

## ESTUDIO DE SUCEPTIBILIDAD GENÉTICA A LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (DMAE)

### *Study of Genetic Susceptibility to Age-related Macular Degeneration*

Tomás GONZÁLEZ CABERO; Rogelio GONZÁLEZ SARMIENTO

Unidad de Medicina Molecular. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.  
Universidad de Salamanca. Calle Alfonso X el Sabio, s/n. 37007 Salamanca  
Correo-e: tgonzc00@usal.es; gonzalez@usal.es

**RESUMEN:** La degeneración macular asociada a la edad es la principal causa de pérdida de visión central severa e irreversible en personas mayores de 50 años en los países desarrollados.

Esta enfermedad se puede clasificar en dos grupos, seca y húmeda, siendo esta última objeto de estudio en este trabajo, la cual se caracteriza por el desarrollo de neovascularización coroidea. Debido a la importancia de los SNPs en el desarrollo de esta enfermedad, se estudiarán tres polimorfismos pertenecientes al gen que codifica la endoglina (rs1998923, rs1330683 y rs1330684) y un polimorfismo perteneciente al gen que codifica la presenilina-1 (rs165932). Por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar si el desarrollo de esta enfermedad está relacionado con estos polimorfismos. Para ello, se seleccionaron un total de 326 muestras de ADN de pacientes del Hospital Universitario de Salamanca, de los cuales 175 estaban diagnosticados de DMAE húmeda (casos) y 151 de cataratas (controles) y se analizaron los distintos genotipos mediante discriminación alélica con sondas Taqman®. Tras realizar el test chi-cuadrado para comprobar si existía una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), se concluye que el desarrollo de degeneración macular asociada a la edad húmeda no va a estar relacionado con estos polimorfismos.

*Palabras clave:* DMAE; neovascularización coroidea; drusa; polimorfismo; discriminación alélica.

**ABSTRACT:** Age-related macular degeneration is the leading cause of severe and irreversible central vision loss in people over 50 in developed countries. This disease can be classified into two groups, wet and dry, the latter being the object of study in this paper, which is characterized by the development of choroidal neovascularization. Due to the importance of SNPs in the development of this disease, three polymorphisms belonging to the gene that encodes endogline (rs1998923, rs1330683 and rs1330684) and a polymorphism belonging to the gene that encodes preseniline-1 (rs165932) will be studied. Therefore, the objective of this work is to determine if the development of this disease is related to these polymorphisms. For this purpose, a total of 326 DNA samples were selected from patients at the University Hospital of Salamanca, of which 175 were diagnosed with wet age-related macular degeneration (cases) and 151 with cataracts (controls). The different genotypes were analysed using allelic discrimination with Taqman® probes. After performing the chi-squared test to check whether there was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ), it is concluded that the development of wet age-related macular degeneration will not be related to these polymorphisms.

*Keywords:* AMD; choroidal neovascularization; druse; polymorphism; allelic discrimination.

## 1. INTRODUCCIÓN

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad con una etiopatogenia de carácter multifactorial, la cual se caracteriza por la aparición de una o varias alteraciones degenerativas progresivas en la mácula, como son formación de drusas, alteración del epitelio pigmentario de retina y formación de neovasos (Fernández, 2017).

A día de hoy, es la principal causa de pérdida de visión central severa e irreversible en personas mayores de 50 años en los países desarrollados (Fernández, 2017).

La DMAE dificulta actividades como la lectura, la conducción, reconocer caras, ver la televisión, etc. Es indolora y su progresión varía, avanzando lenta o rápidamente, en un ojo o en ambos. Cuando la DMAE se desarrolla con un deterioro muy gradual (generalmente DMAE seca), el cerebro puede inicialmente compensarlo y sus síntomas tardan en aparecer. Cuando la enfermedad avanza

rápidamente (DMAE húmeda), se puede producir una apreciable y rápida pérdida de visión. Independientemente de cómo de rápido progrese la enfermedad, si no se trata, la DMAE avanzada puede conducir a una pérdida de visión permanente (Fernández, 2017; The Angiogenesis Foundation, 2014).

La DMAE tiene dos formas: la húmeda y la seca. En ambas, los síntomas incluyen metamorfopsias y pérdida de visión central indolora que puede acabar en la presencia de un escotoma central, pudiendo haber también pérdida de sensibilidad al contraste y de visión cromática (Fernández, 2017).

### 1.1. Factores de riesgo

Dado que es una enfermedad de etiopatogenia multifactorial, habrá una serie de factores de riesgo. Dentro de los factores de riesgo más importantes para que se desarrolle o progrese esta enfermedad, está el ser o haber sido fumador, así como la vinculación genética. También serán factores de riesgo la HTA y/o la hipercolesterolemia. Otros factores de riesgo con un peso menor que los anteriores serán la diabetes, un elevado IMC, la menopausia tardía, la hipermetropía, la ingesta de alcohol y el nivel de estudios. Así como hay factores de riesgo, también hay factores que protegen, por lo que van a reducir la incidencia de la enfermedad, la ingesta de AGP omega-3 y la actividad física frecuente (López *et al.*, 2009).

### 1.2. Epidemiología

En España hay alrededor de 130.000 casos de DMAE diagnosticados, estimándose 300.000 afectados en total. Entre 60 y 75 años se estima que un 6,4 % de las personas la padecen, incrementándose hasta un 15-20 % a partir de los 75 años. Dado que es una enfermedad que es más frecuente a medida que la población envejece, cobra gran importancia que en España haya más de 6,5 millones de personas mayores de 65 años, pudiendo aumentarse hasta 8 millones dentro de 20 años, por lo que irá adquiriendo más importancia debido al envejecimiento de la población (FISABIO, 2014).

### 1.3. Clasificación

Existen diversas clasificaciones de la DMAE (Wisconsin, AREDS, etc.), pero todas tienen en común que diferencian dos grandes grupos: la forma seca o atrófica (menos grave) y la forma exudativa, neovascular, hemorrágica o húmeda, que es de mayor gravedad (Fernández, 2017; López *et al.*, 2009).

- La atrófica representa un 86 % de los casos de DMAE, y en ella se aprecia un engrosamiento de la membrana de Bruch, formación de drusas y

degeneración progresiva del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Presenta una progresión más lenta que la exudativa (Fernández, 2017; López *et al.*, 2009).

- La húmeda representa un 14 % de los casos, y se caracteriza por el desarrollo de neovascularización coroidea (NVC). La NVC puede clasificarse de acuerdo a la posición en la que ocurre con respecto a la fovea: extrafoveal (a más de 200 micras desde el centro foveal), yuxtafoveal (entre 1 y 200 micras desde el centro foveal) y subfoveal (debajo del centro foveal). Esta es más agresiva en la afectación visual debido a la NVC y la subsecuente cicatrización (Fernández, 2017; López *et al.*, 2009).

#### 1.4. Etiopatogenia

Los conocimientos en cuanto a la etiopatogenia de esta enfermedad no son del todo completos, pero sí que se conocen cuatro procesos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad:

- **Lipofuscinogénesis:** consiste en la acumulación de lipofuscina, que es consecuencia de alteraciones metabólicas del EPR debido a la edad. Los gránulos de lipofuscina que se forman están constituidos por lípidos (50 %) y proteínas (44 %) procedentes de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Este proceso de lipofuscinogénesis está relacionado con la exposición a la luz y los niveles altos de oxígeno en la retina ya que favorecen los procesos oxidativos, lo cual va a incrementar la lipofuscinogénesis (Nowak, 2006).
- **Drusogénesis:** las drusas son sustancias lipoproteicas, de un color amarillento, que surgen cuando en el ojo no se consiguen eliminar las sustancias de deshecho que en él mismo se producen. Las drusas maculares aparecen entre la membrana basal del EPR y la membrana de Bruch, aparecen con la edad y no tienen por qué producir lesión macular. Sin embargo, en ocasiones producen daño macular pudiendo originar DMAE. Se distinguen drusas duras y drusas blandas. Las primeras son más pequeñas, tienen bordes definidos y se encuentran alejadas unas de otras, no tienen por qué causar problemas de visión. Sin embargo, las segundas son más grandes y se encuentran agrupadas unas con otras, no presentan bordes tan definidos como las anteriores y la presencia de drusas blandas aumenta el riesgo de DMAE (Nowak, 2006; The American Academy of Ophthalmology Foundation, 2014).
- **Neovascularización:** en condiciones normales hay un equilibrio entre factores proangiogénicos (como VEGF) y antiangiogénicos (como PEDF), el cual se puede romper en caso de situaciones de hipoxia o isquemia,

aunque en el caso de la DMAE este desequilibrio viene dado por reacciones inmunes junto con procesos de *inflamación local* (Nowak, 2006).

### 1.5. Pruebas diagnósticas

Basándose en las causas de la enfermedad y en los síntomas, hay diversas pruebas diagnósticas, siendo las que se utilizan a día de hoy:

- Prueba de agudeza visual (AV)
- Rejilla de Amsler
- Exploración del fondo de ojo
- Tomografía de coherencia óptica (OCT)
- Angiografía con fluoresceína (AGF)
- Fotometría intermitente heterocromática (HFP)
- Autofluorescencia (AF)

### 1.6. Tratamientos

- DMAE atrófica: no existe un tratamiento específico, aunque consumir determinados complementos vitamínicos y minerales puede reducir el riesgo de progresión de esta enfermedad con el fin de que no se acabe convirtiendo en una DMAE avanzada o húmeda. Aquí estaría la fórmula vitamínica AREDS (Fernández, 2017).
- DMAE exudativa: puede ser tratada con inyecciones oculares (intravítreas), terapia fotodinámica y cirugía láser, que tienen como objetivo el frenar la angiogénesis. Habrá, por tanto, fármacos como Avastin® (bevacizumab), Eylea® (aflibercept), Lucentis® (ranibizumab), Macugen® (pegaptinib de sodio), además de la terapia fotodinámica (PDT) o la cirugía de fotocoagulación láser (Fernández, 2017).

### 1.7. Genética

La DMAE presenta un componente genético significativo. El riesgo atribuible a la población relacionado con los factores genéticos es del 23 % y la heredabilidad para la DMAE es del 45 %. Las variaciones genéticas que suelen estar más asociadas al riesgo de DMAE son los SNPs, que son cambios de una única base en una posición concreta de la cadena de ADN, de tal forma que pueden dar lugar a la transcripción de un aminoácido alternativo, lo que puede afectar directamente a la función de la proteína produciendo la enfermedad (Simón, 2015).

Debido a la importancia de los SNPs en el desarrollo de la DMAE, en el presente trabajo se estudiará la influencia de cuatro polimorfismos en el desarrollo de esta enfermedad. Los polimorfismos que se van a estudiar van a ser de los genes **ENG (rs1998923, rs1330683 y rs1330684)** y **PSEN1 (rs165932)**.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que la sobreexpresión del gen ENG afecta a los procesos de vascularización in vivo (Núñez *et al.*, 2016), se ha considerado estudiar los polimorfismos rs1998923, rs1330683 y rs1330684 ya que la DMAE húmeda se relaciona con la neovascularización coroidea.

También, respecto al gen PSEN1, se han visto similitudes entre la formación de drusas y la enfermedad de Alzheimer, ya que en ambas existen depósitos de amiloide (Sociedad Española de Retina y Vítreo, 2009), motivo por el cual se ha considerado estudiar el polimorfismo rs165932.

Por tanto, el objetivo de este trabajo será analizar la distribución genotípica de estos polimorfismos con el fin de estudiar si estos se van a relacionar con el riesgo a desarrollar DMAE húmeda.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. *Pacientes*

Se seleccionaron un total de 326 muestras de ADN de pacientes del Hospital Universitario de Salamanca, de los cuales 175 estaban diagnosticados de DMAE húmeda (casos) y 151 de cataratas (controles).

Todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado y las muestras fueron mantenidas en confidencialidad, siendo identificadas con su correspondiente número de laboratorio.

### 3.2. *Extracción del DNA y discriminación alélica mediante sondas Taqman®*

El método utilizado en la extracción del DNA fue el del fenol-cloroformo. Una vez extraído, se analizaron los distintos genotipos de las muestras mediante discriminación alélica con sondas TaqMan®.

Esta técnica de discriminación alélica (PCR en tiempo real) permite amplificar fragmentos específicos del DNA, así como de registrar la cantidad de DNA amplificado gracias al uso de sondas fluorescentes. Una vez amplificado, a través de un termociclador (Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR system) se lleva a cabo la lectura de la emisión de fluorescencia.

Las sondas que se han utilizado estaban marcadas con los fluorocromos VIC y FAM para cada alelo. La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de DNA que se forma, lo que va a permitir conocer y registrar la cinética de la reacción de amplificación.

TABLA 1. Polimorfismos estudiados mediante discriminación alélica con sondas TaqMan®

Gen	Polimorfismo	Sonda Taqman®
ENG	rs1998923	C_3130536_20
ENG	rs1330683	C_8342593_1
ENG	rs1330684	C_8342597_1
PSEN1	rs165932	C_579315_20

### 3.3. Análisis estadístico

Se realizó el test chi-cuadrado para comprobar si existía una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS (versión 21.0).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Gen de la endogлина (ENG)

El gen ENG se localiza en el cromosoma 9, región 34, banda 1 (9q34.1) y consta de 16 exones. Se corresponde con la localización 127811035-127858748. Este gen codifica una proteína transmembrana homodimérica que es una glicoproteína principal del endotelio vascular. Forma parte del complejo que forma el receptor TGF- $\beta$ , que se une a los péptidos TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 con alta afinidad. Mutaciones en este gen causan telangiectasia hemorrágica hereditaria, también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, que consiste en una displasia vascular multisistémica autosómica dominante. Este gen también puede estar involucrado en la preeclampsia y varios tipos de cáncer (NCBI, 2019).

Los resultados obtenidos (Tabla 2) indican que las distribuciones genotípicas de los polimorfismos rs1998923 (G>A), rs1330683 (C>G) y rs1330684 (C>T) no muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con DMAE húmeda y pacientes con cataratas, por lo que el desarrollo de DMAE húmeda no va a estar relacionado con estos polimorfismos.

TABLA 2. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs1998923, rs1330683 y rs1330684 en pacientes con DMAE húmeda y con cataratas

SNP	Genotipo	DMAE	Cataratas	P	IC 95 %
rs1998923	GG	7 (4 %)	5 (3,3 %)	0,922	
	GA	48 (27,4 %)	40 (26,5 %)		
	AA	120 (68,6 %)	106 (70,2 %)		
rs1330683	CC	51 (29,3 %)	45 (30 %)	0,433	
	CG	83 (47,7 %)	79 (52,7 %)		
	GG	40 (23,0 %)	26 (17,3 %)		
rs1330684	CC	67 (38,3 %)	52 (34,4 %)	0,163	
	CT	81 (46,3 %)	84 (55,6 %)		
	TT	27 (15,4 %)	15 (9,9 %)		

#### 4.2. Gen de la presenilina 1 (PSEN1)

El gen PSEN1 se localiza en el cromosoma 14, región 24, banda 3 (14q24.3); se corresponde con la localización 73,127,709 - 73,232,417 y consta de 14 exones. Este gen codifica una proteína (presenilina 1) que se ha demostrado que tiene un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, ya que mutaciones en este gen tienen como resultado una mayor producción de  $\beta$ -amiloide, que es el principal componente de los depósitos amiloides que se encuentran en el cerebro de personas con enfermedad de Alzheimer (EA) (NCBI, 2019).

Dada su importancia en la EA, el motivo por el cual se estudia el polimorfismo rs165932 del gen PSEN1 es porque se han visto similitudes entre la formación de drusas y la EA, ya que en ambas existen depósitos de amiloide (Sociedad Española de Retina y Vítreo, 2009).

Los resultados obtenidos (Tabla 3) indican que las distribuciones genotípicas del polimorfismo rs165932 (G>T) tampoco muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con DMAE húmeda y pacientes con cataratas, por lo que el desarrollo de DMAE húmeda no va a estar relacionado con este polimorfismo.



TABLA 3. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs165932 en pacientes con DMAE húmeda y con cataratas

SNP	Genotipo	DMAE	Cataratas	P	IC 95 %
rs165932	TT	51 (29,1 %)	44 (29,1 %)	0,545	
	TG	97 (55,4 %)	77 (51 %)		
	GG	27 (15,4 %)	30 (19,9 %)		

## 5. CONCLUSIONES

A raíz de los resultados obtenidos en el estudio realizado, se puede concluir que:

1. Ninguno de los polimorfismos del gen ENG (rs1998923, rs1330683 y rs1330684) y PSEN1 (rs165932) muestran diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que presentaban DMAE húmeda y cataratas. El desarrollo de DMAE húmeda no va a estar relacionado con estos polimorfismos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aao.org [Internet]. San Francisco: The American Academy of Ophthalmology Foundation; 2014 [actualizado 20 mar 2019; citado 22 abr 2019]. Disponible en <https://www.aao.org/salud-ocular/enfermedades/drusas>
- Fernández S. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) y Calidad de Visión. *Gaceta de Optometría y Óptica Oftálmica* 2017; 525 (mayo).
- Fisabio.san.gva.es [Internet]. Valencia: FISABIO; 2014 [citado 21 abr 2019]. Disponible en <http://fisabio.san.gva.es/dmae>
- Griño C, Lugo F, León M, Ligeró S, Ruiz JM, Montero J. Tomografía de Coherencia Óptica (OCT). Funcionamiento y Utilidad en Patología Macular (III). *Gaceta de Optometría y Óptica Oftálmica* 2008; 428 (14-16).
- López A, García N, Nieto JC. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE). Revisión Etiopatogénica y Terapéutica. Actuación del Óptico-optometrista en la Detección Primaria y el Seguimiento Terapéutico. *Gaceta de Optometría y Óptica Oftálmica* 2009; 438 (junio).
- Ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. Rockville. National Center for Biotechnology Information [actualizado 3 jun 2019; citado 18 jun 2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2022>
- Ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. Rockville. National Center for Biotechnology Information [actualizado 15 jun 2019; citado 18 jun 2019]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5663>
- Nowak JZ. Age-related Macular Degeneration (AMD): Pathogenesis and Therapy. *Pharmacol Rep.* 2006; 58:353-363.

- Núñez E, López JM, Pericacho M. Las Isoformas de la Endogлина en la Regulación de la Angiogénesis. Gredos 2016. DOI 10.14201/gredos.129776
- Scienceofamd.org [Internet]. Cambridge: The Angiogenesis Foundation. The Science of AMD: 2014 [citado 21 de abr 2019]. Disponible en <http://www.scienceofamd.org/es/learn/>
- Serv.es [Internet]. Santiago de Compostela: Sociedad Española de Retina y Vítreo; 2009 [actualizado ene 2014; citado 10 mar 2019]. Disponible en [https://serv.es/wp-content/descargasWP/.../Guia\\_SERV\\_01\\_segundaRevision.pdf](https://serv.es/wp-content/descargasWP/.../Guia_SERV_01_segundaRevision.pdf)
- Simón B. Genética de la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE). Gaceta de Optometría y Óptica Oftálmica 2015; 505 (julio/agosto).