



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO IAP,
HOSPITAL DR LUIS SÁNCHEZ BULNES

“ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO RS7412 DEL GEN APOE EN EL DESARROLLO DE LA DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA A LA EDAD (DMRE) SECA EN POBLACIÓN MEXICANA”

TESIS DE POSGRADO

QUE PRESENTA
DRA. MARÍA FERNANDA GOLZARRI MILLOTTE

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD
CIRUJANO OFTALMÓLOGO



Asociación para Evitar
la Ceguera en México I.A.P.

ASESOR DE TESIS
DR. LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ ZIMBRÓN

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria:

Dedico esta tesis a Ana Pao, Ana Cecilia y Alejandro,
a quienes amo con todo mi corazón.
Gracias por todo su apoyo en tantos años de estudio y desvelos.
A mi familia y amigos.

Agradecimientos:

Agradezco a Paola Jiménez y Anri por su invaluable ayuda
con la toma de muestras y reclutamiento de pacientes.

Agradezco al comité tutorial por sus sugerencias
y correcciones para la realización de esta tesis.

Gracias a todos los pacientes que donaron su tiempo
y sangre para la realización de este protocolo.

CONTENIDO

Tabla de contenido

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
<u>2.2</u> Justificación	7
<u>2.3</u> Planteamiento del problema	8
<u>2.4</u> Objetivos	9
<u>2.5</u> Hipótesis	9
<u>2.6</u> Pregunta de investigación	9
3. DISEÑO DE ESTUDIO	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
<u>4.1</u> Lugar de estudio y duración	10
<u>4.2</u> Población	10
<u>4.3</u> Criterios de Inclusión.....	10
<u>4.4</u> Criterios de exclusión	10
<u>4.5</u> Variables en estudio	10
<u>4.6</u> Tamaño de la muestra.....	12
<u>4.7</u> Descripción de maniobras principales	12
<u>4.8</u> Toma de muestras y su procesamiento	12
<u>4.9</u> Recolección y análisis de los datos.....	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	25
8. RECURSOS	25
9. REFERENCIAS	25

1. RESUMEN

Introducción: La degeneración macular relacionada a la edad (DMRE) es la principal causa de pérdida visual irreversible en adultos mayores de países desarrollados, y en México constituye la segunda causa de pérdida visual irreversible. Se han identificado algunos genes involucrados en el desarrollo de DMRE, de los cuáles el de apolipoproteína E (APOE) se ha asociado fuertemente al desarrollo de DMRE. Sin embargo, la prevalencia de dichos alelos varía, y en población mexicana no han sido detectadas nuevas variantes de este gen así como los polimorfismos más representativos.

Objetivo: Describir la prevalencia del polimorfismo rs7412 del gen APOE4 en población mexicana con DMRE.

Materiales y métodos: Previo consentimiento informado, se tomó muestra de sangre periférica de pacientes que acudieron a consulta en Asociación para Evitar la Ceguera de julio 2017 a julio 2019, un centro de referencia oftalmológica de la ciudad de México, se extrajo el ADN y se realizó PCR para identificar polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs7412 del gen APOE.

Resultados

Se incluyeron 71 pacientes con DMRE que cumplieron los criterios de inclusión. La media de edad de los pacientes con DMRE fue de 78.4 años ($DE \pm 8.05$ años), 53 (75.6%) mujeres. La prevalencia del polimorfismo C>T en los pacientes con DMRE fue de 38% (n=27). En cuanto al genotipo encontrado en los pacientes, el 61.9% (n=44) se encontraron con el alelo C/C, el 30.9% (n=22) con el alelo T/T, y el 7.2% (n=5) heterocigotos C/T. Se encontró el SNP homo o heterocigoto C>T del gen APOE en 30% (n=16) de las mujeres, versus 61.1% (n=11) en los hombres

Discusión

En este estudio se encontró una alta prevalencia del polimorfismo, más alta que la reportada en poblaciones Europeas y que la esperada en la literatura de frecuencias alélicas menores. Algunos de nuestros resultados coinciden con reportes previos.

Conclusiones

En este estudio en pacientes mexicanos, se encontró mayor prevalencia del SNP rs7412 de APOE en hombres que en mujeres, y la prevalencia global fue de 38%.

Palabras clave: apolipoproteína E, drusas, degeneración macular, retinopatía, maculopatía, envejecimiento, ceguera.

2. MARCO TEÓRICO

La degeneración macular relacionada a la edad (DMRE), es un trastorno degenerativo, crónico, progresivo y común de la mácula que afecta a personas de edad avanzada y se caracteriza por pérdida de la visión central como resultado de anomalías en el complejo fotorreceptores/epitelio pigmentario de la retina / membrana de Bruch / coriocapilaris que resulta en atrofia geográfica o neovascularización (1). La DMRE es la principal causa de pérdida visual irreversible en adultos mayores en países desarrollados. La pérdida de visión generalmente se diagnostica después de los 60 años, y tiende a empeorar con el tiempo. Afecta principalmente la visión central, por lo que el reconocimiento de caras, la lectura o manejar se hacen difíciles. Esta enfermedad es resultado del deterioro gradual de los fotorreceptores en la retina. Específicamente en la mácula, responsable de la visión central. La visión periférica y nocturna generalmente no son afectadas, sin embargo la visión con luz tenue (escotópica) se reduce en etapas tempranas de la enfermedad. Existen dos tipos de esta enfermedad, la forma atrófica (seca) y la exudativa o neovascular (húmeda) (2). La forma seca es mucho más común, representando el 85-90% de los casos. Se caracteriza depósitos amarillentos difusos o separados en la membrana de Bruch (drusas) y atrofia geográfica del epitelio pigmentario de la retina, causando que la visión empeore con el tiempo. La forma húmeda se asocia a pérdida visual grave que empeora rápidamente. Esta se caracteriza por membranas neovasculares coroideas, vasos frágiles que aparentemente se originan en la coriocapilar y penetran a través de la membrana de Bruch y por debajo del epitelio pigmentario. Estos neovasos pueden presentar extravasación, y la sangre exudada puede ser organizada por las células del epitelio pigmentario de la retina en cicatrices maculares, haciendo que la visión central sea borrosa y distorsionada. Esta enfermedad suele ser bilateral, aunque un ojo puede estar más afectado que el otro, y el riesgo de que el ojo contralateral termine afectado es de 50% a 5 años (3).

Etiología

La etiología es multifactorial; la edad avanzada es el principal factor de riesgo, aunque existe un componente genético importante, además de los factores ambientales como el tabaquismo, obesidad, arteriosclerosis, hipertensión, exposición a luz UV, e inflamación, todos éstos fuertemente ligados a la patogénesis de la DMRE(3).

Histopatología

Se caracteriza por acumulación de lipofuscina y péptido beta amiloide (4) en células del epitelio pigmentario de la retina. La presencia de drusas extracelulares entre la lámina basal del EPR y la capa de colágena interna de la membrana de Bruch son hallazgos comunes en esta enfermedad.

DMRE en México (Epidemiología)

La DMRE es la segunda causa de ceguera irreversible en México. Conforme la pirámide poblacional envejece, los casos de DMRE incrementarán. En EUA, de 2000 a 2010, hubo un incremento de 18% (de 1.75 millones a 2.07 millones) de casos con DMRE.

En un meta-análisis que evaluó de la prevalencia de DMRE por razas y regiones geográficas, se encontró que latinos la prevalencia de DMRE temprana es de 9.87% (IC 95% 4.97 – 18.90) tomando en cuenta 5 estudios grandes en población mayor a 40 años. La prevalencia de DMRE en etapas tardías en hispanos fue de 0.32% (IC 95% 0.13 – 0.75), y la prevalencia de cualquier etapa de DMRE en hispanos fue de 10.43% (IC 95% 5.27 – 20.01). Se espera que para 2020 en Latinoamérica y el Caribe existan cerca de 39 millones de personas con DMRE (IC 95% 15–82). A nivel mundial, se espera que en 2020 vivan cerca de 196 millones de personas con DMRE, y que éste número incremente a 288 millones para el año 2040 (1).

De acuerdo a estadísticas de EUA, la prevalencia de DMRE en población hispana es del 0.9%, (de 0.55% a los 50 años de edad, aumentando hasta 2.22% en mayores de 80 años). En 2010, se contabilizaron 76,202 casos de DMRE en hispanos, cifra que se proyecta aumentará a 239,962 en 2030, y para 2050 existirán alrededor de 446,478 pacientes hispanos con DMRE, tan sólo en EUA (1).

Clasificación

A continuación se describe cada una de las categorías de acuerdo a la clasificación AREDS (5)

1. Sin DMRE (Categoría 1 AREDS) representado por el grupo control, sin drusas o con algunas drusas menores a 63 μm de diámetro.
2. DMRE temprana (Categoría 2 AREDS) combinación de múltiples drusas pequeñas, algunas drusas intermedias (63-124 μm) o anomalías del EPR leves.
3. DMRE intermedia (categoría 3 AREDS) caracterizada por cualquiera de las siguientes:
 - a. Múltiples drusas intermedias
 - b. Por lo menos una drusa grande (mayor o igual a 125 μm diámetro)
 - c. Atrofia geográfica (un área bien delimitada, usualmente redonda u ovalada, de atrofia del EPR que no involucre el centro de la fovea
4. DMRE avanzado (categoría 4 AREDS) caracterizada por una o más de las siguientes en un ojo:
 - a. Atrofia geográfica del EPR que involucre el centro fovea
 - b. Maculopatía neovascular que incluya cualquiera de las siguientes:
 - i. Neovascularización coroidea (definida como el proceso de angiogénesis patológica que se origina de los vasos coroideos y se extiende a través de un defecto en la membrana de Bruch
 - ii. Desprendimiento de retina o EPR seroso o hemorrágico
 - iii. Exudados duros retinianos (resultado de fuga intravasclar crónica)

- iv. Proliferación fibrovascular subretiniana o sub-EPR
- v. Cicatrices disciformes (fibrosis subretiniana)

Envejecimiento y degeneración macular

Como se ha mencionado anteriormente, el principal factor de riesgo para desarrollar DMRE es el envejecimiento. El envejecimiento causa una disminución de diferentes funciones en diferentes tejidos y en este particular caso en la retina debido a la pérdida de elementos neuronales y a la acumulación de material de desecho del propio metabolismo celular. Esta acumulación ocurre principalmente debajo de la retina y entre los principales productos de acumulación se encuentra la lipofuscina. (6)

Otros factores de riesgo han sido asociados al desarrollo de esta patología; entre ellos podemos mencionar el tabaquismo, la exposición a radiación ultravioleta, factores nutricionales, hipercolesterolemia, hipertensión, arteroesclerosis, inflamación; como es el caso del factor de complemento H y finalmente, susceptibilidad genética (1).

Polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP, por sus siglas en inglés)

Un gen es polimórfico cuando más de un alelo ocupa el locus de ese gen dentro de una población. Se han estudiado polimorfismos de genes para distintas enfermedades con resultados variables dependiendo de la etnia de dicha población, cuya prevalencia es importante para describir si dichas variaciones alélicas son importantes o posiblemente determinantes de ciertas enfermedades (7).

Los polimorfismos de nucleótidos únicos (*single nucleotide polymorphisms*) ocurren con normalidad en el DNA de las personas. De hecho, ocurre cada 300 nucleótidos en promedio, lo que significa que existen cerca de 10 millones de SNPs en el genoma humano. Su utilidad radica en que pueden servir como biomarcadores de enfermedades, cuando se encuentran asociados a alguna, además de dar pistas sobre las

posibles vías alteradas y probables mecanismos fisiopatológicos en enfermedades como DMRE, donde hasta la fecha no se conoce el mecanismo etiopatogénico con precisión. Entre algunos de los genes involucrados en el desarrollo de DMRE están descritos HTRA1 (rs11200638) ABCA4, APOE, ARMS2, C3, CST3, ERCC6, FBLN5, HMCN1, MMP9, RAX2, TLR4. Sin embargo, en población mexicana no han sido detectadas nuevas variantes de estos genes así como los polimorfismos más representativos. El polimorfismo en HTRA1 (rs11200638) es el más estudiado y con mayor factor de riesgo para desarrollar DMRE. Sin embargo, APOE y ABCA4 han sido menos estudiados y nunca en la población mexicana.

Apolipoproteína E (APOE)

La proteína codificada por este gen localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.32) es la mayor apoproteína de los quilomicrones. Se une a receptores específicos de hígado y receptores de células periféricas, es esencial para el catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Sus mutaciones se asocian a disbetalipoproteinemias, hiperlipoproteinemia tipo III, en la cual aumentan el colesterol y triglicéridos en plasma como consecuencia de aclaramiento disfuncional de los quilomicrones y remanentes de VLDL.

ApoE, codifica una glicoproteína responsable del transporte de colesterol y se encuentra altamente expresada en la retina, y es posible que juegue un papel importante en mantener una función retiniana normal. El haplotipo E4 de la lipoproteína E actúa como ligando para el receptor de baja densidad (LDL) y está involucrado en el mantenimiento y reparación de las membranas celulares neuronales(8). La frecuencia de alelos de APOE ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, y $\epsilon 4$) muestra una historia divergente entre DMRE y otras enfermedades tales como Alzheimer. Se ha demostrado que $\epsilon 4$ protege contra estadios avanzados de DMRE. También está reportado un riesgo incrementado de DMRE exudativa en individuos homocigotos

para $\epsilon 2$. Esto se puede explicar, posiblemente, porque la estructura local y fisiología del cerebro senescente y la retina, varían significativamente(9–11).

Un gran número de variantes genéticas se ha descrito para el gen humano APOE en el cromosoma 19q13.2, posición 44908822. Este gen codifica para tres proteínas principales en las isoformas (apoE2 (MIM] 107741.0001), apoE3 (MIM] 107741.0015), y apoE4 (MIM] 107741.0016)). Cada una de las isoformas difiere en secuencia de aminoácidos en dos sitios: el residuo 112 (sitio A) y el residuo 158 (sitio B). En estos sitios A y B, las isoformas apoE2, apoE3, y apoE4 contienen cisteína/cisteína, cisteína/arginina, y arginina/arginina, respectivamente (12). Estos aminoácidos están codificados en la variante alélica $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ (c.526C4T de GenBank secuencia de referencia NM_000041.2), $\epsilon 3$ (secuencia de referencia NM_000041.2), y $\epsilon 4$ (c.388T4C secuencia de referencia NM_000041.2), respectivamente.

La forma alélica $\epsilon 3$ es la isoforma wild-type más frecuente, y se ha demostrado previamente que en cohortes Caucásicas, estos alelos tienen frecuencias de $\epsilon 2$ (6.9%), $\epsilon 3$ (75.2%), y $\epsilon 4$ (17.9%) (6). Éstas generan 6 diferentes genotipos, de las cuales el genotipo $\epsilon 3\epsilon 3$ es el más frecuente (56.1%) (6). En varias enfermedades, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, se ha demostrado que el alelo $\epsilon 4$ de este gen representa un factor de riesgo para la enfermedad.

2.2 Justificación

Dado que se sabe que APOE4 transporta colesterol, y en DMRE aun no está clara su función, sin embargo se conoce que histológicamente las drusas en DMRE son acumulación de lípidos y lipofuscina, entonces habrá que comprobar si dicho gen participa o regula esta vía.

La frecuencia del alelo de APOE varía dependiendo de la latitud, la proporción de portadores aumenta de 10-15% en el sur de Europa versus 40-50% en el norte (13)

No se han realizado estudios en población latinoamericana, y se sabe que los polimorfismos genéticos cambian completamente en cuanto a prevalencia de población a población, por lo que es importante conocer primero la prevalencia en población mexicana, y sus posibles asociaciones a las variedades seca y proliferativa de DMRE, o incluso a otras enfermedades asociadas al envejecimiento.

La identificación de estos polimorfismos será útil para un diagnóstico temprano de esta patología, así como para demostrar si existe una asociación genética.

Justificación de la elección de genes

Se realizó una búsqueda en PubMed en el submenú Gene, para encontrar los registros de genes asociados a la degeneración macular relacionada a la edad en Homo sapiens, cuyo estatus fuera actual hasta junio 2017. Se encontraron un total de 215 genes.

Se encontraron un total de 17 genes directamente asociados a mayor riesgo de DMRE temprana en algunas poblaciones: ABCA4, APOE, ARMS2, C3, CST3, ERCC6, FBLN5, HMCN1, HTRA1, MMP9, RAX2, TLR4. De los mencionados anteriormente, estudió el polimorfismo rs7412 del gen APOE.

2.3 Planteamiento del problema

Las alteraciones visuales causadas por el envejecimiento, tienen un efecto significativo en la calidad de vida y es necesario diferenciar entre funciones visuales reducidas en el envejecimiento normal y el envejecimiento de un paciente con alguna alteración fisiológica.

El principal objetivo de este estudio es describir la prevalencia del polimorfismo rs7412 del gen APOE4 en pacientes mexicanos con DRME.

La generación de este conocimiento es muy importante ya que puede ayudarnos a entender mejor su patogénesis, así como proponer nuevos tratamientos dirigidos a varios blancos.

A la fecha, alteraciones genéticas que participan en la progresión de esta enfermedad no ha sido reportadas en nuestra población. Por lo tanto, se realizará este análisis sobre las variantes alélicas comunes del gen APOE para elucidar su papel en estas patologías. Finalmente, es necesario realizar investigaciones de este tipo en el país ya que no existe ninguna información al respecto.

2.4 Objetivos

2.5.1.1 Objetivo General

Describir la prevalencia del polimorfismo rs7412 del gen APOE4 en población mexicana con DMRE.

2.5 Hipótesis

En la población mexicana, el polimorfismo rs7412 del gen APOE4 es más prevalente en DMRE que en la población general.

2.5.2.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

El polimorfismo rs7412 del gen APOE está relacionado con un mayor riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad seca comparado con la población general.

2.6 Pregunta de investigación

¿Existe mayor prevalencia del polimorfismo del gen APOE en pacientes con degeneración macular relacionada a la edad?

3. DISEÑO DE ESTUDIO

Transversal de prevalencia (descriptivo, observacional)

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Lugar de estudio y duración

Departamento de Investigación – Asociación para Evitar la Ceguera en México, Dr. Luis Sánchez Bulnes,

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM

El estudio tuvo una duración de 2 años para la inclusión de pacientes.

4.2 Población

4.2.2 Unidad de observación: Pacientes con diagnóstico de DMRE (Categoría 1 y 2 de acuerdo a la clasificación AREDS)

4.2.2 Universo: Pacientes con diagnóstico corroborado de DMRE por clínica o imagen.

4.2.3 Método de muestreo: reclutamiento por conveniencia “convenience sampling”.

4.2.4 Obtención de la población: se reclutaron pacientes atendidos en el hospital durante los meses del estudio que deseaban participar y que aceptaron firmar el consentimiento informado.

4.3 Criterios de Inclusión

Se identificaron a los pacientes con DMRE (Categoría 1 y 2) mayores de 50 años mediante exploración oftalmológica de fondo de ojo, una vez identificados se tomaron fotografías de campo ultraamplio. Los pacientes se categorizaron de acuerdo al ojo con mayor afección.

4.4 Criterios de exclusión

Maculopatías de otras etiologías, retinopatía diabética proliferativa.

4.5 Variables en estudio

4.5.1 Variable principal de desenlace (dependiente): presencia o ausencia de polimorfismo rs7412 del gen APOE

4.5.2 Variables independientes o predictoras: DMRE, variedad seca o neovascular, estadio/etapa (del 1 al 5) edad, sexo, lugar de nacimiento, fecha subjetiva inicio síntomas visuales (edad), edad al diagnóstico, capacidad visual al diagnóstico, capacidad visual al momento de inclusión, alteraciones maculares.

Variable	Clasificación	Unidad de medición	Instrumento de medición	Momento de la medición
VARIABLES DEPENDIENTES				
Polimorfismo gen APOE	Catagórica binomial	Presencia o ausencia	PCR en tiempo real	Al momento de la inclusión en el estudio
VARIABLES INDEPENDIENTES O PREDICTORAS:				
DMRE	Catagórica binomial	Presencia o ausencia	Biomicroscopía fondo de ojo u OCT macular	Durante inclusión
Seca o neovascular	Catagórica binomial	Presencia o ausencia	Criterio clínico	Durante inclusión
Estadio / etapa	Ordinal	1,2,3,4,5	Criterio clínico	Durante inclusión
Edad	Continua	años	Interrogatorio, historia clínica	Durante inclusión
Sexo	Catagórico binomial	Femenino o masculino	Interrogatorio, historia clínica	Durante inclusión
Lugar de Nacimiento	Catagórico, estados de la república	32 Estados y Ciudad de México	Interrogatorio, historia clínica	Durante inclusión
Subjetivo inicio síntomas visuales, edad	Continua	años	Interrogatorio, historia clínica	Durante inclusión
Capacidad visual al diagnóstico	Ordinal	NLP, PLNDC, PLDC MM, CD, 20/800 a 20/20	Cartilla de Snellen	Durante inclusión
Capacidad visual al momento de inclusión	Ordinal	NLP, PLNDC, PLDC MM, CD, 20/800 a 20/20	Cartilla de Snellen	Durante inclusión
Alteraciones maculares	Catagórico	A describir	OCT macular	En cualquier momento
Tabaquismo	Catagórico binomial	Presente o ausente	Interrogatorio, historia clínica	Durante inclusión
Índice tabáquico	Continuo	Años fumando x número de cigarros al día / 20	Interrogatorio, historia clínica	Durante inclusión

4.6 Tamaño de la muestra

Se utilizó el programa EpiInfo para calcular el tamaño muestral, para un diseño de prevalencia, con un poder deseado de 95%, un margen de error aceptable del 5%, una frecuencia alélica esperada de 7%, se requiere una muestra total de 100 muestras.

4.7 Descripción de maniobras principales

Previo consentimiento informado, se incluyeron pacientes con diagnóstico de DMRE previamente diagnosticada en el hospital. Se realizó historia clínica completa, así como interrogatorio dirigido a la enfermedad de base y fecha de inicio de los síntomas visuales. Se realizó una exploración oftalmológica completa, y exploración de fondo de ojo bajo dilatación farmacológica (a excepción de que el paciente tenga alguna contraindicación).

Se clasificó la DMRE de acuerdo a la clasificación AREDS descrita en párrafos anteriores.

Se realizó OCT macular a todo paciente con diagnóstico de DMRE.

4.8 Toma de muestras y su procesamiento

Se obtuvieron muestras de sangre (5-10 ml) en tubos morados con EDTA para procesamiento y extracción de suero, con posterior aislamiento de DNA por parte de la Unidad de Investigación. La secuenciación para identificación específica de los polimorfismos rs7412 del gen APOE4 y APOE2, por medio de método de PCR en tiempo real fue realizada en el Departamento de Investigación de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México.

Preparación de las muestras

Se obtuvieron muestras de sangre (5-10 ml) en tubos con EDTA , se mantuvieron a -70 grados centígrados para posterior aislamiento de DNA.

Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído de sangre fresca total usando el Kit de purificación total QIAamp® DNA blood Mini Kit (QUIAGEN), de acuerdo al protocolo de fábrica.

Al primer tubo eppendorf® se le agregan 20µ de proteínasa K y posteriormente se le agregan 200µl de sangre total. Después se le adiciona 200µl de Buffer AL y se mezcla en vórtex durante 15 segundos. La muestra se pone a incubar durante 10 minutos a 56°C. Una vez pasado el tiempo se centrifuga a 800 RPM por 40 segundos para remover las gotas de las paredes del interior del tubo. El siguiente paso es adicionar 200µl de etanol 100%, se vuelve a homogeneizar la muestra y se centrifuga a 800 RPM por 40 segundos. Cuidadosamente se pasa la muestra anterior a una mini columna de centrifugado QIAamp, y se centrifuga a 800 RPM por 1 minuto, se cambia el tubo de colección y se descarta el filtrado.

Lentamente se abre la mini columna de centrifugado QIAamp y se adiciona 500µl de buffer AW1 y se centrifuga a 800 RPM por 1 minuto, se cambia el tubo de colección y se descarta el filtrado. Se adiciona 500µl de buffer AW2 y se centrifuga a 14,000 RPM por 3 minutos. Se descarta el filtrado, se adicionan de 200-100µl de buffer AE. Se incuba a temperatura ambiente (15-25°C por 5 minutos para incrementar el rendimiento del DNA y la muestra se centrifuga a 8000 RPM por 1 minuto. Una vez finalizado el proceso se pasa el filtrado se coloca en hielo para determinar su concentración por espectrofotometría.

Cuantificación de DNA por espectrofotometría

Las concentraciones del DNA purificado fueron determinados por espectrofotometría. Se utiliza el equipo Gen5, (BioTek) y el software versión 3.04 para el análisis. Se colocan 2µl de Buffer AE sobre el Take3

(No. 289719) en cada uno de los pozos, se selecciona en el equipo de cómputo la opción de analizar muestra de DNA, se le indica que son “blanco” y se le da aceptar. Se colocan 2 μ l de muestra con 1 repetición en el Take3 en los pozos B-H.

Evaluación de integridad del DNA por gel de agarosa

Se utiliza para valorar la integridad de DNA genómico y evaluar el éxito de la amplificación lograda por la PCR. Se calcula la concentración de agarosa requerida, que será de 1x (referencia para evaluar DNA genómico), después se calcula la dimensión y el volumen del gel necesario para el tanque de electroforesis. En un matraz Erlen-Meyer de 200ml se colocan 500 mg de agarosa de grado molecular marca Bioline (No. De catálogo BIO-41025) en 50 ml de buffer TAE al 1%, y se calienta para disolver la agarosa. Se deja polimerizar de 10-30 minutos, cubriéndolo de corrientes de aire y polvo. Durante este tiempo se prepara el buffer TAE al 1% (TAE, 25X Liquid Concentrate, ultra puro, AMRESCO, LLC. No. De catálogo e0796-1.6L) 1000ml.

Después de transcurrido el tiempo se retiran los sellos acrílicos del casete y se coloca dentro del tanque de electroforesis, se le agrega Buffer TAE 1% hasta la línea de referencia. Se retira el peine del gel cuidadosamente para evitar romper los pocillos y se preparan para cargar. Para el carril 2-43 se cargan con 5 μ l de la muestra de DNA y se le adiciona 2 μ l de 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific, No. Lote 00752576), en el primer carril se coloca 3 μ l de 1Kb DNA Ladder (Axygen, No lote M-DNA - 1KB). El gel de electroforesis se corre a 80 Volts por 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, con luz tenue se saca el casete y el gel se coloca en un contenedor con una disolución de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, No lote 1880742) en buffer TAE, a una concentración 1:10,000, se cubre con aluminio y se deja en agitación por 30 minutos, transcurrido el tiempo se coloca en el transiluminador y se observa.

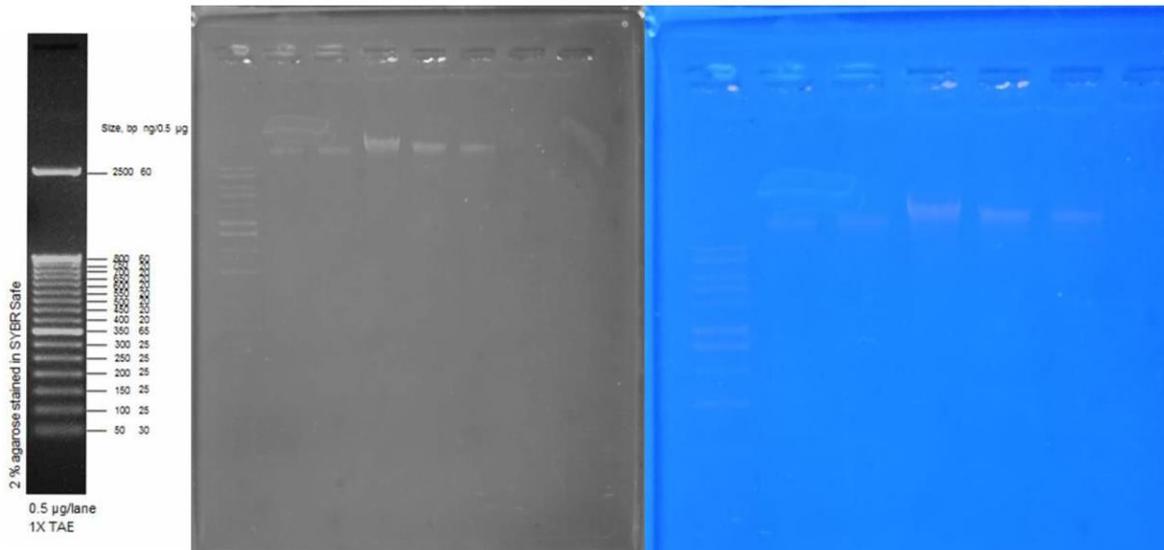


Imagen 1. Fotografía del gel agarosa: Comprobación de la integridad del DNA

Se obtiene el un gel donde se pueden apreciar las bandas en un mismo peso molecular, que corresponden a 2500 pb.

Genotipificación

Se realiza genotipificación para rs7412 utilizando una sonda TaqMan® SNP Genotyping Assay (Número de catálogo C_904973_10, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), para su preparación primero se realiza la preparación de la sonda TaqMan®, que se encuentra a una concentración 40X y se requieren stocks a 20X. Se debe diluir 1X TE buffer, que tiene una composición 10-mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8.0, en agua libre de DNAsas. Primero se calcula la molaridad del EDTA (Ambresco, No catálogo M101-500G) y Tris-HCL (US Biological, No. Lote T8650) y posterior cálculo para obtener la molaridad requerida, siendo necesario diluir 0.1576g/100ml de Tris-HCL y 0.0372g/100ml para la preparación del buffer. Después se filtra la solución en campana y se realizan 3 stocks de la sonda TaqMan® para su almacenamiento a una concentración 1:1 a un volúmen final 50µ, y el cuarto stock se prepara a la misma concentración, pero a un volumen final de 12µl. Se rotulan por números del 1 al 4 y se almacenan los tres

primeros a -20°C . y el cuarto se deja para su utilización. Se realiza la solución madre del total de muestras a preparar, de ahí se coloca la cantidad indicada en la tabla en los tubos eppendorf®, se le adiciona agua libre de DNAsas y el templado de DNA. En la primera corrida se hace una evaluación del rendimiento de las muestras con y sin solución-Q Se realiza conforme a las indicaciones de la fábrica a un volumen final de $25\mu\text{l}$.

Pasos para la preparación de la solución para PCR.

Se trasladan en hielera al Instituto de Fisiología, donde son analizadas con el equipo StepOne plus (Applied Biosystems; USA). Las muestras son centrifugadas a 800 RPM durante dos minutos, previo a la colocación de la placa en el equipo. Posteriormente se abre el programa en la computadora, se selecciona “nueva corrida”, se le indica al programa que va a realizar una “genotipificación”, se agrega la “pre-corrida” y se indican las temperaturas preestablecidas por fábrica.

Una vez que finaliza la lectura se selecciona “analizar” y se obtienen los datos utilizando el software StepOne Plus™ (Applied Biosystem, USA).

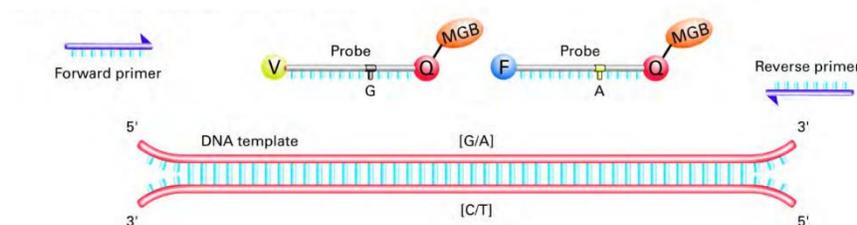


Imagen 2. Tomada del Manual TaqMan SNP, se muestra la sonda VIC para el Alelo 1 (en este caso C), y la sonda FAM para el Alelo 2 (en este caso T).

Se especifican a continuación la secuencia genómica analizada:

APOE E4

e4 (c.388T4C) NM 000041.2

rs7412(Homo sapiens)

CCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T]GCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGC

Cromosoma: 19:44908822

Gen: APOE

Consecuencia funcional: missense

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

Significancia clínica: Patogénico

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

Frecuencia alélica menor global: T=0.0751/376

HGVS:

NC_000019.10:g.44908822C>T, NC_000019.9:g.45412079C>T, NG_007084.2:g.8041C>T, NM_000041.3:c.526C>T, NM_001302688.1:c.604C>T, NM_001302689.1:c.526C>T, NM_001302690.1:c.526C>T, NM_001302691.1:c.526C>T, NP_000032.1:p.Arg176Cys, NP_001289617.1:p.Arg202Cys, NP_001289618.1:p.Arg176Cys, NP_001289619.1:p.Arg176Cys, NP_001289620.1:p.Arg176Cys, XM_005258867.1:c.604C>T, XM_005258868.1:c.526C>T, XP_005258924.1:p.Arg202Cys, XP_005258925.1:p.Arg176Cys

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

Frecuencia alélica:

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

4.9 Recolección y análisis de los datos

Se recolectaron los datos en una base de datos de SPSS. Se utilizaron media y desviación estándar para descripción de variables con distribución paramétrica, así como mediana y rango intercuartil para variables no paramétricas. Los resultados fueron analizados y realizó un análisis de equilibrio de Hardy Weinberg, para posteriormente analizar con Chi2 los resultados obtenidos. Se utilizó el software SPSS Inc. V21, Chicago, IL).

4.10 Métodos estandarizados: recolección de muestras de sangre periférica en laboratorio del hospital.

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

4.12 Bioseguridad

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

5. RESULTADOS

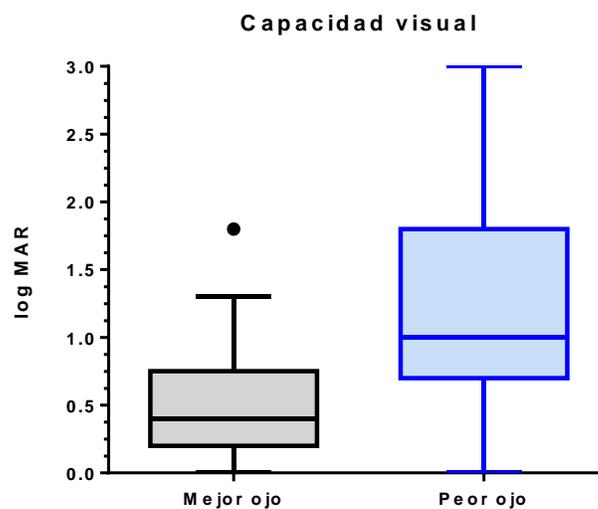
Se incluyeron 71 pacientes con DMRE que cumplieron los criterios de inclusión. La media de edad de los pacientes con DMRE fue de 78.4 años ($DE \pm 8.05$ años), 53 (75.6%) mujeres y 18 (25.4%) hombres.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes estudiados

Característica	N = 71
Edad	78.7 \pm 8
Sexo femenino	53 (74.6%)
Comorbilidades	
Diabetes mellitus	12 (16.9%)
Hipertensión arterial sistémica	24 (33.8%)
Alzheimer/Parkinson	3 (4.2%)
Capacidad visual	
mejor ojo, log MAR	0.46 \pm 0.38
peor ojo, log MAR	1.14 \pm 0.67

La mediana de capacidad visual en el mejor ojo fue de 0.3 log MAR (rango intercuartil 0.2 a 0.72), equivalente a 20/40 Snellen, y en el peor ojo fue de 1.0 log MAR (rango intercuartil 0.68 a 1.8), equivalente a 20/200 Snellen. En la figura 1 se grafica la visión.

Figura 1. Capacidad visual en escala log MAR del mejor y peor ojo de los pacientes estudiados, se observa mediana, rango intercuartil, mínimo y máximo.

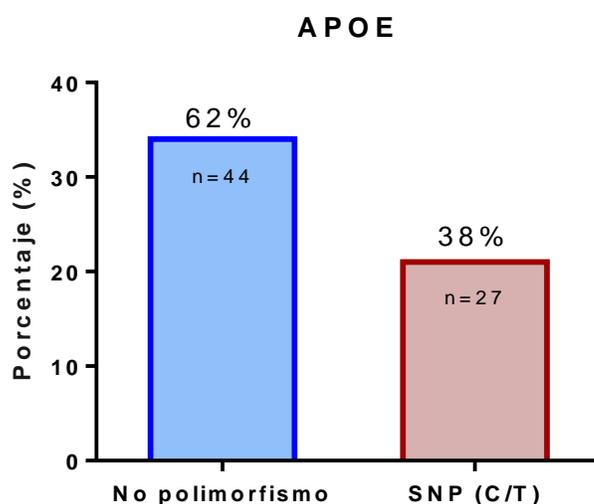


El 16.9% (n=12) padecían DM2, sin embargo sin retinopatía diabética, el 33.8% (n=24) hipertensión arterial sistémica, 4.2% (n=3) con algún tipo de demencia (Alzheimer o Parkinson), 2.9% (n=2) con hipotiroidismo, y 1.4% (n=1) artritis reumatoide.

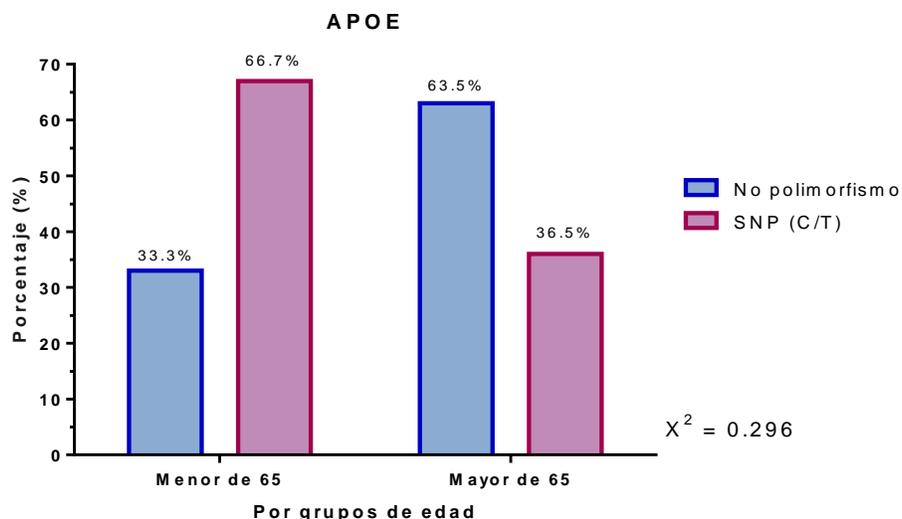
Análisis genético y alélico

La prevalencia del polimorfismo C/T en los pacientes con DMRE fue de 38% (n=27).

Figura 2. Porcentaje de pacientes con y sin el polimorfismo rs7412 del gen APOE.



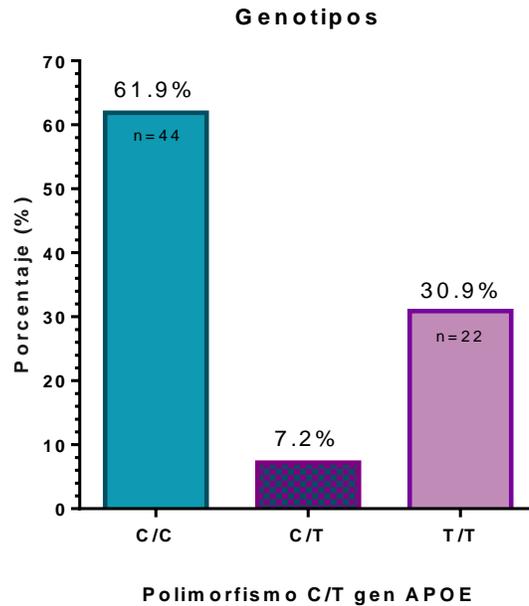
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la proporción de pacientes con DMRE categoría 1 (33.3%) vs categoría 2 (38.1%) que presentaron el polimorfismo (X^2 p=0.763). Al dividir a los pacientes con DMRE por grupo de edad, en menores de 65 años, versus mayores de 65 años, sí hubo una tendencia, siendo que el 66.7% de los menores de 65 años presentaron el polimorfismo, versus 36.5% de los mayores de 65 años, sin embargo estos resultados deben tomarse con cautela por el grupo tan pequeño de pacientes menores a 65 años analizados (Test exacto de Fisher p = 0.296).

Figura 3. Prevalencia del polimorfismo por grupos de edad

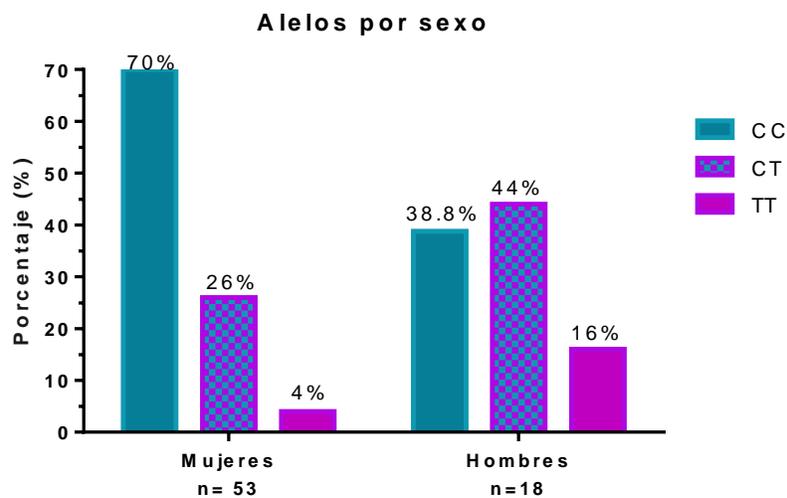
En cuanto al genotipo encontrado en los pacientes, el 61.9% (n=44) se encontraron con el alelo C/C, el 30.9% (n=22) con el alelo G/G, y el 7.2% (n=5) fueron heterocigotos, presentando el alelo C/G. Con estos datos, se calculó la frecuencia alélica observada C = 0.65, T = 0.35 utilizando el software en línea para cálculo de equilibrio de Hardy Weinberg desarrollado por Rodriguez et al (14).

Tabla 2. Equilibrio de Hardy Weinberg.

SNP	N=71		HWE	χ^2	Valor P
	Frecuencia observada		Frecuencia esperada		
rs7412	Genotípica				
	CC	44 (0.619)	30.4 (0.855)	53.043	<0.0001
	CT	5 (0.070)	32.5 (0.139)		
	TT	22(0.309)	8.1 (0.006)		
Alélica					
C	46 (0.65)	67(0.9385)	19.11	<0.0001	
T	25 (0.35)	4 (0.0615)			

Figura 4. Prevalencia de homocigotos y heterocigotos.

Finalmente se compararon los alelos por sexo, encontrándose SNP homo o heterocigoto C>T del gen APOE en 30% (n=16) de las mujeres, versus 61.1% (n=11) en los hombres, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, como se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Prevalencia de los alelos por sexo.

$$\chi^2 = 18.89, df 2, p < 0.0001$$

6. DISCUSIÓN

El gen APOE codifica para la apoproteína E, una proteína que juega un papel principal en el transporte y distribución de lípidos en el sistema nervioso central y periférico (15), está asociado a Alzheimer y se sabe que en Alzheimer y DMRE existe depósito de beta amiloide en SNC y sobre la membrana de Bruch, respectivamente. En este estudio se encontró una alta prevalencia del polimorfismo, más alta que la reportada en la literatura. Nuestros resultados no están en equilibrio de Hardy Weinberg, ya que la frecuencia observada fue estadísticamente diferente a la esperada para la población, antes se creía que los SNPs que no pasaban la prueba de equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) debían ser excluidos del análisis, sin embargo muchos investigadores han buscado las posibles causas de esta desviación del HWE, y las posibles causas incluyen errores de genotipificación, mezcla entre poblaciones, o duplicación segmentaria, sin embargo, estudios poblaciones a muy grande escala han encontrado variaciones estructurales abundantes en el genoma humano, incluyendo variaciones en el número de copias (CVN), lo cual sugiere que un número significativo de SNPs están dentro de estas regiones, lo que podría causar desviaciones del equilibrio HW.

El gen tiene 3 alelos (E2, E3, y E4) cada uno codificando para diferentes isoformas de proteínas, siendo E3 el alelo más común (16,17). Además, el alelo E4 de APOE, se ha propuesto como un gen que confiere riesgo incrementado de DMRE, sin embargo otros estudios no han encontrado esta asociación (18–21). Un estudio en 2006 reportó que los polimorfismos en APOE podrían aumentar el riesgo de progresión de la DMRE, y que las variantes alélicas tienen un papel específico dependiendo del sexo en los efectos de los alelos del gen APOE en DMRE y en otras enfermedades (por ejemplo cardiovasculares), Baird et al reportaron que las mujeres con el alelo E4 de APOE tienen un riesgo incrementado de DMRE (22), en nuestro estudio, encontramos mayor prevalencia de heterocigotos y homocigotos T/T en hombres que en

mujeres. Se han realizado estudios previos de casos y controles en Países Bajos, Italia, Francia, Estados Unidos, Australia e Islandia, que reportan que el alelo E4 podría conferir un efecto protector contra la DMRE (6,23–27). Sin embargo, no hay una asociación entre el alelo E4 y la DMRE en otros estudios de Japón, Hong Kong y EUA (19,20,28,29). Un estudio reciente de Lituania que incluyó a 720 pacientes con DMRE, encontró que el genotipo ApoE 4/2 se observó con mejor frecuencia en mayores de 65 años con DMRE húmeda, comparada con controles sanos de esa edad, por lo que sugieren la hipótesis de un efecto protector de ApoE 4/2 para el desarrollo de DMRE en pacientes mayores (8). La heterogeneidad de estos resultados podría deberse a la diferente distribución basal de estos alelos dependiendo de las poblaciones étnicas estudiadas (30). Además, los estudios varían en cuanto a severidad y tipo de DMRE estudiada, que incluyó desde etapas tempranas hasta atrofia avanzada o DMRE neovasculare. Un estudio realizado en EU examinó el efecto de los genotipos APOE y la historia de tabaquismo(31). El estudio se basó en la teoría de que el alelo E4 reduce el riesgo de DMRE y el alelo E2 lo incrementa (26). Un análisis posterior en 2005 sugirió que en pacientes con DMRE húmeda (n=260), fumar confirió un mayor riesgo a los portadores del alelo E2, con una razón de momios de 1.9 para los portadores ($p=0.11$), 2.2 para los homocigotos de E3 ($P=0.007$), y de 4.6 para los portadores de E2 ($p=0.001$) cuando se compararon con controles no fumadores homocigotos E3. Ellos concluyen que fumar aumenta el riesgo en portadores del alelo E2 comparado con aquellos con otros alelos APOE (31). Es interesante hacer notar que el hecho de que el polimorfismo se encuentre en menor frecuencia en mayores de 65 años podría sugerir cambios epigenéticos que eliminan su factor protector.

Limitaciones

Las limitaciones de este estudio incluyen su naturaleza transversal, en la que no hay forma de asociar el polimorfismo con el desarrollo de formas más agresivas de la enfermedad, además de que no se puede

identificar causalidad, y es difícil separar el polimorfismo como factor de riesgo o factor pronóstico. Además, el tamaño de muestra reducido, limita la validez externa de los resultados.

7. CONCLUSIONES

En este estudio en pacientes mexicanos, se encontró mayor prevalencia del SNP rs7412 de APOE en hombres que en mujeres, y la prevalencia global fue de 38%.

8. RECURSOS

8.1.1 Recursos humanos

Se contó con el apoyo técnico de una pasante de servicio social, así como una estudiante de maestría.

8.1.2 Recursos materiales

Se utilizaron consumibles de laboratorio (tubos eppendorf, pipetas Pasteur de plástico, laminillas, cubre-objetos, anticuerpos, anticuerpos acoplados a fluorescencia, reactivos diversos, parafina, xilenos, alcoholes, entre varios más).

8.2 Recursos del Hospital

OCT macular, agudeza visual, ERG, FAF, angiografía, toma de muestras clínicas.

8.3 Financiamiento

Este proyecto contó con financiamiento por parte de la Unidad de Investigación de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México.

9. REFERENCIAS

1. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C, et al. Global prevalence of age-related

- macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040 : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2014;2(2):e106–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1)
2. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet* [Internet]. 2018;392(10153):1147–59. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60282-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60282-7)
 3. Jong PTVM De. Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2006;355:1474–85.
 4. Ratnayaka JA, Serpell LC, Lotery AJ. Dementia of the eye: the role of amyloid beta in retinal degeneration. *Eye* [Internet]. 2015;29:1013–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2015.100>
 5. Kassoff A, Kassoff J, Buehler J, Eglow M, Kaufman F, Mehu M, et al. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(10):1417–36.
 6. Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HT V, Guymer RH. The E2 and E4 Alleles of the Apolipoprotein Gene Are Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1311–5.
 7. Shastry BS. Single-Nucleotide Polymorphisms. *Mol Diagnostics*. 2010;578:111–20.
 8. Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, Smalinskiene A, Petkeviciene J, Zaliuniene D, Lesauskaite V. The role of apolipoprotein E (rs7412 and rs429358) in age-related macular degeneration. *Ophthalmic Genet* [Internet]. 2018;00(00):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/13816810.2018.1479429>
 9. Adams MKM, Simpson JA, Richardson AJ, English DR, Aung KZ, Makeyeva GA, et al. Apolipoprotein E Gene Associations in Age-related Macular Degeneration The Melbourne Collaborative Cohort Study. *Am J Epidemiol*. 2012;175(6):511–8.
 10. Kulminski AM, Ukraintseva S V., Arbeev KG, Manton KG, Oshima J, Martin GM, et al. Health-protective and Adverse Effects of the Apolipoprotein E ϵ 2 Allele in Older Males. *J Am Geriatr Soc*. 2008;56(3):478–83.
 11. Vingerling JR, Ho L, Jong PTVM De, Fletcher AE. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration - a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat*. 2011;32(12):1407–16.
 12. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW, Francisco S. Abnormal Lipoprotein Receptor-binding Activity of the Human. *J Biol Chem*. 1982;257(5):2518–21.

13. Gerdes LU. The Common Polymorphism of Apolipoprotein E: Geographical Aspects and New Pathophysiological Relations. *Clin Chem Lab Med.* 2004;41(5):628–31.
14. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009;169(4):505–14.
15. Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, et al. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 1986;83(4):1125–9.
16. Mullins RF, Russell SR, Anderson DONH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J.* 2018;14:835–46.
17. Anderson DH, Ozaki S, Nealon M, Neitz J, Mullins RF, Hageman GS, et al. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: Implications for the process of drusen formation. *Am J Ophthalmol.* 2001;131(6):767–81.
18. Conley YP, Thalamuthu A, Jakobsdottir J, Weeks DE, Mah T, Ferrell RE, 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.* 2005;14(14):1991–2002.
19. Yoshimura N. Apolipoprotein E Polymorphisms in Japanese Patients With Polypoidal Choroidal Vasculopathy and Exudative Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2004;138:567–74.
20. Schultz DW, Klein ML, Humpert A, Majewski J, Schain M, Weleber RG, et al. Lack of an Association of Apolipoprotein E Gene Polymorphisms With Familial Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2003;121(May).
21. Wong TY, Shankar A, Klein R, Bray MS, Couper DJ, Klein BEK, et al. Apolipoprotein E gene and early age-related maculopathy: The atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology.* 2006;113(2):255–9.
22. Baird PN, Richardson A, Robman L, Dimitrow P, Tikellis G, McCarty C, et al. Apolipoprotein (APOE) gene is associated with progression of Age related macular degeneration (AMD). *Hum Mutat.* 2006;29(1):167–75.
23. Klaver CCW, Kliffen M, Duijn CM Van, Hofman A, Cruts M, Grobbee DE, et al. Genetic Association of Apolipoprotein E with Age-Related Macular Degeneration. *Am J Hum Genet.* 1998;63:200–6.

24. Simonelli F, Testa F. Apolipoprotein E Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration in an Italian Population. *Ophthalmic Res.* 2001;33:325–8.
25. Souied EH, Benlian P, Amouyel P, Feingold J. The e4 Allele of the Apolipoprotein Gene as a Potential Protective Factor for Exudative Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol.* 1998;353–9.
26. Schmidt S, Klaver CCW, Saunders AM, Postel EA, Paz MAD La, Agarwal A, et al. A pooled case-control study of the apolipoprotein E (APOE) gene in age-related maculopathy. *Ophthalmic Genet.* 2002;23(4):209–23.
27. Zarepari S, Reddick AC, Branham KEH, Moore KB, Jessup L, Thoms S, et al. Association of Apolipoprotein E Alleles with Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration in a Large Cohort from a Single Center. *Invest Ophthal Vis Sci.* 2004;45(5):1306–10.
28. Magnusson KP, Duan S, Sigurdsson H, Petursson H, Yang Z, Zhao Y. CFH Y402H Confers Similar Risk of Soft Drusen and Both Forms of Advanced AMD. *PLOS Med.* 2006;3(1):109–14.
29. Pang CP, Baum L, Chan WM, Lau TC, Poon PMK, Lam DSC. The Apolipoprotein E e4 Allele Is Unlikely to Be a Major Risk Factor of Age-Related Macular. *Ophthalmologica.* 2000;214:289–91.
30. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world . Is APOE * 4 a ‘ thrifty ’ allele ? *Ann Hum Genet.* 1999;63:301–10.
31. Schmidt S, Haines JL, Postel EA, Agarwal A, Kwan SY, Gilbert JR, et al. Joint effects of smoking history and APOE genotypes in age-related macular degeneration. *Molec Vis.* 2005;(November 2004):941–9.

10. LISTA DE ABREVIATURAS

DMRE	Degeneración Macular Relacionada a la Edad
ABCA4	ATP-binding cassette (ABC) superfamily transmembrane protein 4
APOE	Apolipoproteína E
ARMS2	Age-Related Maculopathy Susceptibility 2
C3	Complemento 3
CST3	Cystatin-C
ERCC6	DNA excision repair protein 6
FBLN5	Fibulin5
HMCN1	Hemicentin1
HTRA1	Human Peptidase serin 1
MMP9	Metaloproteinase9
RAX2	Retina And Anterior Neural Fold Homeobox 2
TLR4	Toll-like Receptor 4