



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN
MÉXICO
(APEC)**

**Prevalencia del polimorfismo rs429358 del gen APOE4
en Degeneración Macular Relacionada a la Edad
(DMRE)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL:

TÍTULO DE ESPECIALISTA

EN:

MEDICINA (OFTALMOLOGÍA)

PRESENTA:

MARISOL ROMERO MÁRQUEZ

TUTOR DE TESIS

DR. LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ ZIMBRÓN

FECHA DE EXAMEN:

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO A 22 DE OCTUBRE DEL 2021,





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

1.MARCO TEORICO.....	3
2. PREGUNTA DEINVESTIGACION.....	11
3.HIPOTESIS.....	12
4. OBJETIVOS.....	12
5. TIPO DE ESTUDIO.....	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
7. RESULTADOS.....	21
8.DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	29
9.ANEXOS.....	30
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1. MARCO TEORICO

1.1 SÍNTESIS DEL PROYECTO

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 APOE se ha asociado fuertemente tanto al desarrollo de DMRE. Sin embargo, en población mexicana no han sido detectadas nuevas variantes de este gen así como los polimorfismos más representativos, por lo que en este estudio transversal se identificará la prevalencia de la prevalencia del polimorfismo rs429358 del gen APOE2 en población mexicana.

1.2 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Degeneración macular relacionada a la edad (DMRE)

La 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 (Hernández-Zimbrón LF et al., 2018)

Características generales de la enfermedad

La degeneración macular relacionada a la edad 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). 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 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 (Hernández-Zimbrón LF et al., 2018).

Clasificación AREDS:

El estudio Age Related Eye Disease Study (AREDS) fue un ensayo clínico multicéntrico que incluyó 4,757 participantes para estudiar el efecto de antioxidantes en la DMRE y cataratas, y la clasificación descrita en ese estudio, se utiliza desde entonces para estadificar la enfermedad, y se ha utilizado en numerosos estudios clínicos, de la siguiente manera (AREDS Group, 2001 Arch Ophth):

1. Sin DMRE representado por el grupo control, sin drusas o con algunas drusas menores a 63 μm de diámetro.
2. DMRE temprana, combinación de múltiples drusas pequeñas, algunas drusas intermedias (63-124 μm) o anomalías del EPR leves.
3. DMRE intermedia, 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 fóvea
4. DMRE avanzado, caracterizada por una o más de las siguientes en un ojo:
- a. Atrofia geográfica del EPR que involucre el centro foveal
 - 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 retinaianos (resultado de fuga intravasclar crónica)
 - iv. Proliferación fibrovascular subretiniana o sub-EPR
 - v. Cicatrices disciformes (fibrosis subretiniana)

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.

Histopatología

Se caracteriza por acumulación de lipofuscina y péptido beta amiloide (Ratnayaka, Serpell, & Lotery, 2015) 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.

Epidemiología de DMRE en México

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 (Wong et al., 2014).

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 (Wong et al., 2014).

Envejecimiento

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. (Baird et al. 2004)

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, aterosclerosis, inflamación; como es el caso del factor de complemento H y finalmente, susceptibilidad genética (Wong et al., 2014).

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.

Los polimorfismos de nucleótidos únicos (single nucleotide polymorphisms) ocurren con normalidad en el DNA de las personas. De hecho, ocurren 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)

(<https://www.snpedia.com/index.php/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.

Un gran número de variantes genéticas se ha descrito para el gen humano APOE en el cromosoma 19q13.2. 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 [Weisgraber et al., 1981]. Estos aminoácidos están codificados en la variante alélica épsilon (ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4 (c.526C4T de GenBank secuencia de referencia NM_000041.2), ϵ 3 (secuencia de referencia NM_000041.2), y ϵ 4 (c.388T4C secuencia de referencia NM_000041.2), respectivamente.

La forma alélica ϵ 3 es la isoforma wild-type más frecuente, y se ha demostrado previamente que en cohortes Caucásicas, estos alelos tienen frecuencias de ϵ 2 (6.9%), ϵ 3 (75.2%), y ϵ 4 (17.9%) [Baird et al., 2004]. Éstas generan 6 diferentes genotipos, de las cuales el genotipo ϵ 3 ϵ 3 es el más frecuente (56.1%) [Baird et al., 2004]. En varias enfermedades, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, se ha demostrado que el alelo ϵ 4 de este gen representa un factor de riesgo para la enfermedad. (Davignon et al., 1999; Strittmatter and Roses, 1995, Tai L et al., 2015)

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. La frecuencia de alelos de APOE (ϵ 2, ϵ 3, y ϵ 4) muestra una historia divergente entre DMRE y otras enfermedades tales como Alzheimer. Se ha demostrado que ϵ 4 protege contra estadios avanzados de DMRE. También está reportado un riesgo incrementado de DMRE exudativa en individuos homocigotos para ϵ 2 (Tabla 1) . Esto se puede explicar, posiblemente, porque la estructura local y fisiología del cerebro senescente y la retina, varían significativamente.

	E2	E3	E4
Frecuencia alélica (USA)	8%	77%	15%
Diferencias secuenciales	Cys-112 Cys-158	Cys-112 Arg-158	Arg-112 Arg-158
Afinidad con otros receptores de lipoproteínas	<2%	100%	80-100%
Riesgo	Hiperlipoproteinemia tipo III DMRE	“Normal”	Alzheimer
Protector	¿Alzheimer?		DMRE
Polimorfismo mas asociado	rs7412		rs429358

Tabla1.1 Traducida al español del artículo de Huang Y. et. al. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer’s Diseases.

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 enero 2021 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, estudiarán los polimorfismos del gen APOE. Tres variantes alélicas derivadas de los SNP, comúnmente denominadas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, se diferencian sobre la base de los intercambios de residuos de cisteína (Cys) y arginina (Arg) en las posiciones 112 (rs429358) y 158 (rs7412) en el amino secuencia ácida y dan lugar a seis genotipos ($\epsilon 3 / \epsilon 3$, $\epsilon 3 / \epsilon 4$, $\epsilon 2 / \epsilon 3$, $\epsilon 4 / \epsilon 4$, $\epsilon 2 / \epsilon 4$ y $\epsilon 2 / \epsilon 2$), clasificados de mayor a menor frecuencia entre las poblaciones europeas. Sin embargo en poblaciones latinas lo anterior no ha sido analizado.

APOE apolipoproteína E

La proteína codificada por este gen 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. 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.

[RefSeq, Jun 2016]

AD2; LPG; APO-E; ApoE4; LDLCQ5

Loci: 19q13.32

A nivel de la retina se sabe que es una lipoproteína altamente expresada en las células de Muller en donde funge como una glicoproteína encargada del adecuado aclaramiento de LDL, VLDL y los quilomicrones gracias a su excelente afinidad con los receptores de receptores de LDL , LRP, VLDL, y gp330, permitiendo un adecuado funcionamiento del complejo de fotoreceptores y epitelio pigmentario evitando de esta manera la senescencia y apoptosis de dichas poblaciones celulares indispensables para la manutención del ciclo visual. (Huang et. al, 2014)

1.3 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.

También se sabe generalmente que el alelo ApoE 4 es un derivado del polimorfismo rs429358 y rs7412.

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.

Planteamiento del problema y contribución del proyecto al avance del conocimiento en su propia temática y en su área de conocimiento

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 rs429358 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.PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la prevalencia del polimorfismo rs429358 del gen APOE4 en pacientes con DMRE seca y húmeda en población mexicana?

3.HIPÓTESIS

En la población mexicana con DMRE, el polimorfismo rs429358 del gen APOE4 es más prevalente (aproximadamente 10%) comparado con lo reportado en otros estudios similares de la literatura internacional (7%) (Huang et.al, 2014)

4.OBJETIVOS

4.1Objetivo general:

- Describir la prevalencia del polimorfismo rs429358 del gen APOE4 en pacientes con DMRE.
- Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes con DMRE mexicanos.

5.Tipo de estudio : Transversal, Prevalencia

6.Materiales y métodos

6.1METODOLOGÍA

6.1.1LUGAR DE ESTUDIO Y DURACIÓN

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

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM

El estudio tendrá una duración de 1 año para la inclusión de pacientes.

6.1.1POBLACIÓN

6.2.2Unidad de observación: Pacientes con diagnóstico de DMRE cualquier estadio y pacientes sanos

6.2.3Universo: Pacientes con diagnóstico corroborado de DMRE por clínica o imagen.

6.2.4Método de muestreo: reclutamiento por conveniencia “convenience sampling”.

6.2.5 Obtención de la población: se reclutaron pacientes atendidos en el hospital durante los meses del estudio que deseen participar y que sean presentados con alguno de los investigadores del estudio.

6.2.6 Criterios de Inclusión de casos

- a. Pacientes mexicanos mayores de 50 años
- b. Diagnóstico clínico de DMRE en cualquier estadio
- c. Deseo de participar en estudio y que firmen consentimiento informado .

6.2.7 Criterios de exclusión de casos:

- a. Menores de 50 años
- b. Opacidad de medios que impida visualización de la retina (hialosis asteroidea densa, hemorragia vítrea, catarata brunescence, opacidad corneal)
- c. Degeneración coroidomiópica
- d. Retinopatía hipertensiva
- e. Uveítis de cualquier tipo
- f. Deterioro cognitivo importante que imposibilite la valoración de polo posterior.
- g. Otras maculopatías
- h. Retinopatía diabética proliferativa

6.3 VARIABLES EN ESTUDIO

6.3.1 Variable principal de desenlace (dependiente): presencia o ausencia de polimorfismo rs429358 del gen APOE4

6.3.2 Variables independientes o predictoras: DMRE, variedad seca o húmeda , estadio/etapa (del 1 al 5) edad, sexo, lugar de nacimiento, síntomas visuales iniciales , 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 rs429358 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
Edad de diagnóstico	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	Categórico 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

6.4 Tamaño de la muestra

Se utilizó el programa Epilnfo para calcular el tamaño muestral, para un diseño de prevalencia, con un poder deseado de 95%, nivel de significancia estadística (alfa) de 5%, la frecuencia alélica mayor de los casos siendo 39% (reportada en PubMed), y la frecuencia alélica menor esperada en los controles siendo de 7.82%, el tamaño muestral necesario para encontrar diferencias estadísticamente significativas es de 99 pacientes, tomando 100 pacientes como referencia.

6.5 MÉTODOS

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.

Toma de muestras y su procesamiento

Se obtuvieron muestras de hisopado en tubos eppendorf 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 rs429358 del gen APOE4 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 hisopado del carrillo interno de la boca de los pacientes , se mantuvieron a -70 grados centígrados para posterior aislamiento de DNA.

Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído de la muestra 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 líquido obtenido de las muestras de hisopado . 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 2µl de muestra con 1 repetición en el Take3 en los pozos BH.

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 5µl de la

muestra de DNA y se le adiciona 2µl de 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific, No. Lote 00752576), en el primer carril se coloca 3µl 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.

Genotipificación

Se realiza genotipificación para el SNP específico utilizando una sonda TaqMan® SNP Genotyping Assay (Número de catálogo C_904972_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 volumen 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 25µl.

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).

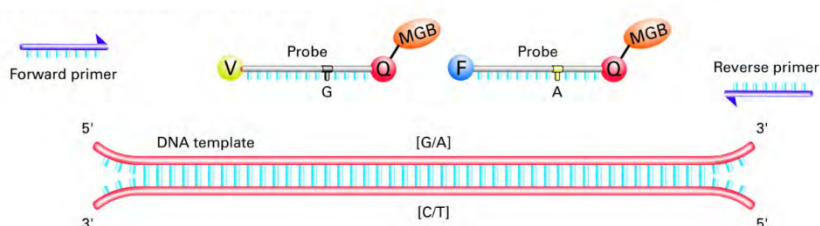


Imagen 1. Tomada del Manual TaqMan SNP, se muestra la sonda VIC para el Alelo 1 (en este caso C), y la sonda FAM para el Alelo 2 (en este caso T).

Se especifican a continuación la secuencia genómica analizada:

APOE E4

e4 (c.388T4C) NM 000041.2

rs429358 (Homo sapiens)

Allelos T>C

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

6.6 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).

Métodos estandarizados: recolección de muestras de hisopado del carrillo interno de la boca en laboratorio del hospital.

6.7 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 7 Febrero 2021 con el número de protocolo INV-21-03. Para el desarrollo de este proyecto se tomaron en cuenta los principios de la declaración de Helsinki para investigación en humanos.

6.8 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.

Se realizó el análisis estadístico en la base de datos con SPSS. Los resultados serán analizados y se correlacionarán con las siguientes pruebas; prueba de X² (Chi-squared test) para las variables categóricas en un análisis univariado. La asociación alélica fue cuantificada mediante un análisis de regresión multivariado, considerando edad, tabaquismo, hipertensión, diabetes como posibles confusores.

7.0 RESULTADOS

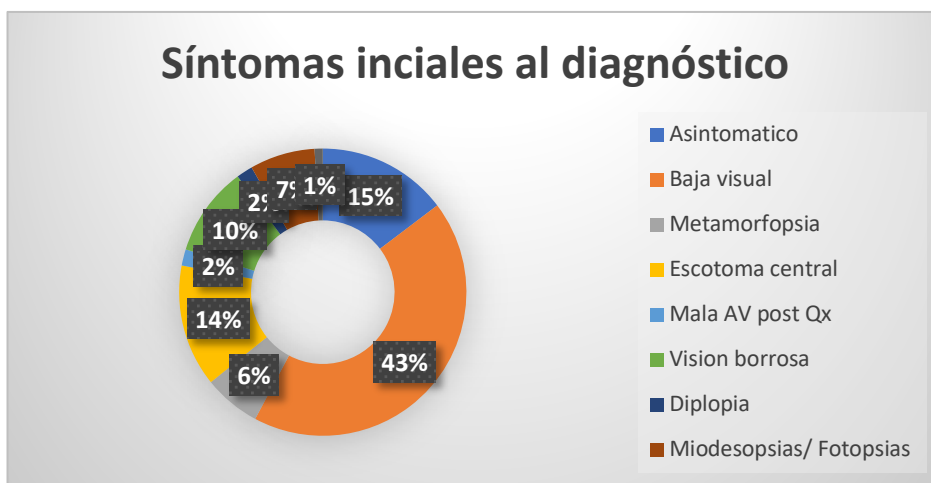
Se recolectaron las muestras de 100 pacientes cuya edad promedio fue de 77.4+/- 8.06 años 68% mujeres y 28% hombres 57 de los cuales eran originarios de la Ciudad de Mexico y el resto de otros estados. Durante el analisis estadistico no existieron desviaciones ya que todos los pacientes cumplían con los criterios de inclusion adecuadamente. Se incluyeron un total de 196 ojos en 200 pacientes. Dos de los cuatro ojos excluidos se encontraban en no percepcion de luz (NPL) secundarios a desprendimiento de retina regmatogenos, uno por desprendimiento de retina secundario a endoftalmitis y solamente un ojo se encontraba en cuenta dedos (CD) secundario a queratopatía bullosa, por lo que el fondo de ojo no era valorable al momento de la realización del estudio, aunque ya se conocía con el diagnóstico de DMRE de larga evolución en el hospital.

En cuanto antecedentes oftalmológicos relevantes se encontraron:

- Sospecha de glaucoma: 15 pacientes
- Sospecha de cierre angular primario: 1 paciente
- Glaucoma primario de angulo abierto : 8 pacientes
- Otros glaucomas: 2 pacientes:
- Diabetes mellitus sin retinopatía: 13 pacientes
- Retinopatía diabética leve: 1 paciente
- Retinopatía diabética moderada: 2 pacientes
- Membrana Epiretiniana: 5 pacientes
- Agujero macular: 1 paciente
- Escleritis y/o uveítis anterior: 4 pacientes
- Cirugía de glaucoma: 4 pacientes
- Catarata clinicamente significativa (que se considerara contribuyera a baja visual del paciente): 1 paciente

Del total de los pacientes la edad promedio a la cual se les realizó el diagnóstico de degeneración macular fue de 74.3 +/- 8.83 años. El 47% de los pacientes refirió

como síntoma inicial la baja visual de uno de sus ojos de manera significativa en promedio de alrededor de 20.9 meses (1.8 años) de evolución previo a acudir a una valoración. Solamente el 15% de los pacientes reportó un escotoma central como manifestación inicial de la enfermedad. 16% estaba asintomático al momento del diagnóstico.



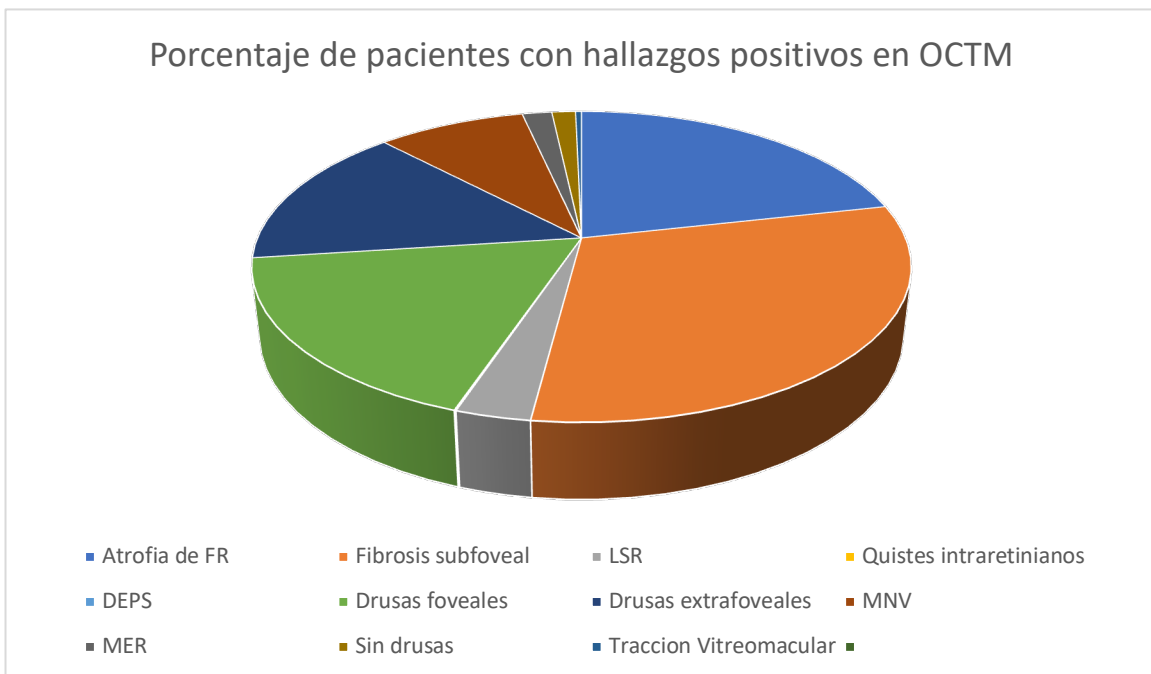
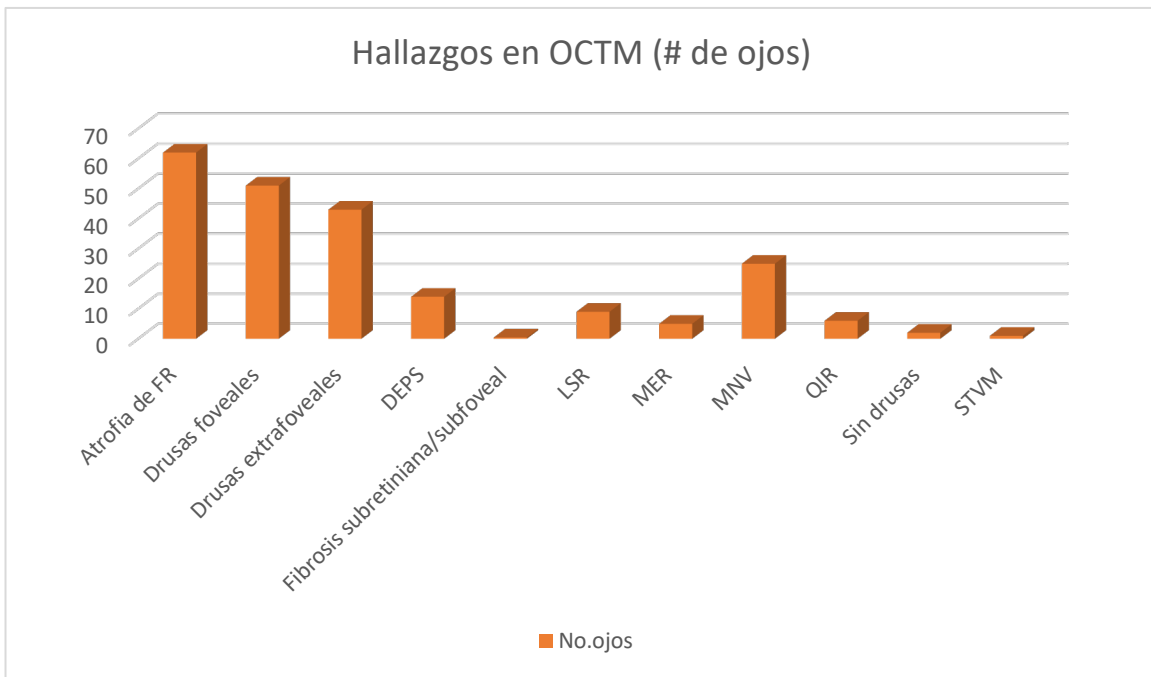
En cuanto a tipo de degeneración macular se encontraron 107 (53.5%) en estadio seco y 89 (44.5%) húmedos, lo que contrasta fuertemente con la prevalencia aproximada de 10% de DMRE húmeda y 90% seca reportada en la literatura, los cuales se clasificaron de acuerdo a la clasificación AREDSII encontrándose la siguiente distribución:

Estadio (Severidad)	Ojos
Seca Leve (Estadio 1)	62
Seca Moderada (Estadio 2)	28
Seca Severa (Estadio 3)	17
Húmeda (Estadio 4)	89

Se consideró a los pacientes en la categoría de DMRE húmeda a todos los que presentaran antecedente documentado en el expediente clínico electrónico de haber presentado actividad en forma de membrana neovascular o líquido subretiniano en cualquier momento de su seguimiento en la institución. Al

momento de la recolección de la muestra, se encontró que de los 90 ojos, 25 ojos se encontraban con actividad en ese momento.

En cuanto a alteraciones maculares en OCT (Tomografía de coherencia óptica) se encontró:

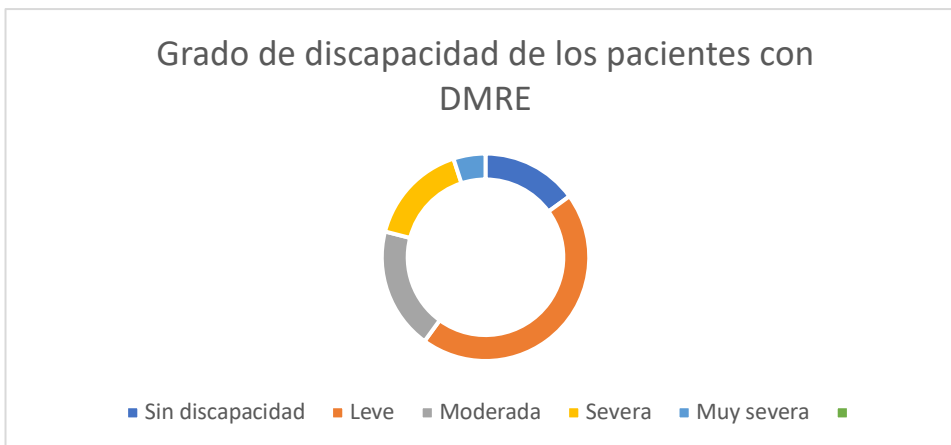


Atrofia de fotorreceptores	31 %
Fibrosis subfoveal y/o subretiniana	22%
Líquido subretiniano (LSR)	3.5%
Quistes intraretinianos (QIR)	3%
Despegamientos del epitelio pigmentario (DEPS)	7%
Drusas foveales	25.5%
Drusas extrafoveales	21.5%
Membrana activa (MNV)	12.5%
Membrana epiretiniana (MER)	2.5%
Sin drusas (ojo contralateral afectado)	1%
Síndrome de tracción vitreomacular	0.5%

En cuanto a grado de discapacidad visual, se agruparon a de acuerdo a sus agudezas visuales mejor corregidas (AVMC) encontrándose:

Sin afectación visual (20/20-20/30)	62 ojos
Baja visual leve (20/40-20/60)	39 ojos
Baja visual moderada (20/70-20/150)	24 ojos
Baja visual severa (20/160-20/400)	27 ojos
Baja visual muy severa (20/420-MM)	44 ojos

Al combinar los datos de agudezas visuales de ambos ojos con el fin de conocer el grado de discapacidad visual de cada paciente:



15 pacientes sin discapacidad visual, 45 pacientes con discapacidad visual leve, 19 con discapacidad moderada, 16 con severa y 5 con discapacidad muy severa,

siendo estos últimos pacientes cuya capacidad visual en su mejor ojo era igual o peor de 20/400.

De estos datos, cabe destacar que del total de pacientes, 37 se encontraban con solamente un ojo único funcional definido como una AVMC de 20/200 o menor en alguno de los ojos. Asimismo 26 pacientes eran considerados como ciegos legales al presentar una AVMC de su mejor ojo en 20/70 o menor.

Durante el estudio se intentó hacer la asociación entre la severidad de la enfermedad y el tabaquismo, sin embargo no se logró obtener la suficiente información de los expedientes como para poder correlacionar la información de manera significativa ya que solamente 5 pacientes del total reportaron un antecedente positivo de tabaquismo, lo cual se considero con un probable confusor dado su baja incidencia

Caso	Sexo	Edad	AVMC OD	AVMC OI	Tipo y Estadio OD	Tipo y estadio OI	OCTM	Origen	IT	Sintomas Visuales	Tiempo de evolución (meses)	Edad al dx
1	F	80	20/25	20/25	Seca L	Seca L	DEF AO	CDMX	0	ASX	0	79
2	F	79	20/20	20/20	Seca L	Seca L	DEF AO	CDMX	0	BAJA AV OI	12	79
3	F	65	20/40	20/30	Seca M	Seca L	AFR OD /DEF OI	CDMX	0	BAJA AV AO	6	65
4	M	80	NPL	20/30	NA	Seca L	DF OI	EDMX	0	ASX	0	77
5	M	81	20/30	CD	Seca L	Seca S	DEF OD / AFR OI	CDMX	0	BAJA AV OI	24	74
6	F	74	20/30	20/40	Seca L	Seca M	DF AO	CDMX	0	MT AO	3	60
7	F	87	CD	20/200	Seca S	Seca S	FSF AO	PUE	0	BAJA AV AO	12	87
8	F	69	20/20	20/100	Seca L	Humeda	DEF OD/ AFR OI	CDMX	0	EC OI	6	67
9	M	93	CD	CD	Humeda	Humeda	AFR + FSF AO	CDMX	0	MALA AV POST QX	4	87
10	F	90	20/250	20/40	Humeda	Seca M	MNV OD / DF OI	CDMX	0	ASX	0	88
11	M	69	20/20	20/40	Seca L	Seca M	DEF OD / DF OI	GRO	0	VB AO	12	86
12	F	86	20/40	20/70	Seca L	Seca M	DF AO	CDMX	0	BAJA AV AO	60	86
13	F	81	20/50	20/150	Seca L	Seca M	DF AO + MER OI	CDMX	0	BAJA AV AO	12	80
14	F	83	20/30	20/60	Seca L	Humeda	DEF OD / AFR OI	CDMX	0	BAJA AV + MD	6	64
15	M	93	20/120	20/450	Humeda	Humeda	AFR AO	CDMX	0	MALA AV OI	18	92
16	M	79	20/200	20/100	Humeda	Humeda	AFR AO	CDMX	0	EC AO	12	64
17	F	91	CD	20/100	Humeda	Seca M	FSF OD// DF+MER OI	SIN	0	BAJA AV OI	12	89
18	M	58	20/100	20/25	Seca L	Seca L	DEF AO	GTO	0	BAJA AV AO	6	58
19	F	85	20/200	CD	Humeda	Humeda	AFR AO	CDMX	0	BAJA AV AO	12	79
20	F	76	20/20	20/200	Humeda	Humeda	MNV OD/ FSF OI	EDMX	0	BAJA AV AO	12	69
21	F	86	20/200	20/60	Seca M	Seca L	DF AO+ AFR OD	MOR	0	VB AO + EC	2	86
22	F	76	CD	20/40	Humeda	Seca M	AFR+ FSF OD/ DF OI	CDMX	0	BAJA AV OD	3	75
23	F	69	20/30	20/100	Seca L	Humeda	DEF OD/ FSF OI	GRO	0	BAJA AV +EC	6	68
24	F	78	20/50	20/800	Humeda	Humeda	MNVOD/ AFR+ FSFOI	VER	0	EC	24	78
25	M	76	20/200	MM	Humeda	Humeda	MNV OD/ AFR OI	CDMX	0	MT AO	24	75
26	F	83	20/60	20/360	Seca M	Humeda	AFR AO	EDMX	16	MT OI	9	78
27	F	75	20/30	20/60	Seca L	Humeda	DEF OD/ FSF OI	EDMX	0	EC	2	75
28	F	86	20/60	CD	Seca M	Humeda	DF OD/ FSF OI	JAL	0	BAJA AV AO	36	86
29	F	78	MM	20/60	Humeda	Seca S	AFR OD/ FSR OI	CDMX	0	BAJA AV AO	12	65
30	M	86	20/400	20/60	Seca S	Seca M	AFR+ DF OD/ DF OI	PUE	0	BAJA AV OD	12	86
31	M	80	20/30	CD	Seca L	Humeda	DEF OD/ MNV OI	CDMX	9	BAJA AV OI	72	72

32	F	81	20/30	20/100	Seca L	Seca M	DEF OD/ AFR OI	CDMX	0	MD+ BAJA AV	4	79
33	F	74	20/400	20/800	Humeda	Humeda	MNV AO	MICH	0	MD + BAJA AV	6	74
34	F	83	CD	20/20	Humeda	Seca L	AFR OD / DEF OI	CDMX	0	BAJA AV AO	12	80
35	M	89	20/60	20/40	Humeda	Seca L	MNV OD/ DF OI	HGO	0	VB AO	8	86
36	F	80	CD	20/200	Humeda	Humeda	FSF AO	HGO	0	MALA AV AO	36	80
37	F	81	20/60	20/30	Humeda	Seca L	FSR OD/ DF OI	CDMX	0	MALA AV OD	1	64
38	F	89	CD	MM	NA	Seca S	AFR + FSR OI	CDMX	0	MALA AV AO	6	68
39	F	70	20/25	20/50	Seca L	Seca M	DEF OD/ DEPS OI	CDMX	0	MD AO	1	70
40	M	91	CD	20/200	Humeda	Humeda	FSF AO	GRO	0	BAJA AV OD	48	84
41	F	76	CD	20/100	Humeda	Humeda	AFR AO	CDMX	0	ASX	0	72
42	F	78	20/70	20/70	Humeda	Humeda	AFR + FSF AO	CDMX	0	BAJA AV OI	9	74
43	M	79	20/40	20/50	Seca M	Humeda	DF OD/ MNV+DF OI	CDMX	0	NO PUEDE LEER	5	79
44	F	81	20/25	20/50	Seca L	Seca L	DEF OD/ DF OI	MICH	0	ASX	0	81
45	F	76	20/150	20/100	Seca M	Humeda	DEPS AO+ MNV OI	CDMX	0	EC	36	76
46	M	77	20/40	20/30	Seca L	Seca L	DF AO	CDMX	0	ASX	0	77
47	F	67	20/20	20/20	Seca L	Seca L	DEF AO	CDMX	0	ASX	0	67
48	M	75	20/100	CD	Seca M	Seca S	DF +DEP OD/ AFR OI	CDMX	0	BAJA AV OI	1	75
49	F	74	20/30	20/30	Seca L	Seca L	DF AO	GRO	0	VB AO	6	72
50	F	78	20/30	20/60	Seca L	Humeda	SD OD/ DF+MNV OI	JAL	0	DIPLOPIA	2	77
51	F	67	20/200	20/200	Humeda	Humeda	FSF AO+ MNV OI	TLAX	0	BAJA AV AO	8	66
52	M	84	CD	20/50	Seca S	Humeda	AFR OD/ MNV OI	QRO	0	BAJA AV AO	30	76
53	F	72	20/150	CD	Humeda	Humeda	OD LSR + DF OI LSR + AFR	HGO	0	BAJA AV +EC+MT AO	24	72
54	M	84	20/30	20/30	Seca L	Seca L	DF AO	CDMX	0	ASX	0	82
55	M	73	20/25	CD	Seca L	Humeda	DEF + MER OD MNV OI	CDMX	0	ASX	0	69
56	M	71	20/20	20/30	Seca L	Humeda	DEF OD AFR+ DEPS+ LSR OI	HGO	27.5	ASX	0	71
57	F	54	20/20	20/20	Seca L	Seca L	DEF AO	EDMX	0	ASX	0	54
58	F	74	20/30	CD	Seca L	Seca S	DF OD/ AFR OI	EDMX	0	EC OI	240	75
59	F	85	20/30	CD	Humeda	Humeda	AFR AO	PUE	0	MALA AV AO	60	85
60	F	86	20/70	NPL	Humeda	NA	MNV+ DF OD	CDMX	0	VB OD	3	74
61	F	86	20/400	CD	Humeda	Humeda	AFR + FSF AO	CDMX	0	BAJA AV AO	24	85
62	F	85	20/30	20/50	Seca M	Seca M	AFR OD/ DF+ FSF OI	CDMX	0	ASX	0	80
63	F	87	20/200	CD	Humeda	Seca S	MNV OD/ AFR OI	CDMX	0	EC OI	2	86

64	F	68	20/25	20/25	Seca L	Seca L	DF AO	CDMX	0	ASX	0	67
65	F	78	20/40	20/25	Seca L	Seca L	DF + DEPS AO	QRO	0	BAJA AV AO	12	78
66	M	75	20/400	CD	Humeda	Humeda	AFR AO	MICH	0	BAJA AV AO	36	75
67	M	75	20/60	CD	Humeda	Humeda	AFR+ QIR OD FSF OI	CDMX	0	BAJA AV OD	12	72
68	M	81	20/30	20/25	Seca L	Seca L	DEF AO +MER OI	CDMX	0	BAJA AV AO	12	71
69	F	64	20/60	CD	Humeda	Seca S	AFR+ QIR OD FSF OI	CDMX	0	MALA AV OD	12	63
70	F	83	20/30	20/30	Seca L	Seca L	DEF AO	PUE	0	ASX	0	82
71	F	75	20/100	20/50	Humeda	Humeda	AFR AO+ FSF OD	CDMX	0	BAJA AV AO	12	72
72	M	80	20/360	20/120	Humeda	Humeda	FSR OD DF+ DEPS OI	CDMX	0	MD+ VB AO	6	72
73	F	69	CD	20/30	Seca S	Humeda	AFR AO+ DEF OI	CDMX	0	VB AO	6	52
74	M	66	20/20	20/40	Seca L	Seca L	DF AO	PUE	0	MT OI	60	66
75	F	80	20/400	20/40	Humeda	Seca M	FSF OD + DF AO	CDMX	0	EC	3	80
76	F	75	20/80	20/30	Humeda	Seca L	FSF + STVM OD MNV+DEF OI	GRO	0	VB OD	4	73
77	F	62	CD	20/200	Seca S	Seca S	AFR AO	CDMX	0	VB AO	1	54
78	F	78	20/20	20/20	Seca L	Seca L	DEF AO	CDMX	0	VB AO	8	78
79	M	83	20/450	20/160	Humeda	Humeda	AFR AO+ FSF OD	CDMX	0	VB OI	2	78
80	F	86	CD	20/30	Humeda	Seca L	AFR OD / DF OI	CDMX	0	ASX	0	75
81	F	81	20/50	20/60	Seca M	Seca M	DF AO	HGO	0	MALA AV POST QX	3	81
82	F	81	20/250	CD	Humeda	Humeda	FSF +LSR OD AFR OI	CDMX	0	BAJA AV OD	60	77
83	M	86	20/400	20/25	Seca S	Seca L	DEPS+ AFR OD DEF OI	PUE	0	BAJA AV OD	60	86
84	M	84	NPL	20/100	NA	Seca S	AFR + DEF OI	SIN	57.5	MT OI	8	68
85	F	71	20/50	20/25	Humeda	Seca L	DF + FSR+ LSR OD DEF OI	CDMX	0	BAJA AV + MD	1	62
86	F	75	20/280	20/200	Humeda	Humeda	AFR AO + DEPS OD	BCS	0	BAJA AV AO	36	72
87	F	75	20/80	20/800	Humeda	Humeda	MNV OD/ AFR OI	OAX	0	BAJA AV AO	24	73
88	F	75	20/350	20/20	Humeda	Seca M	FSF OD / DF OI	BCN	0	EC SUBITO	0.1	75
89	F	71	20/20	20/200	Seca L	Humeda	DEF OD FSF + LSR OI	GRO	0	EC OI	3	66
90	F	73	20/400	20/30	Humeda	Seca L	AFR + FSF OD DF OI	CDMX	0	FOTOPSIAS AO	1	62

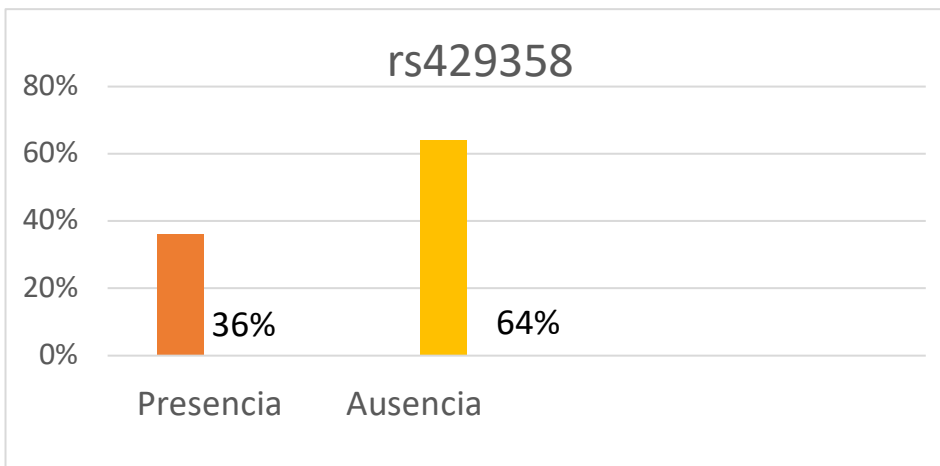
91	M	86	CD	CD	Humeda	Humeda	FSF + DEF AO QIR OD	CDMX	0	BAJA AV AO	24	82
92	M	87	CD	20/400	Humeda	Humeda	FSF + LSR AO	CDMX	0	MALA AV AO	9	87
93	M	63	20/40	20/100	Seca M	Humeda	DEF OD DEPS OI	MICH	0	MALA AV AO	6	62
94	M	90	CD	20/30	Humeda	Seca M	FSF + MNV OD DF OI	CDMX	0	EC OD	5	90
95	F	67	20/25	20/25	Seca L	Seca L	DEF AO	MICH	0	ASX	0	67
96	F	72	20/40	20/40	Seca L	Humeda	DF OD /DEP+ LSR	CDMX	0	EC OD	6	71
97	F	64	20/60	20/30	Humeda	Seca M	AFR + FSF OD AFR + DEPS OI	CDMX	0	MD + DIPLOPIA	3	57
98	F	83	MM	20/30	Humeda	Seca M	AFR + FSR OD DEPS +DF OI	COAH	0	BAJA AV	24	82
99	F	64	20/20	20/150	Seca M	Humeda	DEF AO + MNV OI	CDMX	0	MT OI	300	57
100	F	65	CD	20/20	Seca S	Seca L	AFR+ FSF OD OI SD	CDMX	3.2	BAJA AV OD	1	64

Tabla 2. Resumen de las características clinico demograficas de la muestra.

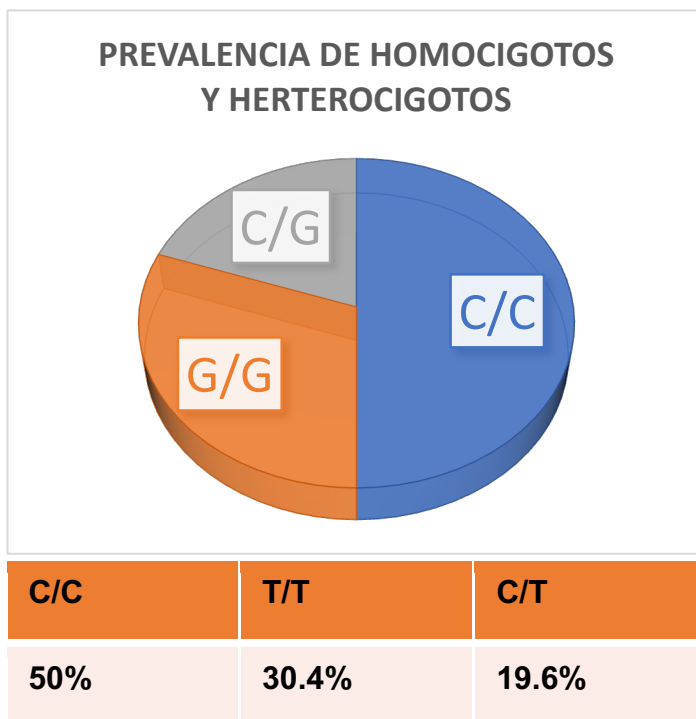
Abreviaturas: AV (Agudeza visual) AVMC (Agudeza visual mejor corregida), NPL (No Percepción de Luz), MM (Movimiento de manos), CD (Cuenta Dedos), DF (Drusas foveales) DEF (Drusas extrafoveales) AFR (Atrofia de fotorreceptores) FSF (Fibrosis subfoveal) FSR (Fibrosis subretiniana) DEPS (Despegamiento de epitelio pigmentado) LSR (Liquido subretiniano) QIR (Quiste intraretiniano) MNV (Membrana Neovascular) SD (Sin Drusas) STVM (Sindrome de Traccion Vitreomacular) MER (Membrana epiretiniana), OD (Ojo Derecho), OI (Ojo izquierdo) AO (Ambos ojos) ASX (Asintomatico) EC (Escotoma central) VB (Visión Borrosa) MT (Metamorfopsias) MD (Miodesopsias), PUE (Puebla) EDMEX (Estado de México) CDMX (Ciudad de México) VER (Veracruz) MICH (Michoacán), COAH (Coahuila), SIN (Sinaloa), BCN (Baja California Norte) BCS (Baja California Sur), OAX (Oaxaca), QRO (Queretaro), JAL (Jalisco), TLAX (Tlaxcala), GRO (Guerrero), HGO (Hidalgo), MOR (Morelos)

Análisis de polimorfismos

Se analizaron las muestras de los 100 pacientes reclutados, encontrándose una prevalencia del 36% del polimorfismo estudiado versus 64% de ausencia del mismo, misma que supera la hipótesis esperada de 10% y que a su vez contrasta con estudios similares en donde la prevalencia promedio del polimorfismo se encontró entre el 7-15% (Huang, et. al , 2014)



En cuanto al genotipo encontrado en los pacientes con el polimorfismo positivo (n=36) se encontro el alelo CC en el 50%, (n=18), GG en el 30% (n=11) y GC en 19.6% (n=7). Con estos datos se calculó la frecuencia alélica observada C=0.65 y T=0.34 utilizando el calculo de equilibrio de Hardy Weinberg en donde se muestra una relación estadísticamente significativa de las frecuencias genotípicas estudiadas con una $p < 0.00001$ así como una prevalencia mayor de pacientes heterocigotos de lo esperado (30.4% vs 19.4% proyectado) y una menor de los homocigotos (50% vs 77% proyectado) respectivamente.



SNP	N=36 FRECUENCIA OBSERVADA	HWE FRECUENCIA ESPERADA	χ^2	VALOR P
	Genotípica			
rs429358	CC 18 (0.425)	28.51(0.792)	13.74	<0.0001
	CG 11 (0.102)	7.02 (0.195)		
	GG 7 (0.120)	0.43 (0.012)		
	Alélica (N=72)			
	C 47 (0.652)	64 (0.890)	17.70	<0.0001
	T 25 (0.347)	8 (0.110)		

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La degeneración macular relacionada con la edad es un padecimiento muy común entre la población mexicana. En nuestro estudio se encontró una prevalencia de degeneración de tipo húmeda mucho más alta a la que se esperaría, probablemente secundario al hecho de que el estudio fue realizado en un centro de concentración oftalmológico y también al largo tiempo de espera que presentaban la mayoría de los pacientes para buscar atención médica provocando que la mayoría de los pacientes recolectados tuvieran cuadros mucho más graves de lo que se esperaría con un diagnóstico tardío, derivando en un porcentaje muy elevado de discapacidad entre los que la padecen; 40% de los participantes presentaban ya un grado de discapacidad moderado a severo. Esto nos demuestra la necesidad inminente de realizar programas de prevención para evitar la discapacidad visual severa derivada de la enfermedad.

En el caso del polimorfismo rs429358 del gen APOE4 se encontró una prevalencia estadísticamente significativa mayor a la reportada en series similares, pudiendo indicar que contrario a lo que sucede en poblaciones caucásicas y asiáticas, dicho polimorfismo podría estar asociado a DMRE avanzada tanto húmeda como seca, sin embargo se requiere un estudio de asociación con muchos más sujetos de estudio para poder comprobar esta hipótesis, esto también asociado al hecho de que la mayoría de los pacientes que resultaron positivos, presentaban clínicamente estadios avanzados de la enfermedad.

Con estos resultados preliminares, sería importante realizar un estudio de prevalencia del polimorfismo en población general para poder conocer la misma de manera precisa con el fin de poder realizar un cálculo de muestra mucho más preciso en un segundo estudio de asociación, el cual deberá ser multicéntrico e incluir a muchos más pacientes en estadios menos avanzados de la enfermedad que nos permita conocer si es que este polimorfismo es un factor de riesgo para la enfermedad grave en nuestra población.

9. ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas

DMRE	Degeneración Macular Relacionada con la edad
ABCA4	ATP-binding cassette (ABC) superfamily transmembrane protein 4
APOE	Apolipoproteína E
ARMS2	Age-Related Maculopathy Suceptibility 2
C3	Complemento 3
CST3	Cystatin 3
ERCC6	DNA excision repair protein 6
FBLN5	Fibulin 5
HMCN1	Hemicentin1
HTRA1	Human Peptidase serin 1
MMP9	Metaloproteinase 9
RAX2	Retina and anterior neural fold homebox 2
TRL 4	Toll-like receptor 4

Anexo 2: Consentimiento informado

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. TÍTULO DEL ESTUDIO.

Prevalencia de Polimorfismo rs429258 del gen APOE4 en la Degeneración Macular Relacionada a la Edad

Doctores encargados del estudio: Dra. Marisol Romero Márquez /Dr. Luis F. Hernández

Zimbrón.

Oftalmología / Unidad de Investigación

Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP

Vicente García Torres 46-S, San Lucas, 04030 Ciudad de

México

Número de teléfono: 565965 72

POR FAVOR, LEA ESTE FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CON ATENCIÓN. EN EL DOCUMENTO SE PRESENTA INFORMACIÓN RELEVANTE ACERCA DE ESTA INVESTIGACIÓN. SI TIENE DUDAS, PREGUNTE A LOS MÉDICOS ENCARGADOS DEL ESTUDIO ACERCA DE ELLAS.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO.

Lo/la invitamos a que participe en un estudio de investigación. Los médicos e investigadores de la Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP Dr. Luis Sánchez Bulnes, están interesados en estudiar los diferentes genes de los mexicanos que podrían estar asociados a desarrollar a edades tempranas degeneración macular relacionada a la edad.

El objetivo de este estudio es conocer si los pacientes que tienen diagnóstico de degeneración macular, tienen mutaciones en ciertos genes que los hagan más propensos a desarrollarla tempranamente. Estos genes que queremos estudiar, se han encontrado en otros países asociados a esta enfermedad, y nuestra intención es conocer si estas mutaciones también ocurren en mexicanos.

Este estudio es del conocimiento de las autoridades del Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP Dr. Luis Sánchez Bulnes. Se planean incluir aproximadamente 100 pacientes con o sin diagnóstico de degeneración macular, similar a la enfermedad que usted tiene.

2. ¿TENGO QUE PARTICIPAR?

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si Usted no está de acuerdo en participar, no se verá perjudicado(a) de ninguna manera, incluyendo el tratamiento médico y los cuidados que tiene derecho a recibir. Si decide otorgar el consentimiento para participar en el estudio, y una vez iniciado decide que no quiere seguir participando, puede retirar el consentimiento en cualquier momento sin que ello afecte su tratamiento o cuidados médicos.

3. ¿QUÉ PASARÁ CONMIGO SI PARTICIPO?

Si decide participar, al momento de su ingreso al estudio, se le tomará una muestra de sangre, la cual será procesada y para la identificación de ciertos genes.

Además de esta única toma de sangre, el personal del estudio recopilará información acerca de su estado de salud. La mayor parte de las veces esta información se obtendrá a través del expediente, pero en otras se le tendrá que preguntar a usted directamente, y revisar cómo evoluciona.

4. ¿QUE RIESGOS EXISTEN AL PARTICIPAR?

La toma de muestra de sangre, se realiza con material estéril tal y como se toman las muestras de pacientes diariamente en el laboratorio. Puede sentir un pinchazo, para algunas personas puede resultar desagradable por el hecho de tener que introducir una aguja para retirar 5-8 ml de sangre. Ocasionalmente puede haber molestias como ardor leve por unos minutos después de haber tomado la muestra, así como posible formación de un moretón. Ocasionalmente se puede sentir hormigueo, que ocurriría sólo en caso de que la aguja tocara algún nervio, lo cual es extremadamente raro. Además, las complicaciones asociadas a este procedimiento son muy escasas.

De presentar molestias relacionadas a este procedimiento se indicará un tratamiento apropiado para ello, normalmente será a base fomentos fríos. Favor de NO doblar el brazo una vez que se le tome la muestra, sólo presione sobre la herida con su dedo y un algodón durante 10 minutos. La

persistencia de las molestias después de la toma de la muestra son muy infrecuentes. De necesitar el tratamiento, este no tendrá costo para usted.

Es necesario mencionar a usted que este protocolo ha sido evaluado y aprobado por los comités de investigación y ética en investigación de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México I.A.P.

5. ¿CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS DE PARTICIPAR?

Si usted resulta tener alguna mutación en los genes que estudiaremos, y si se demuestra que dichas mutaciones significan un mayor riesgo de presentar la enfermedad, usted será informado, para que tome las medidas de evaluación temprana con sus familiares (hijos, sobrinos, etc). Esta información puede ayudar a sus médicos a tomar mejores decisiones en cuanto a la frecuencia de revisiones o inicio de tratamiento o medidas profilácticas. Además, ayudará al avance científico para que otros pacientes en el futuro sean diagnosticados tempranamente.

Dependiendo de los resultados del estudio, en un futuro puede ayudar a que se establezcan ciertas políticas de diagnóstico y manejo que ayuden a otros pacientes como Usted.

6. ¿CUÁNTO CUESTA PARTICIPAR?

La participación en este estudio no tiene ningún costo. Todas las muestras de sangre que se soliciten serán cubiertas por este estudio.

7. ¿CUALES SON MIS RESPONSABILIDADES EN ESTE ESTUDIO?

Mi responsabilidad al participar en este estudio es la de contestar las preguntas realizadas por los doctores del estudio y proporcionar las muestras requeridas.

8. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Durante el estudio, las muestras biológicas (sangre) serán recogidas, procesadas para la obtención de ADN de estas muestras y reportadas en la Asociación para Evitar la Ceguera, IAP. Todas las muestras identificables serán tratadas de manera tal que se mantenga la confidencialidad del paciente en todo momento. Las muestras de ADN y la información relacionada a este tipo de muestra no será compartida con ninguna otra persona o institución que no esté registrada en este protocolo.

9. ¿CÓMO SE USARÁN MIS DATOS PERSONALES?

Toda la información será recabada, procesada, almacenada y analizada por los investigadores y personal del estudio. Toda la información será tratada de manera confidencial, y de efectuarse alguna publicación de los hallazgos del estudio, los datos de carácter personal no serán identificables.

La información, así como cualquier registro de imagen (fotografías) sólo estarán disponible para los investigadores y personal del estudio. En caso de solicitarlo, las autoridades de la Asociación para Evitar la Ceguera, IAP podrán tener acceso a la información relacionada con este estudio.

10. ¿A QUIEN DEBO CONTACTAR SI NECESITO MAS INFORMACIÓN O AYUDA?

En caso de dudas acerca del estudio, por favor póngase en contacto con los investigadores principales:

Nombre de los investigadores: Dra. Marisol Romero Márquez , Número de contacto 24 horas: 5529699281

Dr. Luis F. Hernández Zimbrón, Número de contacto 24 horas;
5525646078

Dirección: Unidad de Investigación, Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP, Vicente García Torres 46-S, San Lucas, 04030 Ciudad de México

Número de teléfono del Departamento de Investigación: 56 59 65 72

Para aclarar sus dudas sobre sus derechos por participar en un estudio clínico, puede contactar al Comité de Ética en Investigación con el Dr. Everardo Hernández, Presidente y Secretario

Comité de Ética en Investigación de Asociación para Evitar la Ceguera en México, IAP

Dr. Everardo Hernández, Presidente del Comité de Ética en Investigación.

Dirección: Vicente García Torres 46-S, San Lucas, 04030 Ciudad de México Teléfono: 1084-1400, extensión 1303.

11. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO Y AUTORIZACIÓN DEL SUJETO

He recibido información verbal sobre el estudio y he leído la información adjunta por escrito. Me han dado la oportunidad de discutir el estudio y hacer preguntas. Yo voluntariamente doy mi consentimiento para participar en el estudio. Acepto voluntariamente permitir que el personal del estudio recoja, utilice y comparta mi información de salud como se especifica en este formato. Entiendo que puedo negarme a participar o retirarme del estudio en cualquier momento sin que ello repercuta en mis cuidados y atención médica. Acepto libremente participar en el estudio. Recibiré una copia firmada de esta carta de consentimiento informado.

_____	_____	_____
Nombre del participante	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre de quien obtuvo el consentimiento	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del testigo 1 y parentesco	Firma	Fecha
	Dirección	
_____	_____	_____
Nombre del testigo 2 y parentesco	Firma	Fecha
	Dirección	

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baird PN, Guida E, et al. The epsilon2 and epsilon4 Alleles of the Apolipoprotein Gene Are Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(5):1311–5. [PubMed: 15111582].
- Huang.Y. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's DiseasesvNeurobiol Dis. 2014 December ; 72PA: 3–12.
- Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *The British journal of ophthalmology*. 2012 May;96(5):614-8. PubMed PMID: 22133988.
- Strittmatter WJ, Roses AD. 1995. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4725–4727.
- Tai, L. M., Ghura, S., Koster, K. P., Liakaite, V., Maienschein-Cline, M., Kanabar, P., ... & Green, S. J. (2015). APOE-modulated Aβ-induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *Journal of neurochemistry*, 133(4), 465-488.
- Takes N, Miyashita A, Tsukie T, et.al. Genetic association study on in and around the APOE in late onset Alzheimer's disease in Japanese. *Genomics* (93) 2009; 441-448
- Wallace VA. Concise review: making a retina-from the building blocks to clinical applications. *Stem Cells*. 2011; 29:412–417. [PubMed: 21425405]
- Wang, W., Li, Z., Sato, T., & Oshima, Y. (2012). Tenomodulin Inhibits Retinal Neovascularization in a Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 15373-15386.
- Weisgraber K. H., Innerarity T. L. and Mahley R. W. (1982) Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J. Biol. Chem.*257, 2518–2521.

- Yang F, Chu X, Yin M, Liu X, Yuan H, Niu Y, et al. mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behav Brain Res.* 2014;264:82-90
- Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health.* 2014;2(2):e106-e16.