



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE SIETE VARIANTES TIPO SNP  
EN PACIENTES MEXICANOS CON DEGENERACIÓN  
MACULAR RELACIONADA A LA EDAD”**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**  
P R E S E N T A :

**ADAPAULINA RAMOS PÉREZ**

DIRECTORA DE TESIS  
**M. EN C. ALEJANDRA VIRGINIA CONTRERAS**



México



2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Los Reyes Iztacala a 24 de julio de 2013

**DRA. PATRICIA D. DAVILA ARANDA**  
**DIRECTORA DE LA FES IZTACALA**  
**Presente**

Atención: Lic. Eloy González Fernández  
 Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de: **TESIS DE INVESTIGACIÓN**

Titulado **“Estudio de asociación de siete variantes tipo SNP en pacientes Mexicanos con Degeneración Macular Relacionada a la Edad”**

Que presenta el (la) pasante de Biología **ADAPaulina Ramos Perez** número de cuenta: **30481179-1** Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
DRA.	MARTHA OFELIA SALCEDO ALVAREZ		Presidente
M. EN C.	RAMON VICTOR MORENO TORRES		Vocal
M. EN C.	ALEJANDRA VIRGINIA CONTRERAS		Secretario
M. EN C.	MA. EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO		Suplente
M. EN C.	IRMA ELENA DUEÑAS GARCIA		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

**A t e n t a m e n t e**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



JEFATURA DE  
 BIOLOGÍA

JEFA DE CARRERA

**DRA. CLAUDIA TZASNA HERNANDEZ DELGADO**

Vo. Bo.

**Dra. Patricia D. Dávila Aranda**  
 Directora



## Agradecimientos

Quiero agradecer primero al Conacyt por su apoyo en este proyecto, sin el cual, nada de esto hubiera sido posible. Número: SALUD-2008-c01-87887.

Quiero agradecer al INMEGEN por abrirme sus puertas, a la Dra. Myriam Mata Sotres y a la Lic. Diana María Rodríguez por su apoyo y confianza para terminar esta tesis. A la Dra. Irma Silva Zolezzi, quien me dió la oportunidad de participar en el proyecto y muy especialmente a la Dra. Alejandra Contreras, por su disposición, entrega y enseñanza de vida.

Gracias a mis Sinodales por toda la retroalimentación, el apoyo y la presión para terminar la tesis Mtro. Ramón Moreno, Dra. Martha Salcedo, Mtra. Ma. Eugenia Heres, Mtra. Irma Dueñas.

Gracias a mis Maestros, por todo lo que me compartieron, por su vocación de enseñar, en especial a la Dra. Tzasna Hernández, Dra. Margarita Canales, Dra. Verónica Anaya, Dr. Elías Piedra, Dr. Sergio González Moreno, Dr. Martín Martínez, Dr. Cesar Flores, Dra. Sofía Solorzano, Dr. Raymundo Montoya y a la Dra. María Rosa Ávila.

La UNAM ha sido de las mejores etapas en mi vida. La atesoro muchísimo, Mi *Alma Mater* es un hogar que me cambio la vida. Gracias.

A mi mamá que significa mi vida, has sido el papel, la pluma, la tinta y la intensidad. Por tu apoyo, tu compañía, tu ejemplo de tenacidad, voluntad, responsabilidad y fuerza, por tu manera de ser y de ver la vida. Te agradezco cada palabra de regaño, cada pelea, cada rescate, cada abrazo, cada porra y cada risa. Gracias por no darte por vencida conmigo, por tu paciencia, por siempre estar, tu compañía es lo que más atesoro en la vida.. Esta tesis es para ti ma, este logro es de las dos.

Mi tita, mi alarma y la luz que me hace levantar todos los días, princesa gracias por todo lo que me das todos los días, eres un ejemplo de vida y sigo tus pasos.. Tu compañía siempre ha sido un abrazo constante. Gracias princesa por acompañarme, protegerme, escucharme, platicarme, por siempre estar.

Mis hermanos, Eric y Ricky que me sacan los ojos al igual que risas. Son los mejores que pude haber tenido. Soy quien soy mucho por lo que representan en mi vida, gracias por su apoyo, los rescates, las porras y su presencia. Los amo.

A mi papi, gracias por inculcarme el amor y la pasión por saber más y ver alto. Tu compañía y tu ausencia han sido un maestro que me ha dejado mucho crecimiento. Gracias por dejarme ser y amarme tal cual soy. Te amo.

A ti Adrian, gracias por tu compañía en este camino, por dejarme ser, tenerme fe, por tu franqueza, tu paciencia, tu amor y esa pasión con la que siempre alcanzas tus metas. Aprendo de ti a diario.

Este logro no podría existir sin mis compañeros, maestros y amigos: Faby y Ulises, llenaron esta etapa de mi vida con risas, cariño y apoyo. Faby gracias por dejarme aprender sola y guiarme cuando estaba perdida. Man tu forma de ser y tu compañía.. llenaron mi alma Gracias totales.

A dos personas que nunca han dejado de estar, que le dan estabilidad y constancia a mi vida. Chops y Lety, nos haremos viejitas juntas, son mi inversión más grande. Gracias por 25 años de verdadera amistad. Caro gracias por las risas. Las adoro a las 3.

A las familias Pérez's López, Domínguez y Osnaya por tanto cariño.

Y a las Ramos's Jaimes, Brossiere y Montelongo. A mis tias, son un pilar muy importante, gracias por tanto cariño. A todos mis primos incluyendo a los políticos. Un gracias enorme a mi abuelita, por mostrarme tan perceptiblemente que entre tanta ciencia, la magia existe.

A la familia Tovar López, por las cenas, las tradiciones, los viajes, por el apoyo, las platicas y los amigos para toda la vida. A Kabu que me dio el contacto y tuvo confianza en mi. A todos los vecinos, hermanos anexos, amigos y colados.

Gracias en especial a una pequeña continuación de mi, Sandra, hay muchos recuerdos contigo que me hacen reír hasta las lagrimas en cualquier día gris. Gracias por hacer mi Universidad los primeros semestres de la carrera, tu apoyo incondicional y leal, te quiero güerita.

A mi mocotoyo, mi hermano, mi mejor amigo, gracias por tu apoyo, por tu compañía, por las risas y por dejarme ser.

Bre, Mariana, gracias por la infinita paciencia, por la complicidad. Mayén gracias por alentarme a salir de lo cómodo y hacerme fuerte. Rosario, Ana, gracias por las carreras, el apoyo y las porras. Nuestras pláticas son oro.

Gracias bandita por tantas risas, peleas, regaños, zapes, confianza, experiencias y recuerdos Lau, Bk, Gus, Alan, Güerito, Poot, Dianita, Diana, Yoli, Yuris, Amaury, Yaneth, Aza, Lucero, Adán, etc.

Jk, gracias por ser tu, por el baile y las risas, te quiero mucho cara de arroz. Anna Sommer, Paco, los quiero mucho, es un orgullo ser más que una amiga.

A Usho, mi nena y mi pequeño Tor..

# Índice.

Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
Glosario	V
Abreviaturas	VIII
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	5
Justificación	10
Hipótesis	10
Objetivo General	11
Objetivos Particulares	11
Capítulo 1. Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE)	12
1.1 El ojo	13
1.2 Drusas	15
1.3 Tipos de DMRE	16
1.3.1 Degeneración Macular Seca	17
1.3.2 Degeneración Macular Húmeda	18
1.4 Diagnóstico	20
1.5 Factores de Riesgo	23
1.5.1 Factor genético	25
Capítulo 2. Estudios de Asociación genética	28
2.1 Estudios de Asociación Casos y controles	29
2.2 Importancia de los Estudios de asociación	30

2.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)	31
Capítulo 3. Metodología	33
3.1 Selección de muestras	33
3.2 Extracción de DNA	34
3.3 Cuantificación y preparación de placas de DNA para genotipificación	34
3.4 PCR y ensayos de genotipificación con sondas alelo específicas (TaqMan)	35
3.5 Análisis e interpretación de datos	36
Capítulo 4. Resultados	37
4.1 Frecuencia genotípica	39
4.2 Equilibrio Hardy-Weinberg	41
4.3 Asociación alélica	42
Capítulo 5. Discusión	44
Conclusiones	52
Perspectivas	54
Anexo I. Polimorfismos de una sola base o nucleótido (SNP)	55
Anexo II. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	56
Anexo III. PCR en tiempo real	58
Anexo IV. TaqMan	59
Anexo V. Discriminación Alélica	61
Anexo VI. Razón de Momios (OR)	62
Referencias	63



## Índice de figuras.

Figura 1. Anatomía del ojo humano	13
Figura 2. Capas entre la retina y la coroides	14
Figura 3. Localización de la mácula en el ojo humano	15
Figura 4. Esquema de fases de DMRE	17
Figura 5. Representación de la diferencia entre una visión normal y una visión con DMRE en etapas tempranas	18
Figura 6. Representación de la diferencia entre una visión normal y otra con DMRE húmeda	20
Figura 7. Rejilla de Amsler Grid	20
Figura 8. Angiografía Fluoresceínica	21
Figura 9. Oftalmoscopia	21
Figura 10. Etapas de PCR	57
Figura 11. Esquema de PCR tiempo real	58
Figura 12. Representación gráfica del fundamento de la técnica TaqMan	60
Figura 13. Esquema de Discriminación alélica	61

## Índice de tablas.

Tabla I. Sistema de Estadificación Clínica de Maculopatía	
Relacionada a la Edad (CARMS)	22
Tabla II. Factores de riesgo a DMRE	23
Tabla III. Criterios de inclusión y Exclusión para individuos analizados	33
Tabla IV. Caracterización de la muestra. Clasificación de	
los estados de la enfermedad basados en CARMS	37
Tabla V. Localización de SNPs	38
Tabla VI. Frecuencias genotípicas de los SNPs analizados	40
Tabla VII. Equilibrio Hardy Weinberg	41
Tabla VIII. Frecuencia y asociación alélica de los alelos estudiados	43
Tabla IX. Claves de las sondas utilizadas para cada variante	
de Applied Biosystems	60

## Glosario:

**ADN o DNA:** Acido desoxirribonucleico, biomolécula portadora de la información genética.

**Alelo:** Forma alternativa del gen o variante.

**Alelo Wild type:** Alelo ancestral o alelo más frecuente en la población.

**Aminoácido:** Moléculas pequeñas cuya composición química esta basada en un grupo “amino” y un “acido carboxílico” y que al unirse entre ellas forman cadenas largas que dan lugar a las proteínas; constituyen un grupo de 20 diferentes

**Análisis de vías:** Estudios sobre las vías metabólicas que pueden participar en la enfermedad.

**Autosomas:** Par de cromosomas homólogos

**Ceguera:** Agudeza visual inferior a 20/400 y/o un campo visual menor a 10°

**Célula diploide:** célula con dos juegos de cromosomas homólogos

**Cohortes:** Grupo de sujetos que tienen una característica común o un grupo de características que los categorizan.

**Desequilibrio de ligamiento:** Asociación de 2 alelos en *loci* ligados con mayor frecuencia de lo que cabria esperar por azar.

**Dominio:** Sitio específico del DNA que lleva a cabo una función bioquímica única.

**Drusa:** Depósitos amarillentos debajo de la retina compuesto principalmente por grasa.

**Enfermedad compleja:** Padecimientos que se originan por la suma de distintos factores ambientales y genéticos.

**Epidemiología genética:** Ciencia que estudia la etiología, la distribución y el control de las enfermedades hereditarias. Además, las causas hereditarias de las enfermedades en las poblaciones.

**Estudios de agregación familiar:** Análisis de pacientes e individuos sanos con parentesco sanguíneo para determinar mecanismo de herencia de los factores genéticos asociados a la enfermedad.

**Estudios poblacionales:** Análisis genéticos de enfermedades que padecen sujetos de una misma etnia o raza.

**Exón:** Segmentos de DNA de un gen que se transcriben y se traducen a proteínas.

**Fenotipo:** expresión “observable” del genotipo.

**Fotorreceptores:** neuronas localizadas en la retina, sensibles a la luz.

**Fóvea:** Parte central de la mácula.

**Frecuencia alélica:** proporción de las copias en la población de un alelo específico.

**Frecuencia genotípica:** proporción de la población que tiene un genotipo determinado para un *loci* específico.

**Gen:** Unidad fundamental de herencia.

**Genómica:** El estudio de la estructura, función e interacción de los genes, incluyendo sus interacciones con factores ambientales.

**Genotipo:** Constitución genética de un organismo, es decir, composición alélica del SNP o gen de estudio.

**Genotipificación:** asignación de genotipos en una muestra.

**Haplotipo:** Grupo de alelos de *loci* íntimamente ligados que lleva un individuo y que se heredan como una unidad.

**Heterocigoto:** Individuo con distintos alelos en un *locus* determinado.

**Homocigoto:** Individuo con alelos idénticos en un *locus* determinado.

**Intrón:** Porción de DNA entre regiones codificantes de un gen que se transcribe pero que no aparece en el mRNA maduro.

**Locí:** Plural de *locus*.

**Locí monomórficos:** Secuencia idéntica en los cromosomas de un *loci*.

**Locí polimórficos:** Diferentes alelos para un *locus* determinado.

**Locus:** Región específica en un cromosoma donde se localiza un gen o una variante específica.

**Mácula:** Parte central de la retina responsable de la visión central y a detalle.

**Prevalencia:** frecuencia de un factor determinado en individuos enfermos.

**Polimorfismo:** Variaciones en una posición o región específica en la secuencia de DNA que se presentan en al menos un 1% de la población.

**Primers o iniciadores:** Oligonucleótidos sintéticos complementarios al DNA molde que se busca amplificar.

**Proteína:** Molécula compuesta por uno o mas polipéptidos, formados por aminoácidos unidos covalentemente.

**Retina:** Capa interna del ojo que funciona como una tela donde se proyectan las imágenes.

**Secuenciación:** Herramienta que permite determinar el orden exacto de los nucleótidos a lo largo del DNA.

**SNP:** alelos con frecuencias del 1% o más en la población.

**Variantes comunes:** alelos con frecuencias de 5% o mayores en la población.

**Variantes raras:** alelos con frecuencias por debajo del 1% en la población.

**Visión baja:** Agudeza visual inferior a 20/70 y/o un campo visual menor a 20°

## Abreviaturas.

**A:** Adenina

**Ala:** alanina

**AREDS:** Estudio de enfermedades de los ojos relacionadas a la edad

**BrM:** Membrana de Bruch

**C:** Citosina

**CARMS:** Sistema de Estadificación Clínica de Maculopatía Relacionada a la Edad

**CFH:** Factor H del complemento

**CI:** intervalo de confianza

**CNV:** Neovascularización caroidal

**ddNTPs:** Dideoxynucleótidos

**DDs:** Diámetros de disco

**DMRE:** Degeneración macular relacionada a la edad

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dNTPs:** Deoxynucleótidos

**G:** Guanina

**GWAS:** Genome Wide Association Analysis o Estudios de Asociación de Genoma Completo.

**His:** histidina

**kb:** kilo-bases

**LD:** Desequilibrio de ligamiento

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**NO:** Nervio óptico

**OR:** odds ratio

**pb:** pares de bases

**EPR:** epitelio del pigmento retiniano

**Ser:** Serina

**SNP:** single nucleotide polymorphism o polimorfismo de un solo nucleótido

**T:** Timina

**Tyr:** tirosina

**UI:** Unidades internacionales

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

**V-PDT:** Terapia fotodinámica con Verteporfina

## Resumen.

Para la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades complejas, es necesario conocer qué factores ambientales y genéticos intervienen en su desarrollo. En este sentido, los componentes genéticos en las enfermedades complejas se han buscado ampliamente por estudios de asociación de casos y controles. Estudios en los que se identifican las diferencias significativas entre un grupo y otro para señalar posibles causantes de la enfermedad.

Para la degeneración macular asociada a la edad (DMRE), enfermedad crónica y compleja cuyo desarrollo afecta el área central de la retina (mácula), causando alteraciones que pueden llegar incluso a la pérdida total de la visión; diversos estudios de epidemiología genética además de haber evidenciado su alta heredabilidad, identificaron diversos genes asociados a la DMRE. Dentro de éstos, los que aparentemente contribuyen de una manera más importante a la enfermedad, están relacionados a la vía del complemento. Existen siete señales genéticas que han sido asociadas y replicadas a la DMRE en diversos grupos poblacionales, por lo que la presente tesis tuvo como objetivo realizar un estudio casos-controles de estas variantes genéticas (rs1410996 y rs1061170 en *CFH*, rs547154 en *C2*, rs4151667 en *CFB*, rs1047286 y rs2230199 en *C3* y de la variante rs10490924 en *ARMS2*), en un grupo de pacientes de población mexicana.

Nuestros resultados muestran asociaciones alélicas significativas en 5 de los SNPs analizados: *CFH* rs1410996  $P=3.22E-06$ , OR=1.913; *CFH* rs1061170  $P=1.8E-04$ , OR=1.95; *C3* rs2230199  $P=2.0E-04$ , OR=2.608; *C3* rs1047286  $P=4.01E-03$ , OR=2.121; y de la variante *ARMS2* rs10490924  $P=2.00E-15$ , OR=2.992. Siendo esta última la más asociada y con mayor contribución al riesgo de padecer DMRE.

## Introducción.

Los estudios de asociación genética tienen como objetivo establecer la susceptibilidad y el efecto de los distintos componentes genéticos sobre las enfermedades y sus posibles interacciones con factores ambientales.

Para la DMRE se han realizado distintos estudios de asociación genética, de segregación familiar, de gemelos y de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés); que ha evidenciado su heredabilidad, e identificado regiones cromosómicas, genes y variantes genéticas tipo SNP asociadas, resultados que se han replicado en diversos estudios y poblaciones (Swaroop *et al.*, 2007; Katta *et al.*, 2009).

La DMRE se reconoce como una enfermedad compleja multifactorial que incluye interacciones metabólicas, funcionales y factores ambientales (Seddon, *et al.*, 2005; Nowak y Jerzy, 2006; Womack *et al.*, 2012).

La importancia del componente genético en el desarrollo de la enfermedad va del 46 a 71% de concordancia en homocigotos, por debajo del 100% esperado para un comportamiento únicamente genético, pero significativamente mayor que el 19% de concordancia en heterocigotos (Thompson, *et al.*, 2004).

La DMRE es una enfermedad ocular asociada a un cuadro fenotípico clínico diverso, que coincide en la muerte de fotorreceptores en la región central de la retina (llamada mácula), provocando alteraciones que van desde visión borrosa hasta pérdida irreversible de la visión central (Swaroop, *et al.*, 2007; Jong, 2006).

Durante la última década se han hecho grandes esfuerzos conducentes a la identificación de las variantes genéticas asociadas a la enfermedad. Algunos de los primeros genes asociados codifican a proteínas de la vía alterna del complemento (*CFH*, *C2*, *CFB*, *C3*, *CFI*) y son reconocidos como los mayores participantes en la



etiología de la DMRE. Además, en diversas poblaciones se han replicado SNPs en genes como *ARMS2*, *APOE* y otros que participan en el metabolismo de lípidos. Se estima que los genes que se han identificado hasta hoy, representan aproximadamente 50% de la variación genética que participa en la patología de este padecimiento (Francis y Klein, 2011).

Por su parte, estudios poblacionales han revelado diferencias significativas tanto en la incidencia como en la prevalencia de los subtipos de la DMRE, entre los grupos de diferentes etnias y con diferentes componentes ancestrales en Estados Unidos, Europa y Australia. Sugiriendo que poblaciones caucásicas tienen mayor riesgo a desarrollar el padecimiento en comparación a las poblaciones que presentan un mayor componente ancestral Africano (Swaroop, et al., 2007).

La DMRE en su grado avanzado es la causa más común de ceguera irreversible en países desarrollados. Tiene una prevalencia que aumenta considerablemente según la edad hasta el 28% después de los 85 años de edad (Katta, et al., 2009), siendo responsable de aproximadamente 50% de los casos totales de ceguera en países como Gran Bretaña. En México, la DMRE se ubica dentro de las primeras causas de ceguera en adultos (Morales, 2008).

Se estima que en el periodo de 1980 a 2020, la población de edad avanzada aumentará en países desarrollados y en países en desarrollo 186% y 356% respectivamente (Friedman, et al., 2004; Liutkeviciene, et al., 2010). Tomando en consideración que México es un país que se encuentra en una etapa de inversión de la pirámide poblacional, el número de adultos mayores será cada vez más importante. Por tanto el estudio de la DMRE se hace un tema importante a fin de evitar el incremento en los casos de ceguera y en el deterioro de la calidad de vida que persisten como secuela de la enfermedad (Morales, 2008).

Así, considerando que: 1) los familiares de los pacientes tienen un riesgo de 2.4 a 19.8 veces mayor a padecer la enfermedad que la población general (Chen, *et al.*, 2010), 2) que la DMRE es una de las principales enfermedades oculares en México, 3) que los adultos mayores constituyen cada vez más un importante segmento de la sociedad mexicana, y 4) que por el origen mestizo de la población mexicana pueden existir valores de asociación genética con una magnitud distinta a las obtenidas en otras poblaciones anteriormente estudiadas; resulta de gran importancia diseñar estudios de asociación genética de este padecimiento en población mexicana. Los hallazgos obtenidos potencialmente podrán servir para sentar bases en el desarrollo de productos y servicios adecuados, que faciliten el diagnóstico temprano, optimicen el tratamiento y la identificación pre-sintomática, en nuestra población, y eventualmente, en otras poblaciones similares de origen mestizo.

## Antecedentes.

La DMRE fue identificada y originalmente descrita en el siglo XVIII por Pagenstecher and Genth (1875), como “Enfermedad coroido-retinal central simétrica que padecen personas de edad avanzada”, no obstante hasta ese momento sólo se conocía en su estado más severo. Diez años después Nettleship (1884) y Haab (1885) identificaron la forma seca de la enfermedad y confirmaron la húmeda (Penfold y Provis, 2005; Jong, 2006). Fué hasta un siglo más tarde en 1973, que Gass relacionó los términos “drusas familiares”, “drusas seniles”, “degeneración macular senil (forma seca)” y “degeneración macular senil disciforme (forma húmeda)”, sugiriendo que eran términos sinónimos para una misma enfermedad “heredodegenerativa”. Es entonces cuando el término “Degeneración Macular Relacionada a la Edad” es adoptado para incluir estos padecimientos generalmente sobrepuestos (Gass, 1973).

A mediados de la década de los 80's se confirmaron los primeros factores de riesgo para padecer DMRE: la edad, género, etnia, color de iris, hipertensión, masa corporal, entre otras (Liutkeviciene, *et al.*, 2010). Y si bien desde que se describió la DMRE se sugirió su heredabilidad (Hyman, *et al.*, 1983), su relación fue confirmada hasta diez años después.

Fue a finales de los 90's que diversos estudios de segregación familiar mostraron las siguientes características: a) alta concordancia fenotípica de la enfermedad entre gemelos monocigotos, b) alta incidencia de DMRE reportada en los familiares de primer grado, y c) incremento en el riesgo de los hermanos de pacientes a padecer la enfermedad de 3 a 6 veces (Swaroop, *et al.*, 2007). A partir de entonces, diversos estudios de agregación familiar (Klein, *et al.*, 1994; Silvestri, *et al.*, 1994; Seddon, *et al.*, 1997; Klaver, *et al.*, 1998) en gemelos (Meyers, *et al.*, 1995; Hammond, *et al.*, 2002), así como múltiples estudios poblacionales

(Weeks, *et al.*, 2000; Majewski, *et al.*, 2003) han demostrado que el factor genético juega un papel muy importante en la DMRE.

Se han implicado un gran número de regiones cromosómicas, las más replicadas **1q25-31** y **10q26**; y de variantes asociadas, identificadas en su mayoría a partir del análisis de genes candidatos (Jong, 2006; Haddad, *et al.*, 2006).

GWAS en diferentes poblaciones y con distintos alcances, han señalado grandes números de supuestos *loci* asociados a la DMRE, sin embargo, sólo algunos cuantos se han replicado en estudios independientes (Haddad, *et al.*, 2006). Para las variantes que muestran pobre asociación debidas a estudios de bajo poder estadístico, en el 2005 se realizó un meta-análisis donde encontraron evidencia de ligamiento en regiones previamente descritas, así como en 2p, 3p, 4q, 12q y 16q; cada una de éstas fue propuesta como candidata a contener genes que participan en la fisiopatología de la DMRE (Fisher, *et al.*, 2005). En el mismo año, Conley propuso por la relación de los genes asociados, la participación de múltiples vías en la etiología de la enfermedad, incluyendo vías de biosíntesis de ácidos grasos y del sistema del complemento (Conley, *et al.*, 2005). Hoy en día se han vinculado además, genes participantes en remodelación de la matrix extracelular y angiogénesis (Fritsche, *et al.*, 2013).

Para el 2006 se contaba con evidencia de asociación de múltiples genes a la DMRE, como lo son: *CX3CR1*, genes de la familia *HLA*, *VEGF*, *ELOVL4*, *SOD2*, *PON1*, *VLDLR*, *TLR4*, *LRP6*, *Fibulin5*, *Fabulin6* *ACE*, *CST3* y *MMP9* (Haddad, *et al.*, 2006). Otras asociaciones más definidas se han identificado en otros genes tales como *APOE*, *ABCA4* y *HMCN1*. Sin embargo, durante los últimos años en los que se ha estudiado el componente génico en la DMRE, se han identificado y replicado por diversos estudios independientes, genes específicos que poseen una señal de asociación consistente. Estos genes incluyen a la Susceptibilidad a la Maculopatía relacionada a

la edad 2 (*ARMS2*), el componente 2 del complemento (*C2*), el factor B del complemento (*CFB*), el componente 3 del complemento (*C3*) y el factor H del complemento (*CFH*) (Haddad, *et al.*, 2006; Hageman, *et al.*, 2005; Fritsche, *et al.*, 2013), siendo éste último el más estudiado.

En el 2005 se identificó y replicó en el gen de *CFH*, una variante de tipo SNP (rs1061170), que representa el cambio en una proteína (Y402H). Está fuertemente asociada con un valor de OR=7.4 (95% C.I: 2.9-19),  $P < 10E-07$ , y ha sido confirmada en al menos 12 poblaciones provenientes de distintas regiones del mundo, y en al menos 14 estudios en EUA. En múltiples trabajos se ha estimado y se propone que puede participar hasta en más de la mitad de los casos de DMRE. Sin embargo, se han encontrado frecuencias muy diferentes entre algunos grupos, Japoneses 7%, Hispanos 17%, Africanos Americanos 35%, Caucásicos 34% y Somalíes 34% (Grassi, *et al.*, 2006; Fisher, *et al.*, 2005; Klein, *et al.*, 2005; Nonyane, *et al.*, 2010). Además en poblaciones Asiáticas se ha identificado una variante intrónica muy significativa en el SNP rs1410996 también en el gen *CFH*, que ha demostrado en algunos estudios ser incluso más importante que la variante Y402H (Maller, *et al.*, 2006).

En el 2006 siguiendo la vía del complemento a la que pertenece la variante Y402H, el equipo del Laboratorio de Diversidad Genómica del Instituto Nacional de Cáncer en EUA, por primera vez encontró variantes no sinónimas de protección en *CFB* (L9H y R32Q) y *C2* ( IVS10 y E318D) asociadas a la enfermedad (Gold, *et al.*, 2006), que fueron rápidamente replicadas en cohortes Caucásicas de EUA, Australia e Inglaterra. Los SNPs rs4151667 (L9H), rs641153 (R32Q), rs547154 (IVS10) y rs9332739 (E318D), se presentaron con mayor frecuencia en controles normales y ~74% de los casos no mostraron ninguno de estos SNPs. Los alelos normales de estos cuatro *loci* confieren un riesgo para DMRE de  $P=0.0013$  y OR=1.32 (Katta, *et al.*, 2009; Gold, *et al.*, 2006; Maller, *et al.*, 2006).

La asociación de los SNPs en el gen de *C3* se analizó por dos estudios independientes en cohortes de Ingleses y de Escoceses. La variante funcional rs2230199 (R102G) se encontró mayormente asociada en los Ingleses [ $P= 5.9E-05$  OR=2.4 (95% C.I. 1.2-2.2)] (Yates, *et al.*, 2007). Esta asociación ha sido replicada en varios estudios en poblaciones de origen Europeo (Despriet, *et al.*, 2009; Francis, *et al.* 2009), aunque es importante señalar que la asociación de este SNP no fue exitosamente replicado en poblaciones Asiáticas (Pei, *et al.*, 2009; Gotoh, *et al.*, 2006). Asociado a este SNP, se ha identificado otra variante en el mismo gen, también como contribuyente al riesgo a padecer DMRE, rs1047286. Este SNP funcional cambia un aminoácido en la proteína Pro292Leu, altamente asociado en poblaciones caucásicas (Yates, *et al.*, 2007).

La segunda mayor asociación a la DMRE fue encontrada en la región **10q26** por Weeks en el año 2000 (Weeks, *et al.*, 2000) en el gen *ARMS2*, y si bien aún no se conoce qué función tiene la proteína que sintetiza este gen, se demostró la asociación del SNP rs10490924 (A69S) [ $P=2E-21$  OR=7.61 (4.90-11.82)], localizado en el exon 1 del gen *ARMS2* (Rivera, *et al.*, 2005). Esta asociación ha sido confirmada en múltiples poblaciones europeas, caucásicas, chinas y japonesas (Majewski, *et al.*, 2003; Yang, *et al.*, 2006; Yoshida, *et al.*, 2007).

En México existe poca información epidemiológica sobre DMRE (García y Bueno 2012). En 1999 se identificó como la séptima causa más frecuente de enfermedad ocular (Santos y Paczka, 1999), sin embargo, en el 2008, se ubicó dentro de las causas más importantes junto con la rinopatía diabética, las cataratas y el glaucoma (Morales, 2008).

En el 2010 con la finalidad de explorar la posibilidad de estudiar las bases genéticas de la DMRE en población mexicana, el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) realizó un estudio piloto de asociación genética por GWAS que incluyó 94 pacientes con DMRE severa, 90 controles sanos y 300 controles poblacionales

mexicanos mestizos del Proyecto de Diversidad Genómica de la Población Mexicana. Se encontraron asociaciones de las variantes rs10490924 y rs11200638 del gen *ARMS2*, relacionadas en LD al gen *HTRA1* ( $P < 4.8E-07$ ) mientras que la variante Y402H no mostró asociación significativa ( $P = 0.037$ ). El estudio piloto sugiere que en la población mexicana la variante de *ARMS2* confiere riesgo a padecer DMRE tal como se ha descrito en otras poblaciones del mundo, sin embargo las frecuencias y las contribuciones genéticas al riesgo a padecer DMRE pueden ser diferentes a las previamente identificadas en otras cohortes.

Finalmente en el 2012 se publicó un estudio realizado en el Instituto de Oftalmología “Conde de la Valenciana” en México, que incluyó la genotipificación de 7 SNPs en 159 pacientes y 152 controles. Identificaron la asociación de *ARMS2* A69S [ $P = 4E-07$  OR=3.04 (95% C.I. 2.2-4.3)], *CFH* Y402H [ $P = 1E-05$  OR=3.8 (95% C.I. 2.4-5.9)] y *CFB* R32Q [ $P = 0.01$  OR=2.5 (95% C.I. 1.1-5.7)] a DMRE (Buentello-Volante, *et al.*, 2012).

## Justificación.

Existen enfermedades que incapacitan y reducen la calidad de vida de los pacientes. La DMRE se reconoce como una de las principales causas de ceguera legal en adultos mexicanos (Morales, 2008) y la tercera causa más frecuente en el mundo (OMS, 2013) por debajo del glaucoma y de las cataratas. Es una enfermedad que puede privar de la vista a los adultos mayores, un grupo cuyo número está siendo cada vez más significativo en la población mexicana. Por lo que es importante contribuir al conocimiento genético de la patología de la DMRE, que cabe mencionar, poco se ha revisado en población mexicana.

Los estudios de asociación genética nos permiten tener un mejor entendimiento de las enfermedades complejas, y conociendo los componentes que intervienen en su desarrollo, podemos conocer vías biológicas de acción, entender su etiología y potencialmente, desarrollar terapias más apegadas y menos dañinas para su tratamiento (Phillips y Mallal, 2010).

## Hipótesis.

Las variantes genéticas tipo SNP rs1410996 y rs1061170 en *CFH*, rs1047286 y rs2230199 en *C3* y la variante rs10490924 en *ARMS2* contribuyen al riesgo de padecer DMRE; mientras que los SNPs rs547154 en *C2* y rs4151667 en *CFB* participan como variantes de protección asociadas a la DMRE en una población Mexicana.



## Objetivos.

### Objetivo General.

Realizar un estudio de asociación genética de siete variantes tipo SNP (rs1410996 y rs1061170 en *CFH*, rs547154 en *C2*, rs4151667 en *CFB*, rs1047286 y rs2230199 en *C3* y de la variante rs10490924 de *ARMS2*) en pacientes Mexicanos con DMRE.

### Objetivos Particulares.

1. Caracterizar la frecuencia de 7 variantes genéticas previamente asociadas a DMRE, mediante genotipificación por la técnica de discriminación alélica TaqMan en muestras de población Mexicana.
2. Identificar la posible asociación a la DMRE de cada variante usando una prueba de Chi cuadrada.
3. Estimar la contribución de cada SNP al riesgo (razones de momio) de desarrollar DMRE.

## Capítulo 1. Degeneración Macular Relacionada a la Edad (DMRE).

La DMRE es una enfermedad compleja, multifactorial y degenerativa que se define por la pérdida progresiva e irreversible de la visión central. Es una enfermedad que resulta de una gradual destrucción de la mácula.

Si bien se conoce poco sobre el origen de la patología, se sabe que los pacientes presentan anomalías en 4 distintos tejidos interrelacionados que sufren desgaste parcial o total, éstos son los fotorreceptores, el epitelio pigmentario de la retina (EPR), la membrana de Bruch (BrM) y la red capilar (Hendrik, *et al.*, 2007). Es importante señalar que en la región macular se encuentra una alta densidad de células y el mínimo daño es muy importante, los daños en las capas subretinales también deterioran la periferia, pero estos tienen una menor repercusión en la disminución de la agudeza visual y en la calidad de vida, porque las células afectadas son en proporción, mucho menores (Nowak y Jerzy, 2006).

En algunos casos, la DMRE avanza tan lentamente que los pacientes no perciben ningún cambio en su visión. En otros casos, la enfermedad progresa más rápidamente y puede causar ceguera legal en ambos ojos. Hoy se cuenta con 2 intervenciones clínicas disponibles: las que reducen su aceleración, que intentan retardar o prevenir la aparición de complicaciones de la atrofia geográfica (coctel de antioxidantes, vitaminas y zinc: AREDS), y las que intentan detener o revertir la neovascularización coroidal (operaciones con resultados frecuentemente temporales pues se enfocan en la destrucción de vasos sanguíneos anormales y generalmente otros pueden aparecer más tarde). Sin embargo, a pesar de las investigaciones, no se ha encontrado aún una terapia que pueda “curar” la enfermedad o revertir los daños y su curso. Es importante

señalar que los estudios sobre el padecimiento avanzan día a día por lo que se espera que en un futuro existan tratamientos más efectivos y especializados (Penfold y Provis, 2005; ncbi, 2012; Nowak y Jerzy, 2006).

Esta enfermedad es la causa principal de ceguera incorregible en personas mayores de países desarrollados. En México existen diversas enfermedades que puede sufrir el ojo, sin embargo el Consejo Mexicano de Optometría Funcional coloca a la DMRE dentro de las más importantes y frecuentes junto con la retinopatía diabética, la catarata y el glaucoma (Morales, 2008).

## 1.1 El ojo.

Está formado por tres grandes capas, de lo más externo, esclerótica, úvea o coroides y retina (Ferreruela, 2007) (Figura 1).

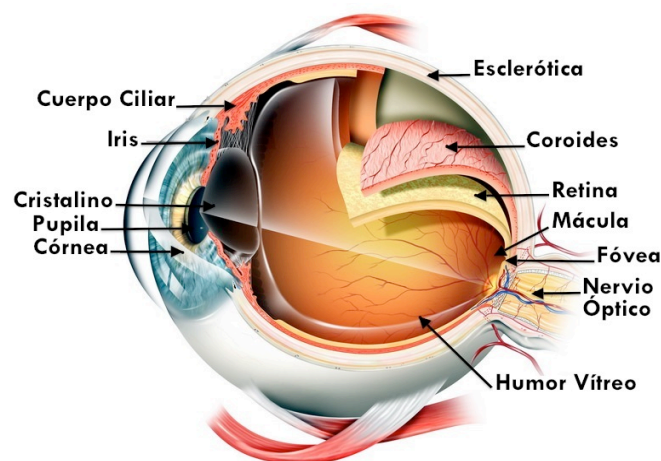
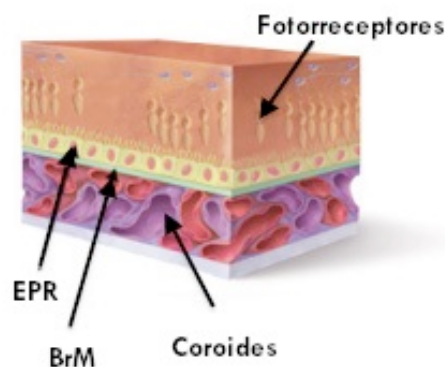


Fig 1. Anatomía del ojo humano.

La **retina** es la capa más interna y delicada del ojo, lo rodea en más del 80% (Fliesler y Bretilon, 2010). La retina madura de los vertebrados es altamente estratificada, un tejido multicelular generalmente descrito con seis tipos de células neuronales fundamentales

(fotorreceptoras, bipolares, ganglionares, horizontales, amadrinas e interplexiformes; además de células gliales) sin embargo, se ha estimado que hay cerca de 55 neuronas anatómicamente distintas en la retina de los mamíferos adultos (Fliesler y Bretillon, 2010; Jong, 2006; Ferreruela, 2007).

Hacia la superficie externa de la retina está una capa de tejido llamado **epitelio pigmentario de la retina** (EPR). El EPR (Figura 2) es una importante vía por donde pasan los nutrientes que van de la coroides a la retina, así como los productos de desecho en dirección contraria. El EPR posee 10 funciones conocidas más, donde resaltan la formación y el mantenimiento de las matrices extracelulares, el transporte de fluidos, la fagocitosis, la oxigenación y otros iones; entre los fotorreceptores y la red coriocapilar (Ferreruela, 2007; Fliesler y Bretillon, 2010; Jong, 2006).



**Fig 2. Capas entre la Retina y la Coroides.**

Explicación en el texto: EPR- Epitelio Pigmentario de la Retina; BrM- Membrana de Brunch.

Detrás de la EPR, se encuentra la **membrana de Brunch** (BrM; figura 2). Esta capa mantiene una carga negativa que obstaculiza el paso de macromoléculas cargadas positivamente (Jong, 2006; Fliesler y Bretillon, 2010).

En la retina resalta un área que posee el mayor número de receptores y es por ello, la más especializada en detectar colores y detalles finos, es conocida como **mácula** (Figura 3). Es responsable de la agudeza visual y está justo en el centro de la retina

ocupando un área menor al 10% de la retina entera. La mácula está compuesta por células muy unidas y sensibles llamadas bastones (utilizados para la visión periférica y con poca luz) y conos (células responsables de la visión a color y principalmente necesarios para la visión central) (Fliesler y Bretilon, 2010; Ferreruela, 2007).



**Fig 3. Localización de la mácula en el ojo humano.**

Explicación en el texto: NO- Nervio Óptico.

## 1.2 Drusas.

Las drusas forman parte de un envejecimiento normal de las personas y continuamente son asociadas a distintas enfermedades coroidoretinales. Sin embargo los oftalmólogos concuerdan que son la primera señal clínica inminente de padecer DMRE, y que el número y el tamaño de ellas, son factores de riesgo comunes e indispensables para el desarrollo de esta patología y para su evolución de estados tempranos a estados más avanzados (Katta, et al., 2009; Bok, 2002).

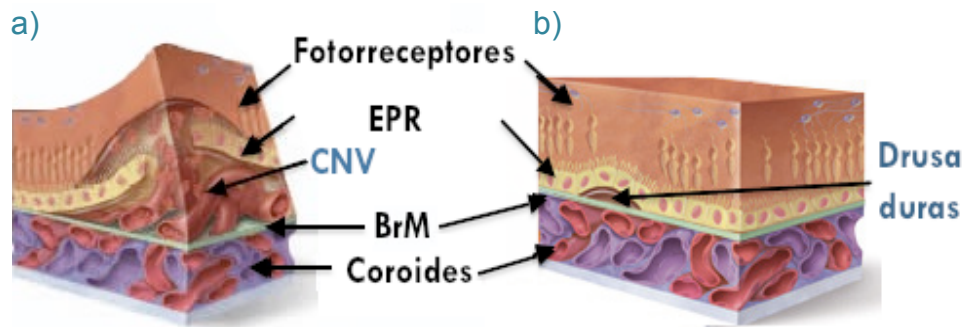
Las drusas son depósitos patológicos de desecho amarillentos que se localizan debajo de la retina entre el EPR y la BrM (Figura 4b; 9b y 9c), sólo visibles cuando sobrepasan los 25 $\mu$ m de diámetro (Katta, et al., 2009; Jong, 2006; Liutkeviciene, et al., 2010).

En general las drusas contienen fosfolípidos, triglicéridos, colesterol, ésteres, apolipoproteínas, inmunoglobulinas, algunos factores de la vía del complemento y otros compuestos que aun no han sido caracterizados en su totalidad (Abdelsalam, *et al.*, 1999; Liutkeviciene, *et al.*, 2010; Van der Schaft, *et al.*, 1933; Kliffen, *et al.*, 1997; Green, 1999).

Una teoría sobre el origen celular de las drusas propone un origen vascular asociada a la red coriocapilar y algún tipo de dificultad para que los desechos lleguen a éste. Otra, que su origen es gracias a un mal funcionamiento del EPR, se propone que las drusas encapsulen entre otras cosas, a células mal digeridas. Muchas de las sustancias identificadas en las drusas han sido encontradas dentro de las mismas que son expresadas por el EPR, otras incluyen componentes del sistema del complemento y otras son producidas en la cascada de otras respuestas inmunes. Por lo que también se ha sugerido que una probable inflamación después de un daño (ya sea por alguna mutación genética, un daño oxidativo o una acumulación de desecho) en el EPR, sea el origen de las estructuras (Bok, 2002).

### **1.3 Tipos de DMRE.**

En el envejecimiento normal o natural de las personas hay cambios en estructuras del ojo como: la disminución del número de fotorreceptores, cambios en la pigmentación del EPR y acumulación de depósitos laminares basales por debajo del EPR, el crecimiento de drusas, el aumento de grosor de BrM (lo que ocasiona menor espacio intercapilar y alineaciones irregulares en las células del EPR), entre otros.



**Fig 4. Esquema de fases de DMRE. a) DMRE húmeda; b) DMRE seca.** Explicación en el texto: EPR- Epitelio Pigmentario de la Retina; BrM- Membrana de Brunch; CNV- Neovascularización coroidal.

Sin embargo en la DMRE, estos cambios graduales cuando son anormales, se asocian a características patológicas severas que tienen distintos estados de gravedad; van desde visión borrosa en etapas tempranas hasta ceguera legal en etapas más avanzadas. Generalmente la DMRE se divide en dos formas llamadas la forma seca o atrofia coroidal (figura 2.1.b) y la forma húmeda o neovascular (Figura 4a y 4b) (Katta, et al., 2009).

### 1.3.1 Degeneración Macular Seca.

Etapas tempranas de la DMRE comienzan con el deterioro gradual de las células sensibles a la luz de la mácula y del EPR especialmente con el desarrollo de un número importante de drusas ( $\leq 10$ ) (Figuras 4b, 8b). Éstas interfieren con el metabolismo del oxígeno, lo que lleva a la degeneración de los fotorreceptores, seguido de una atrofia profunda y extensa del EPR, provocando su adelgazamiento; junto con la superposición de células fotorreceptoras (suceso llamado **atrofia geográfica**), lo que ocasiona hipo o hiperpigmentación de la retina; y angiogénesis aberrante de la coroides (Jong, 2006).

A esta etapa también se le conoce como no-neovascular o no-exudativa afecta a la mayor parte de los pacientes (80-90%) con diferentes grados de severidad, es importante señalar que puede sólo desarrollarse en uno de los ojos o bien, presentarse en cada ojo con diferente grado de gravedad (Jong, 2006; Nowak y Jerzy, 2006).

En muchas ocasiones, al comienzo de la enfermedad los síntomas pasan desapercibidos, gracias a la compensación de la buena visión del ojo opuesto, o bien, el paciente los atribuye a otras patologías como las cataratas.

La DMRE puede comenzar con síntomas como visión borrosa, los objetos en la visión central lucen distorsionados y opacos, necesidad de mayor iluminación. Se puede tener dificultad para leer o distinguir detalles, se comienza a percibir una mancha borrosa en el centro de la visión (Figura 5) que paulatinamente se vuelve más grande y grisácea (Nowak y Jerzy, 2006).



**Fig 5. Representación de la diferencia entre una visión normal y una visión con DMRE en etapas tempranas.** La imagen de la izquierda muestra cómo vería una persona sana. La imagen a la derecha, representa cómo vería una persona con DMRE en etapas tempranas.

### 1.3.2 Degeneración Macular Húmeda.

La DMRE húmeda también es conocida como neovascular o exudativa. Es más severa que la seca y la padecen 10 a 20% de los pacientes, de los cuales el 90% sufre



pérdida de la visión causada principalmente por la neovascularización de la coroides (Liutkeviciene, *et al.*, 2010; Nowak y Jerzy, 2006).

Debido al crecimiento de las drusas y al daño causado en las capas sub-retinales, hay inflamación en distintas capas que causan a su vez, hipoxia; la hipoxia entre muchas consecuencias, trae consigo la mala regulación de diversas moléculas. La DMRE húmeda, comienza cuando vasos sanguíneos mal formados comienzan a crecer por debajo de la mácula, estos tienden a ser frágiles, frecuentemente se dañan y esto provoca un goteo de sangre o una hemorragia (Liutkeviciene, *et al.*, 2010; Nowak y Jerzy, 2006). La hemorragia generalmente empieza separando la BrM y el EPR (Figura 4a), lo que provoca que se corrompa el delicado arreglo y distribución de los fotorreceptores (el desarrollo de la atrofia geográfica es mucho mayor) y se traduce en una imagen distorsionada llamada **metamorfopsia** (primer síntoma de la DMRE húmeda). Los vasos sanguíneos nuevos, tienden a crecer hacia la fovea. Las hemorragias llegan a causar procesos de cicatrización intra o subretinales en el área de la mácula dañándola irreversiblemente y puede haber desprendimiento o rompimiento del EPR o de la retina neurosensorial (Jong, 2006; Nowak, *et al.*, 2006).

El daño producido hace que se perciban las líneas rectas, torcidas y onduladas, aparece una mancha cada vez mas grande y oscura en el centro de la visión (Figura 6), los objetos pueden parecer más pequeños y lejanos y puede causar ceguera legal (capacidad visual  $\leq 0.1$ , 6/60) después de algunos meses de diagnosticada.

En cambio, la ceguera legal provocada por la forma seca, podría tardar años, o bien, nunca suceder; cuando sólo está afectada la mácula, el paciente podría tener una visión periférica suficiente para mantener una vida muy similar a la que siempre llevó.



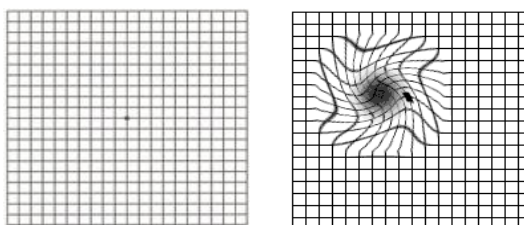
**Fig 6. Representación de la diferencia de visión entre una persona normal y otra con DMRE húmeda.** La imagen de la izquierda muestra cómo vería una persona sana. La imagen a la derecha, representa cómo vería una persona con DMRE avanzada.

## 1.4 Diagnóstico.

La mejor manera de detectar la DMRE de manera temprana es haciendo exámenes periódicos del ojo.

Además de la prueba de agudeza visual, los exámenes para detectar esta patología son muy completos y minuciosos, incluyen:

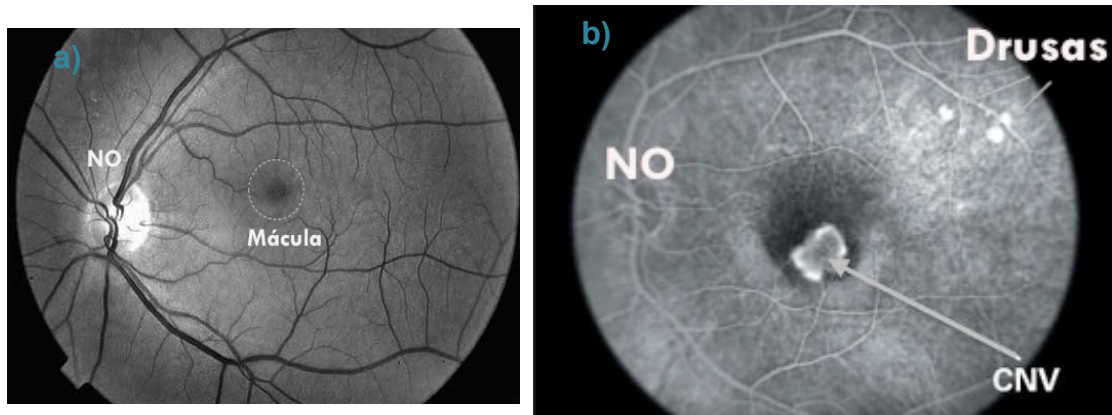
» Prueba de **Rejilla Amsler grid**. Consiste en observar el punto negro que se encuentra en medio una rejilla (parecida a un tablero de ajedrez; Figura 7) con un ojo tapado, esto se utiliza para notar si el paciente puede observar la rejilla sin que las líneas se distorsionen o desaparezcan.



**Fig 7. Rejilla de Amsler Grid.** La rejilla izquierda muestra cómo la vería una persona sana. La rejilla derecha sin en cambio, representa cómo la vería una persona con DMRE.

» Examen de **tonometría**. Mide la presión dentro del ojo.

» **Angiografía fluoresceínica.** Permite detectar derrames y goteos y confirmar DMRE húmeda (Figura 8).

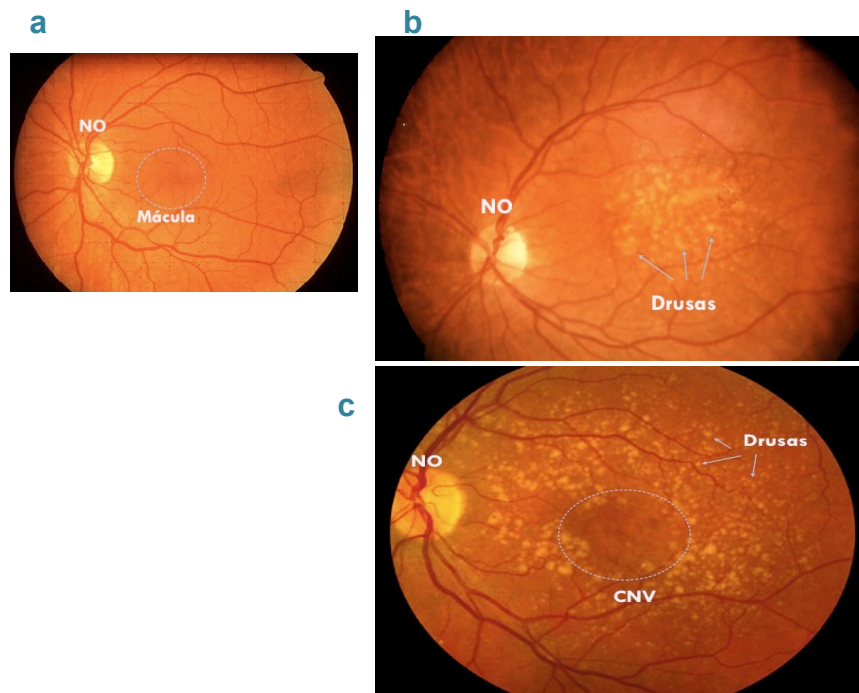


**Fig 8. Angiografía Fluoresceínica.**

a) Muestra una fotografía de un ojo normal; b) Muestra de una fotografía de ojo con DMRE húmeda. NO- Nervio Ocular; CNV- Neovascularización corooidal.

» **Foto de autofluorescencia.** Se utiliza para determinar el alcance y/o aumento de la superficie de la atrofia geográfica en pacientes con DMRE.

» **Oftalmoscopia o fondo de ojo.** Se buscan drusas a través de una fotografía del fondo del ojo (Figura 9.).



**Fig 9. Oftalmoscopia.** a) ojo normal; b) ojo con DMRE seca; c) ojo con DMRE húmeda.

Explicación en el texto: NO- Nervio Óptico; CNV- Neovascularización corooidal.

El sistema más utilizado para la clasificación del fenotipo está basado en el estudio de Enfermedades Oculares Relacionadas a la Edad (AREDS por sus siglas en inglés), llamado Sistema de Estadificación Clínica de Maculopatía Relacionada a la edad (CARMS por sus siglas en inglés) que clasifica a la enfermedad en 5 categorías (Tabla I), donde las primeras cuatro, corresponden a la etapa seca y la última, a la etapa húmeda de la enfermedad (Seddon, et al., 2006).

**Tabla I. Sistema de Estadificación Clínica de Maculopatía Relacionada a la Edad (CARMS).**

<b>Grado de maculopatía</b>	<b>Características clínicas</b>
<b>1</b>	Sin drusas o <10 drusas pequeñas (<63µm de diámetro localizadas dentro de 2DDs del centro de la mácula) sin alteraciones de pigmento.
<b>2</b>	Aprox. ≥10 drusas pequeñas o <15 drusas medianas (≥63µm pero <125 µm localizadas dentro de 2DDs del centro de la mácula) o alteraciones de pigmento asociadas con DMRE. a) Drusas b) Cambios en el EPR como hipo o hiperpigmentación c) Ambas.
<b>3</b>	Aprox ≥15 drusas medianas o cualquier drusa grande (≥125µm localizada dentro de 2 DDs del centro de la mácula) a) Sin desprendimiento del EPR drusenoidal (drusas suaves confluentes ≥500µm) b) Con desprendimiento EPR drusenoidal.
<b>4</b>	Atrofia geográfica que involucra el centro de la mácula o atrofia geográfica no central de al menos 350µm

5

DMRE exudativa, incluyendo desprendimiento del EPR no drusenoide, desprendimientos de retina serosos o hemorrágicos, MNVC con hemorragia sub-retina o sub EPR o fibrosis o cicatrices consistentes con tratamiento de DMRE  
a) Desprendimiento del EPR seroso con MNVC  
b) MNVC o cicatriz disiforme

Explicación en el texto: DDs: Diámetros de disco; EPR: Epitelio Pigmentario de la Retina; MNVC: Membrana neovascular Coroidal

## 1.5 Factores de Riesgo.

Para la DMRE el factor más importante conocido es la edad. Otros validados en estudios epidemiológicos incluyen enfermedades sistémicas como la hipertensión y enfermedades cardiovasculares entre otras; hábitos como el fumar, alcoholismo y dieta. Se han propuesto otros factores como la exposición a la luz solar, el color de iris y padecer de cataratas (Liutkeviciene, et al., 2010).

A continuación (Tabla II) se describen con mayor detalle los factores ambientales de riesgo comúnmente tomados en cuenta (los factores genéticos son revisados más adelante).

**Tabla II. Factores de Riesgo a DMRE.**

(Liutkeviciene, et al., 2010; Katta, et al., 2009; Chen, et al., 2010).

<b>Factores de Riesgo</b>	<b>Impacto</b>
<b>Edad</b>	Es el principal factor de riesgo, mientras más grande es el individuo, el riesgo a padecer DMRE aumenta (10% de 66 a 74 años, llegando a 30% en pacientes entre 75 y 85 años).

<b>Predisposición familiar</b>	Los familiares de pacientes con DMRE, tienen un riesgo de 2.4 a 19.8 veces mayor a padecer la enfermedad que la población general. Se estima una heredabilidad de 46-71%
<b>Origen étnico</b>	Se ha demostrado que personas de origen caucásico tienen mayor predisposición a la DMRE que personas de origen negro o asiático.
<b>Fumar</b>	Incrementa el riesgo hasta 2 veces, ya sea por la cantidad de cigarros o por el tiempo que se ha mantenido el hábito. Puede provocar el inicio de la enfermedad de 5 a 10 años antes que en los no fumadores.
<b>Hipertensión Arterial</b>	La presión sanguínea alta aumenta 1.5 las probabilidades de padecer la DMRE húmeda.
<b>Masa corporal</b>	En personas obesas, i.e. con un $IMC > 30 \text{Kg/m}^2$ el riesgo a desarrollar DMRE es 2.35 (95% C.I. 1.27-4.34), comparadas con personas con un $IMC < 25 \text{kg/m}^2$
<b>Dieta</b>	El consumo excesivo de grasas saturadas, particularmente la animal, incrementa en un 80% el riesgo a padecer DMRE.
<b>Estrés Oxidativo</b>	Se cree que los lisosomas del EPR acumulan moléculas pro-oxidativas que pueden ser responsables de la reducción de la velocidad de "digestión" del EPR, y por consiguiente aumenta el riesgo a DMRE.
<b>Antioxidantes</b>	Bajos niveles de vitaminas C y E así como carotenoides y zinc influyen en el desarrollo de DMRE.
<b>DMRE en un ojo</b>	Si se tiene DMRE en un ojo, se incrementa el riesgo de desarrollarla en el otro ojo en 87%. En el 87% de los casos se presentan las lesiones en un periodo de 4 años.
<b>Otros</b>	Diabetes, artritis, enfermedades respiratorias, gota, alcohol, cafeína, terapia de reemplazo hormonal.

### 1.5.1 Factor genético

Existen más de 20 genes y más de 30 SNPs asociados a la DMRE. Incluso en estudios recientes, aún se han identificado nuevos *loci* asociados (Ryu, *et al.*, 2010). Dos de los *loci* más estudiados por sus altas frecuencias (encontrados en alrededor del 50% de los pacientes) fueron encontrados independientemente por diversos estudios de ligamiento y de genoma completo en el año 2005 (Klein, *et al.*, 2005; DeWan, *et al.*, 2006). Uno de estos *loci* se localiza en la región **1q31**, el segundo en la región **10q26** e involucra dos genes: *ARMS2* (*Age-Related Aaculopathy Susceptibility 2*) y *HTRA1* (*High- Temperature Required Factor A1*); ambas regiones con otros *loci* asociados.

La primera región incluye al Factor H del complemento (**CFH**) y a los 5 genes Relacionados a *CFH* o por sus siglas *CFHRs* (**CFHR1-CFHR5**) (Hendrik, *et al.*, 2007). La proteína de *CFH* es esencial para mantener la homeostasis del sistema del complemento y restringir la acción en fluidos y en superficies celulares, acelera además, el decaimiento de la vía alterna de complemento. En el gen *CFH* numerosos y relevantes SNPs han sido identificados tanto en la región promotora (rs3753394) como en regiones codificantes (exón 2, rs800292 I62V) e intrónicas (entre el exón 15 rs380390 y el 16 rs1329428) (Li, *et al.*, 2006). La variante tipo SNP que en un principio se presentó como la más importante por su frecuencia y participación en la enfermedad, es el SNP rs1061170, localizado en el exón 9, que a nivel proteínico se traduce en el cambio de una tirosina (Y) por una histidina (H) en el aminoácido 402, incrementando el riesgo de 2 a 4 veces para pacientes heterocigotos y de 3 a 7 veces para pacientes homocigotos (Chen, *et al.*, 2006; Hageman, *et al.*, 2006; Despriet *et al.*, 2006; Rodríguez y Goicoechea, 2008).

Otra asociación en *CFH* que recientemente ha demostrado una participación

importante en la patología, es una variante sinónima tipo SNP en el intrón 14, rs1410996 (Li, *et al.*, 2006; Maller, *et al.*, 2006) que aumenta el riesgo a padecer DMRE 1.8 veces para heterocigotos y 6.6 veces para homocigotos (Bergeron, *et al.*, 2009). Ésta variante se ha replicado en múltiples estudios y se ha encontrado en algunos, aún más asociada que la variante rs1061170 (Maller, *et al.*, 2006).

Otros genes involucrados en el sistema del complemento, son el componente 2 (**C2**) activador de la vía clásica y el factor B (**CFB**), activador de la vía alterna del complemento, se encuentran localizados el cromosoma **6p21** separados sólo por 500 pb dentro del complejo de histocompatibilidad clase III. Tienen variantes asociadas a la DMRE, como: rs547154 (IVS10) y rs4151667 (L9H) respectivamente. En ambos casos, se han asociado dando protección contra la DMRE, en caucásicos han sido asociadas con una  $P=1.3E-07$  y  $P=2E-04$  respectivamente (Maller, *et al.*, 2006).

El gen del componente 3 (**C3**) en el cromosoma **19p13**, también está involucrado en el sistema del complemento, su proteína es activadora de la vía clásica y alterna del complemento. Posee dos polimorfismos en LD, se encuentran asociados al riesgo a padecer DMRE. El rs2230199 resulta en un cambio de aminoácido de arginina (R) por glicina (G) en la posición 102, duplica el riesgo para pacientes heterocigotos y lo triplica para pacientes homocigotos y rs1047286 quien modifica al aminoácido 314 de una prolina a una leucina (Pencer, *et al.*, 2008; Katta, *et al.*, 2009; Hendrik, *et al.*, 2007; Zerbib, *et al.*, 2010).

El segundo locus claramente asociado a la DMRE, está ubicado en la región **10q26** que incluye dos genes. **ARMS2** (originalmente llamado LOC387715) posee un SNP asociado en el exón 1 (rs10490924) que se estima, incrementa el riesgo a DMRE 2.6 veces para heterocigotos y 7.0 para homocigotos (Rivera, *et al.*, 2005).



Corresponde a un cambio de alanina (A) por serina (S) en la posición 69 de la proteína. Otro grupo atribuye la señal de asociación en esta región a otro gen río abajo de *ARMS2*, el gen ***HTRA1***, en el SNP rs11200638 en la región promotora que afecta la expresión de la proteína, serina proteasa, codificada por este gen (DeWan, *et al.*, 2006). Estos dos genes se encuentran en DL y sus posibles efectos son indistinguibles en los análisis estadísticos de asociación (Jakobsdottir, *et al.*, 2005; Katta, *et al.*, 2009).

Se ha observado en los distintos estudios realizados, que la importancia de los SNPs asociados, varía en los diferentes grupos poblacionales (Flores-Alfaro, *et al.*, 2012). Por ejemplo en el caso de las variantes genéticas relacionadas a la DMRE, los SNPs *CFH* rs1061170, *C2* rs547154 y *CFB* rs4151667 están ampliamente distribuidos en Caucásicos, no así en poblaciones Asiáticas. Por el contrario, el SNP *ARMS2* rs10490924 es más frecuente en poblaciones Asiáticas que en Caucásicas (Chantaren, *et al.*, 2012; Lee, *et al.*, 2008).

## Capítulo 2. Estudios de Asociación genética.

En la mayor parte del genoma, los *loci* son monomórficos para todos los humanos, sin embargo existen algunos *loci* polimórficos (en los que existe más de un posible alelo o variante para el mismo locus y está distribuido en por lo menos 1% de la población), dados por mutaciones mantenidas a lo largo del tiempo (variaciones dadas al azar). La mayoría de estos *loci* polimórficos únicamente son bialélicos (hay 2 bases posibles en el sitio de interés dentro de un gen), así, el genotipo del individuo estará determinado por la combinación de ambos alelos (denominados “a” –el alelo *wild type*, silvestre o más común- y “A” -alelo menos frecuente-), por lo tanto habrán 3 posibles genotipos: “AA” homocigoto para el alelo menos frecuente, “Aa” heterocigoto y “aa” homocigoto para el alelo silvestre (Martínez, 2011).

Ahora, la variante (alelo) puede o no producir un cambio en el fenotipo del individuo (mutaciones neutrales). En el contexto de los estudios de asociación genética, el fenotipo se refiere a si un individuo está o no afectado por una determinada enfermedad. Por lo que si un individuo posee el alelo que participa en el desarrollo de una enfermedad, podría entonces, desarrollar el fenotipo con la patología (Martínez, 2011).

Para identificar él o los *loci* que participan en el desarrollo de una enfermedad, se utilizan **los estudios de asociación**, que además permiten, la caracterización de estas variantes y valorar las complejas relaciones que tienen con su entorno genético y con los factores ambientales (Martínez, 2011; Flores-Alfaro, *et al.*, 2012).

Existen enfermedades que están definidas por una única mutación (monogénicas) y que presentan un modelo de herencia simple, a estas enfermedades se les llama **enfermedades mendelianas**. Por lo general presentan frecuencias bajas en la mayoría de las poblaciones, además presentan un espectro alélico complejo, es decir,

múltiples mutaciones en un único gen pueden provocar el mismo fenotipo, cada una de ellas es altamente penetrante (cada variante puede o casi puede, causar el fenotipo final por sí sola) (Martínez, 2011). Ejemplo de este tipo de enfermedades son la anemia falciforme, la fibrosis quística, fenilcetonuria y la enfermedad de Huntington.

Las **enfermedades complejas** en cambio, están causadas por la acción de múltiples *loci* y no muestran una herencia mendeliana. Ningún gen o variante genética podría por sí sola causar la patología, cada una tiene su contribución y cada uno de estos *loci* puede interactuar entre sí y a su vez, interactuar con la acción y la interacción de los factores ambientales, todos ellos determinan el fenotipo final (Martínez, 2011; Hirschhorn, 2005).

Ejemplos de este tipo de enfermedades son la diabetes, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, DMRE, etc.

## 2.1 Estudios de asociación de casos y controles.

Los principales diseños utilizados en estudios de asociación genética son de cohorte, transversales, basados en familias y de casos y controles (Flores-Alfaro, *et al.*, 2012). El presente estudio se realizó bajo diseño de casos y controles, por lo que a continuación se dará una explicación detallada sobre éste.

**Diseño de casos y controles:** Estos estudios son ampliamente utilizados para evaluar asociaciones entre las variantes, los genes candidato y las enfermedades complejas ya que dan información sólida sobre factores de riesgo ambientales y genéticos, aún cuando ya ha ocurrido la enfermedad (Flores-Alfaro, *et al.*, 2012; Hirschhorn, 2005).

Al elegir controles que no están relacionados genéticamente dentro de una población, se obtiene mayor eficacia estadística que otros modelos, permiten analizar

asociaciones de múltiples genes con la enfermedad y el análisis de datos es más sencillo que otros modelos (Flores-Alfaro, *et al.*, 2012).

Una pieza clave para el aumento del poder estadístico de un estudio, es la correcta selección del fenotipo de la enfermedad y de la muestra representativa de los controles, esto para evitar crear sesgos en la muestra y reducir errores tipo I. (Rodríguez, *et al.*, 2009).

Para diseñar un estudio de asociación genética cuando se busca identificar a las primeras variantes relacionadas a una enfermedad, se puede elegir entre **estudios de genes candidatos**, donde se analizan los genes sobre los que se ha hecho una hipótesis *a priori* acerca de la funcionalidad, creada por una evidencia experimental que visualiza una ruta biológica que puede estar involucrada en el desarrollo de una enfermedad; y **estudios de asociación de genoma completo** (GWAS), en los que no hay hipótesis previa. Se emplean chips que a través de distintas plataformas, genotifican parte del genoma, con cobertura de 500k a varios millones de SNPs. El genoma humano posee aproximadamente  $3E+10^9$  bases, si se utiliza el DL, se puede capturar gran parte de la variabilidad del genoma (Rodríguez, *et al.*, 2009; Bourgain *et al.*, 2007).

## 2.2 Importancia de los estudios de asociación.

Los estudios de asociación genética nos permiten identificar variantes asociadas a enfermedades y su participación en ella, una vez que esto se realiza, se abren diversos caminos para el uso de la información. Si el efecto de la variante genética sobre la enfermedad, es suficientemente fuerte, tal vez en combinación con el estilo de vida y/o factores ambientales, se podría predecir el riesgo o protección que otorga el poseer la variante, a padecer o no esa enfermedad en específico. Paralelamente, la

asociación de las variantes podría ser utilizada para intentar predecir la respuesta a un medicamento determinado.

Y si el efecto de la variante sobre la enfermedad no es muy significativo en términos de importancia, y por lo tanto no muy útil para los propósitos antes mencionados, la información podría ser usada para identificar genes asociados, o bien, para identificar vías genéticas que podrían contribuir a la caracterización de la fisiopatología de la enfermedad; lo que implicaría vislumbrar nuevas terapias más especializadas, personalizadas y menos tóxicas (Need y Goldstein, 2010; Phillips y Mallal, 2010).

## 2.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

El principio de Hardy-Weinberg, desarrollado por el matemático inglés G.H. Hardy y el físico alemán Wilhelm Weinberg, propone que el proceso de la herencia, por si mismo, no cambia ni las frecuencias alélicas ni las frecuencias genotípicas de un *locus* determinado a pesar de las generaciones. Establece la relación entre estas frecuencias en una población bajo los siguientes supuestos: la población debe ser suficientemente grande que pueda ser tratada como infinita, con apareamiento al azar, sin selección natural, mutación o migración, además, excluye caracteres que se distribuyen de forma diferente de acuerdo al sexo (Martínez, 2011; Engels, 2009).

Bajo estos términos, si se considera un locus con dos alelos "A" y "a" con frecuencias alélicas p y q respectivamente,  $p=1-q$  (pues la suma de las frecuencias alélicas siempre debe ser igual a 1 o al 100%). Y por lo tanto, las frecuencias genotípicas de los posibles genotipos AA, Aa y aa son:  $p^2 + 2pq + q^2 =1$  respectivamente, se comportan como el binomio de Newton (Engels, 2009; Martínez, 2011).

Estas frecuencias siempre serán las mismas generación tras generación si se cumplen las condiciones arriba descritas. En caso de darse una alteración de las condiciones y de las frecuencias, éstas restablecerán el equilibrio después de una generación con cruzamientos aleatorios (Martínez, 2011; Wei Guo y Thompson 1992).

Entonces, para comprobar si los alelos están en EHW se comparan las frecuencias esperadas (las obtenidas por el modelo) con las observadas (obtenidas experimentalmente) empleando diferentes estadísticos (frecuentemente la prueba de  $X^2$  o chi cuadrada), para determinar si las frecuencias observadas son distintas significativamente a las esperadas. Si las frecuencias no son distintas, la población se encuentra en EHW, y aplicado a los estudios de asociación genética en una población, el muestreo se consideraría bueno pues no mostraría sesgos, también puede ser indicador de una buena genotipificación (Martínez, 2011).

Generalmente la comprobación de EHW se realiza sobre la población control pues es el grupo que se espera que haya sido tomado representativa y aleatoriamente. Al seleccionar el grupo de casos, el muestreo no es aleatorio dentro de la población, pues ya se están seleccionando rasgos comunes entre ellos que sesgan el grupo (Martínez, 2011).

## Capítulo 3. Metodología.

### 3.1. Selección de muestras.

Se incluyeron individuos mayores de 50 años y sin límite de edad, que cumplieron los criterios de inclusión/exclusión (Tabla III). Todos los casos y controles sanos incluidos fueron sometidos a un examen oftalmológico que incluyó fotografías maculares estereoscópicas y/o digitalizadas. Las fotografías fueron calificadas y cada individuo se estadificó en uno de los cinco grados definidos con base en CARMS (Tabla I). A partir de muestras de sangre de 280 pacientes con algún tipo de DMRE y 208 controles sanos se extrajo DNA. Todos los participantes, firmaron consentimiento informado y fueron diagnosticados por los hospitales oftalmológicos “Instituto de Oftalmología FAP Conde de Valenciana I.A.P.” y de “Asociación para evitar la ceguera en México I.A.P. Hospital Luis Sánchez Bulnes”, ubicados en la zona centro de la ciudad de México.

**Tabla III. Criterios de Inclusión y Exclusión para individuos analizados.**

<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Inclusión</b>	<b>Inclusión</b>
» Individuos de ambos sexos mayores de 50 años de edad.	» Individuos de ambos sexos mayores a 50 años de edad.
» Individuos con DMRE uni o bi-lateral dentro de las etapas 4 y 5 de CARMS.	» Individuos sin DMRE y sin antecedentes familiares de DMRE.
» Sin antecedentes de cirugía vitro-retineana o enfermedades retinianas asociadas	» Individuos con drusas menores de 63µm.
<b>Exclusión</b>	<b>Exclusión</b>
» Enfermedades oculares que condicionen la opacidad de medios e impidan la estadificación.	» Enfermedades oculares degenerativas.

## 3.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó por muestras de paquete celular (*buffy coat*), utilizando columnas por adsorción en membranas (QIAmp Blood Maxi Kit QIAGEN). Se siguió el procedimiento marcado por el kit, que incluía centrifugados, incubaciones y lavados utilizando buffers especiales.

La muestra de DNA se almacenó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su conservación.

## 3.3 Cuantificación y preparación de placas de DNA para genotipificación.

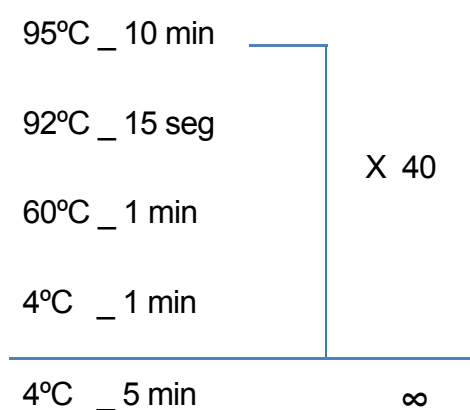
Las muestras de DNA extraídas se cuantificaron a través de espectrofotometría en un equipo diseñado para muestras de bajo volumen (1-5 $\mu\text{L}$ ) (NanoDrop ND-1000) y se ajustaron a una concentración de trabajo 50ng/ $\mu\text{L}$ . Las muestras de controles y casos fueron distribuidas en placas de 96 pozos con una cantidad aproximada de 12.5ng de DNA genómico.

Para preparar las placas de trabajo para genotipificación, primeramente se realizó una placa maestra (placa de 96 pozos) en la que se preparó una dilución 1:20 de cada una de las muestras, utilizando 1 $\mu\text{L}$  de la solución de DNA de trabajo (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) y 19  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNAsa y RNAsa. Cada muestra de la placa maestra quedó con una concentración final de 2.5ng/ $\mu\text{L}$ . Posteriormente, de esta placa, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  para ser utilizados en las placas de trabajo, de esta forma, las muestras quedaron distribuidas en las placas de trabajo de 96 pozos (*Applied BioSystems*) con una cantidad total de DNA de 12.5ng para ser utilizadas en los ensayos de genotipificación.



### 3.4. PCR y ensayos de genotipificación con sondas alelo específicas (TaqMan).

Los reactivos para la PCR se encontraron contenidos en la mezcla maestra Master-TaqMan Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystem*), solución que genera resultados óptimos para la técnica TaqMan, contiene una DNA polimerasa que aumenta la amplificación de productos específicos, incluye un colorante pasivo para potencializar instrumentos de PCR tiempo real, buffer, uracil-N-Glicosilasa que ayuda a evitar la re-amplificación de los productos de PCR. La mezcla de reacción se realizó con 220µL del PCR Mix Master, 6.5µL de la mezcla de sonda a utilizar y 285 µL de H<sub>2</sub>O, grado Biología Molecular. Posteriormente, se dispensaron 5 µL de esta mezcla, a cada muestra localizada en cada pozo de las placas de trabajo. Cada placa se selló con una cubierta óptica y se centrifugó a 2000 rfc por 2min, asegurando la ausencia de burbujas, se sustituyó la cubierta óptica por un empaque plástico (pad) para evitar evaporación. La placa se colocó en el termociclador, el cual previamente había sido programado con las siguientes condiciones:



Al finalizar, se realizó una lectura de punto final en el equipo *7900 HT Fast Real Time PCR System* dentro de la aplicación de discriminación alélica. Se emplearon sondas

(*Applied Biosystems*) previamente descritas en otros trabajos (Anexo IV) y marcadas específicamente para los SNPs analizados. La genotipificación se realizó por la prueba de DNA fluorescente, basada en la actividad de la Taq polimerasa 5' a 3' exonucleasa, Taqman (ver fundamentos de técnica en Anexo IV). Para los SNPs de baja frecuencia en la muestra (rs547154, rs4151667, rs1047286 y rs2230199), se requirió además procesarlos por PCR por tiempo real (ver fundamento en Anexo III) para determinar los genotipos.

### 3.5 Análisis e interpretación de datos.

La genotipificación se realizó por discriminación alélica (ver fundamento en Anexo V) con el programa S.D.S. 3.2 en el equipo 79000 de ABI.

El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas, el equilibrio de Hardy-Weinberg y el análisis de asociación, fueron estimados utilizando la prueba Chi cuadrada dentro del programa de la Universidad de Munich de libre acceso en línea "FINETTI" ([helmholtz-muenchen, 2012](#)).

Para calcular el efecto conferido por las variantes a la enfermedad se estimó el riesgo relativo por el *Odds ratio* (OR por sus siglas en inglés) o razón de momios a través del mismo programa de la Universidad de Munich (ver fundamento en Anexo VI).

## Capítulo 4. Resultados.

Un total de 488 individuos fueron incluidos en este estudio. De los cuales, 190 mujeres (67.85%) y 90 hombres (32.14%) presentaron la enfermedad con edad promedio de 76 años y de 75 años respectivamente; y 148 mujeres (71.15%) y 60 hombres (28.84%) fueron voluntarios sanos de edad promedio de 66 años para ambos géneros (Tabla IV).

**Tabla IV. Caracterización de la muestra.**

Variable	Controles	Casos
Sin síntomas ni manifestaciones de la enfermedad	208	
<b>CARMS</b>		
Estado 1		6
Estado 2		41
Estado 3		7
Estado 4		45
Estado 5		181
Totales	208	280
<b>Sexo - no. (%)</b>		
Hombres	60 (28.84)	90 (32.14)
Mujeres	148 (71.15)	190 (67.85)
Promedio de edad -años	66 +/-8.78	76 +/-8.31

Clasificación de los estados de la enfermedad basados en CARMS (Tabla 1).

En la Tabla V se presenta información sobre la localización de los SNPs analizados. Siete variantes: rs1410996, rs1061170, rs547154, rs4151667, rs1047286, rs2230199 y rs10490924; en 5 genes: *CFH*, *C2*, *CFB*, *C3* y *ARMS2*; localizados en 4 cromosomas distintos: 1, 6, 10 y 19.

Dos de los SNPs están ubicados en zonas intrónicas *CFH* rs1410996 y *C2* rs547154, mientras que el resto producen un cambio en un aminoácido, *CFH*

rs1061179, tirosina por histidina; *CFB* rs4151667, leucina por histidina; rs1047286, prolina por leucina; *C3* rs2230199, arginina por glicina; y *ARMS2* rs10490924, alanina por serina.

**Tabla V. Localización de SNPs**

SNP	Alelos	Alelo asociado	Tipo de Asociación	Contexto	Gen	Cromosoma	Región
rs1410996	T/C	C	Riesgo	Intrón 14	<b><i>CFH</i></b>	1	1q32
rs1061170	T/C	C	Riesgo	Tyr402His Exón 9			
rs547154	C/A	A	Protección	IVS10 Intrón 9	<b><i>C2</i></b>	6	6p21.3
rs4151667	T/A	A	Protección	Leu9His Exón 1	<b><i>CFB</i></b>		
rs1047286	C/T	T	Riesgo	Pro314Leu Exón 9	<b><i>C3</i></b>	19	19p13.3
rs2230199	G/C	G	Riesgo	Arg102Gly Exón 3			
rs10490924	G/T	T	Riesgo	Ala69Ser Exón 1	<b><i>ARMS2</i></b>	10	10q26.13

Como ya se había comentado anteriormente, estudios previos han demostrado que para ambos SNPs del gen *CFH*, el alelo asociado a la enfermedad es citosina y están asociadas como variantes de riesgo, por lo que si un individuo presenta este alelo como parte de su genotipo, tiene un incremento en el riesgo a padecer la enfermedad. Este es el caso de los alelos de las variantes de *C3* y *ARMS2*, que también están asociados al riesgo a DMRE, mientras que por otro lado, la participación en la enfermedad de los SNPs *C2* rs547154 y *CFB* rs4151667, es de

protección, es decir, poseer estos alelos disminuye el riesgo de desarrollar la enfermedad.

#### 4.1 Frecuencia genotípica.

Las frecuencias observadas para cada genotipo posible en casos y controles de cada una de las variantes estudiadas, se presentan en la Tabla VI.

En el estudio de casos, el genotipo más abundante para el SNP de *CFH* rs1410996 fue el homocigoto para el alelo de riesgo (CC) que mostró una frecuencia del 47.8%, seguido por el genotipo heterocigoto (CT), que aporta un 40.7%. En el grupo de controles el genotipo de riesgo (CC) fue menos frecuente que en casos, en este grupo el genotipo más frecuente fue el heterocigoto (55.2%).

El genotipo homocigoto silvestre GG de *ARMS2* rs10490924 mostró una alta frecuencia en controles (53.5%), seguido por el heterocigoto (TG 37.0%) y el homocigoto de riesgo (TT 9.5%), colocando a este último, como el de menor frecuencia del grupo. En el grupo de casos, el genotipo más común fue el heterocigoto (TG 39.9%), seguido del homocigoto de riesgo (TT 33.9%). En este grupo, los dos genotipos con el alelo de riesgo, fueron los más abundantes.

Los SNPs faltantes que participan como alelos de riesgo (*CFH* rs1061170, *C3* rs1047286 y *C3* rs2230199), no mostraron diferencias tan importantes en las frecuencias genotípicas entre los dos grupos, como las observadas para *CFH* rs1410996 y *ARMS2* rs10490924. Sin embargo es importante resaltar que los dos genotipos que poseen los alelos de riesgo (homocigoto de variante de riesgo y

heterocigoto) para *CFH* rs1061170, *C3* rs1047286 y *C3* rs2230199, tuvieron una mayor frecuencia en el grupo de casos que en controles.

**Tabla VI. Frecuencias genotípicas de los SNPs analizados**

Gen	SNP	Genotipo	Frecuencia genotípica			
			Casos		Controles	
			%	N	%	N
<b><i>CFH</i></b>	<b>rs1410996</b>	<b>CC</b>	47.8	255	25.2	190
		<b>CT</b>	40.7		55.2	
	Intrón14	TT	11.3		19.4	
	<b>rs1061170</b>	<b>CC</b>	8.3	227	2.2	180
		<b>CT</b>	36.1		26.6	
Y402H		TT	55.5		71.1	
<b><i>C2</i></b>	<b>rs547154</b>	<b>AA</b>	0.0	266	0.5	200
		<b>AC</b>	6.0		9.0	
	IVS10	CC	93.9		90.5	
<b><i>CFB</i></b>	<b>rs4151667</b>	<b>AA</b>	0.0	272	0.0	201
		<b>AT</b>	1.4		3.4	
	L9H	TT	98.5		96.5	
<b><i>C3</i></b>	<b>rs1047286</b>	<b>TT</b>	0.8	243	0.0	189
		<b>TC</b>	20.5		11.1	
	P314L	CC	78.6		88.8	
	<b>rs2230199</b>	<b>GG</b>	1.9	261	0.0	200
		<b>GC</b>	20.3		10.0	
R102G	CC	77.7		90.0		
<b><i>ARMS2</i></b>	<b>rs10490924</b>	<b>TT</b>	33.9	278	9.5	200
		<b>TG</b>	39.9		37.0	
	A69S	GG	26.2		53.5	

Se presentan los genotipos de la siguiente manera: homocigoto del alelo asociado (riesgo/protección), heterocigoto, homocigoto silvestre.

En cuanto a las variantes que participan como protectoras en DMRE, en el grupo de controles se observó que los homocigotos con el alelo de protección AA de *C2* rs547154, mostraron una frecuencia de 0.5%, mientras que en los heterocigotos

AC fue de 9.0%. En el grupo de controles, las frecuencias de ambos genotipos fueron más altas que en el grupo de casos (AA 0% y AC 6%).

El segundo SNP de protección *CFB* rs4151667 fue muy poco abundante en la muestra total. El homocigoto de protección AA no se encontró en ninguno de los grupos, aunque es importante señalar que los heterocigotos AC fueron más frecuentes en controles que en casos (3.4% vs 1.4%).

#### 4.2 Equilibrio Hardy-Weinberg

Con el objetivo de validar el comportamiento de las variantes genéticas de acuerdo al EHW se realizó un análisis  $X^2$  de Pearson considerando los valores observados y esperados para cada genotipo posible (Tabla VII).

**Tabla VII.. Equilibrio Hardy Weinberg**

Gen	SNP	$X^2$		<i>p</i> -value	
		Casos	Controles	Casos	Controles
<i>CFH</i>	Contexto				
	<b>rs1410996</b>	0.8930	2.2570	0.3446	0.1330
	intron14				
	<b>rs1061170</b>	1.1490	0.0410	0.2836	0.8400
	Y402H				
<i>C2</i>	<b>rs547154</b>	0.2560	0.5540	0.6130	0.4566
	IVS10				
<i>CFB</i>	<b>rs4151667</b>	0.0150	0.0630	0.9027	0.8016
	L9H				
<i>C3</i>	<b>rs1047286</b>	0.4220	0.6540	0.5160	0.4186
	P314L				
	<b>rs2230199</b>	0.4880	0.5540	0.4846	0.4566
	R102G				
<i>ARMS2</i>	<b>rs10490924</b>	10.7730	1.3560	0.0010	0.2442
	A69S				

En el grupo de controles, los SNPs analizados se encuentran en EHW. Las variantes *CFH* rs1410996, *CFH* rs1061170, *C2* rs547154, *CFB* rs4151667, *C3* rs1047286 y *C3* rs2230199 en el grupo de casos se encuentran en EHW, sin embargo en este mismo grupo, la variante *ARMS2* rs10490924 no tuvo este comportamiento ( $P=0.0010$ ), un evento esperado en un grupo sesgado por la selección de individuos enfermos.

### 4.3 Asociación alélica

El análisis de asociación alélica indica diferencias significativas en las frecuencias alélicas de las 5 variantes de riesgo entre los grupos de casos y controles: *CFH* rs1410996  $P=3.22E-06$  y *CFH* rs1061170  $P=1.80E-04$ ; en *C3* rs1047286  $P=4.01E-03$  y *C3* rs2230199  $P=2.0E-04$ , y se destaca la asociación *ARMS2* rs10490924  $P=2.0E-15$ .

*ARMS2* rs10490924 además de resultar como la variante más fuertemente asociada al riesgo a DMRE, también presentó una mayor contribución a la enfermedad con un OR=2.99 veces con un estrecho intervalo de confianza (95% C.I. 2.27-3.94). Para las demás variantes analizadas se encontró un efecto menor en el riesgo. Los valores de OR observaron fueron: *C3* rs2230199 OR= 2.60 (95% C.I. 1.55-4.39), *C3* rs1047286 OR= 2.13 (95% C.I. 1.26-3.59), *CFH* rs1061170 OR= 1.95 (95% C.I. 1.37-2.78) y *CFH* rs1410996 OR= 1.91 (95% C.I. 1.45-2.52) (Tabla VIII).



**Tabla VIII. Frecuencia y asociación alélica de los alelos estudiados**

Gen	SNP Condición	Alelo	Frecuencia alélica (%)		Asociación alélica	
			Casos	Controles	OR [C.I. 95%]	p-value
<b>CFH</b>	<b>rs1410996</b> Intrón14	<b>C</b>	68.2	52.9	1.913 [1.454-2.517]	3.22E-06
	<b>rs1061170</b> Y402H	<b>C</b>	26.4	15.6	1.95 [1.370-2.777]	0.00018
<b>C2</b>	<b>rs547154</b> Intrón 9	<b>A</b>	3.0	5.0	0.589 [0.301-1.152]	0.1182
<b>CFB</b>	<b>rs4151667</b> L9H	<b>A</b>	0.7	1.7	0.418 [0.122-1.438]	0.21958
<b>C3</b>	<b>rs1047286</b> P314L	<b>T</b>	11.1	5.6	2.125 [1.259-3.586]	0.00401
	<b>rs2230199</b> R102G	<b>G</b>	12.1	5.0	2.608 [1.549-4.391]	0.0002
<b>ARMS2</b>	<b>rs10490924</b> A69S	<b>T</b>	53.8	28.0	2.992 [2.273-3.937]	2.00E-15

No se detectó asociación alélica significativa para las variantes C2 rs547154 ni para CFB rs4151667,  $P=0.1182$  y  $P=0.21958$  respectivamente, lo anterior puede deberse a que la frecuencia de los alelos de protección de estas variantes, fue muy baja en la muestra analizada de casos y controles, por lo que probablemente no se alcanzó el suficiente poder estadístico para encontrar la asociación.

## Capítulo 5. Discusión.

En la presente tesis se describe el estudio de asociación de 7 variantes tipo SNP en pacientes mexicanos con la DMRE. Se identificaron asociaciones alélicas significativas en 5 de los SNPs analizados: *CFH* rs1410996, *CFH* rs1061170, *C3* rs1047286, *C3* rs2230199 y *ARMS2* rs10490924, mientras que para las variantes que confieren protección a la DMRE, no fué el caso: *C2* rs547154, *CFB* rs4151667. Las variantes asociadas al riesgo de padecer DMRE contribuyen con ORs de entre 1.913- 2.992, siendo la más asociada e importante, la variante de *ARMS2* rs10490924.

La DMRE es una enfermedad que se espera sea frecuente en sujetos de mayor edad. Se ha reportado en el mundo occidental, una incidencia de 1.3% antes de los 55 años y aumenta hasta 28% después de los 85 años (Katta, *et al.*, 2009). En el presente estudio, las edades promedio de los individuos analizados fue de 66 y 76 años para controles y casos respectivamente. En el 2010, Nonyane, presentó una compilación de trabajos en donde exhibe las edades promedio que manejaron múltiples trabajos realizados en distintas poblaciones con DMRE, fueron más de 6 los que trabajaron con promedios de edad de hasta 54 años y al igual que otros autores con promedios de edad parecidos, incluso 10 años menores que los de la cohorte utilizada en este estudio, obtuvieron asociaciones significativas de los SNP analizados (Nonyane, *et al.*, 2010; Xu, *et al.*, 2008).

En esa misma publicación, Nonyane y su equipo exhiben también porcentajes de individuos por género, donde en diversos estudios de asociación, los hombres están en una frecuencia por debajo de 50% (Nonyane, *et al.*, 2010). En el presente estudio, la relación de mujeres vs hombres en la muestra analizada fue mayor,

para mujeres 71.15% en casos y 67.85% en controles; y para hombres 28.84% en casos y 32.14% en controles. Sin embargo esta proporción es muy similar entre los grupos de casos y controles, por lo que se disminuye el posible sesgo por género que pudieran tener nuestros resultados.

Se ha discutido por años la importancia de los intrones en el genoma, y aunque poco se sabe sobre ellos en cuanto a su relación a enfermedades, se han descubierto algunas funciones como: splicing alternativo, aumento de la expresión del gen, aumento de la diversidad proteómica, etc. (Yenerall y Zhou 2012). Se han identificado diversos SNPs en estas zonas que están asociados a diversas enfermedades, por ejemplo Namboori, menciona que existen 33 SNPs intrónicos en el gen *ApoE*, algunos relacionados al Alzheimer (Namboori, et al., 2011).

En los resultados obtenidos en este estudio, la segunda mayor asociación fue encontrada en un SNP intrónico, rs1410996 del gen de *CFH* ( $P=3.22E-06$ ). A pesar de que se desconoce la participación funcional que pueda tener esta variante (Cui, et al., 2010), se ha replicado en múltiples estudios incluso, mostrando mayor asociación que la variante no-sinónima Y402H también de *CFH* (Li, et al., 2006; Maller, et al., 2006; Bergeron, et al., 2009), reconocida como la variante de mayor riesgo genético para el desarrollo de DMRE en Caucásicos (Xu, et al., 2008).

El alelo de riesgo C del SNP *CFH* rs1410996 en este estudio, mostró tener un efecto aumentando el riesgo a padecer DMRE 1.91 veces (95% C.I. 1.454-2.517), un efecto similar al que muestra esta variante en poblaciones de chinos OR=1.71 (95% C.I. 0.82-3.54) (Cui, et al., 2010; Bergeron, et al., 2009), poco mayor que la identificada en japonesas OR=0.987 (95% C.I. 0.969-1.006) (Mori, et al., 2007), pero menor a la encontrada en caucásicos OR=2.9 (95% C.I. 2.2-3.7).

Mientras que el SNP rs1410996 ha sido reportado en japoneses ( $P=2.37E-05$ ) (Mori, *et al.*, 2007) y en chinos ( $P= <0.001$ ) (Cui, *et al.*, 2010) como una variante altamente asociada, en estas mismas poblaciones la variante Y402H sólo ha mostrado asociación en algunos pocos estudios (LI, *et al.*, 2006), y algunos otros no la han identificado asociada a DMRE (Xu, *et al.*, 2008; Mori, *et al.*, 2007; Chen, *et al.*, 2006). Este SNP que en caucásicos ha mostrado tener tanta relevancia ( $P=<1E-59$  OR=7.6 ) (Maller, *et al.*, 2006) con prevalencia de 60-94% en pacientes con DMRE y >46% en individuos sanos (Xu, *et al.*, 2008); en poblaciones Asiáticas de Chinos, Taiwaneses y Japoneses la prevalencia es muy baja (4-11.3% en casos y 2.8-8% en controles) (Xu, *et al.*, 2008); Mori, *et al.*, 2007). En el presente estudio la variante rs1061170 (Y402H) mostró una distribución en la muestra de forma tal que en casos se encontró 26% y 15.6% controles, una prevalencia superior a las reportadas en poblaciones asiáticas, pero evidentemente menores a las de poblaciones caucásicas. Asimismo esta misma variante, tuvo una  $P=0.00018$ , con un OR=1.95 (95% C.I. 1.37-2.77). Los resultados obtenidos son similares a los identificados en otros estudios realizados, en los que reportan valores de OR= 2.05 a 4 (Magnusson, *et al.*, 2006; Francis, *et al.*, 2007).

En el estudio realizado por Buentello-Volante y colaboradores en una población mexicana, se reportan valores de asociación para Y402Y de  $P=1E-05$ , con frecuencias para casos y de controles de 29.2% y 9.9% respectivamente y OR=3.8 (95% C.I. 2.4-5.9). Los valores de asociación encontrados por este grupo fueron un poco más altos que en los hallados por nosotros, lo que puede deberse a que ellos, únicamente incluyeron a pacientes con DMRE dentro de los últimos dos niveles de acuerdo a la clasificación CARMS 4 y 5 (Buentello-Volante, *et al.*, 2012),

por lo que la selección de casos pudo haber estado sesgada hacia un grupo de individuos con una mayor frecuencia de esta variante.

La variante que presentó mayor asociación en este estudio fue la localizada en el gen *ARMS2* con una  $P=2E-15$  y una frecuencia para casos y controles de 53.8% y 28% respectivamente. En ese estudio en población mexicana realizado por Buentello-Volante reportan frecuencias de 52.5% para casos y 26.6% para controles y una  $P=4E-07$ . Las frecuencias de ambos estudios en pacientes mexicanos, son muy similares, apoyando lo obtenido en un estudio en pacientes asiáticos, en el que hicieron un comparativo con pacientes de las dos distintas etapas de la DMRE (seca o temprana y húmeda o avanzada) y sus resultados señalan que no hay diferencias genéticas significativas de este SNP entre estas etapas de la enfermedad (54.1% y 37.3% de etapas tempranas y 56.8% y 36.8% en etapas avanzadas de pacientes e individuos sanos respectivamente) (Chantaren, *et al.*, 2012; Buentello-Volante, *et al.*, 2012).

Sin embargo, otro estudio realizado en japoneses, mostró que a pesar de que las frecuencias de este SNP entre casos con DMRE húmeda y seca son similares, tiene efectos más importantes en pacientes con etapas avanzadas de la enfermedad (OR=2.13 [95% C.I. 1.91-2.38] para etapas tempranas y OR=3.09 [95% C.I. 2.71-3.51] para etapas más avanzadas) (Yanagisawa, *et al.*, 2011). Este grupo discute la posibilidad de que la presencia de este SNP en mayor prevalencia en asiáticos que en europeos, esté relacionado con la tendencia de los orientales a padecer la DMRE en etapas más avanzadas en una mayor prevalencia que los europeos. De igual manera al comparar los efectos de riesgo entre los pacientes de este estudio para el SNP *ARMS2* rs10490924 con un OR=2.99 (95% C.I. 2.273-3.937) (incluidos todos los estadios de la enfermedad) y los del otro estudio

en mexicanos (Buentello-Volante, *et al.*, 2012) (pacientes únicamente en con atrofia geográfica y neovascular) con un OR=3.04 (95% C.I. 2.2-4.3) encontramos que se podría apoyar esta premisa.

En el presente estudio, las variantes de C3 mostraron asociación con la DMRE rs2230199  $P=2E-04$  y rs1047286  $P=4.01E-03$ , valores similares a los reportados en otros estudios en poblaciones caucásicas. El caso del SNP rs2230199, en una población inglesa se identificó con una  $P=5.9E-05$ , en escoceses se identificó con una  $P=5.1E-04$ , (Yates, *et al.*, 2007), al igual que en un tercer grupo de pacientes caucásicos, donde tuvo valor de asociación  $P=3E-04$  (MacKay, *et al.*, 2010). Para este mismo SNP, en el presente estudio la prevalencia hallada fue 12.1% en casos y 0.5% en controles y OR= 2.06 (95% C.I.1.59-4.391). Las frecuencias no fueron muy similares a las halladas en estas mismas poblaciones caucásicas, sin embargo, los valores de OR, si lo son. En la inglesa se identificó una prevalencia de 28% en casos y 20% en controles con un OR=2.4 (95% C.I. 1.3-4.4); en la escocesa se identificó una prevalencia de 27% en casos y 20% en controles con un OR= 2.9 (95% C.I. 1.4-5.9) (Yates, *et al.*, 2007) y en el tercer grupo de caucásicos estuvo distribuido bajo una frecuencia 29.6% en casos y 22.1% en controles, aportando un riesgo de OR=1.48 (95% C.I. 1.19-1.85) (MacKay, *et al.*, 2010). La prevalencia observada en la población mexicana, es baja en comparación con los obtenidos en estos estudios en caucásicos, sin embargo en poblaciones orientales, las frecuencias fueron tan bajas (1.0% en casos y 0.3% en controles) que no se encontró ninguna asociación con este SNP (Goto, *et al.*, 2009; Cui, *et al.*, 2010).

En el estudio realizado por Beatriz Buentello (Buentello-Volante, *et al.*, 2012) en pacientes mexicanos, el C3 rs2230199 no mostró ninguna asociación significativa, tal vez debido al menor número de individuos utilizados en el estudio, que presentaron

frecuencias muy similares entre los grupos (15.4% para casos, 10.2% para controles). Cabe señalar que ni en nuestros resultados ni en los de ellos se identificaron individuos homocigotos para el alelo de riesgo, lo que nos indica de la baja frecuencia que tiene este genotipo en la población mexicana.

Yates en el 2007 identificó la asociación de C3 rs1047286, en ingleses  $P=4.0E-04$ , no así en pacientes asiáticos, población en la que no se encontró ninguna asociación para C3 rs1047286. Además, la prevalencia en ingleses fue de 20% y 28% para casos y controles respectivamente, mientras que en asiáticos fue de 0.7% en casos y 0.3% en controles (Cui, *et al.*, 2010; Goto, *et al.*, 2009). En el presente estudio se encontró asociada y con frecuencias de 11.1% en casos y 5.6% en controles, valores que se posicionan entre las poblaciones caucásicas y asiáticas.

En este estudio se identificó que el C3 rs1047286 aumenta el riesgo a padecer DMRE 2.125 veces, este OR se considera alto en estudios de enfermedades complejas, donde los OR generalmente son bajos pues muchas variantes genéticas y ambientales participan en su desarrollo (Martínez, 2011). Este SNP se encuentra en LD con rs2230199 (Katta, *et al.*, 2009).

Las variantes de protección, C2 rs547154 y CFB rs4151667 no se encontraron con asociación significativa ( $P=0.1182$  y  $P=0.219$  respectivamente), posiblemente debido a la baja frecuencia observada (C2 rs547154 3.0% en casos y 5.0% en controles; y CFB rs4151667 0.7% en casos y 1.7% en controles) y como consecuencia no se identificaron homocigotos del alelo de protección.

El CFB rs4151667 tampoco fue replicado por estudios en anglo-célticos ( $P=0.17$ ) ni en chinos (Richardson, *et al.*, 2009; Lee, *et al.*, 2008). En el estudio en anglo-célticos se notaron prevalencias muy similares a las observadas por nosotros 2.2% en casos y 3.7% en

controles (Richardson, *et al.*, 2009). Al igual que en chinos, donde se observaron frecuencias de 2.1% en casos y 2.2% en controles, sin ninguna asociación significativa (Lee, *et al.*, 2008). Estos resultados contrastan con los reportados en una población estadounidense con un OR=0.36 (95% C.I. 0.21-0.48) donde se observó una asociación importante  $P=3.93E-06$  (Gold, *et al.*, 2006).

En el otro estudio realizado en mexicanos tampoco se encontró asociación en la variante CFB rs4151667, en ninguno de los dos se identificaron homocigotos de protección, aunque al aumentar en nuestro estudio la N (200 vs 152), se nota también un aumento en la frecuencia genotípica de los heterocigotos en controles (AT 3.4% vs 2.6%) y un aumento en la asociación  $P=0.219$  vs  $P=0.8$  (Buentello-Volante, *et al.*, 2012).

Al igual que en pacientes chinos, no se encontró ninguna asociación significativa de la variante C2 rs547154, sin embargo la prevalencia en chinos es un poco más alta 3.5% casos y 4.8% en controles (Lee, *et al.*, 2008). En población japonesa si se encontró una pequeña asociación  $P=0.018$  con un OR= 0.57 (95% C.I. 0.35-0.91) (Nakata, *et al.*, 2012). Y por el contrario en pacientes anglo-célticos se encontraron frecuencias más altas 5.5% para casos y 11.7% para controles, con una  $P=9.1E-05$  y un OR=2.28 (95% C.I. 1.52-3.40) (Richardson, *et al.*, 2009), al igual que en otro estudio realizado pacientes estadounidenses en el 2006 donde la asociación fue mucho mayor  $P=8.45E-08$  con un OR= 0.44 (95% C.I. 0.23-0.56) (Gold, *et al.*, 2006).

Según un estudio realizado por el grupo de Martínez, la mayoría de las variantes comunes que modifican el riesgo en la mayoría de las enfermedades complejas, han mostrado contribuciones bajas de riesgo o protección, por lo que existe la posibilidad que se hayan descrito poco las variantes raras que tengan valores más altos de asociación (por su baja frecuencia) o bien, variantes comunes con valores menores de asociación (por su baja contribución). Martínez recalca la posibilidad de que las



plataformas, los ensayos y los estadísticos con los que contamos, no sean suficientemente poderosos para obtener este tipo de datos y que tal vez a ello se deba el hecho de que algunas variantes sean asociadas en algunas poblaciones con mayor frecuencia que en otras donde las frecuencias no son tan altas y no sean totalmente ciertos las contribuciones que poseen estas variantes a las enfermedades complejas (Martínez, 2011).

## Conclusiones.

En el presente estudio de asociación genética se caracterizaron las frecuencias genéticas y los valores de Hardy Weinberg para todas las variantes. Además se realizó un análisis estadístico para identificar asociaciones alélicas con la DMRE, 5 de las 7 variantes analizadas se observaron con asociaciones significativas, todas ellas con valores altos de contribución al riesgo a padecer DMRE, mientras que las relacionadas a la protección a padecer la enfermedad no se encontraron con frecuencias altas ni con asociaciones significativas.

La variante que mostró mayor asociación a la DMRE en el presente estudio, fue *ARMS2* rs10490924,  $P=2.00E-15$ , OR=2.992 (95% C.I.2.273-3.937). Esta variante muestra frecuencias similares entre las distintas etapas de la enfermedad, distinguidas por seca y húmeda, sin embargo los valores de OR parecen mostrar diferencias según aumenta el grado de afectación de la enfermedad.

Seguida de la variante en *ARMS2*, la variante con mayor asociación en este estudio es la encontrada en el gen de *CFH* rs1410996,  $P=3.22E-06$ , OR=1.913 (95% C.I. 1.454-2.517) es tan asociada en nuestro estudio como lo es en poblaciones asiáticas.

La variante Y402H en comparación con la importancia que cobra en poblaciones caucásicas, en nuestro estudio no fue tan relevante  $P=1.8E-04$ , OR=1.95 (95% C.I. 1.370-2.77). Se ha sugerido que la frecuencia de esta variante y el OR aumentan conforme aumenta el grado de afectación de la enfermedad, nosotros aportamos pruebas para sugieren apoyar esta premisa.

Las variantes en el gen *C3* resultaron asociadas, ambos con OR altos  $<2$ . En ambos SNPs las frecuencias registradas en esta población mexicana, son muy bajas y no se registraron homocigotos para los alelo de riesgo en el grupo de controles.

Para el SNP C3 rs2230199, la asociación identificada fue  $P=2.0E-04$ ,  $OR=2.608$  (95% C.I.1.549-4.391). En caucásicos, la asociación es por mucho superior. El C3 rs1047286 tuvo una asociación de  $P=4.01E-03$ ,  $OR=2.121$  (95% C.I.1.259-3.586).

Las variantes de protección C2 rs547154 y CFB rs4151667 no se encontraron con asociación significativa quizá por su baja frecuencia en nuestra población, incluso no se registraron homocigotos para ambos SNP en los dos grupos. En el Estudio que se realizó por el otro grupo en mexicanos, tampoco se encontró asociación, sin embargo es importante señalar que la frecuencia en nuestro estudio, es más alta para esta variante, probablemente por el aumento de la N.

## Perspectivas.

Se sugiere aumentar el número de individuos de estudio, con lo que se podrían tener resultados más detallados de lo que sucede en la población mexicana y su genómica relacionada con esta enfermedad compleja.

Debido a nuestra constitución primordialmente mestiza sería importante también, obtener muestras de distintos estados de la República. Aunque ambos hospitales de donde se recabaron las muestras, dan consultas a personas de todo el país, podría haber sesgo por la ubicación de los hospitales, y con ello a la representación de la población mexicana en general.

Otra propuesta es realizar estudios de asociación que abarquen también, otros factores de asociación ambientales como el cigarro, la hipertensión, otras enfermedades crónicas, etc. con el fin de entender mejor la relación de estos factores comúnmente asociados a la enfermedad, y a la genética en el desarrollo de la DMRE.

Sería de gran importancia realizar un estudio que abarcara más variantes que han sido vislumbradas hoy con asociaciones con la DMRE. Además como se está haciendo en otras partes del mundo, pasar al área bioquímica y farmacológica, para además de obtener información sobre la asociación de estas variantes, poder darles funcionalidad a estos conocimientos en pro de la salud, prevención, diagnósticos y tratamiento.

## ANEXO 1. Polimorfismos de una sola base o nucleótido (SNP)

Los polimorfismos de una sola base ó nucleótido “SNP” por sus siglas en inglés (*Single Nucleotide Polymorphism*), son una forma de mutación puntual en el genoma. Estas bases o nucleótidos pueden ser: adenina (A), citocina (C), guanina (G) y timina (T). Se distinguen de las variaciones raras, cuando el alelo se presenta con una frecuencia de al menos 1% en la población, excluyendo los *indels* (Brookes,1999; Landegren, *et al.*, 1998).

Se consideran los polimorfismos más comúnmente encontrados en el genoma humano y se piensa, son responsables de 90% de todas las variaciones inter-individuo. La frecuencia de un SNP no cambia mucho de una generación a otra, y por ello es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones (Kao, *et al.*, 2000).

Estas variaciones pueden localizarse en cualquier lugar del genoma y posiblemente, afectar a la respuesta fisiológica de los individuos al ambiente, a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc. Así, que son marcadores útiles en estudios de divergencia poblacional, se pueden utilizar como marcadores en estudios de enfermedades complejas, farmacogenómica, antropología y forense (Kao, *et al.*, 2000; Landegren, *et al.*, 1998).

## ANEXO II. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias a partir de un fragmento de ADN particular “molde” (de 50 hasta 2000 nucleótidos de longitud). Esta técnica se fundamenta en la propia replicación del DNA y utiliza ciclos de temperaturas varias, para activar y desactivar polimerasas, al igual que enlaces químicos. Esto con el fin de separar las hebras de la cadena, copiar y replicarse.

*In vitro* la reacción requiere de una secuencia molde específica a amplificar, “primers” cuya secuencia 5' a 3' es complementaria a fragmentos flanqueantes de la secuencia de interés 3' de cada una de las hebras del ADN; Taq polimerasa u otra polimerasa de ADN, Deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), Buffer, Cationes divalentes y monovalentes de potasio.

Pasos:

» **Desnaturalización:** a (95°C o 97°C; por 30 o 15 seg respectivamente, dependiendo la cantidad de G+C en la secuencia) separa las cadenas del DNA por la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias, produciendo hebras sencillas de ADN.

» **Alineamiento:** se baja la temperatura (la temperatura y tiempo depende de la composición, del tamaño y concentración de los primers  $\approx 5^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$  de los primers. Pueden variar de 55 a 72°C) los primers se unen a la secuencia molde. Sólo se forman enlaces estables cuando la secuencia de los primers es

complementaria a la de la secuencia molde. La polimerasa se une al híbrido secuencia molde-primero y comienza la síntesis de ADN.

» **Extensión:** (72°C) temperatura a la que la ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena complementaria a la cadena de ADN molde mediante la adición secuencial de dNTPs complementarios a la misma, en dirección 5' a 3'. En cada adición se forma un enlace fosfodiéster entre un grupo fosfato 5'- del dNTP correspondiente con el grupo hidroxilo 3'- al final de la hebra naciente de ADN. El tiempo depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura (Figura 10).

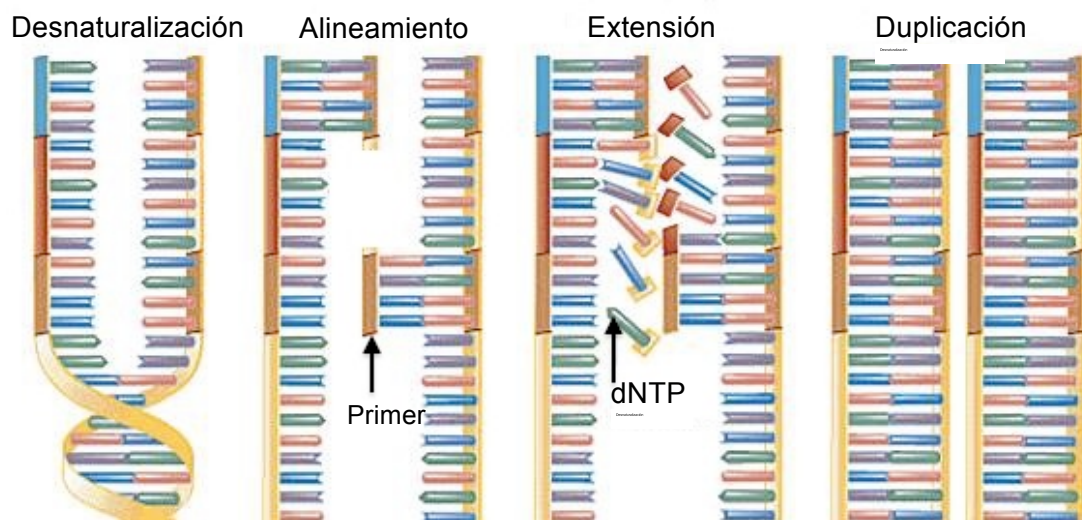


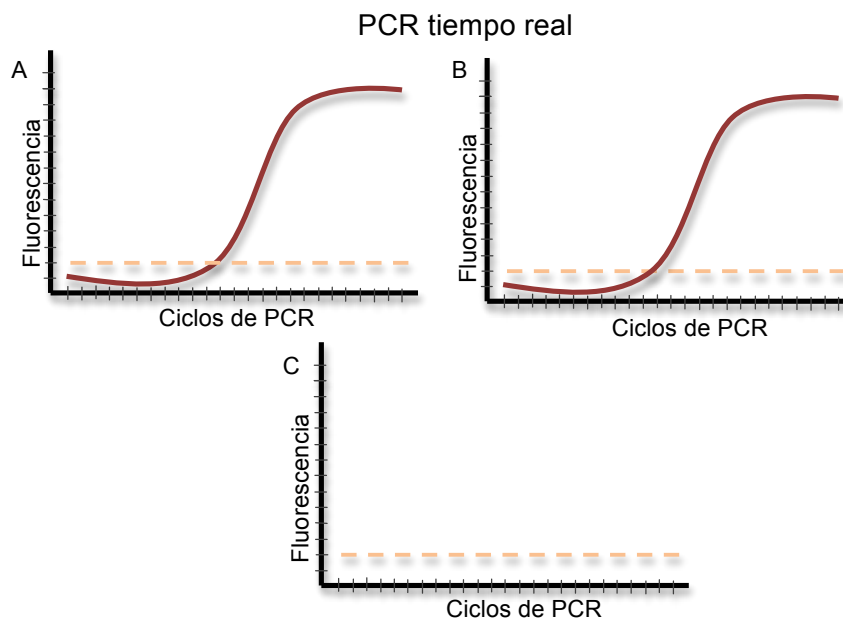
Fig 10. Etapas de PCR

## ANEXO III. PCR en tiempo real.

Se basa en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente acoplado a la secuencia de interés, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción (Figura 11). El termociclador posee un sistema de detección que es capaz de recibir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.

Este método es de los más utilizados para obtener resultados cuantitativos.

Para la detección existen distintos mecanismos químicos que se acoplan a la secuencia blanco. Estos pueden ser agentes intercalantes fluorescentes (*SYBR Green*), *Hairpin probes* (*Molecular Beacons*, *Scorpions*), sondas de hidrolización y sondas hidrolizadas (TaqMan)



**Fig 11. Esquema PCR tiempo real.**

A) fluorescencia de ambos fluorocromos (FAM y VIC), es decir, heterocigotos para un locus. B y C) fluorescencia superior de un fluorocromo sobre el otro, es decir, homocigoto para un alelo.



## ANEXO IV. TaqMan.

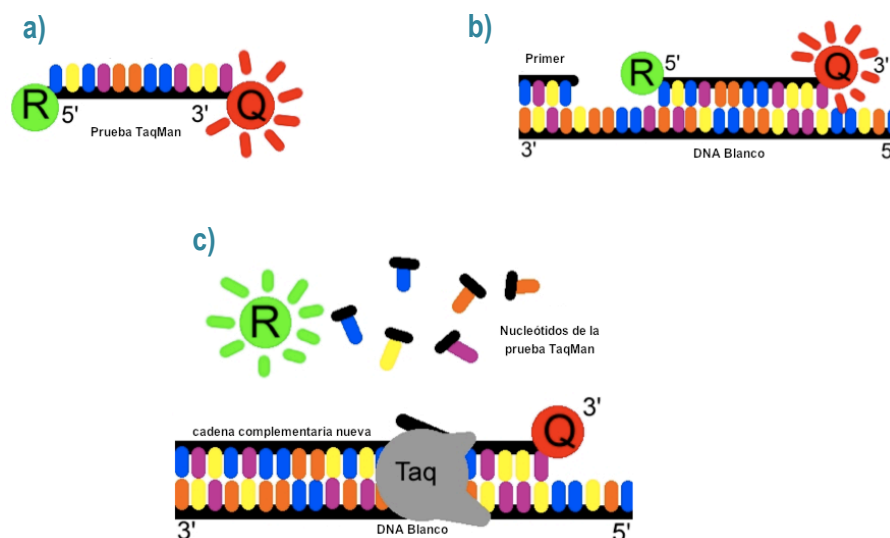
La prueba por TaqMan permite la discriminación alélica durante la PCR en tiempo real. Se fundamenta en la hibridación de alelos marcados y aprovecha la actividad de la ADN Taq polimerasa 5-nucleasa, de digerir una sonda de ADN adherida específicamente para la amplificación de la acumulación de producto (Holland, *et al.*, 1991).

Una sonda de DNA para TaqMan, es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central de un amplicón, posee acoplado en el extremo 3' un fluoróforo apagador (*quencher*) generalmente con una longitud de onda larga roja y en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) generalmente una longitud de onda menor que la del *quencher*, color verde. Estas dos moléculas fluorescentes se encuentran cercanas físicamente (de 1-10nm) e interactúan bajo un fenómeno conocido como Foster o *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET). La fluorescencia del *quencher*, disocia o absorbe la del reportero, incrementando su fluorescencia (Clegg, 2009).

Los reactivos deben ser diseñados cuidadosamente para asegurar que cada una de las dos variantes alélicas sean específicas y se alineen perfectamente sólo a la secuencia complementaria durante el PCR. Cada sonda está marcada con un fluorocromo diferente en el extremo 5' (en caso de las sondas TaqMan de *Applied Biosystems* es con VIC y FAM) y dado que tienen una Tm mayor que los primers, durante la etapa de alineación, se unen a su secuencia blanco antes que los primers. Así, cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación del DNA, se encuentra con la sonda y la degrada gracias a la actividad de exonucleasas 5'-3'. Al ser degradado, libera al reportero del *quencher*, esto

suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida por el reportero puede ser determinada por el sistema de detección del instrumento (Figura 12).

Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y esta a su vez es proporcional a la cantidad de molde analizado, este sistema permite visualizar el incremento de fluorescencia a lo largo de reacción de PCR.



**Figura 12. Representación gráfica del fundamento de la técnica Taqman.**

**A)** Sonda fluorocargada con el Quencher (Q) y el Reportero (R) la fluorescencia del reportero es absorbida por el quencher, por lo que el reportero aparenta no emitir fluorescencia. **B)** la sonda se ha pegado a la cadena de DNA base en la zona donde se encuentra la variante buscada. El primer se ha acoplado también al DNA blanco bases río arriba de la sonda. **C)** la Taq polimerasa comienza la duplicación del DNA, al toparse con los nucleótidos de la sonda, la degrada separando al reportero del quencher a una distancia superior a los 10nm, así el reportero puede emitir fluorescencia y ésta a su vez es registrada por un instrumento.

Las sondas utilizadas en este estudio para la búsqueda de las variantes fueron las siguientes, expuestas en la Tabla 9.

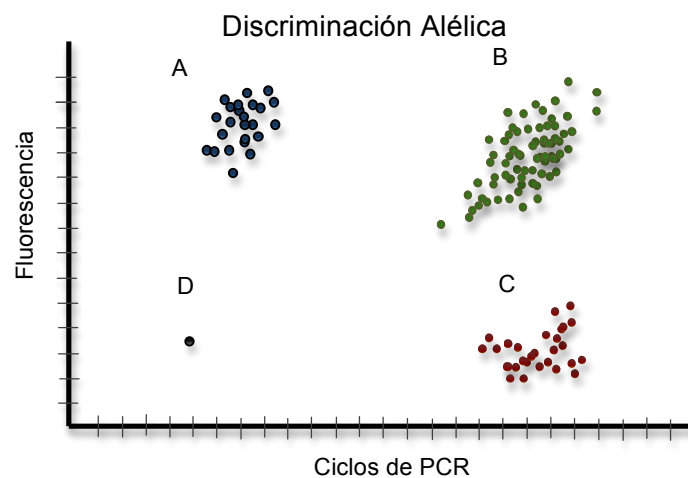
SNP	Sondas alelo específicas
<b>rs1410996</b>	C_2530294_10
<b>rs1061170</b>	De artículo
<b>rs547154</b>	C_90286_10
<b>rs4151667</b>	C_29622248_10
<b>rs1047286</b>	C_1998030_10
<b>rs2230199</b>	C_26330755_10
<b>rs10490924</b>	C_29934973_20

**Tabla 9. Clave de las sondas utilizadas para cada variante de Applied Biosystems.**

## ANEXO V. Discriminación Alélica.

El programa acoplado a la PCR en tiempo real para la discriminación alélica, detecta el incremento de la fluorescencia de una sonda u otra o más bien, de un fluorocromo u otro. Un aumento substancial sólo en la fluorescencia de VIC sugiere homocigocidad para un alelo, un aumento substancial sólo en la fluorescencia de FAM sugiere homocigocidad en el alelo 2, y señales de las dos fluorescencias indican heterocigocidad para la muestra.

La distribución de las muestras y sus fluorescencias, agrupa los tres grupos genotípicos, una distribución homogénea o concentrada (no difusa) de las muestras, normaliza los resultados de las técnicas gráficas (Figura 13).



**Figura 13. Esquema de Discriminación alélica.** A) grupo perteneciente a la fluorescencia FAM o VIC, es decir, homocigotos para un alelo. B) grupo con detección de ambas fluorescencias, es decir, heterocigotos para un *loci*. C) fluorescencia FAM o VIC, es decir homocigotos para un alelo. D) indeterminado

## ANEXO VI. Razón de momios (OR).

Corresponde a la probabilidad de que un grupo (casos o controles) tenga mayor o menor posibilidad de poseer un efecto por una variante determinada en comparación al segundo grupo. Es decir, indica la probabilidad de presentar en el futuro una enfermedad (o exposición) resultado de una variable o viceversa. A través de esta estimación se puede reconocer la naturaleza como factor de riesgo o de protección de una variante e identificar la magnitud o la fuerza de la asociación y fue determinada bajo el mismo programa en línea.

OR= (Casos enfermos/ controles enfermos)/(casos sanos/ controles sanos) y el cálculo de razón de momios (estimación de riesgo relativo estimado con el OR).

## Referencias.

1. Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin MA. "Drusein age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression." *Surv Ophthalmol* 44 (1999): 1-29.
2. Bergeron Sawitzke J., Gold B., Olsh A., *et.al.* "Multilocus analysis of age-related macular degeneration." *European Journal of Human Genetics*, (2009): 1190-1199.
3. Bok Dean. "New insights and new approaches toward the study of age-related macular degeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002): 14619-14621.
4. Bourgain C., Génin E., Cox N., *et.al.* "Are genome-wide association studies all that we need to dissect the genetic component of complex human diseases?" *European Journal of Hum Genet* 15 (2007): 260-263.
5. Brookes Anthony J. "The essence of SNPs." *Gene* 234 (1999): 177-186.
6. Buentello-Volante B., Rodríguez-Ruiz G., Miranda-Duarte A., *et.al.* "Susceptibility to advanced age-related macular and alleles of complement factor H, complement factor B, complement component 2, complement component 3, and age-related maculopathy susceptibility 2 genes in Mexican population." *Molecular vision*, (2012): 2518- 2525.
7. Chantaren P., Ruamviboonsuk P., Ponglikitmongkol M., *et.al.* "Major Single Nucleotide Polymorphisms in polypoidal choroidal vasculopathy: a comparative analysis between Thai and other Asian populations." *Clinical Ophthalmology*, (2012): 465-471.
8. Chen LJ, Liu DT, Tam PO, *et.al.* "Association of complement factor H polymorphisms with exudative age-related macular degeneration." *Mol Vis* 12 (2006): 1536-1542.
9. Chen Y., Bedell M., Zhang K. "Age-related Macular Degeneration: genetic and environmental Factors of Disease." *molecular interventions*, (2010): 271-281.
10. Clegg R. "Förster resonance energy transfer—FRET: what is it, why do it, and how it's done". Vol. 33, in *FRET and FLIM Techniques. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, by Theodorus W. J., 1-57. Amsterdam: Elsevier, 2009.

11. Conley Y.P., Thalamuthu, A., Jakobsdottir, J., *et.al.* "Candidate gene analysis suggests a role for fatty acid biosynthesis and regulation of the complement system in the etiology of age-related maculopathy." *Hum. Molec. Genet.* 14 (2005): 1991-2002.
12. Cui L., Zhou H., Yu J., *et.al.* "Noncoding Variant in the Complement Factor H Gene and Risk of Exudative Age-Related Macular Degeneration in a Chinese Population." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (2010): 1116-1120.
13. Despriet DD, Van Duijn CM, Oostra BA, *et.al.* "Complement component C3 and risk of age-related macular degeneration." *Ophthalmology*, 2009: 474-480.
14. Despriet, D.D., *et al.* "Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration." *Jama* 296, no. 3 (2006): 301-309.
15. DeWan A, Liu M, Hartman S, *et.al.* "HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration." *Science* 314 (2006): 989-992.
16. Engels William R. "Exact Test for Hardy-Weinberg Proportions." *Genetics Society of America* 183 (2009): 1431-1441.
17. Ferreruela Rafael. "La visión y el ojo." *Visión y deporte*, (2007): 8-14.
18. Fisher S.A., *et.al.*, " Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration." *Hum Mol Genet*, 14, no. 15 (2005): 2257-2264.
19. Fliesler S.J., Bretillon L. "The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina." *journal of lipid research*, (2010): 1-53.
20. Flores-Alfaro E., Burguete-García Al., Salazar-Martínez Eduardo. "Diseños de investigación en Epidemiología genética." *Rev Panam Salud Pública*, 2012: 7.
21. Francis P.J., Hamon SC, Ott J, *et.al.* "Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss." *J Med Genet* 46, no. 5 (2009): 300-307.
22. Francis P.J., Klein Michael L. "Update on the role of genetics in the onset of age-related macular degeneration." *Clinical Ophthalmology*, no. 5 (2011): 1127-1133.

23. Francis PJ., Schultz DW., Hamon S., *et.al.* "Haplotypes in the Complement Factor H (CFH) Gene: Associations with Drusen and Advanced Age-Related Macular Degeneration." PLOS One, (2007): 1-6.
24. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, *et.al.* "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. ." Arch Ophthalmol, no. 122 (2004): 564-572.
25. Fritsche LG, Chen W, Schu M., *et.al.* "Seven new loci associated with age-related macular degeneration." nature genetics, (2013): 9.
26. García R, interview by JHE. "L Degeneración Macular Relacionada a la Edad opaca la vida de la tercera edad." Coordinador de Servicios de Retina para el ISSEMYM. (Febrero 18, 2012).
27. Gass J,. "Drusen and disciform macular detachment and degeneration. ." Arch Ophthalmol 90 (1973): 206-217.
28. Gold B., Merriam JE., Zernant J., *et.al.* "Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration." Nat. Genet. 38 (2006): 458–462.
29. Goto A., Akahori M., Okamoto H., *et.al.* "Genetic analysis of typical wet-type age related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population." I Ocul Biol Dis Inform, 2009: 164-175.
30. Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, *et.al.* "No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age related macular degeneration in Japanese." Hum Genet. 120 (2006): 139-143.
31. Grassi, MA., *et.al.* "Ethnic variation in AMD-associated complement factor H polymorphism p.Tyr402His. ." Hum Mutat 27, no. 9 (2006): 921-925.
32. Green WR. "Histopathology of age-related macular degeneration." Mol. Vis, (1999): 5-27.
33. Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, *et.al.* "The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date." Surv Ophthalmol 51 (2006): 316-363.
34. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV *et.al.* " A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci USA 102 (2005): 7227-7232.

35. Hageman GS, Hancox LS, Taiber AJ, *et.al.* "Extended haplotypes in the complement factor H (CFH) and CFH-related (CFHR) family of genes protect against age-related macular degeneration: characterization, ethnic distribution and evolutionary implications." *Ann Med* 38 (2006): 592-604.
36. Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, *et.al.* "Genetic influence on early age-related maculopathy: A twin study." *Ophthalmology* 109 (2002): 730–736.
37. Helmholtz-muenchen: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
38. Hendrik PN, Feckentein M, Charbel PI, *et.al.* "An update on the genetics of age-related macular degeneration, Molecular vision." *Molecular vision* 13 (2007): 196-205.
39. Hirschhorn JN. "Genetic Approaches to studying common diseases and complex traits." *Pediatric Research*, 2005: 74-77.
40. Holland PM., Abramson, RD., Watson R., *et.al.* "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991: 7276-7280.
41. Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris FLIII. *et.al.* "Senile macular degeneration: a case–control study." *Am. J. Epi- demiol.* 118 (1983): 213–227.
42. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, *et.al.* "Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26." *Am J Hum Genet* 77 (2005): 389-407.
43. Jong, Paulus TVM. "Age-Related Macular Degeneration." *the England Journal of Medicine* 355 (2006): 1474-1485.
44. Kao SL, Chong SS, Lee CG. "The role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in understanding complex disorders and pharmacogenomics." *Ann Acad Med Singapore*. 29, no. 3 (May 2000): 376-82.
45. Katta S, Kaur I, and Chakrabarti S. "The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview." *Indian Academy of Science* 88 (2009): 425-450.
46. Klaver CCW, Wolf RCW, Assink JJM., *et.al.* "Genetic risk of age-related maculopathy: Population-based familial aggregation study." *Arch. Ophthalmol.* 116 (1998): 1646–1651.



47. Klein ML, Mauldin WM, and Stoumbos VD. "Heredity and age-related macular degeneration. Observations in monozygotic twins." *Arch. Ophthalmol.* 122 (1994): 932–937.
48. Klein RJ, *et.al.* "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." *Science* (2005): 385-389.
49. Kliffen M, Schaft TL Var Der, Moor CM, *et.al.* "Morphologic changes in age-related maculopathy." *Microsc Res Tech* 36 (1997): 106-122.
50. Landegren U, Nilsson M, Kwok PY. "Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis." *Genome Res* 8 (1998): 769-776.
51. Lee KY., Vitbana EN., Matbur R, *et.al.* "Association analysis of CFH, C2, BF, and HATRA1 gene polymorphisms in Chinese Patients with Polypoidal Coroidal Vasculopathy." *Investigative Ophtalmology & Visual Science* 49 (2008): 2613-2619.
52. Li M, Armaca-Sonmez P, Othman M, *et.al.* "CFH haplotypes without the Y402H coing variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration." *Nature Genetics* 38 (2006): 1049-1054.
53. Liutkeviciene R, Lesauskaite V, Asmoniene V, *et.al.* "Factors Determining age-related macular degeneration: a current view." *Medicina* 46 (2010): 89-92.
54. LI L, Chen SJ, Cheng CY, *et.al.* "Association of the Y402H polymorphism in complement factor H gene and neovascular age-related macular degeneration en Chinese patients." *Invest Ophthalmol*, (2006): 3242-3246.
55. MacKay GJ., Dasari S, Patterson CC., *et.al.* "Complement Component 3: an assessment of association with AMD and analysis of Gene-gene and gene-environment interaction in a Northern Irish cohort." *Molecular Vision* 16 (2010): 194-199.
56. Magnusson KP., Duan S, Sigurdsson H, *et.al.* "CFH Y402H Confers Similar Risk of Soft Drusen and both forms of advanced AMD." *PLOS Medicine*, (2006): 109-114.
57. Majewski J, Schultz DW, Weleber RG, *et.al.* "Age-related macular degeneration A genome scan in extended families." *Am. J. Hum. Genet.* 73 (2003): 540–550.

58. Maller J, George S, Purcell S, *et.al.* "Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration." *Nature Genetics* 38 (2006): 1055-1059.
59. Martínez CP. "Métodos de selección de variables en estudios de asociación genética. Aplicación de un estudio de genes candidatos en Enfermedad de Parkinson." Universidad de Santiago de Compostela, Acuña, 2011, 71.
60. Meyers SM., Greene T. and Gutman F.A. "A twin study of age-related macular degeneration." *Am. J. Ophthalmol.* 120 (1995): 757– 766.
61. Morales Centeno Laura V "Entrenamiento visual de infantes con visión baja o ciega." Consejo Mexicana de Optometria Funcional, A.C., ene 10, 2008: 25.
62. Mori K, Gehlbach PL., Kabasawa S, *et.al.* "Coding and Noncoding Variants in CFH gene and cigarette smoking influence the risk of Age-Macular Degeneration in Japanese Population." *Ophthalmology &visual Science* 48 (2007): 5315-5319.
63. Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, *et.al.* "Significance of C2/CFB variants in Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese Population." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (2012): 794-798.
64. Namboori PK, Vineeth KV, Rohith V, *et.al.* "the ApoE gene of Alzheimer's disease (AD)." *Funct Integr Genomics.* 4 (2011): 519.522.
65. NCBI. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (accessed 02 15, 2013).
66. Need AC., Goldstein DB. "Whole genome association studies in complex diseases: where do we stand?" *Dialogues in Clinical Neuroscience* 12 (2010): 37-46.
67. Nonyane BAS., Nitsh D, Whittaker JC, *et.al.* "Polymorphism, An Ecological Correlation Study of late Age-Related Macular Degeneration and the Complement Factor H Y402H." *Clinical and epidemiologic research* 51 (2010): 2393-2402.
68. Nowak JZ. "Age-related macular degeneration (AMD) pathogenesis and therapy." *Pharmacological Reports*, 2006: 353-363.
69. OMS. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/> (accessed 04 03, 2013).

70. Pei XT, Li XX, Bao YZ, *et.al.* "Association of C3 gene polymorphisms with neovascular age-related macular degeneration in Chinese population." *Curr Eye Res* 34, no. 8 (2009): 615-622.
71. Pencer KL, Olson LM, Anderson BM, *et.al.* "C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration." *Hum Mol Genet* 17 (2008): 1821-1824.
72. Penfold PL, Provis JM. "Macular Degeeration." Springer Berlin Heidelberg, (2005): 200.
73. Phillips E.J., Mallal S.A. "Pharmacogenetics of drug hypersensitivity." *Pharmacogenomics* 11, no. 7 (2010): 973-987.
74. Richardson AJ., Amirul IFM., Guymer RH., *et.al.* "Analysis for rare variants in the complement component 2 (C2) and factor B (BF) genes refine Association for Age-Related Macular Degeneration (AMD)." *Investigative Ophthalmology & Visula Science* 50 (2009): 540-543.
75. Rivera A., Fisher S. A., Fritsche L. G., *et.al.* "Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk." *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005): 3227–3236.
76. Rodríguez de Cordoba S., Goicoechea de Jorge. "Transitional Mini-Review series on complement Factor H: Genetics and disease associations of human complement factor H." *Clinical and experimental immunology* 151, no. 1 (2008): 1-13.
77. Rodríguez EF., Rodríguez PJC, García BMA. "Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica." *Nefrología basada en la evidencia*, (2009): 582-588.
78. Ryu E, Fridley BL., Tosakulwong N, *et.al.* "Genome-wide Association analyses of genetic, phenotypic, and environmental risks in the age-related eye disease study." *Molecular Vision*, 2010: 2811-1821.
79. Santos A & Paczka. "Principales causas de ceguera en México." *Invest Health* 1 (1999): 1-9.
80. Seddon J. M., Ajani U. and Mitchell B. "Familial aggregation of age-related maculopathy." *Am. J. Ophthalmol.* 123 (1997): 199–206.

81. Seddon J. M., Cote J, Page WF, *et.al.* "The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences." *Arch Ophthalmol* 123 (2005): 321-327.
82. Seddon J. M., Sharma S. and Adelman R. A. "Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system." *Ophthalmology* 113 (2006): 260-266.
83. Silvestri G., Johnston P.B. and Hughes A.E. "Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration?" *Eye* 8 (1994): 564–568.
84. Swaroop A, Kari B., Chen W. *et.al.* "Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits." *Hum Mol Genetics* 16, no. 2 (2007): 174-182.
85. Thompson MW., Nussbaum RL., Thompson JS, *et.al.* "Genetics in Medicine". Vol. 5ta ed. España: Elsevier Spain, 2004.
86. Van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, *et.al.* "Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study." *Br J Ophtalmol* 77 (1993): 657-661.
87. Weeks DE, Conley YP, Mah TS. *et.al.* "A full genome scan for age-related macu- lopathy. ." *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000): 1329–1349.
88. Wei Guo Sun, Thompson EA.. "Performing the exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple alleles." *Biometrics* 48 (1992): 361-372.
89. Womack JE., Jang Hyun-Jun, Lee Mi Ok. "Genomics of complex traits." *New York Academy of sciences*, (2012): 33-36.
90. Xu Y, Guan N, Xu J, *et.al.* "Association of CFH, LOC387715, and HTRA1 polymorphisms with exudative age-related macular degeneration in a northern Chinese population." *Mol Vis*, (2008): 1373-1381.
91. Yanagisawa S, Kondo N, Miki A, *et.al.* "Difference between age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in the hereditary contributions of the a69s variante of the age-related maculopathy susceptibility 2 gene (ARMS2)." *Molecular Vision* 17 (2011): 3574-3582.
92. Yang Z, Camp NJ, Sun H, *et.al.* "A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. ." *Science.* 314 (2006): 992–993. .
93. Yates JR, *et.al.* "Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. ." *N Engl J Med* 357 (2007): 553-561.

94. Yenerall P, Zhou L. "Identifying the mechanisms of intron gain: progress and trends." *Biology-direct* 7 (2012): 1-10.
95. Yoshida T, DeWan A, Zhang H, *et.al.* "HTRA1 promoter polymorphism predisposes Japanese to age-related macular degeneration. ." *Mol Vis.* 13 (2007): 545- 548.
96. Zerbib J, Richard F, Puche N, *et.al.* "R102G polymorphism of the C3 gene associated with exudative age-related macular degeneration in a French population." *Molecular Vision*, (2010): 1324-1330.