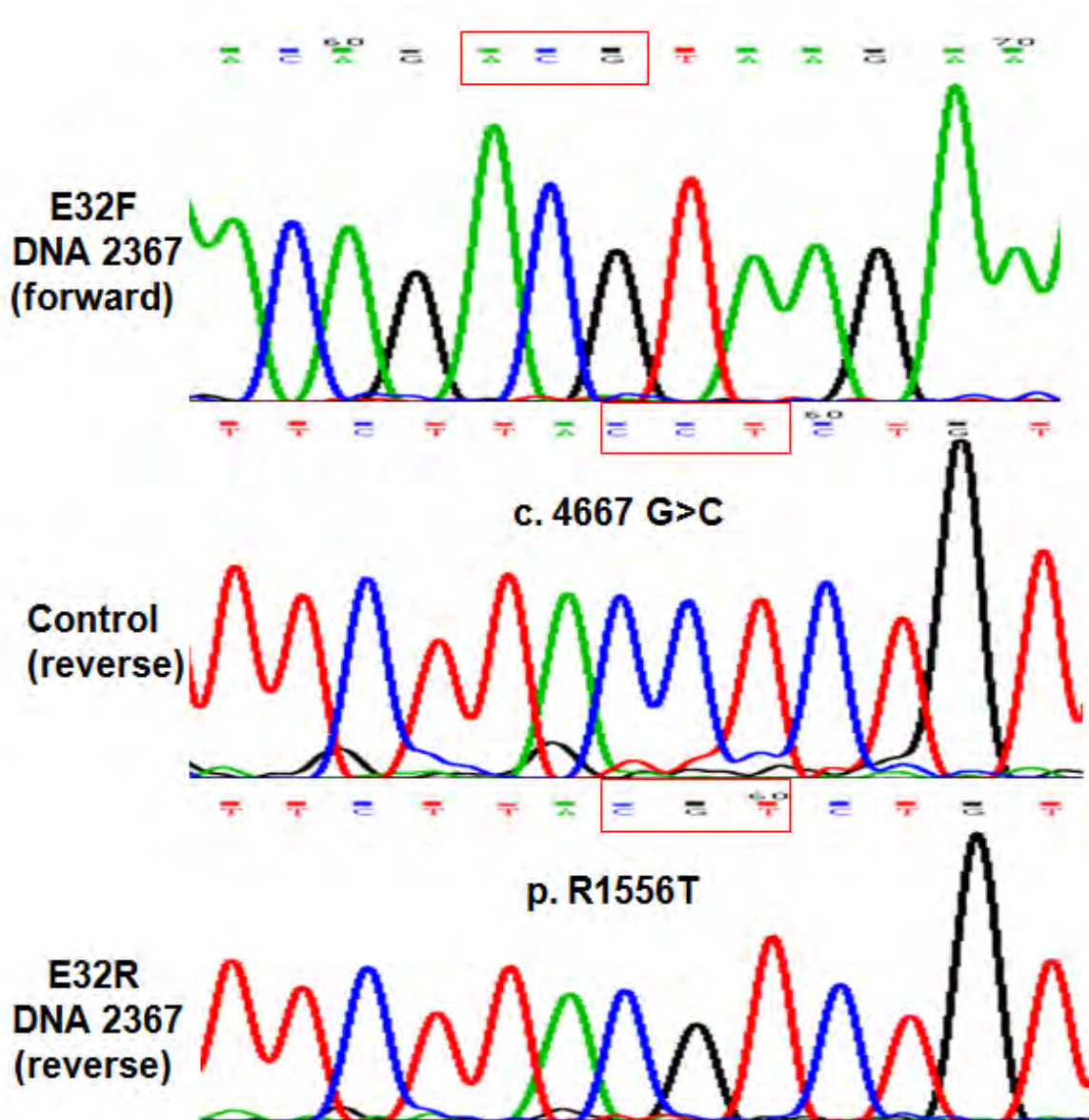


Figura 33. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 2367 en el exón 32. Panel superior e inferior DNA paciente, secuencias forward (F) y reverse (R); panel del medio: control (reverse). En los paneles superior e inferior se muestran una mutación puntual homocigota en el exón 32 del gen *ABCA4* que sustituye una guanina (G) por una citosina (C) en el nucleótido 4667 (c. 4667 G>C), lo que produce una mutación de sentido equivocado de arginina (R) a ácido treonina (T) en el aminoácido 1556 (p. R1556T) de la proteína Rim.

## CASO AISLADO 15 (PACIENTE 1465)

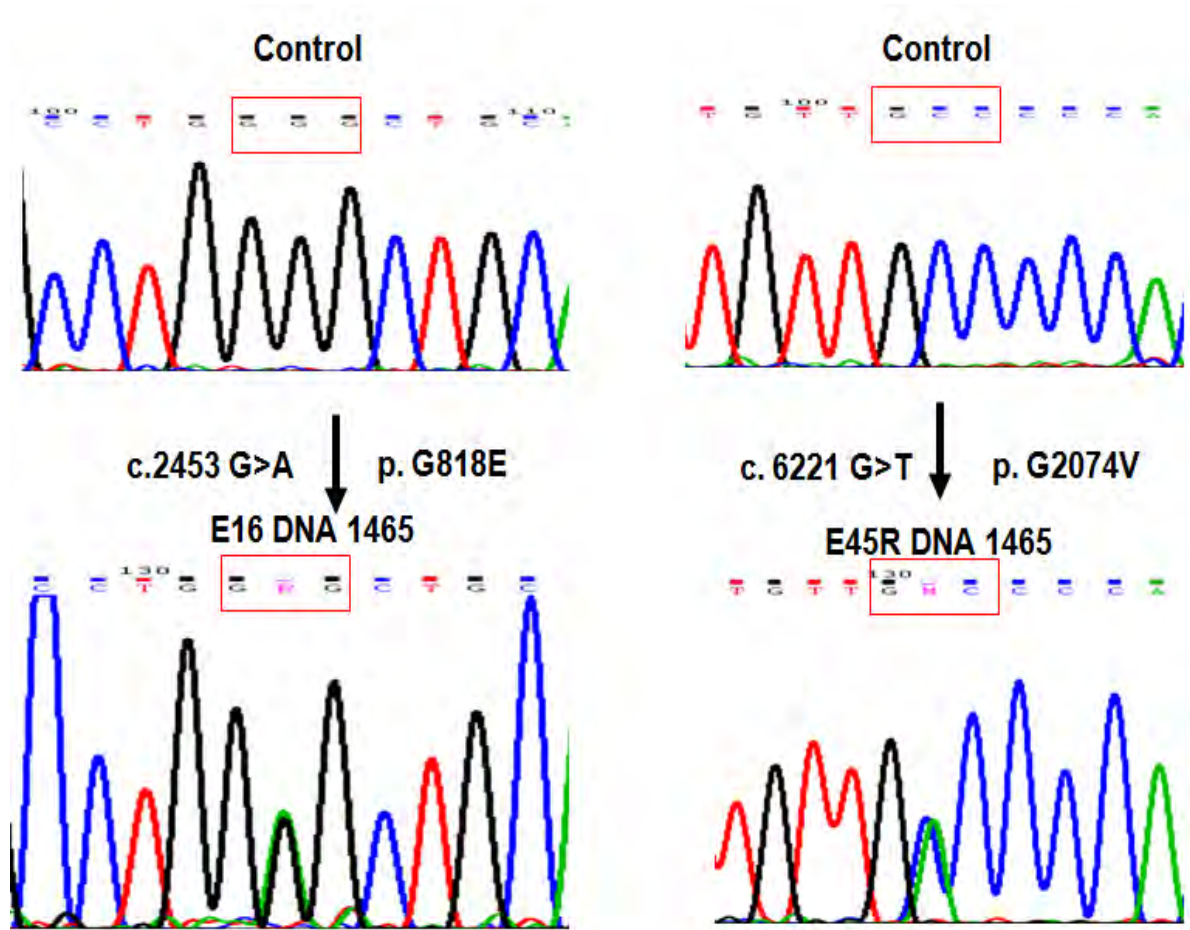


Figura 34. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente 1465 en los exones 16 y 45. Paneles superiores: DNA control; panel inferior: DNA 1465 exones 16 y 45. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 16 y 45 del gen *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 16 se sustituye una guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido 2453 (c. 2453 G>A), lo que produce una mutación de sentido alterado que cambia una glicina (G) por un ácido glutámico (E) en el aminoácido 818 (p. G818E) de la proteína Rim. En el exón 45 se sustituye una Guanina (G) por una timina (T) en el nucleótido 6221 (c. 6221 G>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de glicina (G) a valina (V) en el aminoácido 2074 (p. G2074V) de la proteína Rim.



## CASO AISLADO 16 (PACIENTE 1871)

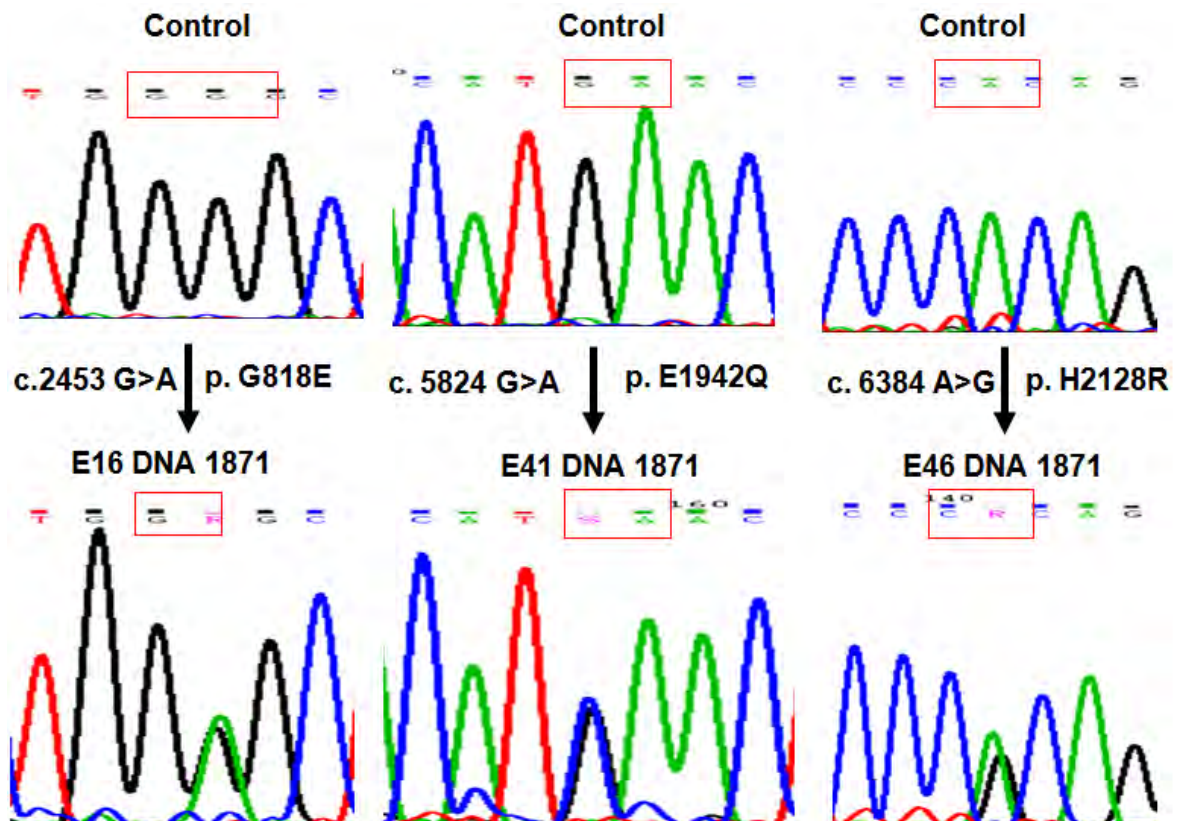


Figura 35. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente 1871 en los exones 16 y 41 y 46. Paneles superiores: DNA control; panel inferior: DNA 171 exones 16, 41 y 46. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 16, 41 y 46 del gen *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto o un alelo múltiple. En el exón 16 se sustituye una guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido 2453 (c. 2453 G>A), lo que produce una mutación de sentido alterado que cambia una glicina (G) por un ácido glutámico (E) en el aminoácido 818 (p. G818E) de la proteína Rim. En el exón 41 se sustituye una Guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido 5824 (c. 5824 G>A)), lo que produce una mutación de sentido equivocado de ácido glutámico (E) a glutamina (Q) en el aminoácido 1942 (p. E1942Q). Finalmente, en el exón 46 se sustituye una adenina (A) por una guanina (G) en el nucleótido 6384 (c. 6384 A>G) lo que produce una mutación de sentido alterado de histidina (H) a arginina (R) en el aminoácido 2128 (p. H2128R) de la proteína Rim. No se muestran secuencias de padres portadores (Padre portador para mutaciones en exones 16 y 41; madre portadora para mutación en exón 46).

## CASO AISLADO 17 (PACIENTE 1129)

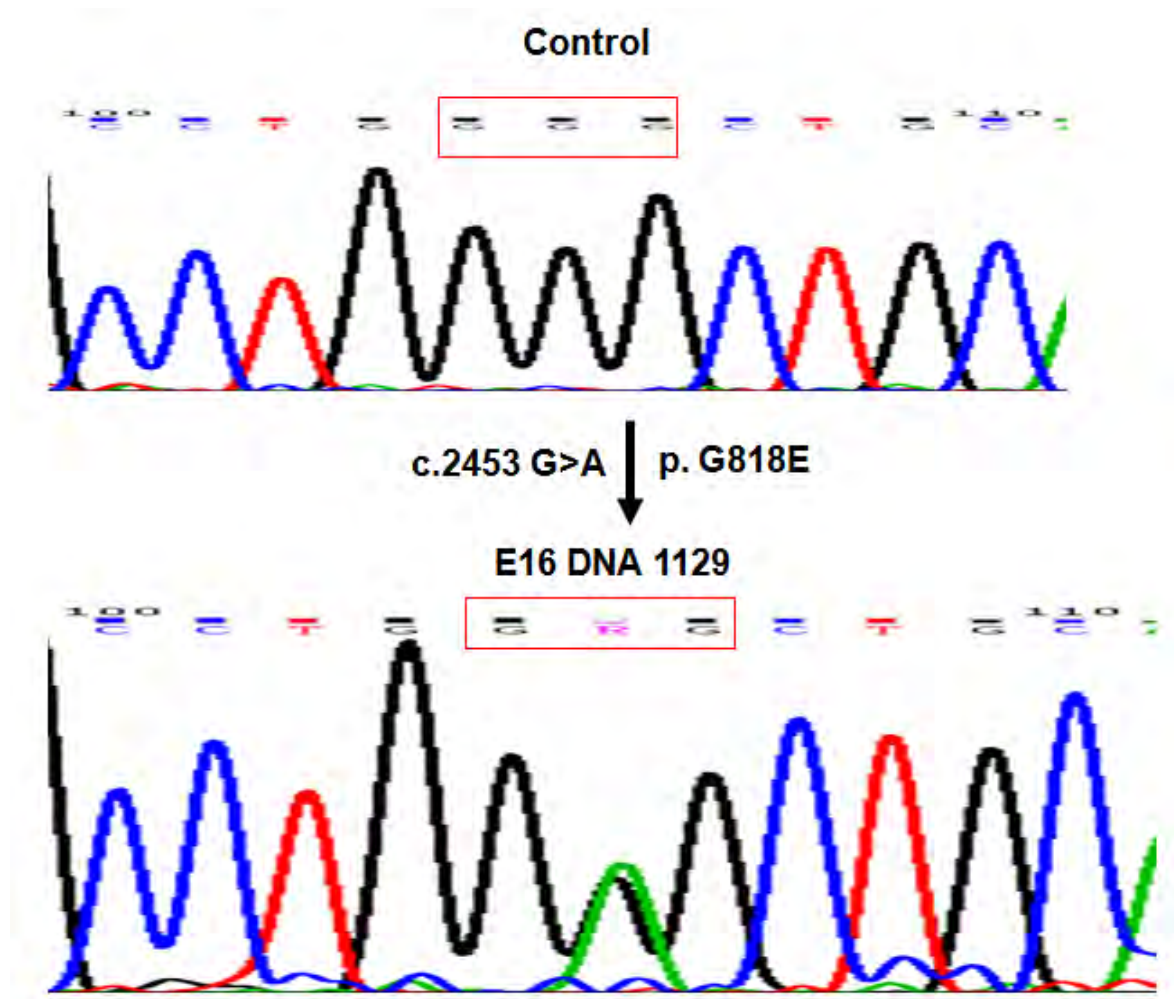


Figura 36. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 1129 en el exón 16. Panel superior: control. Panel inferior DNA paciente, secuencias forward (F). En el panel inferior se muestran una mutación puntual heterocigota en el exón 16 del gen *ABCA4* que sustituye una guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido 2453 (c. 2453 G>A), lo que produce una mutación de sentido equivocado de glicina (G) a ácido glutámico (T) en el aminoácido 818 (p. G818E) de la proteína Rim. Madre portadora de mutación. Padre sano.

## CASO AISLADO 18 (PACIENTE 825)

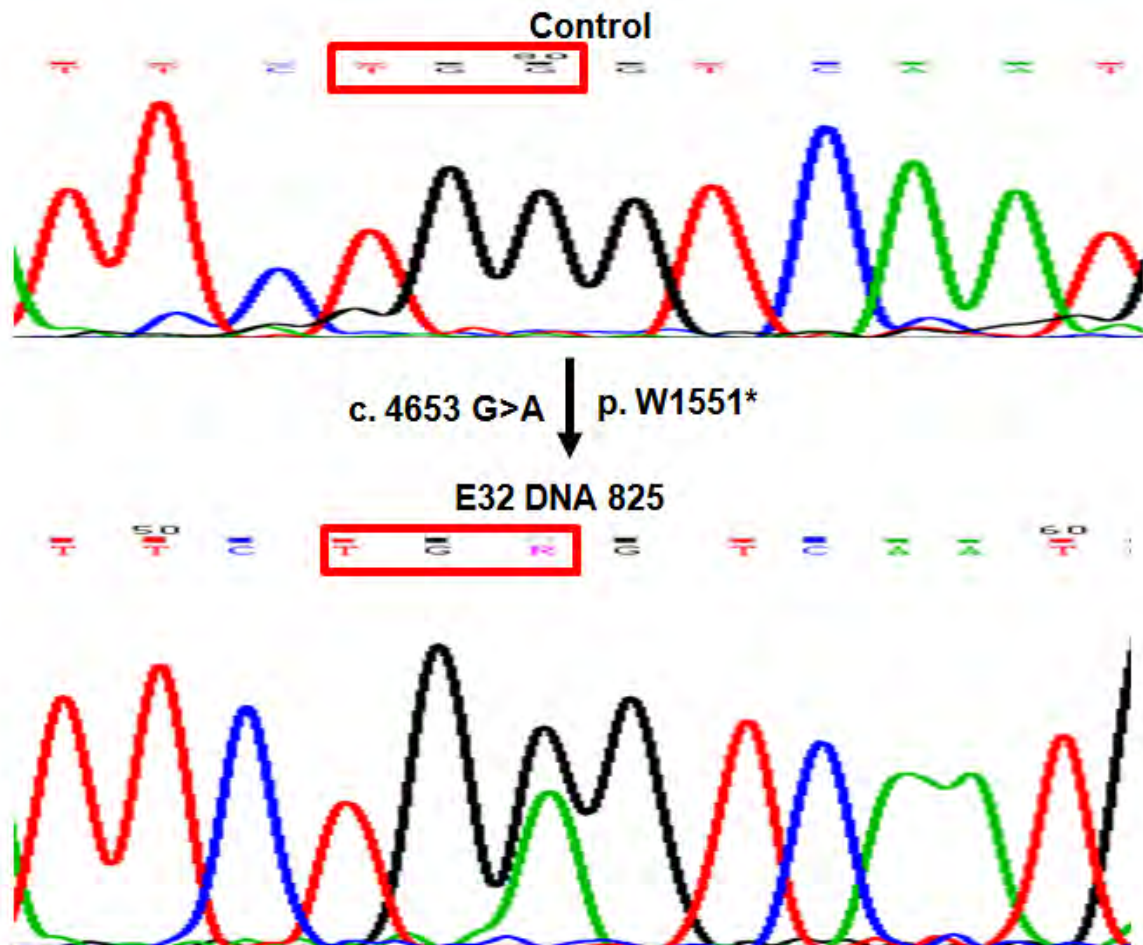


Figura 37. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 825 en el exón 32. Panel superior: control. Panel inferior DNA paciente, secuencias forward (F). En el panel inferior se muestran una mutación puntual heterocigota en el exón 32 del gen *ABCA4* que sustituye una guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido 4653 (c. 4653 G>A), lo que produce una mutación sin sentido de triptofano (W) a un codón de paro (\*) en el aminoácido 1551 (p. W1551\*) de la proteína Rim.

## CASO AISLADO 19 (PACIENTE 2636)

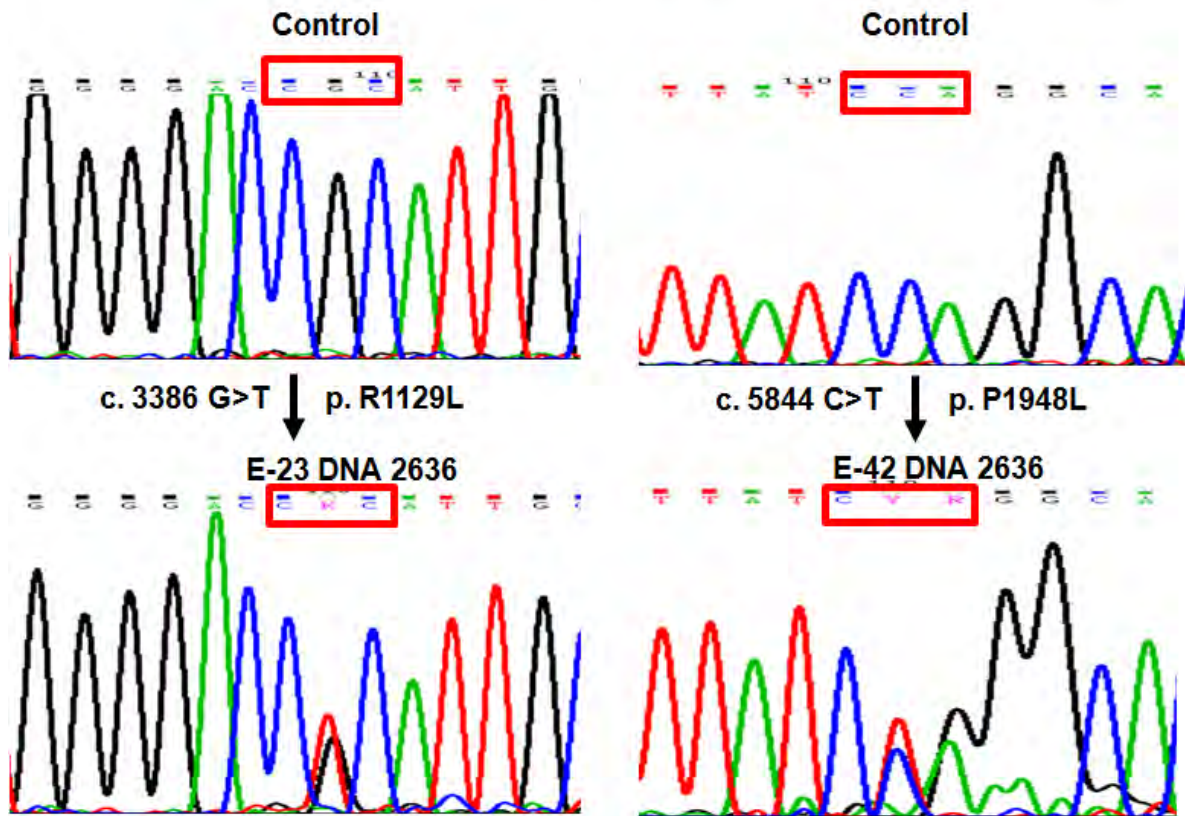


Figura 38. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente 2636 en los exones 23 y 42. Paneles superiores: DNA control; panel inferior: DNA 1465 exones 23 y 42. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 23 y 42 del gen *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 23 se sustituye una guanina (G) por una timina (T) en el nucleótido 3386 (c. 3386 G>T), lo que produce una mutación de sentido alterado que cambia una arginina (R) por un ácido leucina (L) en el aminoácido 1129 (p. R1129) de la proteína Rim. En el exón 42 se sustituye una citosina (C) por una timina (T) en el nucleótido 1948 (c. 5844 C>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de prolina (P) a leucina (L) en el aminoácido 1948 (p. P1948L) de la proteína Rim.



## CASO AISLADO 20 (PACIENTE 769)

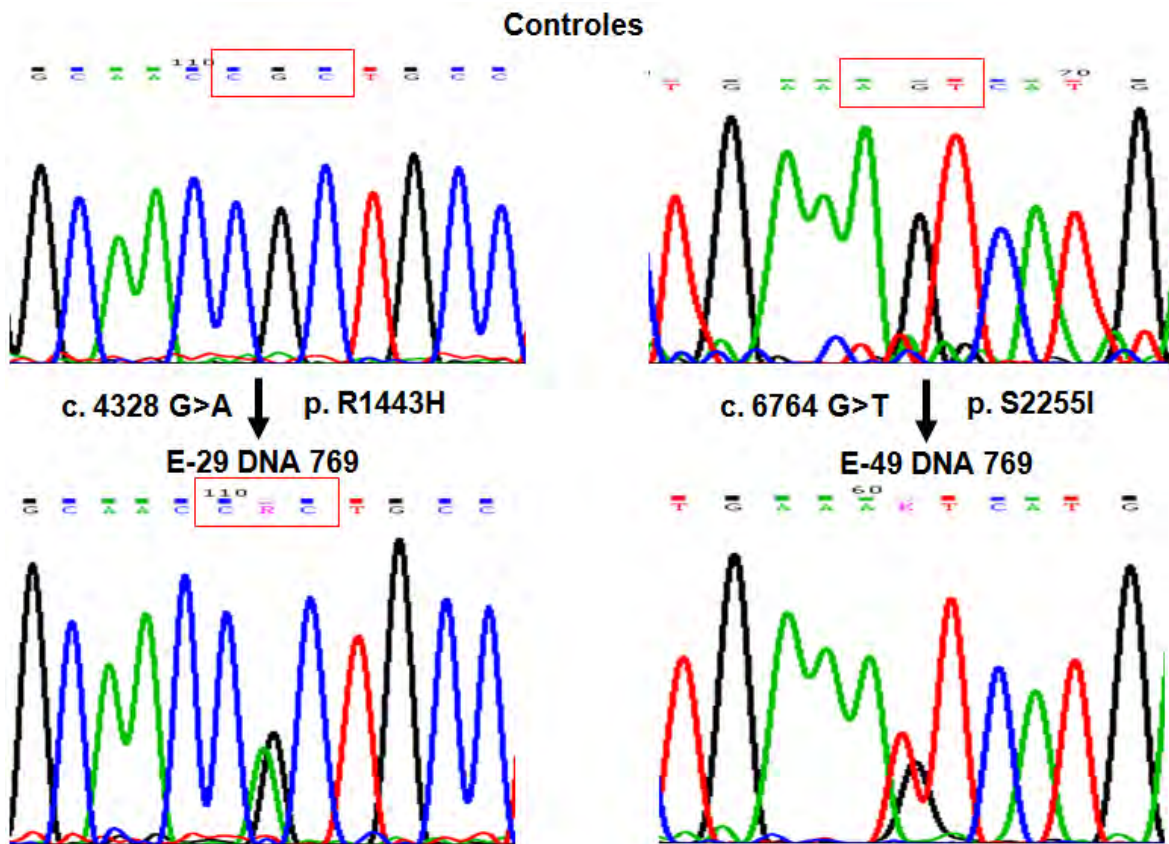


Figura 39. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente 769 en los exones 29 y 49. Panel superior: DNA control; panel inferior: DNA 1465 exones 29 y 49. Se muestra una mutación puntual heterocigota en los exones 29 y 49 del gen *ABCA4*; lo que constituye un heterocigoto compuesto. En el exón 29 se sustituye una guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido 4328 (c. 4328 G>A), lo que produce una mutación de sentido alterado que cambia una arginina (R) por un ácido histidina (H) en el aminoácido 1443(p. R1443H) de la proteína Rim. En el exón 49 se sustituye una Guanina (G) por una timina (T) en el nucleótido 6764 (c. 6764 G>T), lo que produce una mutación de sentido equivocado de serina (S) a isoleucina (I) en el aminoácido 2255 (p. S2255I) de la proteína Rim.



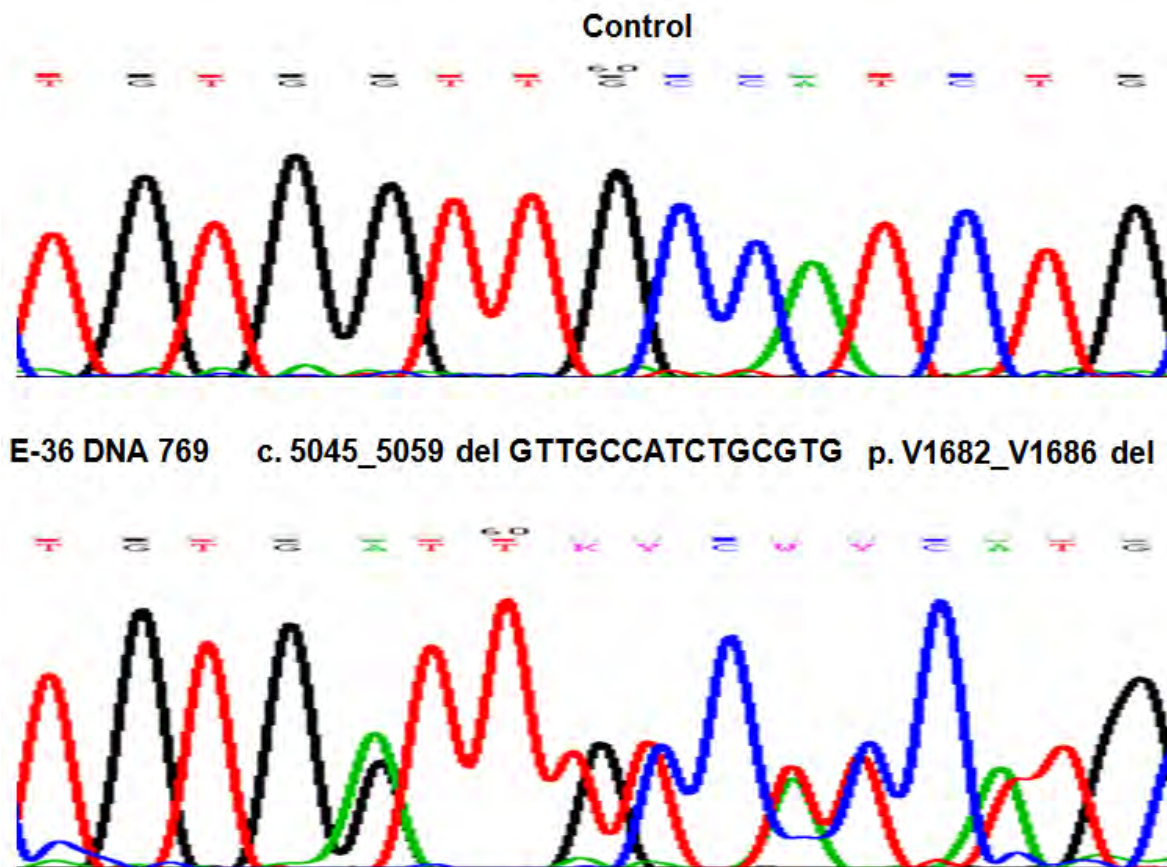


Figura 40. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 769 en el exón 36. Panel superior: control. Panel inferior secuencia paciente DNA 793. Se muestra una mutación heterocigota en el exón 36 del gen *ABCA4* donde hay sobreposición de secuencias. Se determina la delección de 15 pb c. 5045\_5059 del GTTGCCATCTGCGTG, que predice una delección p. V1682\_V1686 en la proteína Rim.

## CASO AISLADO 21 (PACIENTE 1046)

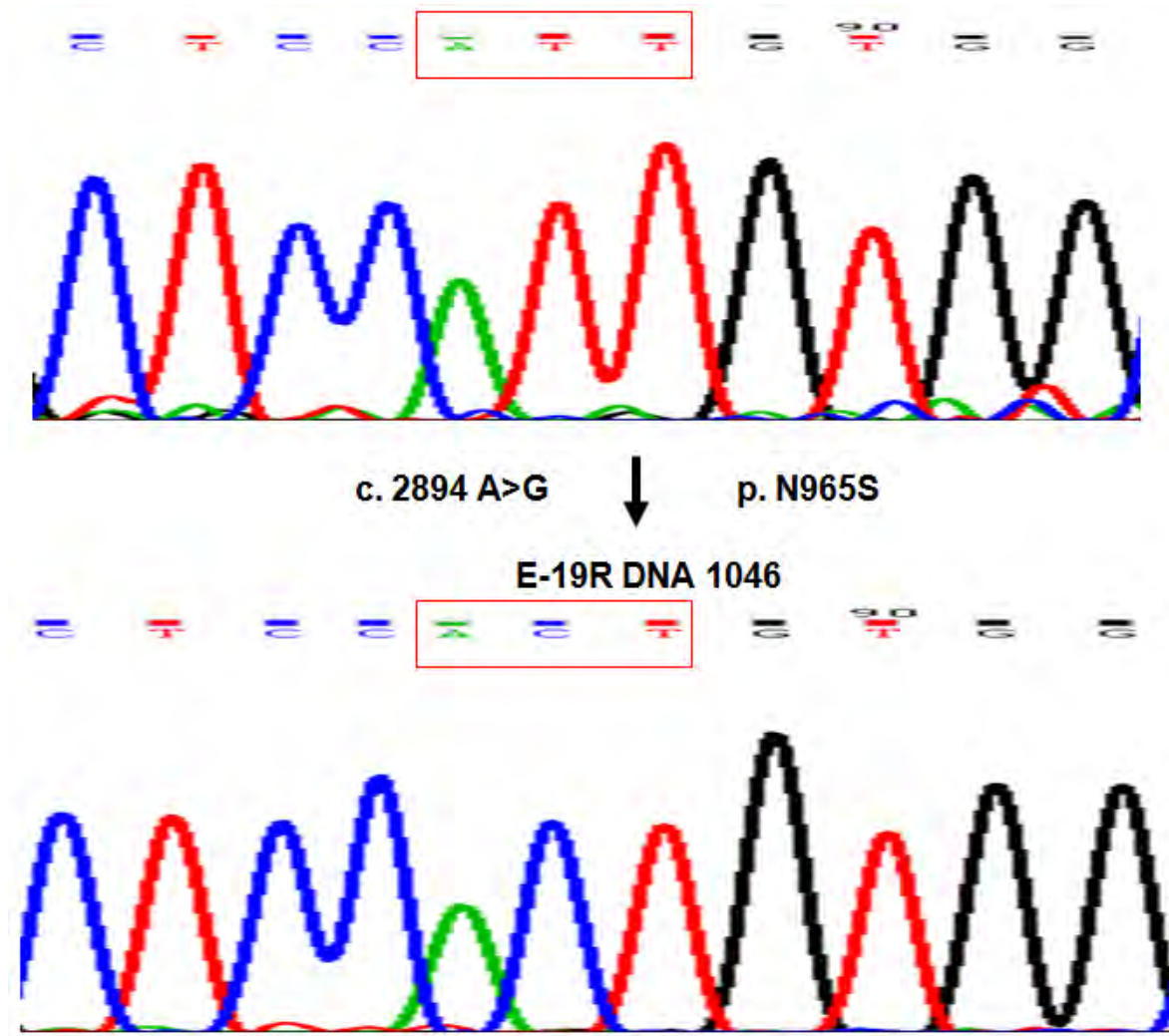


Figura 41. Secuencia nucleotídica parcial del gen *ABCA4* en DNA del paciente DNA 1046 en el exón 19. Panel superior control, secuencia reversa (R). Panel inferior: secuencia reverse de paciente DNA 1046. En el panel inferior se muestra una mutación puntual homocigota en el exón 19 del gen *ABCA4* que sustituye una adenina (A) por una guanina (G) en el nucleótido 2894 (c. 2894 A>G). Este cambio produce una mutación de sentido equivocado de asparagina (N) a serina (S) en el aminoácido 965 (p. N965S) de la proteína Rim.

Las frecuencias alélicas de las mutaciones identificadas en el gen *ABCA4* en el presente estudio de 30 pacientes con enfermedad de Stargardt se reportan en la tabla 7.

Tabla 7. Frecuencia alélica de mutaciones en el gen ABCA4 en 30 casos con enfermedad de Stargardt (en color rojo se indican los exones más afectados).

Exón	Cambio de nucleótido	Efecto en polipéptido	# de alelos
1	c. 52 C>T	p. R18W	1
2	c. 71 G>A	p. R24H	1
➔ 3	c. 265 G>T	p. E89*	1
6	c. 634 C>T	p. R212C	1
➔ 6	*c. 723 A>T	p. E241D	1
8	c. 818 C>T	p. R290W	1
➔ IVS8	*IVS8+1GA	Splice	1
13	c. 1804 C>T	p. R602W	1
16	c. 2453 G>A	p. G818E	7
19	c. 2828 G>A	p. R943Q	2
19	c. 2894 A>G	p. N965S	2
20	c. 3041 T>G	p. L1014R	1
23	c. 3386 G>T	p. R1129L	2
28	c. 4139 C>T	p. P1380L	1
➔ 28	*c. 4249_4251 del TTC	p. F1417 del	1
29	c. 4328 G>A	p. R1443H	1
➔ 30	c. 4537_4538 ins C	p. Q1513E/*41	1
➔ 32	*c. 4653 G>A	p. W1551*	1
➔ 32	*c. 4667 G>C	p. R1556T	2
➔ 36	*c. 5045_5059 del GTTGCCATCTGCGTG	p. V1682_V1686 del	1
36	c. 5114 G>A	p. R1705Q	1
38	c. 5318 C>T	p. A1773V	6
➔ 38	*c. 5324 T>A	p. I1775N	2
➔ 38	*c. 5335 T>C	p. Y1779H	2
40	c. 5503 A>T	p. N1868I	1
➔ 41	*c. 5824 G>C	p. E1942Q	1
42	c. 5844 C>T	p. P1948L	1
➔ 45	*c. 6221 G>T	p. G2074V	1
46	c. 6384 A>G	p. H2128R	1
49	c. 6764 G>T	p. S2255I	4

➔: mutaciones nuevas encontradas en este estudio).

## **CRITERIOS PARA VALIDAR UNA MUTACION DE SENTIDO EQUIVOCADO EN EL GEN *ABCA4* COMO PATOGENICA EN CASOS DE ENFERMEDAD DE STARGARDT**

- Mutación heterocigota en aquellos padres del cual se disponga material genético
- Ausencia de la mutación en 150 alelos control (75 sujetos sanos)
- Análisis predictivo del efecto sobre la proteína utilizando el programa PolyPhen (a partir de próxima página)
- Residuo altamente conservado filogenéticamente
- Aquellas mutaciones que causan nulidad (de sentido equivocado, deleciones o inserciones con desplazamiento del marco de lectura, mutaciones de splicing) de los alelos que consideraron patogénicas por sí mismas.

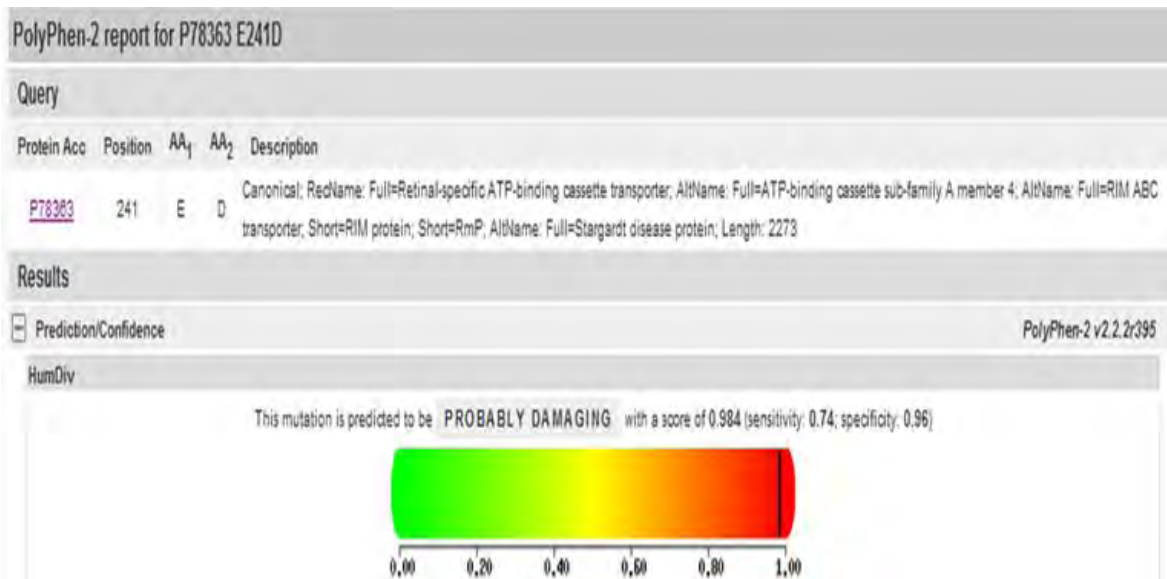
### **VALIDACION DE MUTACIONES NUEVAS**

Se identificaron 12 mutaciones nuevas (Tabla 7):

- 8 sustituciones
  - 6 que causan mutaciones de sentido equivocado
  - 2 que causan mutaciones sin sentido
- 2 deleciones (sin desplazamiento del marco de lectura)
- 1 inserción (con desplazamiento del marco de lectura)
- 1 mutación en sitio de splicing

Se identificaron 2 mutaciones en exón 32 (no se habían descrito mutaciones en este exón de *ABCA4*).

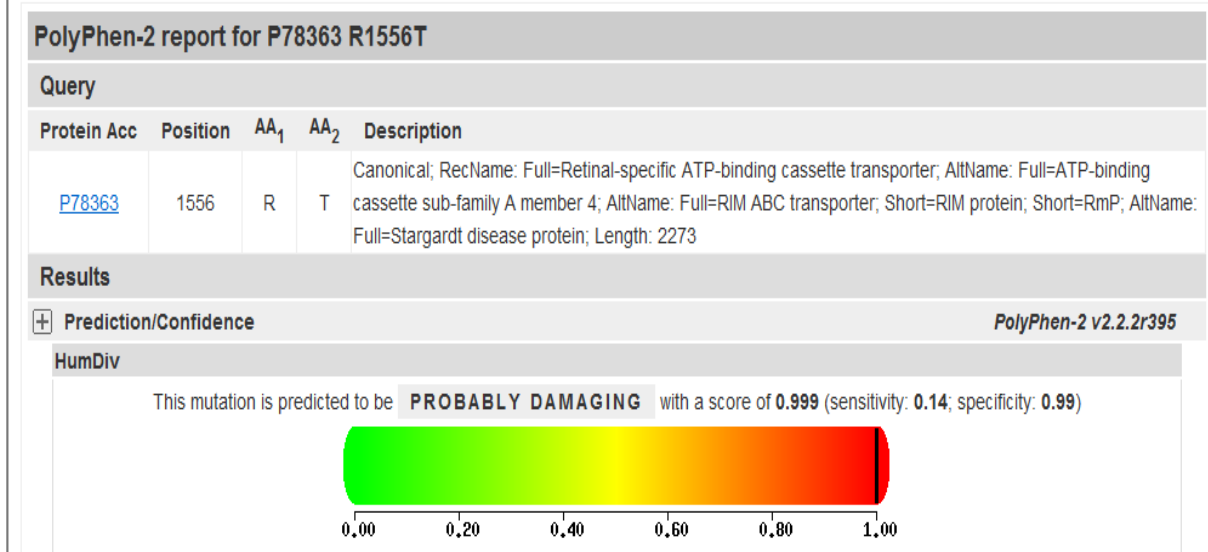
## 1. p. E241D (exón 6)



	UniProtKB/UniRef
Homo sapiens	----QRRGAQTVRDALCSLSQGTIQWM E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S
Taquifugu rubripes	----QRRGAQTVRDAICSLSQGTIQWM E DSL YANVDF-----FKLFRV---LPTLLE-S
Tetraodon nigrobiridis	----QRRGAQTVRDAMCSLSQGTIQWV E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S
Equus caballus	----QRRGAQTVRDAMCSLSQGTIQWV E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S
Canis familiaris	----QRRGAQTVRDAMCSLSQGTIQWV E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S
Rattus norvegicus	----QRRGAQTVRDAMCSLSQGTIQWV E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S
Sus scrofa	----QRRGAQTVRDAMCSLSQGTIQWV E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S
Meleagris gallopavo	----QRRGAQTVRDAICSLSQGTIQWM E DSL YANVDF-----FKLFRV---LPTLLE-S
Bos taurus	----QRRGAQTVRDAMCSLSQGTIQWV E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S
Mus musculus	----QRHGAQTVRDAMCSLSQGTIQWV E DTLYANVDF-----FKLFRV---LPTLLD-S

Figura 42. Resultados del análisis del programa Polyphen para la mutación nueva E241D identificada en el presente estudio. Se muestra score y secuencia de aminoácidos alineados entre especies. Se muestra únicamente la mutación (p. E241D) que tiene un score de 0.98 y el alineamiento entre diferentes especies demuestra una conservación estricta del residuo afectado.

## 2. p. R1556T (exón 32)



	<i>UniProtKB/UniRef100 Release</i>	
Homo sapiens	TEILQDLTDRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPVVPITGEALVGF-----
Taquifugu rubripes	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPVLPITGEALVGF-----
Tetraodon nigrobiridis	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPVLPITGEALVGF-----
Equus caballus	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPVLPITGEALVGF-----
Canis familiaris	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIQSGLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPVLPITGEALVGF-----
Rattus norvegicus	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPILPITGEALVEF-----
Sus scrofa	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPILPITGEALVEF-----
Meleagris gallopavo	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPILPITGEALVEF-----
Bos taurus	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPILPITGEALVEF-----
Mus musculus	TEILQDLTNRNISDFLVKTYPALIRSSLKSKFWVNEQ	R YGGISIGGKLPILPITGEALVEF-----

Figura 43. Resultados del análisis del programa Polyphen para la mutación nueva R1546T identificada en el presente estudio. Se muestra score y secuencia de aminoácidos alineados entre especies. Se muestra únicamente la mutación (p. R1556T) que tiene un score de 0.99 y el alineamiento entre diferentes especies demuestra una conservación en el residuo afectado.



### 3. I1775N (exón 38)



Figura 44. Resultados del análisis del programa Polyphen para la mutación nueva I1775N identificada en el presente estudio. Se muestra score y secuencia de aminoácidos alineados entre especies. Se muestra únicamente la mutación (p. I1775N) que tiene un score de 0.72 y el alineamiento entre diferentes especies demuestra una conservación en el residuo afectado.

#### 4. p. Y1779H (exón 38)

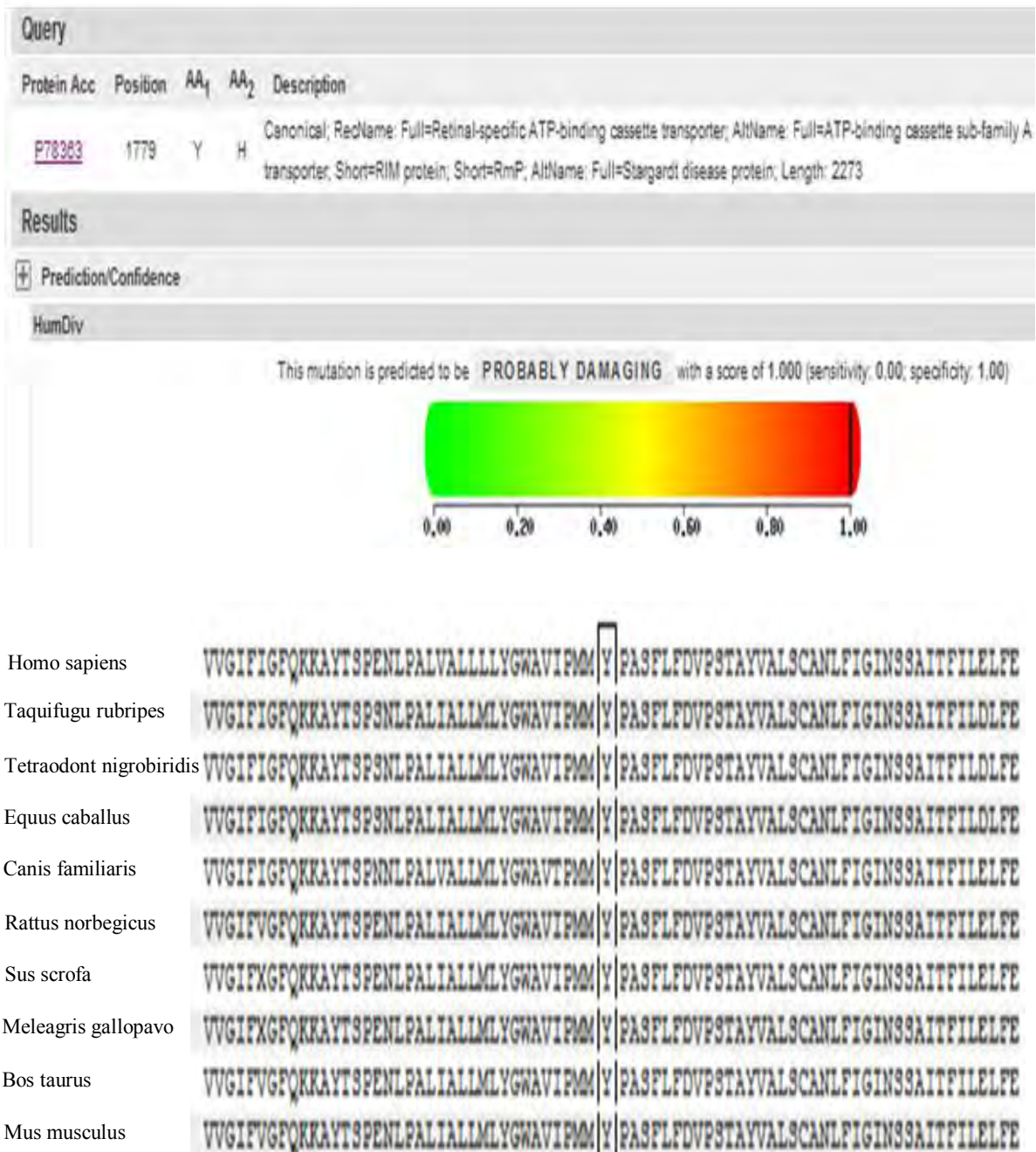


Figura 45. Resultados del análisis del programa Polyphen para la mutación nueva Y1779H identificada en el presente estudio. Se muestra score y secuencia de aminoácidos alineados entre especies. Se muestra únicamente la mutación (p. Y1779H) que tiene un score de 1.0 y el alineamiento entre diferentes especies demuestra una conservación en el residuo afectado.



## 5. E1942Q (exón 41)

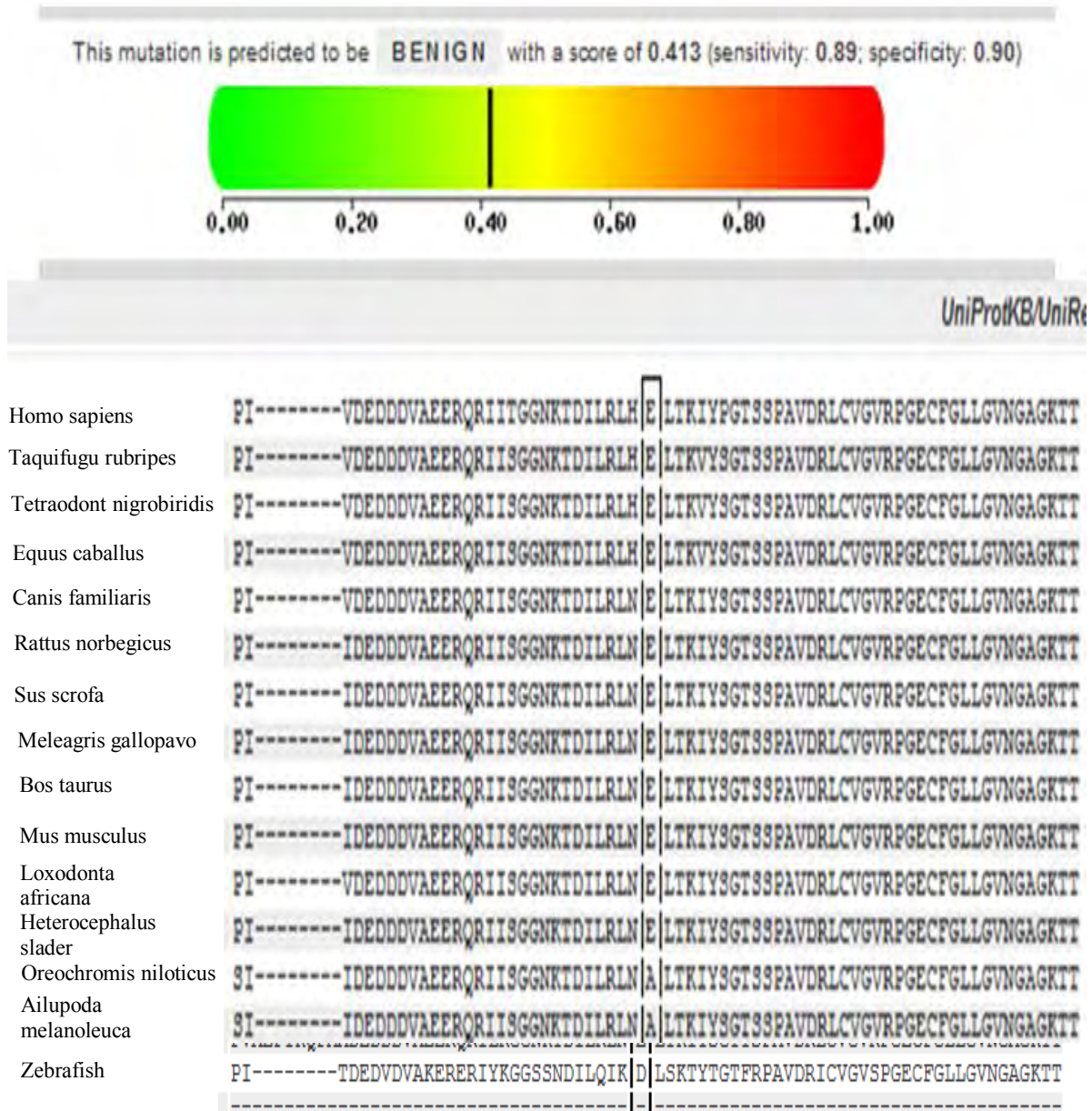


Figura 46. Resultados del análisis del programa Polyphen para la mutación nueva E1942Q identificada en el presente estudio. Se muestra score y secuencia de aminoácidos alineados entre especies. Se muestra únicamente la mutación (p. E1942Q) que tiene un score de 0.41 y el alineamiento entre diferentes especies demuestra una conservación parcial en el residuo afectado por lo cual el software lo considera una mutación benigna.

## 6. P. G2074V (exón 45)

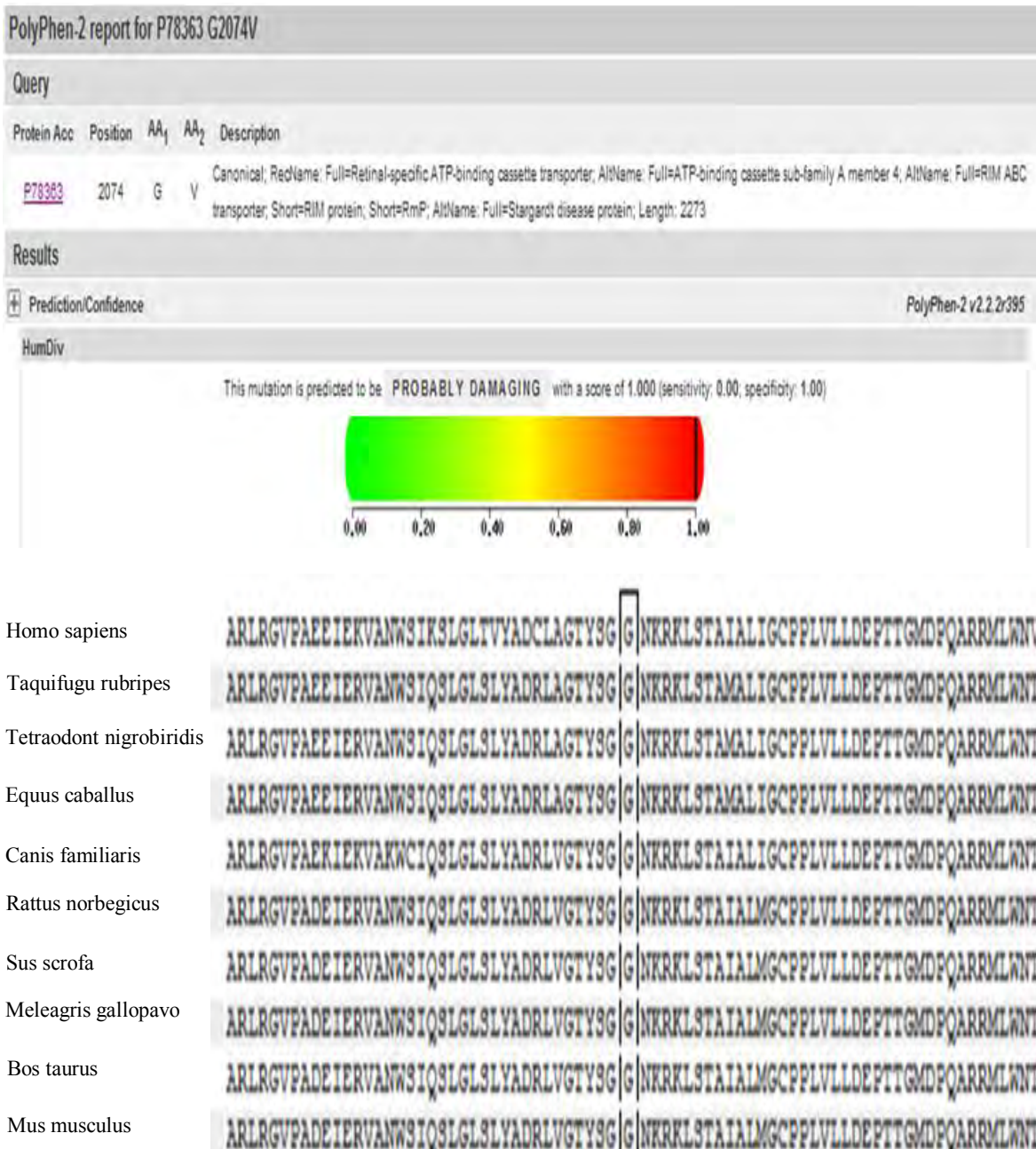


Figura 47. Resultados del análisis del programa Polyphen para la mutación nueva G2074V identificada en el presente estudio. Se muestra score y secuencia de aminoácidos alineados entre especies. Se muestra únicamente la mutación (p. G2074V) que tiene un score de 1.0 y el alineamiento entre diferentes especies demuestra una conservación en el residuo afectado.

Tabla 8. Resultados del análisis de predicción de patogenicidad con el programa Polyphen. Se incluyen todas las mutaciones nuevas de sentido equivocado identificadas en el presente estudio.

CAMBIO DE NUCLEOTIDO	POLIPEPTIDO	POLYPHEN
c. 723 A>T	p. E241D	0.98 (probablemente perjudicial)
c. 4667 G>T	p. R1556T	0.99 (probablemente perjudicial)
c. 5324 T>A	p. I1775N	0.72 (posiblemente perjudicial)
c. 5335 T>C	p. Y1779H	1.0 (probablemente perjudicial)
c. 5824G>C	p. E1942Q	0.41 (benigna)
c. 6221 G>T	p. G2074V	1.0 (probablemente perjudicial)

En la tabla 9, se encuentran todas las mutaciones encontradas por paciente, incluyendo mutaciones por alelo, tipo de mutación por su efecto en el nucleótido, en la proteína y genotipo.\* en celdas de alelos: mutaciones nuevas.

ESPECTRO MUTACIONAL DEL GEN ABCA4 EN 30 CASOS CON ENFERMEDAD DE STARGARDT							
Familia - DNA	Alelo 1			Alelo 2			Genotipo
	Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	
1. 269,433	38	c. 5318 C>T	p. A1773V	38	c. 5318 C>T	p. A1773V	Homocigoto
2. 290,720	-	-	-	-	-	-	-
3. 376,377	6	c. 634 C>T	p. R212C	38	c. 5318 C>T	p. A1773V	Heterocigoto compuesto
4. 1163,1922	23	c. 3386 G>T	p. R1129L	28	c. 4139 C>T	p. P1380L	Heterocigoto compuesto
5. 2255,2296	-	-	-	-	-	-	-
6. 2409,2410	38	c. 5318 C>T	p. A1773V	38	c. 5318 C>T	p. A1773V	Homocigoto
7. 1298	-	-	-	-	-	-	-
8. 793	16	c. 2453 G>A	p. G818E	28	*c. 4249_4251 del TTC	p. F1417 del	Heterocigoto compuesto
Esporádico - DNA	Alelo 1			Alelo 2			Genotipo
	Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	
1. 279	8	c. 868 C>T	p. R290W	-	*IVS8+1G>A	Mutación de splicing	Heterocigoto compuesto
2. 289	38	c. 5318 C>T	p. A1773V	-	-	-	Heterocigoto
3. 1014	20	c. 3041 T>G	p. L1014R	1,49	c. 52 C>T, c. 6764 G>T	p. R18W, p. S2255I	Heterocigoto compuesto
4. 1015	13,19	c. 1804 C>T, c. 2828 G>A	p. R602W, p. R943Q	16	c. 2453 G>A	p. G818E	Heterocigoto compuesto
5. 1128	38	*c. 5324T>A	p. I1775N	38	*c. 5324T>A	p. I1775N	Homocigoto
6. 1173	-	-	-	-	-	-	-
7. 1963	49	c. 6764 G>T	p. S2255I	49	c. 6764 G>T	p. S2255I	Homocigoto
8. 1388	19,40	c. 2828 G>A, c. 5503A>T	p. R943Q, p. N1868I	3	*c. 265 G>T	p. E89*	Heterocigoto compuesto
9. 2090	38	*c. 5335 T>C	p. Y1779H	38	*c. 5335 T>C	p. Y1779H	Homocigoto
10. 2008	16	c. 2453 G>A	p. G818E	16	c. 2453 G>A	p. G818E	Homocigoto
11. 1967	6	*c. 723 A>T	p. E241D	36	c. 5114 G>A	p. R1705Q	Heterocigoto compuesto
12. 2310	2	c. 71 G>A	p. R24H	-	-	-	Heterocigoto
13. 1777	30	*c. 4537_4538 ins C	p. Q1513Pfs*41	-	-	-	Heterocigoto
14. 2367	32	*c. 4667 G>C	p. R1556T	32	*c. 4667 G>C	p. R1556T	Homocigoto
15. 1465	45	*c. 6221 G>T	p. G2074V	16	c. 2453 G>A	p. G818E	Heterocigoto compuesto
16. 1871	16,41	c. 2453 G>A, *c. 5824 G>C	p. G818E, p. E1942Q	46	c. 6384 A>G	p. H2128R	Heterocigoto compuesto
17. 1129	16	c. 2453 G>A	p. G818E	-	-	-	Heterocigoto
18. 825	-	-	-	32	*c. 4653 G>A	p. W1551*	Heterocigoto
19. 2636	42	c. 5844 C>T	p. P1948L	23	c. 3386 G>T	p. R1129L	Heterocigoto compuesto
20. 769	36	*c. 5045_5059 del GTTGCCATCTGC GTG	p. V1682_V1686 del	29,49	c. 4328 G>A, c. 6764 G>T	p. R1443H, p. S2255I	Heterocigoto compuesto
21. 1046	19	c. 2894 A>G	p. N965S	19	c. 2894 A>G	p. N965S	Homocigoto
22. 695	-	-	-	-	-	-	-



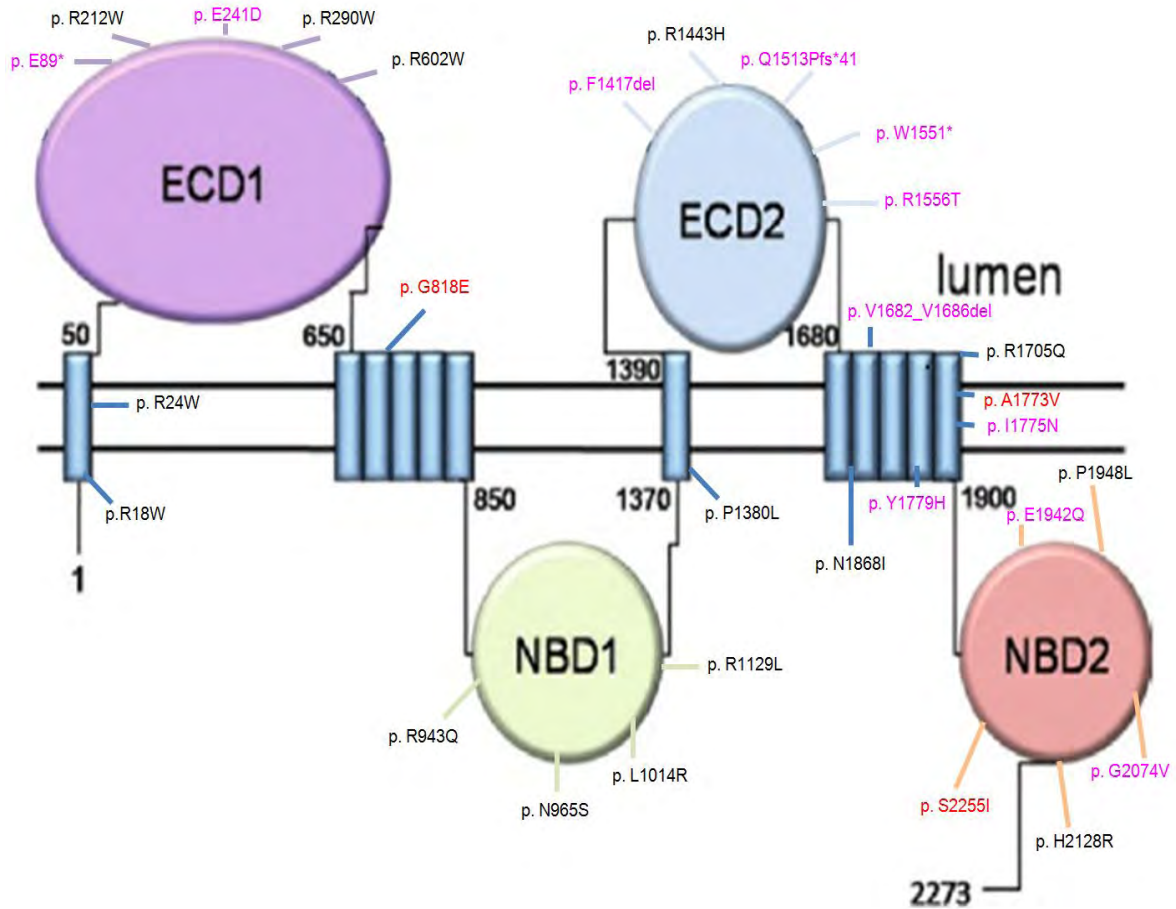


Figura 48. Distribución del espectro mutacional en la proteína ABCA4 en pacientes mexicanos con enfermedad de Stargardt. Se presentan 29 mutaciones encontradas (no se incluye mutación de splice). En rojo mutaciones más frecuentes en esta población. En rosa mutaciones nuevas identificadas (113).

Figura49. Distribución de la mutaciones de 30 pacientes con enfermedad de Stargardt dentro de la República Mexicana

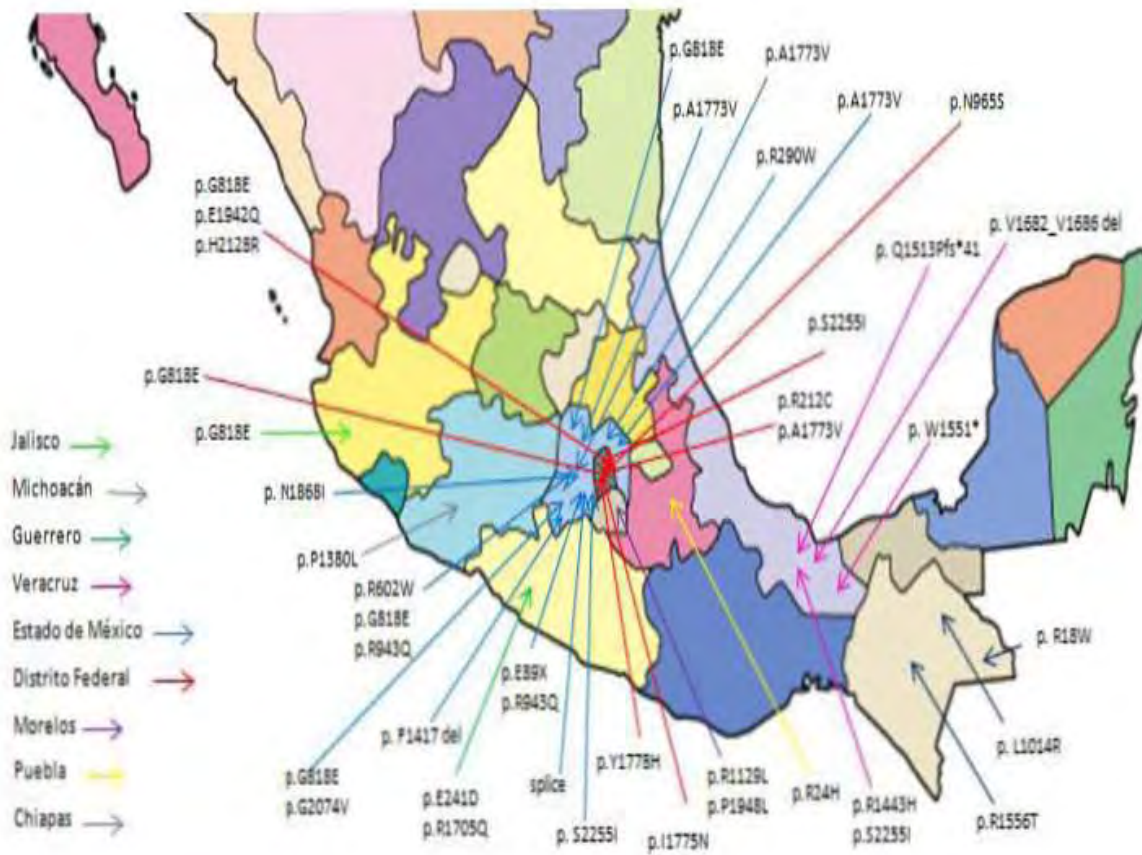


Tabla 10. Distribución de las mutaciones a nivel geográfico

<b>Mutación</b>	<b>Origen geográfico</b>
p. A1773V	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distrito Federal (2)</li> <li>- Distrito Federal (1)</li> <li>- Estado de México (2)</li> <li>- Estado de México (1)</li> </ul>
p. R212C	- Distrito federal (1)
p. R1129L	- Morelos (1)
p. R290W	- Estado de México (1)
p. L1014R	- Chiapas (1)
p. R602W,	- Estado de México (1)
p. R943Q	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estado de México (1)</li> <li>- Estado de México (1)</li> </ul>
p. I1775N	- Distrito Federal (2)
p. S2255I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estado de México (1)</li> <li>- Distrito Federal (2)</li> <li>- Veracruz (1)</li> </ul>
p. N1868I	- Estado de México (1)
p. Y1779H	- Distrito Federal (2)
p. G818E	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estado de México (1)</li> <li>- Estado de México (1)</li> <li style="padding-left: 20px;">- Jalisco (2)</li> <li>- Estado de México (1)</li> <li>- Distrito Federal (1)</li> <li>- Distrito Federal (1)</li> </ul>

p. E241D	- Guerrero (1)
p. R24H	- Puebla (1)
p. Q1513Pfs*41	- Veracruz (1)
p. R1556T	- Chiapas (2)
p. G2074V	- Estado de México (1)
p. E1942Q	- Distrito Federal (1)
p. P1948L	- Morelos (1)
p. V1682_V1686 del	- Veracruz (1)
p. N965S	- Distrito Federal (2)
p.P1380L	- Michoacán (1)
p.E89*	- Estado de México (1)
Splice	- Estado de México (1)
p.R18W	- Estado de México (1)
p.R1705Q	- Guerrero (1)
p. F1417 del	- Estado de México (1)
p.H2128R	- Distrito Federal (1)
p. W1551*	- Veracruz (1)
p.R1443H	- Veracruz (1)
Heterocigoto (1)	Homocigoto (2)



## DISCUSION

Las distrofias retinianas hereditarias representan la causa más importante de pérdida de visión en la adolescencia, afectando aproximadamente a 1 en 2000 individuos. Las mutaciones en *ABCA4* han sido demostradas como causantes de enfermedad de Stargardt, así como de algunas formas de retinitis pigmentosa y de distrofia de cono-bastón (114). La enfermedad de Stargardt es una distrofia macular de inicio juvenil que se asocia con un daño rápido de la visión central con atrofia progresiva bilateral del EPR. Se caracteriza por la aparición de “flecks” amarillentos en el centro o alrededor de la mácula, así como en áreas periféricas de la retina (28, 29). El signo del silencio coroideo en la FAG, presente en una gran proporción de los pacientes (60-86%), refleja la acumulación de lipofuscina en la retina (115).

Al menos 5 distintos fenotipos retinianos (retinitis pigmentosa, distrofia de conos-bastones, degeneración macular relacionada a la edad, fundus flavimaculatus y enfermedad de Stargardt) han sido asociados a mutaciones en *ABCA4* (85). Actualmente se han identificado más de 600 variantes asociadas a estos fenotipos. Sin embargo, los alelos más frecuentes de *ABCA4* asociados a enfermedad sólo han sido identificados en ~ 10% de los pacientes con STGD y más de la mitad de las variantes sólo han sido detectadas en una sola ocasión, lo cual es un gran desafío para la inequívoca clasificación molecular de la enfermedad. Así, esta clasificación generalmente se logra mediante el análisis funcional de la proteína mutante, que en la mayoría de las ocasiones una tarea difícil de realizar para el investigador (116,117). Debido a que las enfermedades asociadas a *ABCA4* son autosómicas recesivas, muchos pacientes a menudo representan el único miembro afectado en una familia. Aunque determinar el estado mutacional es posible si las muestras parentales están disponibles, esto a veces es complicado o imposible (118). Los estudios

funcionales de las variantes de *ABCA4* son también complicados a causa de que *ABCA4* solo se expresa en los fotorreceptores, lo cual significa que el tejido afectado no puede ser obtenido de estos pacientes. De esta forma, un examen funcional directo no se encuentra disponible aún (117) y aunque se han utilizado algunos modelos, aún es difícil la realización de experimentos funcionales para cientos de variantes raras (119,120).

Por otra parte, la heterogeneidad alélica ha complicado enormemente el análisis genético del gen *ABCA4* asociado a enfermedades retinianas. A pesar del esfuerzo relacionado en la detección y genotipificación, lo cual es crucial para estudios de correlación genotipo-fenotipo, todavía se necesitan analizar miles de muestras para lograr un poder estadístico de todas las variantes raras y sus combinaciones cuando hay 2 alelos mutantes distintos. También relacionado a los anterior y que también necesita de análisis estadístico similar es la presencia de alelos complejos (presencia de 2 ó más variantes en el mismo cromosoma), los cuales se encuentran hasta en un 10% de todos los pacientes con STGD (117).

La variación en el locus *ABCA4* ha emergido como la causa más prevalente de enfermedad retiniana, puesto que 1/20 personas en diversas poblaciones portan una variante en este gen potencialmente asociada a enfermedad (56,89,117). Esta frecuencia implica que la prevalencia establecida de 1 en 10,000 para la enfermedad de Stargardt posiblemente sea muy superior. Así lo confirmó Riveiro-Alvarez et al. en un estudio de casos control al demostrar una frecuencia de portadores del 6.4%, que permitió estimar una prevalencia para la enfermedad de 1 afectado en cada 870 individuos de la población (121).

El microarreglo para mutaciones de ABCA4, el cual es actualizado regularmente, contiene todas las variantes genéticas conocidas asociadas a la enfermedad (hasta octubre 2011) en el gen ABCA4 (aproximadamente 600 variantes). Este método actualmente detecta ~70% de los alelos asociados a la enfermedad. En promedio el microarreglo identifica 2 mutaciones en ~40% de los pacientes diagnosticados con enfermedad de Stargardt clásica. Del resto, 1 mutación es detectada en otro 40%, mientras que en un 20% de los pacientes no es posible identificar un segundo alelo de ABCA4 asociado a enfermedad. Pese a las nuevas tecnologías, la secuenciación directa por el método de Sanger sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico molecular de enfermedades mendelianas. En promedio este método detecta entre 66% y 80% de los alelos en enfermedad de Stargardt.

En el presente estudio, 83% (25/30) de los pacientes estudiados presentó al menos una mutación asociada a STGD. De un total de 30 pacientes, 66.6% (20/30) presentó 2 alelos mutantes y 17% (5/30 pacientes) presentó un alelo mutante. En el restante 16.6% (5/30 pacientes) no se identificaron mutaciones. En aquellos pacientes con mutación en ambos alelos de ABCA4, 40% (8/20 pacientes) fueron homocigotos y de éstos 37.5% (3/8) reconocieron consanguinidad o endogamia en la familia; 60% (8/12 pacientes) fueron heterocigotos compuestos y de éstos solamente un 16.6% (2/12) reconocieron consanguinidad o endogamia. En este trabajo se logró la identificación de 30 diferentes variantes asociadas a enfermedad de la cuales ~90% (27/30 variantes genéticas) fueron sustituciones, 6.6% (2/30) deleciones y 3.3% (1/30) inserciones. Por su efecto en la proteína, la mayoría de estas mutaciones (80%, 24/30) originaron cambios de sentido equivocado. Dos mutaciones (6.6%) predijeron eliminación de aminoácidos sin desplazamiento del marco de lectura mientras que otras 2 mutaciones (6.6%) causaron

terminación prematura de la proteína con un codón directo de paro. Se identificó solamente una mutación de splicing (3.3%) y otra con desplazamiento de marco de lectura (3.3%).

En 1997, Allikmets et al., reportaron por primera vez mutaciones asociadas al gen *ABCA4* en un total de 48 familias con enfermedad de Stargardt en las que identificaron 19 mutaciones, la mayoría de sentido alterado (44). Lewis et al. en 1999 secuenciaron el gen *ABCA4* completo en 150 familias e identificaron variación en este gen en 173 (57%) de los alelos (85). En tal estudio, 59 familias demostraron 2 ó más mutaciones, mientras en igual número de familias se identificó al menos una mutación (85). Apoyando el modelo de la actividad residual del transportador *ABCA4*, se ha establecido que cuando los dos alelos están afectados y al menos uno de ellos tiene una mutación de sentido equivocado o una deleción sin desplazamiento del marco de lectura, la proteína conserva cierta actividad funcional y se correlaciona con un fenotipo de enfermedad de Stargardt (44,85). En un análisis de la variación alélica en el gen *ABCA4* en el año 2001, Webster et al. estudiaron 374 probandos no relacionados con diagnóstico de enfermedad de Stargardt e identificaron dos alelos causantes de enfermedad en 18% de los casos, un alelo mutante en 35% y ningún alelo mutado en 47% de los sujetos estudiados (77). Al mismo tiempo Briggs et al. estudiaron 118 pacientes con STGD identificando 21 mutaciones nulas (15 nuevas), 55 mutaciones de sentido alterado y una deleción de un aminoácido sin desplazamiento del marco de lectura. También demostraron que 52 (44%) pacientes con la enfermedad presentaban 2 alelos mutados, 33 (31%) pacientes con un alelo mutado y en 29 (25%) de ellos no se encontraron mutaciones (64). En el año 2000, Simonelli estudió 11 familias con STGD y encontró 10 variantes en 16 (73%) de los 22 alelos; ~80% de las variantes fueron mutaciones de sentido alterado y ambos alelos estuvieron afectados en 6 (55%) de 11 familias. También, Simonelli en el año 2005, estudiaron 18 familias con STGD e

identificaron mutaciones de sentido equivocado en un 53.8%, seguidos por deleciones (27%), mutaciones del corte-empalme (11.6%) e inserciones y mutaciones sin sentido en 3.8% (25). Rivera et al. estudiaron 144 pacientes y encontraron 191 mutaciones asociadas a enfermedad de las cuales las mutaciones de sentido alterado representan la mayoría (76.4%) seguido por las mutaciones sin sentido (9.9%), splice (9.4%) y mutaciones con desplazamiento del marco de lectura (4.2%). en 59 pacientes (40.9%), ambos alelos presentaban mutaciones, en 48 pacientes (33.3%) se identificó mutación en un solo alelo y en 37 pacientes (25.7%) no se encontraron mutaciones. En Sudáfrica en el año 2004, September et al. estudiaron una cohorte de enfermos e identificaron variantes en 40 de 64 pacientes (63%). Las mutaciones más comunes fueron sustituciones de una base en su mayoría transiciones (80). Özgull et al. en el año 2004 estudiaron la población turca y encontraron que un 40% de los pacientes con esta enfermedad presentaron al menos un alelo mutado (70). Hargitai et al. en 2005 en población húngara estudiaron 35 pacientes y detectaron mutaciones en un 65.7% (23/35), incluyendo 48.5% de pacientes con ambos alelos y 17% con un alelo afectado (24). En un estudio danés en el año 2007, Rosenberg et al. que un 77% de los individuos estudiados presentaron variantes patogénicas. Encontraron que un 41.6% de los pacientes presentaron 2 mutaciones, un 31.7% un alelo afectado y 3.7% más de 3 alelos afectados. La mayoría de las mutaciones fueron de sentido equivocado (82). Valverde et al. en 2006 estudiaron 76 pacientes españoles con enfermedad de Stargardt e identificaron mutaciones en un 60% de los cromosomas estudiados. Un 43% de los pacientes presentaron los dos alelos mutados, mientras que en 33% solo se identificó un alelo afectado (86). También en España en el año 2009, Aguirre-Lamban et al. estudiaron 31 familias, incluyendo 23 con STGD, identificando un 43.5% de alelos mutados (61). En población portuguesa, Maia-Lopes et al. estudiaron 21 familias

encontrando 22 variantes asociados a enfermedad, resultando en una detección del 67%. La gran mayoría de esos cambios fueron mutaciones de sentido equivocado (72.7%), seguido por mutaciones con cambio del marco de lectura (19.4%), mutaciones sin sentido (8.3%) y una mutación del splicing (2.7%). En México y en Latinoamérica no hay reportes de estudios moleculares del gen ABCA4 en la enfermedad de Stargardt. El único estudio que antecede al nuestro en México fue realizado por nuestro grupo en 5 pacientes mexicanos con enfermedad de Stargardt (84) y en el que se analizaron los exones 12, 17, 20, 23, 24, 28, 29, 40, 41 y 42, que fueron los exones con mayor número de mutaciones en población española. En este estudio no se identificó ninguna variante genética patogénica asociada a la enfermedad. A nuestro conocimiento, no existen estudios para conocer el espectro mutacional del gen ABCA4 en pacientes con enfermedad de Stargardt en Latinoamérica.

#### **MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO Y QUE HAN SIDO DESCRITAS PREVIAMENTE**

Se identificaron en total 30 variantes patogénicas, 18 de las cuales ya han sido reportadas en diversos estudios. En el exón 1 del gen *ABCA4* se identificó la transición c. 52 C>T (p.R18W) (DNA 1014) descrita por Gerber et al. en 1998 en 2 familias no relacionadas de origen francés y alemán, respectivamente (122). Esta mutación se localiza en la región corta amino terminal que precede a la primera asa transmembranal de la proteína y se considera que afecta un aminoácido no conservado y con posible benignidad aunque su función hasta la fecha es desconocida (36). Similarmente, la mutación c. 71 G>A (p. R24H) (DNA 2310), fue identificada en nuestro estudio y descrita por Lewis et al. en 1999 y es una mutación de sentido equivocado de efecto desconocido en la función de ABCA4, de localización adyacente al primer dominio transmembranal de la proteína en una

posición residual no conservada (36,85). Es importante mencionar que las dos mutaciones anteriores son consideradas como benignas y podrían combinarse con alguna mutación de afección severa en la función del transportador y de esta forma causar el fenotipo de enfermedad de Stargardt. Esta variante patogénica ha sido identificada en varias poblaciones. Paloma et al. en población española describieron una familia con distrofia de cono-bastón con genotipo de heterocigoto compuesto debido al cambio p. R212C (c. 634 C>T) (DNA 376, 377) en un alelo y un desplazamiento del marco de lectura en el otro. Rozet et al. en 1998 y Simonelli en 2005 describieron esta mutación en estado homocigoto y heterocigoto, respectivamente, asociados ambos genotipos a un inicio temprano (antes de los 10-12 años) de la enfermedad de Stargardt (25, 124). Estos datos indican que es probable que la forma homocigota y heterocigota conserven actividad residual del transportador ABCA4; mientras que la forma con una proteína truncaada y el cambio p. R212C tiene solo un alelo con actividad residual provocando un cuadro clínico más agresivo como lo es la distrofia de cono-bastón. Así mismo, esta mutación también ha sido considerada como factor de susceptibilidad para AMD (125). La mutación c. 818 C>T (p. R290W) (DNA 279) fue identificada en el año 2007 en una familia portuguesa originaria de las islas Azores. En esta familia se observó variabilidad clínica ya que algunos individuos presentaban distrofia de cono-bastón y un individuo tenía enfermedad de Stargardt. En este último sujeto se identificó la mutación p. R290W. Esta sustitución de arginina a triptófano en la posición 290, afecta un residuo del primer asa intradiscal de ABCA4 que está conservado en diferentes especies como el humano, el ratón, la rata, el perro y el *Xenopus* entre otros. Es probable que este cambio de un residuo básico a uno neutral/hidrofóbico tenga consecuencias funcionales (126). La mutación c. 1804 C>T (p. R602) (DNA 1015) fue identificada por Lewis et al. en 1999 y a partir de entonces ha sido descrita con

frecuencias variables siendo una de las más comunes en población sudafricana (6 familias de 64 familias) y en española (6%) (61,77,80,83,85,86). El residuo p. R602W está altamente conservado en las proteínas ABCA4 entre las diferentes especies y con otros miembros de la familia ABCA. Este aminoácido está localizado en el dominio ECD I y aún no se conoce su importancia en estructura y función. Se ha especulado que la sustitución de una carga positiva de la arginina a un triptófano no polar puede tener efectos adversos sobre la organización espacial de la proteína (120). Para investigar los efectos de la severidad de la retinitis pigmentosa autosómica recesiva por la mutación de sentido equivocado p. R602W sobre la localización de ABCA4, se generó un modelo de *Xenopus* transgénico p. R602W. Los estudios de inmunofluorescencia demostraron retención del transgénico dentro del segmento externo y sugirieron un plegamiento anormal de la proteína mutada. Así mismo, se realizó la medición de la actividad ATPasa de la mutante p.R602W y se identificó un decremento marcado comparado con el alelo tipo silvestre (actividad de 21.6% vs ~100%) (120). La mutación c. 2453 G>A (p. G818E) (DNA 793, 1015, 1465, 1871, 2008) fue identificada en 1997 por Allikmets et al. en un análisis de pacientes con enfermedad de Stargardt y degeneración macular relacionada a la edad (21). Esta fue la mutación más frecuente en nuestra población, ya que se identificó en 7 alelos (7/60). Este cambio está localizado en el asa que conecta las hélices transmembranales 5 y 6. Estas asas se ordenan de diferentes formas aún no totalmente establecidas, esta variabilidad estructural puede explicar porque esta mutación provoca una enfermedad leve. También se propone que esta variante patogénica reduce la capacidad ATPasa de la proteína (120). La variante genética c. 2828 G>A (p.R943Q) (DNA 1015, 1388) fue identificada en 1997 por Allikmets et al. Esta alteración ha sido reportada en muchos estudios como una mutación de patogenicidad baja o leve o bien como un polimorfismo (22). Estudios de expresión han



demostrado que este cambio produce una pequeña pero detectable reducción en la actividad nucleotidasa y afinidad de unión al nucleótido de la proteína ABCA4. Otros estudios han mostrado que este cambio puede estar asociado con c. G863A o c. 2588G>A, produciendo un fenotipo severo. Se especulan dos posibilidades; primero, el cambio p. R943Q se puede asociar con mutaciones más severas y, segundo, R943Q puede tener un efecto modulador sobre otro gen implicado en la enfermedad, no descubierto aún (62, 127). En nuestro estudio se identificaron 2 alelos con esta variante genética y los datos apoyan el punto referido anteriormente debido a que ambos alelos se encuentran como alelos complejos con mutaciones de moderada a severa funcionalidad en la proteína (p. R602W y p. N1868I). Además, en el otro alelo se encuentran mutaciones de severa y moderada a leve patogenicidad (p. E89\* y p. G818E, respectivamente). De manera importante, se ha demostrado recientemente un desequilibrio de ligamiento entre p. R602W y p. R943Q en la población española (128). Ese hecho es interesante debido a que un alelo que identificamos con la variante p.R943Q forma un alelo complejo con p. R602W. La mutación c. 2894 A>G (p. N965S) (DNA 1046) fue identificada en 1997 por Allikmets et al. (21). En el año 2007, Rosenberg et al en un estudio en población danesa, encontraron esta variante genética en 28 pacientes y fue la mutación más común entre 161 pacientes no relacionados. La mutación p.N965S está ausente en estudios europeos y se ha presentado esporádicamente en Estados Unidos (77,85). Recientemente se ha demostrado que esta variante tiene un impacto medio a severo sobre el fenotipo debido al daño de la hidrólisis del ATP por la proteína mutada (119). La mutación c. 3041 T>G (p. L1014R) (DNA 1014) fue identificada por Webster et al. en 2001. Dicha mutación fue validada utilizando 96 sujetos normales y 182 pacientes con degeneración macular. A nuestro conocimiento este es el único estudio que ha reportado esta mutación (77). La mutación c. 3386 G>T (p. R1129L) (DNA 1163,

1922, 2636) fue identificada por primera vez por Webster et al. en el año 2001. En pacientes españoles, Valverde et al. la reportaron como una variante presente en 25% de los alelos asociados a la enfermedad. Esta mutación puede considerarse con efecto moderado a severo, dado que en 5 pacientes homocigotos para esta variante fueron diagnosticados con STGD en la vida adulta temprana. En los casos donde p. R1129L fue heredada con una segunda mutación, el rango de la edad de inicio de la enfermedad fue más amplio (9 a 40 años), y la naturaleza de la severidad de la enfermedad dependió de la segunda mutación (86). La caracterización bioquímica de una proteína recombinante ABCA4 con la mutación p. R1129L reveló una reducción sustancial en la expresión y en la actividad de unión a ATP (119). La mutación 4139 C>T (p. P1380L) (DNA 1163, 1922) fue identificada por Lewis et al en 4 sujetos en el año 1999. Fue validada en 220 sujetos no afectados donde no se encontró la variante (85). Diversos estudios demuestran también que sujetos con mutaciones heterocigotas para el gen *ABCA4* pueden estar predispuestos a desarrollar degeneración macular relacionada con la edad (118), a consecuencia de una posible haploinsuficiencia en el producto ABCA4. La mutación c. 4328 G>A (p. R1443) (DNA 769) fue identificada por Rivera et al. en el 2000, validándose en 220 sujetos no afectados de la población alemana (78). September et al. en un estudio en población sudáfricana en el 2004, describió la mutación como una sustitución de un aminoácido arginina conservado por una histidina, otro aminoácido básico en la posición 1443 dentro del dominio 2 extracelular (ECD2) de la proteína ABCA4. Es predicho que este cambio no afecta dramáticamente la función en el espacio intradiscal del fotorreceptor donde ECD2 está localizado. Los aminoácidos básicos son usualmente encontrados en las superficies exteriores de las proteínas a causa de sus fuertes propiedades polares. Ha sido sugerido que las mutaciones hacia el extremo 3' del gen pueden no tener un efecto significativo en la

función de la proteína y por lo tanto estar asociado a fenotipos más leves (80). La mutación c. 5114 G>A (p. R1705) (DNA 1967) fue identificada por Rivera et al. en el año 2000, validándose con 220 sujetos sanos de población alemana (78). En esta variante patogénica no se han descrito ni realizado estudios funcionales. La mutación c. 5318 (p. A1773V) (DNA 269, 433, 376, 377, 2409, 2410, 289) fue identificada en el año 2007 por Downs et al. Esta mutación tiene resultados controversiales en diferentes países. En Estados Unidos, se ha reportado como una variante de baja patogenicidad y se ha descrito en población sana, no obstante no se demuestran resultados concluyentes ni resultados de segregación de la mutación (111). Recientemente, en el año 2008, en un estudio italiano sucedió lo contrario, Stenirri et al. identificaron esta variante y la consideraron como variante patogénica, aunque no hay detalles ni descripción de la mutación (112). Al ser la segunda posible variante patógena más frecuente en nuestra población de estudios, decidimos validar esta variante con 105 sujetos sanos, ninguno de los cuales presentó la variante. Posteriormente, demostramos que dicha mutación se segregaba en la familia. Nosotros encontramos 2 familias no relacionadas con dos hermanos afectados cada familia. En cada uno de esos hermanos se demostró la mutación p. A1773V en estado homocigoto. En seguida realizamos el examen molecular a los padres y encontramos que cada uno de ellos resultó ser portador para la mutación. En un análisis utilizando Polyphen se demostró también que el residuo alanina en la posición 1773, está conservado filogenéticamente (resultados no mostrados). Todas estas son evidencias para demostrar porque consideramos a esta variante como la causante de la enfermedad en las personas que portan este cambio nucleótido. No obstante, aún faltan estudios funcionales de la proteína para demostrar todo lo anteriormente descrito. Para la mutación c. 5503 A>T (p. N1868I) (DNA 1388) fue identificada por Webster et al. en el año 2001 como una variante genética que predispone a

enfermedad de Stargardt y degeneración macular relacionada a la edad. Al ser validada con 96 sujetos sanos, se encontró que la variante estaba presente en 7 de ellos. La mutación tiene una funcionalidad parecida a la mutación p. R602W, donde son cambios que se presentan muy frecuente en la población, pero también se encuentran en controles según los estudios reportados (77). Es esperado que este alelo no puede causar enfermedad si se parea entre sí mismo, pero puede causar enfermedad si se aparea con otro alelo de más patogenicidad (por ejemplo un alelo nulo), como lo visto con el apareo con el alelo p. E89\* (77). Recientemente, Aguirre-Lamban et al. en un estudio en población española demostraron que esta variante es identificada en una más alta proporción de pacientes que en controles y confiere hasta el doble de riesgo para desarrollar la enfermedad (OR 2.23; IC 95% 1.01-5.0a, p=0.05). La mutación c. 5844 C>T (p. P1948L) (DNA 2636) fue identificada por Maugeri et al. en el año de 1999 (56). Se considera una variante con poca patogenicidad, y varios estudios en distintas poblaciones han demostrado que se trata de un polimorfismo, aunque podría tener cierta patogenicidad dependiendo si se aparea con un alelo de alta patogenicidad que altere la función de la proteína ABCA4 (77). La mutación c6384 A>G fue identificada por Fishman et al. en 1999 (129). Webster et al. en el mismo año validaron esta mutación con 96 sujetos sanos y 182 con degeneración macular relacionada a la edad, ninguno de ellos presento la variante (77). En 2010, Kelly et al. describieron que esta mutación es la única que afecta un “C-loop”, que es un segmento con secuencia conservada (de 10-12 residues) que inicia con una histidina conservada que tiene un papel en la unión e hidrólisis (130). Por último, para la mutación de sentido equivocado c. 6764 G>T (p.S2255I) (DNA 769, 1014, 1963) la frecuencia alélica es generalmente alta en diversas poblaciones (85). Estos alelos pueden ser definidos como de baja patogenicidad debido a que se presentan con alta frecuencia en enfermos con Stargardt sin que sean

totalmente penetrantes. Estos alelos por si solos no son causantes de enfermedad, sobre todo si se aparean entre ellos. No obstante, ellos pueden causar la enfermedad si se aparean con otro alelo de alta patogenicidad (77,85). Valverde et al. en 2007 al estudiar pacientes españoles con retinopatía severas mencionó que se necesitan realizar más estudios para determinar el verdadero papel de este alelo controversial en la patogénesis de la enfermedad (62).

## **MUTACIONES NUEVAS DE ABCA4 IDENTIFICADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO**

Doce de las 30 variantes encontradas, (12/30, 40%) se consideran mutaciones nuevas debido a que no están reportadas en la literatura internacional. Se tomaron en cuenta diversos criterios para validar estas variantes nuevas. Primero, que no se encontraran en bases de datos como el “Human Gene Mutation Database” (HGMD) (116), RetNet The retina international scientific newsletter, Mutation Database: Mutations of the ATP-binding cassette transporter retina (ABCR, ABCA4) (131) y Pubmed dentro del NCBI, entre otras. Segundo, todas las alteraciones en la secuencia del gen *ABCA4* que predijeron una proteína truncada prematura (como por ejemplo mutaciones sin sentido, pequeñas inserciones o deleciones que causen desplazamiento del marco de lectura) o alteraciones que afectan el “splicing” fueron clasificadas como mutaciones asociadas a la enfermedad.

Para las mutaciones de sentido equivocado tomamos en cuenta varios pasos para validarla como nueva. Se incluyeron a 75 sujetos sanos como controles y ninguno de ellos debió presentar la variante en cuestión. Se realizó un análisis de segregación donde son importantes los hermanos (los también afectados) y los padres. En los primeros se buscó que tuvieran las mismas mutaciones que los probandos y en los segundos el estado portador

de la enfermedad. Posteriormente, se realizó un análisis de predicción *in silico* utilizando el programa Polyphen. Este programa estima la posibilidad que la variante sea dañina o no, tomando en cuenta como la mutación cambia la estructura de la proteína y su funcionalidad. Por último se realizó un análisis filogenético de los residuos de la proteína afectados para demostrar si ellos estaban o no conservados.

De las 12 mutaciones nuevas identificadas, 2 correspondieron a mutaciones sin sentido, 2 a deleciones sin desplazamiento del marco de lectura, una a inserción con desplazamiento del marco de lectura, una por alteraciones del sitio de corte y empalme (splicing) y 6 correspondieron a mutaciones de sentido equivocado.

### **Nuligocidad asociada a enfermedad de Stargardt**

Un alelo nulo es un tipo de alelo conducente a la ausencia de un determinado fenotipo debido a la ausencia de un producto génico normal. Se encontró mutaciones aparentemente nulas en 4 de 60 alelos estudiados (6.66%). Lewis et al. en el año de 1999 encontró en población estadounidense que un 12% de todos sus alelos eran nulos (85). En otra población del mismo país Briggs et al en el año 2001 encontró que un 10% de los alelos eran mutaciones nulas (64). Rivera et al. en el año 2001 en población alemana encontraron variantes con nulidad en un 23.5% de todos los alelos, siendo las mutaciones sin sentido el 9.9% y las de splicing el 9.4%, mientras las que causan un desplazamiento del marco de lectura sólo en 4.2% (77). Aguirre-Lamban et al. en el año 2009 en población española encontró que un 12.9% correspondían a este tipo de alteraciones (61). Maia-Lopes et al. en población portuguesa en el año 2009 encontró que ~ un 35% todos los alelos mutados eran mutaciones nulas (variantes con desplazamiento del marco de lectura 19.4%, mutaciones sin sentido 8.3% y un cambio de splicing 2.7% (83). Por lo anterior, se puede

concluir que hay una gran heterogeneidad y que cada población maneja porcentajes que varían ampliamente para este tipo de variantes. La mutación c. 256 G>T (p. E89\*) (DNA 1388) fue predicha según los criterios ya establecidos como proteína prematura truncada, por lo tanto con una funcionalidad nula en el transportador ABCA4. El residuo afectado se encuentra en el dominio extracitoplásmico 1 (ECD1), en la mitad aminoterminal de la proteína, pero debido a la naturaleza de la proteína truncada, este dominio así como los sucesivos a la mutación no tienen actividad, dando nulidad a la función en este alelo. El paciente portador de esta mutación, presenta en el otro alelo una mutación en cis o compleja (p. R943Q y p. N1868I) que son consideradas como mutaciones de sentido equivocado de baja patogenicidad; de esta forma éste sería un buen ejemplo que explica el modelo de la actividad residual del transportador ABCA4, donde una mutación severa (p. E89\*) y una mutación leve (p. R943Q y p. N1868I) causarían la enfermedad de Stargardt (30, 37). La mutación de “splicing” IVS8+1 G>A (DNA 279) provocaría un no reconocimiento del sitio donador (GT) para el spliceosoma mayor. El RNA splicing (RNAsn o RNA pequeño nuclear, spliceosoma) requiere reconocer las secuencias nucleotídicas en los límites entre exón-intrón del transcrito primario. Los dinucleótidos en los finales de los intrones están altamente conservados, así casi siempre la mayoría de los intrones inician con GT (sitio donador) y finalizan con AG (sitio aceptor). Actualmente se conoce que no sólo estos dinucleótidos deben estar conservados, las secuencias que están adyacentes a ellos lo están también, constituyendo las secuencias consenso de la unión del splicing. La posible consecuencia de esta mutación sería la nulidad para el alelo afectado, pero Lewis et al. describieron que las mutaciones que provocaran una proteína truncada cerca del extremo carboxilo de la proteína, aún podrían retener cierta funcionalidad del transportador (85). En nuestro paciente el otro alelo presenta una mutación de sentido equivocado, lo cual también

apoya el modelo residual. La mutación c. 1530\_1531 ins C (p. Q1513Pfs\*41) (DNA 1777) es una inserción de una citosina entre los nucleótidos 1530 y 1531 de gen *ABCA4* que originó un desplazamiento del marco de lectura heterocigota en el aminoácido 1531 del transportador. Este desplazamiento a su vez causó un codón de paro 41 codones “río abajo”, causando así una proteína prematura truncada la cual se considera con nula funcionalidad. El codón 1530 se encuentra en el dominio extracitosólico (ECD2) en el inicio de la segunda mitad carboxilo del transportador. La mutación causaría daño severo y nulidad de función por defecto del resto de la proteína (incluyendo el ECD2, TMD y NBD2). La mutación c. 4653 G>A (DNA 825) es una sustitución que originó una mutación sin sentido en el aminoácido 1551 (p. W1551\*) con función nula en la proteína transportadora. Este residuo se encuentra en el dominio extracitosólico 2, pero como en la mutación anterior, se dañan los dominios restantes del transportador, de esta manera causando la gravedad o nulidad de la funcionalidad proteica. En estas dos últimas mutaciones, no se encontró el otro alelo afectado en la regiones codificantes, una discusión acerca de ese tema será tomado más adelante. También es importante mencionar que todas estas variantes con nulidad de función no se encontraron en estado homocigoto, lo cual se ha predispuesto más a fenotipos relacionados con distrofia de cono-bastón o retinitis pigmentosa.

### **Deleciones sin desplazamiento del marco de lectura.**

Se identificaron 2 alelos mutados con este tipo de alteración (c. 4249\_4251 del TTC, p. F1417del (DNA 793); c. 5045\_5059 del GTTGCCATCTGCGTG, p. V1682\_V1686 del) (DNA 769) que representan un 0.33% del total de los alelos estudiados y un 6.66% del total de los alelos estudiados. Estas variantes son rara vez identificadas, por ejemplo Lewis et al.



en 1999 reportaron 3 alelos con estos tipos de mutaciones (3/183 variantes asociadas a enfermedad de Stargardt) (85). Así mismo Briggs et al. identificaron una deleción sin desplazamiento del marco de lectura en 77 cambios patogénicos asociados a la enfermedad (64). Este tipo de mutaciones (deleciones sin desplazamiento del marco de lectura) se define como aquella en la cual se pierden nucleótidos en múltiplos del número 3, por lo tanto se pierde(n) codón(es) completos sin que se corra el marco de lectura. Los efectos de la proteína va a depender del residuo que se pierda, su ubicación y la conservación de éste a través de las especies. En el año 2000, Sun et al. estudiaron los efectos bioquímicos en variantes de la proteína ABCR asociados a retinopatías humanas, incluyendo 3 pequeñas deleciones sin desplazamiento del marco de lectura, encontrándose ellas principalmente en el extremo carboxilo del transportador (119). De manera interesante, la deleción delVVAIC1681, descrita por Lewis et al. en 1999, se encuentra un aminoácido adyacente a nuestra mutación (p. V1682\_V1686 del) y ambos residuos (el afectado en nuestro estudio y el afectado en el estudio de Lewis et al.) están conservados y se encuentran en el primer asa del dominio transmembranal de la proteína ABCA4. Sun et al. estudiaron la mutación reportada por Lewis et al. y estudiaron su efecto en el transportador. Ellos demostraron que esta mutación causó grandes reducciones en la cantidad de la proteína por lo cual puede tener una patogenicidad severa o funcionalidad nula (119). En nuestro paciente, esta mutación se presentó en estado heterocigoto acoplándose con un alelo complejo (p. R1443H y p. S2255I), que posiblemente tengan patogenicidad leve a moderada. Con respecto a la otra mutación (c. 4249\_4251delTTC, p. F1417del), se encuentra en un aminoácido conservado dentro del dominio ECD2, que se ha visto implicado en funciones principalmente asociados al plegamiento de la proteína (113). Nosotros desconocemos la verdadera consecuencia funcional de esta nueva mutación.

### **Mutaciones de sentido equivocado nuevas**

Se identificaron un total de 6 mutaciones de sentido equivocado nuevas (c. 723 A>T, p. E241D (DNA 1967); c. 4667 G>C, p. R1556T (DNA 2367); c. 5324 T>C, p. I1775N (DNA 1128); c. 5335 T>C, p. Y1779H (DNA 2090); c. 5824 G>C, p. P1942Q (DNA 1871); c. 6221 G>T, p. G2074V (DNA 1465) que representan un 10% dentro de todos los alelos estudiados, 20% entre el total de las variantes encontradas y un 25% de todas las mutaciones de sentido equivocado identificadas en el estudio. Lógicamente, no se puede relacionar el número y porcentaje de mutaciones nuevas en los estudios internacionales ya que éstos tienen a disminuir a través de los años por la cantidad de mutaciones identificadas hasta la fecha, aunque debemos mencionar que más del 50% de las variantes patogénicas únicamente se han descrito en una sola ocasión (117). Se debe reiterar que todas las mutaciones de sentido equivocado fueron validadas: a) utilizando 75 sujetos sanos como controles, donde ningunos de ellos presentó las variantes en estudio; b) en aquellos casos en que fue posible, se estudió la segregación de la mutación buscando el estado portador de los padres, y en casos familiares el estudio de los hermanos también afectados; c) utilizando programas in silico se analizó una predicción funcional proteica, y d) la conservación de los residuos de aminoácidos a través de las especies.

La mutación c. 723 A>T (p. E241D) afecta al exón 6 del gen ABCA4 y a un residuo conservado dentro del dominio exocitosólico 1 (ECD1) del transportador. El programa Polyphen lo analizó como un residuo conservado y el cambio como posiblemente dañino. Este residuo pertenece a un ácido glutámico (E) que es cambiado por un ácido aspártico (D) en la posición 241 de la proteína. Estos dos aminoácidos comparten cadenas laterales acídicas que son importantes para aceptar protones, y se diferencian únicamente por un carbono extra en el E. Por lo descrito anteriormente consideramos que se trata de una

mutación de sentido equivocado conservada, por lo cual consideramos que sea una mutación de baja patogenicidad en la funcionalidad de la proteína, a pesar del análisis in silico. No obstante, Sun et al. estudiando variantes en la misma región ECD1 (S206R y L541P) demostró que tenían una reducción basal de la actividad ATPasa (119). Además, Tsybovsky et al. proponen una posible función de este dominio relacionada a la interacción con otras proteínas (113).

La mutación c. 4667 G>C (p. R1556T) se encuentra dentro del exón 32 del gen *ABCA4* y afecta a un residuo altamente conservado que predice un cambio probablemente dañino (Polyphen) en el transportador. Este residuo es una arginina R en la posición 1556 de la proteína que cambia a una treonina (T). La arginina tiene una cadena relativamente largas que acaba en grupos cargados positivamente a pH neutro con un extremo contralateral guanidino, siendo al final de cuentas un aminoácido básico; por otro lado, la treonina que contiene un grupo hidroxilo alifático hace que pueda ser una molécula alifática. Por estos cambios bioquímicos consideramos que se trata de una mutación de sentido alterado no conservada con cambio de un aminoácido básico (R) por un aminoácido polar sin carga (T). Sun et al. analizaron diversos residuos con mutaciones de sentido alterados dentro del dominio ECD1, cercanos a nuestra mutación y demostraron que tenían una actividad de ATPasa disminuida moderadamente (119). Es sumamente importante mencionar que las mutaciones c. 4656 G>A (p. W1551\*) y c.4667 G>T (p. R1556T) se localizan en el exón 32 del gen *ABCA4* y para nuestro conocimiento, no hay mutaciones reportadas para la enfermedad de Stargardt ni para los fenotipos relacionados al gen *ABCA4* en este exón. La mutación c. 5324 T>C (p.I1775N) se encuentra dentro del exón 38 del gen *ABCA4* y afecta un residuo conservado que predice un cambio posiblemente dañino en el dominio transmembranal 2 (TMD2) del transportador. Este residuo es una isoleucina (I) en

la posición 1775 de la proteína que cambia por una asparragina (N). La isoleucina es un aminoácido con cadenas laterales hidrocarbonadas de gran tamaño, alifáticas e hidrofóbicas con un centro quiral adicional que le permite empaquetarse y formar estructuras compactas con pocas cavidades.; en tanto la asparragina es un derivado sin carga del aspartato que tiene una carboxamida terminal en lugar de ácido carboxílico libre. Por los cambios bioquímicos tan complejos antes mencionados consideramos a esta mutación de sentido equivocado no conservada, en la cual cambia un aminoácido no polar alifático (I) por uno polar sin carga (N). Nuestra mutación se presentó en el probando con un genotipo homocigoto y el análisis molecular de los padres demostró el estado portador de ellos. La mutación c. 5335 C>T (p. Y1779H) se encuentra dentro del exón 38 del gen ABCA4 y afecta un residuo altamente conservado que predice un cambio probablemente dañino en el TMD2 del transportador. Este residuo es una tirosina (Y) en la posición 1779 de la proteína que cambia por una histidina (H). La tirosina es un aminoácido con una cadena lateral aromática con un grupo hidroxilo reactivo; mientras que la histidina posee una cadena lateral muy polar que lo convierte en una molécula altamente hidrofílica, además contiene un grupo imidazol que es un anillo aromático que puede estar cargado positivamente. Por los cambios estructurales tan marcados consideramos que se trata de una mutación de sentido equivocado no conservada, en la cual un aminoácido con un grupo R aromático (R) cambia por un aminoácido con un grupo R cargado positivamente (H). Sun et al. al estudiar residuos derivados de mutaciones de sentido alterado en el dominio transmembranal en modelos celulares demostró que mutaciones que causan un cambio de carga en estos dominios producen de manera importante una disminución en la cantidad de proteína (119). Nuestra mutación se presentó en el probando con un genotipo homocigoto y el análisis molecular de los padres demostró el estado portador de ellos. La mutación c. 5824 G>C (p.

E1942Q) se encuentra dentro del exón 42 del gen *ABCA4* y afecta a un residuo no conservado que predice un cambio benigno en el dominio NBD2 del transportador. Este residuo es un ácido glutámico (E) en la posición 1942 de la proteína que cambia por una glutamina (Q). El ácido glutámico es un aminoácido con una cadena lateral ácida; mientras la glutamina es un derivado del ácido glutámico que tiene una carboxamida terminal en lugar de un ácido carboxílico libre. Por los cambios estructurales mínimos entre ambos aminoácidos consideramos que se trata de una mutación de sentido equivocado conservada. Sin embargo, debido a que el ácido glutámico tiene un grupo R cargado negativamente y la glutamina tiene un grupo R polar sin carga también podemos pensar que este cambio de carga pueda ser patogénico. Aunado a que la variante no se encontró en ninguno de los sujetos control también podemos pensar que la variante sea patogénica. Sun et al, analizando residuos con mutaciones de sentido equivocado con cambio de carga en el NBD2 demostró una disminución severa de la actividad ATPasa del transportador (119). La mutación c. 6221 G>T (p. G2074V) se encuentra dentro del exón 42 del gen *ABCA4* y afecta a un residuo altamente conservado que predice un cambio probablemente perjudicial en el dominio NBD2 del transportador. Este residuo es una glicina (G) en la posición 2074 de la proteína que cambia por una valina (V). La glicina es el aminoácido más sencillo que se conoce debido a que únicamente tiene como cadena lateral un hidrógeno; en tanto, la valina tiene una cadena lateral hidrocarbonada. Los dos aminoácidos son no polares alifáticos, pero la cadena lateral hidrocarbonada de la valina y su capacidad hidrofóbica podría conducir a un cambio estructural importante que cause la patogenicidad predicha in silico. Al igual que la mutación anteriormente descrita, se localiza en el NBD2, lo que sugiere que disminuye la actividad ATPasa del transportador (119).

## **PERSPECTIVAS A FUTURO DE NUESTRO ESTUDIO**

Es evidente que el análisis funcional *in vitro* será requerido para elucidar las consecuencias de los efectos singulares o combinados sobre la estructura, procesamiento y función proteica de algunas mutaciones nuevas identificadas en el gen *ABCA4* (80). Esto abrirá nuevas líneas de investigación y proporcionará conocimiento de la funcionalidad del transportador *ABCA4*.

Es importante mencionar que el exón más comúnmente afectado en esta población estudiada fue el exón 38, en el cual se identificaron 10 alelos asociados a la enfermedad (6 alelos para p. A1773V, 2 alelos para p. I1775N y 2 alelos para p. Y1779H). Nos ha llamado la atención que tres probandos de familias no relacionadas y que son originarios del Estado de México (Toluca y poblados circundantes) han presentado la mutación p. A1773V, lo que nos hace pensar en un posible efecto fundador, aunque la población debe aumentar para comprobar ese efecto. Actualmente, se encuentran en análisis otras dos familias con enfermedad de Stargardt (no relacionados con las familias ya estudiadas) y de poblados también del Estado de México, en las cercanías de Toluca y en los cuales se analizará primeramente el exón 38. Uno de los objetivos secundarios de este protocolo, tratar de definir geográficamente las variantes dentro de la república Mexicana, sobretodo en la zona centro y sur, que son los lugares de procedencia de la mayoría de pacientes que están a nuestro alcance. De esta forma los análisis moleculares del *ABCA4* para pacientes con enfermedad de Stargardt podrán ser aplicados como una herramienta para el diagnóstico preciso, pronóstico y asesoramiento adecuado a individuos afectados y sus familiares. Recientemente se ha ofrecido el examen molecular del gen *ABCA4* en el exón 38 para familiares consanguíneos con riesgo para que su descendencia presente también la enfermedad.

El delineamiento de las mutaciones en los pacientes con esta distrofia retiniana permitirá en un futuro cercano aplicar diversas tecnologías que ya se están realizando con éxito, como el diagnóstico genético preimplantación para asegurar a una pareja con la enfermedad de Stargardt o a una pareja de portadores que su generación descendiente no herede el estado homocigoto. De la misma manera, el conocimiento del espectro mutacional en los pacientes con esta enfermedad, abrirá las puertas a otros protocolos para estudiar el efecto de la terapia génica en pacientes donde ya se conoce la mutación causante de la enfermedad de Stargardt.

## CONCLUSIONES

Nuestro protocolo ha permitido identificar las mutaciones patogénicas en el gen *ABCA4* en una muestra de población Mexicana. Se han descrito cada una de las mutaciones y se ha determinado las frecuencias con respecto a alelos, genotipos, efecto en nucleótidos, efecto en la proteína, frecuencia por exón, análisis *in silico* de patogenicidad, distribución geográfica, entre otros.

Nuevas tecnologías como la secuenciación del exoma permitirán en un futuro muy cercano poder establecer el diagnóstico de manera rápida y certera, de manera que se podrá reducir el porcentaje de aquellos pacientes con enfermedad de Stargardt que no son diagnosticados con las técnicas actuales.

La identificación de las mutaciones del gen *ABCA4* causantes de la enfermedad de Stargardt en México es la base para una terapia génica adecuada. Muy pronto estarán disponibles diversos tratamientos génicos que tienen como fundamento el conocimiento de estas variantes patogénicas, por lo que el estudio realizado queda totalmente justificado.

## ANEXO 1

Cronograma de actividades												
	Marzo- abril 2010	Mayo- junio 2010	Julio- Agosto 2010	Septiembre- Octubre 2010	Noviembre- Diciembre 2010	Enero- Febrero 2011	Marzo- Abril 2011	Mayo- Junio 2011	Julio- Agosto 2011	Septiembre- Octubre 2011	Noviembre- Diciembre 2011	Enero- Febrero 2012
Selección de pacientes por criterios clínicos	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙		
Toma de muestras de sangre		⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙		
Extracción de DNA genómico		⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙		
Estandarización de la amplificación por PCR del Gen de interés		⊙	⊙	⊙								
Amplificación por PCR del Gen de interés			⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
Secuenciación automatizada del producto de PCR del Gen de interés				⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
Análisis de secuencias				⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Terminación de escritura de tesis										⊙	⊙	⊙
⊙ Trabajo realizado												



## ANEXO 2

### CARTA DE INFORMACION Y CONSENTIMIENTO

Yo (participante, padre o tutor) \_\_\_\_\_,  
declaro libremente que acepto participar de manera voluntaria en el estudio “**Análisis Molecular del gen ABCA4 en Pacientes Mexicanos con Enfermedad de Stargardt (Distrofia Retiniana Macular Juvenil)**” que se realizará en el servicio de Genética del Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana” y que estará bajo la responsabilidad del Dr. Oscar Francisco Chacón Camacho. Se me ha explicado que se requiere de la toma de una muestra de 2 mililitros de sangre venosa y que esta toma no representa ningún riesgo para mi salud más que la posible formación de un pequeño moretón en el área de la punción. Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de sangre se utilizará exclusivamente para investigar las alteraciones genéticas que produjeron mi enfermedad retiniana. También me ha sido señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en esta investigación en el momento en que yo lo desee y que esta decisión no afectaría la calidad de la atención que recibo por parte del personal de este hospital. Finalmente manifiesto que se me han respondido satisfactoriamente todas mis dudas y que los médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar las que pudieran surgir eventualmente.

Atentamente, \_\_\_\_\_ Nombre y firma

(participante, padre o tutor)

México, D.F., a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

Dirección y teléfono \_\_\_\_\_

Médico responsable \_\_\_\_\_ Nombre y firma

Teléfono del Médico responsable: 55 54 747249

Teléfono del Servicio de Genética del Instituto: 54421700 ext 3212

Testigo 1 \_\_\_\_\_ Nombre y firma

Testigo 2 \_\_\_\_\_ Nombre y firma

## REFERENCIAS

1. <http://www.ucl.ac.uk/iao/research/bird.htm>
2. Bird HC. Retinal photoreceptor dystrophies (51st Edward Jackson Memorial Lecture). *Am J Ophthalmol.* 1995; 119: 543-62.
3. Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11(3):307-16.
4. Michaelides M, Hunt M, Moore AT. The genetics of inherited macular dystrophies. *J Med Genet.* 2003; 40(9): 641-650.
5. Bird AC. X-linked retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol.* 1975; 59:177-99.
6. Wang DY, Chan WM, Tam PO, Baum L, Lam DS, Chong KK, Fan BJ, Pang CP. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2005 Jan; 351(1-2):5-16.
7. Hims MM, Diager SP, Inglehearn CF. Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol.* 2003; 37:109-25.
8. Hartong D, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 2006; 368(9549): 1795-809.
9. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1:40.
10. Hamel CP. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis.* 2007; 2:7.
11. Voo I, Small KW. Update on the genetics of macular dystrophies. *Retina.* 2004; 24(4):591-601.
12. Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jürgens K, Märker T, Wolfrum U. Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network

- provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res.* 2006; 83(1): 97-119.
13. Kremer H, van Wijk E, Märker T, Wolfrum U, Roepman R. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet.* 2006; 15 Spec No 2: R262-70.
  14. Zaghloul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest.* 2009; 119(3): 428-3.
  15. López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E CPEO and KSS differ in the percentage and location of the mtDNA deletion. *Mitochondrion.* 2009; 9(5): 314-7.
  16. Stargardt K. Über familiäre, progressive Degeneration in der Makulagegend des Auges. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1909; 71: 534-50.
  17. Rosehr K. Über den weiteren Verlauf der von Stargardt und Behr beschriebenen familiären Degeneration der Makula. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1954; 124: 171-179.
  18. Franceschetti A, Francois J. Fundus flavimaculatus. *Arch D'Ophthalmol.* 1965; 25(6): 505-30.
  19. Kaplan J, Gerber S, Larget-Piet D, Rozet JM, Dollfus H, Dufier JL, Odent S, Postel-Vinay A, Janin N, Briard ML, et al. A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. *Nat Genet.* 1993; 5(3): 308-311.
  20. Anderson KL, Baird L, Chinault AC, Otterud B, Leppert M, Lupski JR et al. A YAC contig encompassing the recessive Stargardt disease gene (STGD) on chromosome 1p. *Am J Hum Genet* 1995; 57(6): 1351-63.

21. Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Leppert M, Dean M, Lupski JR, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* 1997; 15(3): 236-246.
22. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski JR, Leppert M. Mutations of the Stargardt disease gene(ABCR) in age-related maculardegeneration. *Science* 1997; 277(5333): 1805-07.
23. Fish G, Grey R, Sehmi KS, et al. The dark choroid in posterior retinal dystrophies. *Br J Ophthalmology.* 1981; 65:359-363.
24. Hargitai J, Zernant J, Somfat G, Vamos R, Farkas A, Salaez G, Allikmets R. Correlation of clinical and genetic findings in Hungarian patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 4402-4408.
25. Simonelli F, Testa F, Zernant J, Nsti A, Rossi S, Allikmets R, Rinaldi E. Genotype-phenotype correlation in Italian with Stargardt disease. *Ophthalmic Res.* 2005; 37: 159-167.
26. Eagle RC, Lucier AC, Bernardino VB, Yanoff M. Retinal pigmento epithelial abnormalities in fundus flavicmaculatus. *Ophthalmology* 1980; 87: 1189-1200.
27. Fishman GA. Fundus flavimaculatus. A clinical classification. *Arch Ophthalmol.* 1976; 94: 2061-2067.
28. Walia S, Fishman GA. Natural history of phenotypic changes in Stargardt macular dystrophy. *Ophthalm Genet.* 2009; 68: 63-68.

29. Genead MA, Fishman GA, Stone EM, Allitnets R. The natural history of Stargardt disease with specific sequence mutation in the ABCA4 gene. *IOVS* 2009; 50: 5867-5871.
30. Klevering BJ. Retinal dystrophies caused by mutations in the ABCA4 gene. Drukkerij Quickprint te Nijmegen. 2004. Germany.
31. Mantyjarvi M, Tuppurainen K. Color vision in Stargardt's disease. *Int Ophthalmol*. 1992; 16(6): 423-8.
32. Lachapelle P, Little JM, Roy MS. The electroretinogram in Stargardt's disease and fundus flavimaculatus. *Doc Ophthalmol*. 1990; 73: 395-404.
33. Sandberg MA, Jacobson SG, Berson EL. Foveal cone electroretinograms in retinitis pigmentosa and juvenile macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1979; 88: 702-7.
34. Traboulsi EI. Genetic diseases of the eye. Oxford University Press. New York, USA. 1998. 377-380.
35. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FP. Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2000; 67: 960-966.
36. Klevering BJ, Yzer S, Rohrschneider K, Zonneveld M, Allikmets R, van den Born LI, Maugeri A, Hoyng CB, Cremers FP. Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12: 1024-1032.
37. van Driel MA, Maugeri A, Klevering BJ. ABCR unites what ophthalmologist divide. *Ophthalmic Genet*. 1998; 19: 117-22.

38. Blodi F. The pathology of central tapeto-retinal dystrophy (hereditary macular degenerations). *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1966; 70: 1047.
39. Bonin P, Passot M, Triolaire-Colton M-Th. Le signe du silence choroidien dans les degenerescences tapetoretiniennes posterieures. In: De Laey JJ, (ed.) *International Symposium on Fluorescein Angiography. Doc Ophthalmol Proc Ser* 1976; 9: 461-3.
40. Wing GL, Blanchard GC, Weiter JJ. The topography and age relationship of lipofuscin in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978; 17: 601-7.
41. Feeney-Burns L, Eldred GE. The fate of the phagosome: conversion to age pigment and impact in human retinal pigment epithelium. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1983; 103: 416-21.
42. Delori FC, Staurenghi G, Arend O, Dorey CK. In vivo measurement of lipofuscin in Stargardt's disease-fundus flavimaculatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 2327-31.
43. Anderson KL, Baird L, Lewis RA, et al. A YAC contig encompassing the recessive Stargardt disease gene (STGD) on chromosome 1p. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: 1351-63.
44. Allikmets R, Singh N, Sun H, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* 1997; 15: 236-246.
45. Bernstein PS, Tammur J, Singh N, . Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex mutation in the ELOVL4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 3331-3336.

46. Kniazeva M, Chiang MF, Morgan B, Anduze AL, Zack DJ, Han M, Zhang K. A new locus for autosomal dominant Stargardt-like disease maps to chromosome 4. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1394-99.
47. Stone EM, Brain E, Kimura AE. Clinical features of a Stargardt-like dominant progressive macular dystrophy with genetic linkage to chromosome 6q. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112:765-72.
48. Gerber S, Rozet JM, Bonneau D, Souied E, Camuzat A, Dufier JL, Amalric P, Weissenbach J, Munnich A, Kaplan J. A gene for late-onset fundus flavimaculatus with macular dystrophy maps to chromosome 1p13. *Am J Hum Genet*. 1995; 56: 396-99.
49. Kaplan J, Gerber S, Larget-Piet D, Rozet JM, Dollfus H, Dufier JL, Odent S, Postel-Vinay A, Janin N, Briard ML, et al. A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. *Nat Genet*. 1993; 5: 308-311.
50. Hoyng CB, Poppelaars F, van de Pol TJ, Kremer H, Pinckers AJ, Deutman AF, Cremers FP. Genetic fine mapping of the gene for recessive Stargardt disease. *Hum Genet*. 1996; 98: 500-504.
51. Broccardo C, Luciani MF, Chimini G. The ABCA class of mammalian transporters. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461: 395-404.
52. Luque J, Herráez A. *Biología molecular e ingeniería genética*. Harcourt; 1ª edición. Madrid, España 2001. pág: 275-284
53. Strachan T, Read A. *Human molecular genetics*. Edit. Garland Science. 4ª edición. New York, USA. Pág 276.
54. Asper ophthalmologics. ABCR gene. [www.asperophthalmologics.com](http://www.asperophthalmologics.com). Jan. 2009.

55. Nasonkin I, Illing M, Koehler MR, Schmid M, Molday RS, Weber BH. Mapping of the rod photoreceptor ABC transporter (ABCR) to 1p21-p22.1 and identification of novel mutations in Stargardt's disease. *Hum Genet.* 1998; 102: 21-26.
56. Maugeri A, van Driel MA, van de Pol DJ, Klevering BJ, van Haren FJ, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Dahl N, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FP. The 2588G→C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 1024-35.
57. Simonelli F, Testa F, de Crecchio G, Rinaldi E, Hutchinson A, Atkinson A, Dean M, D'Urso M, Allikmets R. New ABCR mutations and clinical phenotype in Italian patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 892-897.
58. Ducrop D, Shalev S, Habib A, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Three different ABCA4 mutations in the same large family with several consanguineous loops affected with autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14: 1269-1273.
59. Kitiratschky V, Grau T, Bernd A, Zrenner E, Jägle H, Renner AB, Kellner U, Rudolph G, Jacobson S, Cideciyan A, Schaich S, Kohl S, Wissinger B. ABCA4 gene analysis in patients with autosomal recessive cone and cone rod dystrophies. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16: 812-819.
60. Cideciyan A, Malgorzata S, Aleman T, Sumaroka A, Schwartz S, Roman M, Milam A, Stone E, Jacobson G. ABCA4-associated retinal degenerations spare structure and function of the human parapapillary retina. *IOVS* 2005; 46: 4739-47-46.



61. Aguirre-Lamban J, Ribeiro-Alvarez R, Maia-Lopes S, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas M, Ramos C, Ayuso C. Molecular analysis of the ABCA4 gene for reliable detection of allelic variations in Spanish patients: identification of 21 novel variants. *Br J Ophthalmol.* 2009; 93: 614-621.
62. Valverde D, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Baiget M, Carballo M, Antiñolo G, Millan J, García B, Ayuso C. Spectrum of the ABCA4 gene mutations implicated in severe retinopathies in Spanish patients. *IOVS* 2007; 48: 985-990.
63. Ernest P, Boon C, Klevering BJ, Hoefsloot L, Hoyng C. Outcome of ABCA4 microarray screening in routine clinical practice. *Mol Vis.* 2009; 15: 2841-2847.
64. Briggs C, Ricinski D, Rosenfeld P, Hirose T, Berson E, Dryja T. Mutations in ABCR (ABCA4) in patients with Stargardt macular degeneration or cone-rod degeneration. *IOVS* 2001; 42: 2229-2236.
65. Xi Q, Li X, Traboulsi E, Wang Q. Novel ABCA4 compound heterozygous mutations cause severe progressive autosomal recessive cone-rod dystrophy presenting as Stargardt disease. *Mol Vis.* 2009. 2009; 15: 638-645.
66. Roberts L, Ramesar R, Greenberg J. Clinical utility of the ABCR400 microarray. *Arch Ophthalmol.* 2009; 127: 549-554.
67. Littink KW, Koenekoop RK, Van den Born LI, Collins RW, Moruz L, Veltman JA, Roosing S, Zonneveld MN, Omar A, Darvis M, Lopez I, Kroes HY, van Genderen MM, Hoyng CB, Rohrschneider K, van Schooneveld MJ, Cremers FP, den Hollander A. Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations. *IOVS.* 2010. (Epub ahead of print).

68. Fukui T, Yamamoto S, Nakano K, Tsujikawa M, morimura H, Nishida K, Ohguro N, Fujikado T, Irifune M, Kuniyoshi K, Okada AA, Hirakata A, Miyake Y, Tano Y. ABCA4 gene mutations in Japanese with Stargardt disease and retinitis pigmentosa. IOVS 2002; 43: 2819-2824.
69. Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, WilkeR, García-Sandoval B, Cantapiedra D, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Gimenez A, Trujillo-Tiebas M, Ayuso C. Molecular analysis of ABCA4 and CRB1 genes in a Spanish family segregating both Stargardt disease and autosomal recessive retinitis pigmentosa. Mol Vis. 2008; 14: 262-267.
70. Ozgöl R, Durukan H, Turan A, Oner C, Ogüs A, Farber D. Aolecular analysis of the ABCA4 gene in Turkish patients with Stargardt disease and retinitis pigmentosa. Hum Mut. 2004; 23: 523.
71. Rozet J, Gerber S, Perrault I, Ducrop D, Souied E, Cabot A, Dufier J, Munnich A, Kaplan J. Mutations of the retinal specific ATP binding transporter gene (ABCR) in a single family segregating both autosomal recessive retinitis pigmentosa PR19 and Stargardt disease: evidence of clinical heterogeneity at this locus. J Med Genet. 1999; 36: 447-451.
72. Shastry BS. Evaluation of the common variants of the ABCA4 gene in families with Stargardt disease and autosomal recessive retinitis pigmentosa. Int J Mol Med. 2008; 21: 715.720.
73. Singh H, Jalali S, Narayanan R, Kannabiran C. genetic analysis of Indian families with autosomal recessive retinitis pigmentosa by homozygosity screening. IOVS 2009; 50: 4065-4071.

74. Allitnets R, Shroyer N, Siggh N, Seddon J, Lewis R, Bernstein P, Peiffer A, Zabriskie N, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski J, Leppert M. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCA4) in age-related macular degeneration. *Science* 1997; 277: 1805-1807.
75. Allikmets, R.; the International ABCR Screening Consortium : Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 487-491, 2000.
76. Stone EM, Webster AR, Vandenburg K, Streb LM, Hockey RR, Lotery AJ, Sheffield VC. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 1998;20: 328-9.
77. Webster AR, Héon E, Lotery AJ, Vandenburg K, Casavant TL, Oh KT, Beck G, Fishman GA, Lam BL, Levin A, Heckenlively JR, Jacobson SG, Weleber RG, Sheffield VC, Stone EM. An Analysis of allelic variation in the ABCA4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 1179-1189.
78. Rivera A, White K, Stöhr H, Steiner K, Hemmrich N, Grimm T, Jurklics B, Lorenz B, Scholl HP, Apfelstedt-Sylla E, Weber BH. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4(ABCR) gene in Stargardt disease an age related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 800-13.
79. Sheffield V, Stone EM. Genomic and the Eye. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1932-42.
80. September A, Vorster A, Ramesar R, Geenberg L. Mutation spectrum and founder chromosomes for the ABCA4 gene in South African patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis.* 2004; 45: 1705-1711.

81. Özgüi R, Durukan H, Turan A, Ögüs A, Fraber D. Molecular analysis of the ABCA4 gene in Turkish patients with Stargardt disease and retinitis pigmentosa. *Hum Mut.* 2004; 23: 523.
82. Rosenberg T, Klie F, Garred P, Schwartz M. N965S is a common ABCA4 variant in Stargardt-related retinopathies in Danish population. *Mol Vis.* 2007; 13: 1961-1969.
83. Maia-Lopes S, Aguirre-Lamban J, Castelo-Branco M, Riveiro-Alvarez R, Ayuso C, Duarte Silva E. ABCA4 mutation in Portuguese Stargardt patients: identification of new mutations and their phenotypic analysis. *Mol Vis.* 2009; 45: 584-591.
84. Sáenz de Viteri Vázquez M, Echeverría Vargas JA, Zenteno Ruíz JC. Análisis de las mutaciones responsables de la enfermedad de Stargardt en la población mexicana. XI Reunión de la Investigación Escuela de Medicina-Universidad Panamericana. 2008.
85. Lewis RA, Shroyer F, Singh N, Allikmets R, Hutchinson A, Li Y, Lupski JR, Leppert M, Dean M. Genotype/phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 422-434.
86. Valverde D, Riveiro Alvarez R, Bernal S, Jaakson K, Baiget M, Navarro R, Ayuso C. Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 gene in Spanish patients with Stargardt disease: evidence of a prevalent mutant allele. *Mol Vis.* 2006; 12: 902-8.
87. Blacharsky PA. Fundus flavimaculatus. In: Newsome DA (ed.) *Retinal Dystrophies and Degenerations*, pp. 135-159. New York:Raven Press.
88. Weleber RG. Stargardt's macular dystrophy. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112: 752-4.

89. Jaakson K, Zernant J, Klm M, Hutchinson A, Tonisson N, Glavac D, Ravnik-Glavac M, Hawlina M, Meltzer MR, Caruso RC, Testa F, Maugeri A, Hounq CB Gouras P, Simonelli F, Lewis RA, Lupski JR, Cremers FP, Allikmet R. Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. *Hum Mutat.* 2003; 22: 395-403.
90. Effert T. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Med* 2001; 1: 45-65.
91. Cole SP, Deeley RG, Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter MRP. *Bioessays* 1998; 20: 931-40.
92. Molday RS, Zhong M, Quazi F. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1791: 573-83.
93. Hwang TC, Nagel G, Nairn AC, Gadsby DC. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4698-702.
94. Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005; 6: 123-142.
95. Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762: 510-524.
96. Molday LL, Rabin AR, Molday RS. ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* 2000; 25: 257-258.

97. Mata NL, Weng J, Travis GH. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:7154-59.
98. Eldred GE, Laskey MR. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic d detergents. *Nature* 1993; 361: 724-726.
99. Kanski JJ. *Oftalmología clínica*. Edit. Elsevier. Quinta edición. Cap. 13, pág. 401-416. México, 2003.
100. Kanski JJ. *Oftalmología clínica*. Edit. Elsevier. Quinta edición. Cap. 15, pág. 507. México, 2003.
101. Kanski JJ. *Oftalmología clínica*. Edit. Elsevier. Quinta edición. Cap. 15, pág. 498-499. México, 2003.
102. Colella P, Cotuno G, Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. *Trends Mol Med*. 2009; 15: 23-31.
103. Roy K, Stein L, Kaushal S. Ocular gene therapy: an evaluation of recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy interventions for the treatment of ocular disease. *Hum Gene Ther*. 2010; 21: 915-27.
104. Kong J, Kim S, Binley K, Pata I, Doi K, Mannik J, Zernant-Rajang, Kan O, iqball S, Naylor S, Sparrow J, Gouras P, Allitnets R. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene Ther*. 2008; 15: 1311-1320.
105. Shah SN, Koozekanani DD, Kim JE. Phenotypic heterogeneity and lesión size measurements in Stargardt macular dystrophy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2009; 40: 506-12.

106. Nussbaum R, McInnes R, Huntington F, Willard H. Thompson-Thompson Genetics in medicine. Saunders; 7 edition. USA. 2007. pág. 175-182.
107. Luque J, Herráez A. Biología molecular e ingeniería genética. Harcourt;1ª edición. Madrid, España 2001. pág: 346-352.
108. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Res. 2002; 30: 3894-900.
109. Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. Trends Genet. 2000; 16: 198-200.
110. Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe III W, Kondrashov AS, Bork P. Prediction of deleterious human alleles. Hum Mol Genet. 2001; 10: 591-597.
111. Downs K, Zack D, Caruso R, Karoukis, Branham K, Yashar B, Haimann M, Trzupsek K, Meltzer M, Blain D, Richards J, Weleber R, Heckenlively J, Sieving P, Ayyagai R. Molecular testing for hereditary retinal disease as part of clinical care. Arch Ophthalmol. 2007; 125: 252-258.
112. Stenirri S, Alaimo G, Manitto M, Brancato R, Ferrari M, Cremonesi L. Are microarrays useful in the screening of ABCA4 mutations in Italian patients affected by macular degenerations. Clin Chem Lab Med. 2008; 46: 1250-1255.
113. Tsybovsky Y, Molday R, Palczewski K. ATP-binding Cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. Adv Exp. Med Biol. 2010;703:105-125.
114. Mauregi A, Flothmann K, Hemmrich N, Ingvast S, Jorge P, Paloma E, et al. The ABCA4 2588G>C Stargardt mutation: single origin and increasing frequency from South-West to North-East Europe. Eur J Hum Genet. 2002; 10: 197-203

115. Fishman GA, Farber M, Patel BS, Derlacki DJ. Visual acuity loss in patients with Stargardt's macular dystrophy. *Ophthalmology*. 1987; 94: 809-814.
116. [www.hgmd.org/](http://www.hgmd.org/)
117. Zernant J, Schubert C, Im KM, Brown CM, Fisman A, Tsang SH, Gouras P, Dean M, Allikmets R. Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing. *IOVS*. 2011; 52: 8479-8487.
118. Shroyer NF, Lweis RA, Yatsenko AN, Wensel TG, Lupski JR. Cosegregation and functional analysis of mutant ABCR (ABCA4) alleles in families that manifest both Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 2671-2678.
119. Sun H, Smallwood PM, Nathans J. Biochemical defects in ABCR protein variants associated with human retinopathies. *Nat Genet*. 2000; 26: 242-246.
120. Wiszniewski W, Zaremba CM, Yatsenko AN, Jamrich M, Wensel TG, Lewis RA, Lupski JR. ABCA4 mutations causing mislocation are found frequently in patients with severe retinal dystrophies. *Hum Mol Genet*. 2005; 14: 2769-2778.
121. Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Lopez-Martinez M, Trujillo-Tiebas M, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Ramos C, Ayuso C. Frequency of ABCA4 mutations in 278 Spanish controls: an insight into the prevalence of autosomal recessive Stargardt disease. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93: 1359-1364.
122. Gerber S, Rozet J, van de Pol, Hoyng C, Munnich A, Blankenagel A, Kaplan J, Cremers F. Complete exon-intron structure of the retine-specific ATP binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease. *Genomics* 1998; 48: 139-142.



123. Paloma E, Martínez-Mir A, Vilageliu L, González-Duarte R, Balcells S. Spectrum of ABCA4 (ABCR) gene mutations in Spanish patients with autosomal recessive macular dystrophies. *Hum Mutat.* 2001; 17: 504-510.
124. Rozet JM, Gerber S, Souied E, Perrault I, Chatelin S, Ghazi I, Leowski C, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J. Spectrum of ABCAR gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *Eur J Hum Genet.* 1998; 6: 291-5.
125. Souied EH, Ducrop D, Gerber S, Ghazi I, Rozet JM, Perrault I, Munnich A, Dufier JL, Coscas C, Soubrane G, Kaplan J. Age-related macular degeneration in grandparents of patients with Stargardt disease: genetic study. *Am J Ophthalmol.* 1999; 128: 173-178.
126. Yzer S, van der Born I, Zonneveld M, Lopez I, Ayyagari R, Teye-Botchway L, Mota-Vieira L, Cremers F, Koenekoop R. Molecular and phenotypic analysis of a family with autosomal recessive cone-rod dystrophy and Stargardt disease. *Mol Vis.* 2007; 13: 1568-72.
127. Suárez T, Biswas S, Biswas E. Biochemical defects in retina-specific human ATP binding cassette transporter nucleotide binding domain 1 mutants associated with macular degeneration. *J Biol Chem.* 2002; 277: 21759-67.
128. Aguirre-Lamban J, González-Aguilera JJ, Riveiro-Alvarez R, Cantapiedra D, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Corton M, Blanco-Kelly F, Garcia-Sandoval B, Ayuso C. Further associations between mutations and polymorphism in the ABCA4 gene: clinical implication of allelic variants and their role as protector/risk factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: 6206-12.

129. Fishman GA, Stone EM, Grover S, Derlacki DJ, Haines HL, Hockey RR. Variation of clinical expression in patients with Stargardt dystrophy and sequence variations in the ABCR gene. *Arch Ophthalmol.* 1999; 117: 504-10.
130. Kelly L, Fukushima H, Karchin R, Gow J, Chinn L, Pieper U, Segal M, Kroetz D, Sali A. Functional hot spots in human ATP-binding cassette transporter nucleotide bindings domains. *Protein Sci.* 2010; 19: 2110-21.
131. Retina International Scientific Newsletter. Mutation Database: mutations of the ATP-binding cassette transporter retina (ABCR, ABCA4) ([http://www.retina-international.org/files/sci-news/abcrmut.htm#\(25\)](http://www.retina-international.org/files/sci-news/abcrmut.htm#(25))).