

---

# Análisis genético- molecular de glaucoma primario de ángulo abierto en familias peruanas<sup>1</sup>

GENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF PRIMARY OPEN ANGLE GLAUCOMA IN PERUVIAN FAMILIES

---

Guevara María Luisa <sup>2</sup>

## RESUMEN

### OBJETIVO

Caracterizar e identificar el componente genético del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) en tres familias peruanas con reiterada presencia de GPAA.

### MATERIAL Y MÉTODO

Es un estudio de casos familiares, con una muestra de tres familias que representan un total de 39 individuos de los cuales 25 afectados con diagnóstico de GPAA. El criterio diagnóstico fue presión intraocular (PIO) > 22 mm Hg y/o excavación del disco óptico mayor a 0.6, y que sea primario o esencial. Se extrajo el ADN y se hizo amplificación de microsatélites por PCR, electroforesis en gel de poliacrilamida y búsqueda de mutaciones de miocilina (MYOC) y optineurina (OPTN).

### RESULTADOS

Las tres familias presentaron en ambos sexos segregación mendeliana de tipo autosómico dominante. Una familia segrega con microsatélites de la región GLC1B (cromosoma 2cen-q13). Otra familia segrega con marcadores de la región GLC1F en 7q35-36, y constituye el segundo caso confirmatorio a nivel mundial para este locus. Por otro lado, encontramos una nueva mutación causal en el gen MYOC (GLC1A) en una tercera familia. El producto es similar a la mutación más frecuente en caucásicos.

### CONCLUSIONES

Hubo asociación de GPAA con loci previamente descritos por otros autores, en las regiones cromosómicas GLC1A, GLC1B y GLC1F, confirmándose heterogeneidad genética de GPAA en el Perú. La mutación Asn480Lys está presente en los miembros afectados de una familia estudiada y permitió el diagnóstico presintomático de un paciente, lo que demostró la utilidad del estudio genético-molecular para GPAA.

## PALABRAS CLAVE

Glaucoma de ángulo abierto, Genética, Técnicas de Diagnóstico Molecular (*Fuente: DeCS BIREME*).

Glaucoma primario (*palabra clave de la autora*)

## ABSTRACT

### OBJECTIVE

To characterize and identify the genetic component of primary open angle glaucoma (POAG) in three Peruvian families where POAG affects several members.

### MATERIAL AND METHODS

This is a family case study, with a sample of 39 people in three families and 25 individuals diagnosed with POAG. Diagnosis criteria were intraocular pressure (IOP) > 22 mm Hg and/or excavated ocular disc values higher than 0.6, and with primary glaucoma. DNA was extracted and microsatellites were amplified by PCR, polyacrylamide electrophoresis and searched for mutations in myocilin (MYOC) and optineurin (OPTN).

### RESULTS

The three families showed an autosomal dominant inheritance pattern. One family segregates with microsatellites of the GLC1B region (chromosome 2cen-q13). Another family segregates with markers in region 7q35-36 GLC1F, constituting the second worldwide confirmatory case for this locus. On the other hand, we found a new causative mutation in the gene MYOC (GLC1A) in a third family. The product is similar to the most common mutation in Caucasians.

### CONCLUSIONS

There was an association of POAG with loci previously described by other authors, in the chromosomal regions GLC1A, GLC1B and GLC1F, confirming genetic hetero-

---

<sup>1</sup> Resumen de Tesis de Doctorado, III Concurso Nacional de Postgrado. ANR 2009.

<sup>2</sup> María Luisa Guevara Gil. Docente Inv. Del Centro de Genética Facultad de Medicina Humana - Universidad de San Martín de Porres.

geneity of POAG in Peru. Mutation Asn480Lys is present in the affected members of the studied family and allowed the presymptomatic diagnosis of a patient, demonstrating the usefulness of molecular genetic studies for POAG.

### KEY WORDS

Glaucoma open-angle, Genetics, Molecular Diagnostic Techniques (Source MeSH NLM y DeCS BIREME).

Primary glaucoma

### INTRODUCCIÓN

Dilucidada la secuencia completa del genoma humano, se estudia ahora la estructura y función de los genes y sus productos, además de ver los efectos que tienen sobre la salud humana cuando están alterados por una mutación en alguna secuencia estructural o regulatoria. Hay más de 5000 entradas en OMIM (catálogo en línea de herencia mendeliana en el hombre) para enfermedades genéticas, y en muchas de ellas todavía no se conoce el gen responsable.<sup>1</sup> Para ello, se ponen en práctica estrategias para identificarlas, como por ejemplo, basarse en el conocimiento de la proteína alterada o usar el análisis de ligamiento genético mediante marcadores moleculares.<sup>2</sup>

El término glaucoma incluye una neuropatía óptica en donde la degeneración de las células ganglionares de la retina lleva a la excavación característica de la cabeza del nervio óptico (pérdida de fibras).<sup>2</sup> (Figura 1). Este daño ocasiona la reducción del campo visual y la consiguiente ceguera, afectando usualmente ambos ojos. Los criterios de diagnóstico varían, pero se ha establecido la definición siguiente: aumento de la presión intraocular (PIO) mayor de 22mmHg, “encopamiento” del nervio óptico, anomalías del campo visual (perimetría), todos juntos o como hallazgo único.<sup>3</sup>

Se estima que, hasta un 50% de los pacientes no sabe que tiene la enfermedad en el momento del diagnóstico, la que se vuelve sintomática solamente cuando hay pérdida del campo visual. La PIO elevada está presente en aproximadamente la mitad de los sujetos estudiados, pero un diagnóstico basado solamente en este aspecto es impreciso, debido a la sensibilidad de distintos aparatos para medir PIO, así como el momento y la periodicidad en que se evalúa este y otros parámetros.<sup>1,4,5</sup>

La importancia del componente genético de GPAA, radica en que familiares de pacientes tienen una alta probabilidad de presentar la enfermedad. Así por ejemplo, si un individuo está afectado, existe una probabilidad de hasta 16% de que algún familiar suyo también tenga la enfermedad,

comparado con el 1-2% de estar afectado en la población general.<sup>6</sup>

La investigación de la genética molecular del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) ha progresado considerablemente en la última década, desde que se encontró la primera región cromosómica ligada a la enfermedad en el brazo largo del cromosoma 1 (GLC1A), en donde la estrategia del gen candidato permitió la identificación del gen de la miocilina (MYOC) en 1q23-q25<sup>7,8</sup>. Posteriormente, se hicieron estudios en diversas familias y se encontraron también otras regiones cromosómicas con genes implicados en la enfermedad, como el de optineurina (OPTN) en 10p15-14 y WDR36 en 5q21.3-5q22.1.<sup>9,10</sup>

Según el Comité de Nomenclatura de la Organización del Genoma Humano (The Human Genome Organization/Genome Database), se designa “GLC” al símbolo general para los loci de glaucoma primario. Los números “1”, “2” y “3” representan el tipo de glaucoma, de acuerdo al ángulo iridocorneal: ángulo abierto, ángulo cerrado y glaucoma congénito, respectivamente. Las letras indican el orden temporal de identificación, “A”, “B” y “F” indican el primer, segundo y sexto gen mapeado para cada grupo.<sup>11</sup>

En el caso del glaucoma, y concretamente en GPAA, se ha establecido heterogeneidad genética en el sentido de haber varios genes para la misma enfermedad. Por ejemplo, en el glaucoma juvenil, hay familias con claro ligamiento a la región GLC1A (cromosoma 1), mientras otras con fenotipo clínicamente similar, están mapeadas en otro cromosoma. Así, se reporta heterogeneidad para glaucoma y para hipertensión ocular (factor de riesgo para GPAA) en un estudio en familias francesas con glaucoma juvenil y adulto, en donde las PIOs no diferían significativamente, y encuentran cuatro familias ligadas a GLC1A y tres no ligadas.<sup>12</sup>

El término heterogeneidad genética se aplica cuando manifestaciones clínicamente distintas surgen a partir de mutaciones diferentes en el mismo gen (heterogeneidad alélica)<sup>3</sup>. Existen diversas presentaciones clínicas para GPAA, y conocer la mutación responsable es importante porque dependiendo de ésta, el glaucoma será más o menos severo<sup>6</sup>. Así, algunas mutaciones en miocilina están asociadas a glaucoma juvenil (ej. Tyr437His) con PIOs elevadas y otras como Gln368STOP producen glaucoma adulto. Por ello, la identificación de mutaciones da la posibilidad de un pronóstico molecular y, además, puede ayudar a definir el tratamiento<sup>14</sup>. Así, por ejemplo, la mutación Pro370Leu muestra un fenotipo muy severo y de alta penetrancia, en donde la medicación dada es esencialmente ineficaz, por lo que se requiere de cirugía de filtración para controlar el curso de la

enfermedad. En estos casos, se recomienda que estos pacientes sean revisados continuamente a fin de prevenir el daño al nervio óptico. Igualmente, los pacientes con mutación Glu50Lys del gen OPTN, tienen glaucoma más severo que otros pacientes con glaucoma de presiones normales con otras mutaciones de OPTN<sup>15</sup>.

La contribución de la epidemiología, que estudia la distribución y determinantes de enfermedades en la población, demuestra que éstas no se dan al azar y tienen frecuencias variables en diferentes grupos. A pesar de su etiología compleja, y la dificultad de diagnóstico, se han identificado grupos con mayor prevalencia de glaucoma. Para población caucásica, el rango va entre 0.28% a 2%<sup>16</sup> y en población de origen africano, es hasta 8%<sup>16, 17, 18,19, 20</sup>. A esto se añade el hecho de que existe GPAA de PIOs normales y en Japón por ejemplo, el 78% de los casos de GPAA son de presiones normales (menor de 22 mmHg)<sup>15</sup>.

Se han reportado diversos factores de riesgo para GPAA que incluyen la edad, el grupo étnico, factores vasculares, miopía, diabetes, historia familiar.<sup>18, 21, 22</sup>

Para el estudio realizado, se utilizaron dos estrategias: marcadores microsatélites y detección de mutaciones en MYOC y OPTN. Los microsatélites son secuencias de ADN repetidas en tándem, que se encuentran en todas las regiones cromosómicas y son usadas para estudios de ligación genética y mapeo de genes.<sup>15</sup> La cosegregación de un alelo de un marcador específico con la enfermedad en una familia, sugiere ligación física entre el gen y el marcador, por lo tanto, ellos estarían siendo transmitidos como “un solo paquete” a través de las generaciones.<sup>23</sup>

El GPAA es el tipo más común de glaucoma en el mundo y posee un componente genético variable.<sup>24</sup> El análisis comparativo entre diferentes pacientes/familias va delineando algunas diferencias fenotípicas, de diagnóstico, pronóstico y tratamiento, de acuerdo al locus involucrado y de acuerdo a las mutaciones, cuando son conocidas. Una característica del GPAA es el ser asintomático y progresivo, hasta que ocasiona la pérdida irreversible de la visión, pero felizmente en una fase inicial ésta puede ser controlada, según sea el caso, por gotas tópicas o cirugía.<sup>4, 25</sup>

Por su elevada frecuencia en la población, GPAA está siendo intensamente estudiado a nivel molecular en el hemisferio norte, en diversas poblaciones de países desarrollados.<sup>20, 26</sup> En nuestro medio, no se realizan estudios moleculares debido a la poca información que el clínico tiene respecto al origen genético de la enfermedad y de los beneficios obtenidos con un diagnóstico precoz, lo que deriva en mejor, pro-

nóstico y tratamiento efectivo, no solo para el paciente, sino también para su familia. A excepción de algunos esfuerzos aislados<sup>27</sup>, no existen estudios de prevalencia de GPAA en Perú, ni existen datos sobre el impacto social y económico que la enfermedad tiene sobre los afectados y sus familias.

La posibilidad de diagnóstico usando una herramienta como la biología molecular, constituye un avance importante para los pacientes y sus familiares, pues éstos pueden ser examinados para saber si tienen una mutación causal sin esperar a que presenten pérdida del campo visual para recién ser tratados.

El objetivo general del presente estudio fue caracterizar e identificar el componente genético del glaucoma primario de ángulo abierto en tres familias peruanas, donde la alta concentración de la enfermedad sugiere causalidad genética. Los objetivos específicos fueron determinar el locus responsable de glaucoma primario de ángulo abierto en cada familia estudiada, e implementar un tamizaje de mutaciones causales en los genes MYOC y OPTN.

El presente estudio brindó ayuda al médico para el tratamiento, orientó al paciente y su familia sobre la posibilidad de haber heredado una mutación y, sobre todo, dar inicio a los exámenes oftalmológicos periódicos, antes de que la enfermedad se manifieste como una pérdida de visión.

## MATERIAL Y MÉTODO

*Tipo de estudio, población y muestra:* Corresponde a un diseño de estudio de casos familiares. La muestra estuvo constituida por tres familias (39 individuos en total) con 25 individuos afectados (9 en la primera familia, 8 en la segunda familia y 8 en la tercera familia) por GPAA. Los probandos fueron clínicamente examinados por el Dr. R. Pérez-Grossmann, oftalmólogo especialista en glaucoma. Se determinó la presencia y el tipo de glaucoma, además de monitorear sus presiones intraoculares, daño al nervio óptico, campo visual entre otros caracteres clínicos. El criterio diagnóstico correspondió a PIO mayor de 22 mm Hg y/o excavación del disco óptico mayor a 0.6 y que fuera primario o esencial, es decir que no fuera causado por otras enfermedades.

El reclutamiento de las familias se inició con entrevistas a probandos, que refieren casos similares en la familia; luego se convocó a parientes afectados y sanos, para realizar un diagnóstico clínico. Adicionalmente, ellos recibieron exámenes oftalmológicos periódicos (cada 6 meses o anuales) para monitorear el curso de la enfermedad o detectar si ésta apareciera en los familiares no afectados. Esto permitió definir, clínicamente, cada uno de los individuos

del heredograma para poder realizar un análisis genético y molecular adecuado.

*Criterios de inclusión:* 1) Personas afectadas con GPAA, diagnosticadas luego de evaluación clínica y oftalmológica, 2) Familiares sanos y afectados de primer, segundo o tercer grado de consanguinidad, que deseen participar voluntariamente en el estudio y 3) Consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Humana de la USMP, debidamente leído y explicado con la firma correspondiente.

*Criterios de exclusión:* 1) Aquellos casos aislados (esporádicos) de glaucoma de diversos tipos, que no reportan familiares afectados, 2) Individuos con diagnóstico de glaucoma secundario y 3) Pacientes que no desean participar en el estudio.

*Extracción de ADN y amplificación de microsatélites por PCR:* Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de 3-5ml de sangre periférica y comprendió el uso de tubos al vacío con EDTA, siguiendo protocolos ya establecidos en nuestro laboratorio. La amplificación de microsatélites para cada familia se realizó usando el criterio de análisis de tres microsatélites (dos distales y uno central), cercanos a la región cromosómica estudiada en los cromosomas 1 (GLC1A), 2 (GLC1B), 3 (GLC1C), 8(GLC1D), 10(GLC1E) y 7 (GLC1F). Estos microsatélites fueron obtenidos a partir del GDB (13, 28).

*Geles de poliacrilamida, corrida electroforética y visualización de productos:* Las muestras de cada marcador microsatélite amplificadas por PCR, fueron corridas en geles de poliacrilamida al 6% por tiempos variables, según el tamaño del segmento amplificado y son teñidos con nitrato de plata para el análisis y registro de alelos de cada secuencia microsatélite estudiada. El detalle de la metodología de corrida, tinción y lectura de alelos se basó en trabajos previos (29,30).

*Lectura de alelos obtenidos:* La lectura permitió determinar si había cosegregación de algún alelo de los marcadores usados con el glaucoma en los afectados. Generalmente, evaluamos tres marcadores por cada región cromosómica. Si se obtuvo un resultado en donde hubiera cosegregación, se amplió el número de marcadores, para ver si en alguno de los casos hubiera una recombinación presente, lo que acortaría la región crítica. Si los resultados indicaron recombinación del marcador con la enfermedad para tres marcadores analizados de una región cromosómica particular, pasamos a buscar cosegregación con marcadores de las otras regiones.

*Detección indirecta de mutaciones vía CSGE:* La técnica CSGE detecta mutaciones puntuales sin necesidad de tener la logística necesaria para la secuenciación directa. Las reacciones de PCR que se corren en geles de acrilamida, permiten

el tamizaje de exones de MYOC y OPTN en uno o dos pacientes afectados de cada familia, para luego secuenciarlos si se observa alguna alteración en la corrida. Seguimos el procedimiento de otros autores<sup>31,32</sup> adaptándolo a nuestras condiciones de laboratorio.

*Búsqueda de mutaciones en MYOC y OPTN:* Se realizó el análisis de mutaciones y polimorfismos asociados a dos de los genes conocidos para GPAA, mediante las estrategias CSGE y análisis de secuenciación directa de exones. El análisis directo de secuencias de exones de MYOC y OPTN, detecta si hay segmentos o cambios nucleotídicos de una base que alteran la secuencia normal, y que pueden ser responsables de las alteraciones en las proteínas ocasionando la enfermedad. Los productos de PCR de los exones de MYOC (3 exones) y OPTN (13 exones) fueron amplificados, siguiendo parámetros establecidos previamente en condiciones de nuestro laboratorio<sup>29</sup>.

*Análisis de las muestras con marcadores microsatélites y por secuenciación:* Las muestras de las familias en estudio, se analizaron de forma cualitativa, observando la segregación de alelos para cada grupo de marcadores microsatélites y, además, los resultados pasaron por una prueba de ligamiento con el Programa easyLINKAGE Plus v3,<sup>33</sup> para darle una interpretación estadística a los resultados de las tres familias estudiadas.

También se corrieron muestras en CSGE de todos los exones de miocilina y optineurina, y se revisaron los cromatogramas de la secuenciación directa de exones de ambos genes.

## RESULTADOS

*Datos clínicos de las familias estudiadas y heredogramas:* Las tres familias con GPAA tuvieron segregación mendeliana de tipo autosómico dominante, afectando a ambos sexos en tres generaciones.

*Familias estudiadas:* La familia 004 (D) comprendía tres generaciones con nueve individuos afectados por GPAA. La enfermedad tuvo una edad de inicio variable, con casos de glaucoma adulto y juvenil (17 años), y constituye un caso típico de glaucoma mixto. La familia 005 (E) tuvo también una edad de inicio variable, con afectados en todas las generaciones. La familia 007 (G), provenía de una zona rural de los Andes y presentaba glaucoma juvenil, con individuos afectados en dos generaciones y antecedentes de ceguera en generaciones anteriores (Figuras 2, 3 y 4).

*Amplificación de marcadores microsatélites de las regiones cromosómicas en estudio y corrida de geles:* La amplificación de marcadores microsatélites de las diferentes regiones con loci para GPAA, se realizó con la técnica de PCR, con condiciones

específicas para cada marcador. Después de cada amplificación, se corrieron geles de agarosa al 1%, para verificar la idoneidad de los productos obtenidos antes de someterlos a corridas electroforéticas en geles de acrilamida y se visualiza luego de tinción con bromuro de etidio.

*Análisis genético y molecular de las familias del estudio:* Las corridas electroforéticas en acrilamida 6%, con marcadores microsatélites de las regiones cromosómicas estudiadas, se revisaron y se hizo el análisis de ligamiento con el programa easyLINKAGE Plus v3, usando una penetrancia de 80% en el modelo y asumiendo una herencia de tipo dominante. Los datos obtenidos muestran ligamiento a 3 regiones distintas en las tres familias estudiadas. Sin embargo, el análisis se ve limitado por el número de generaciones de cada familia y al número de individuos estudiados. Un ejemplo del estudio de microsatélites de las 6 regiones se ve en la Tabla N° 1.

*Familia D:* Se encontró ligamiento con los marcadores D7S24442, D7S642, D7S483 de la región GLC1F (Figura 5). Los LODs obtenidos están entre 0.3 y 1.16 para los marcadores de esa región.

En el análisis por secuenciamiento directo de los genes MYOC y OPTN, en algunos miembros de la familia D, no se observaron cambios en los exones de MYOC. En OPTN se observaron cambios en regiones intrónicas 5, 6 y 7 (delecciones y cambios de nucleótidos), que se reportaron como hallazgos y cuyo aporte al fenotipo es desconocido.

Además, en el exón 4 del paciente 046, se observa un cambio sinónimo T34T, que ha sido reportado previamente en otras poblaciones, y que fue detectado como un cambio conformacional en corridas de CSGE (Figura 6).

*Familia E:* En esta familia se encontró ligamiento a GLC1B (cromosoma 2), y constituye el tercer caso de ligamiento a la mencionada región de GPAA en el mundo (34). Encontramos un recombinante sano (un individuo de 45 años) con un haplotipo parcialmente similar al de los afectados en la región entre los marcadores D2S2161 y D2S417 y que nos permitía acortar la región crítica. El individuo en mención, resultó afectado en un análisis clínico posterior (2004), lo que cambió la búsqueda del gen en GLC1B entre D2S2161 y D2S417 como se pensó inicialmente, a D2SQ12 hasta D2S1897. (Figura 7).

En el análisis se obtuvo un LOD de 2.09, con el marcador D2S2264 y los otros marcadores de la región dan valores mayores a 1.

Asimismo, en el análisis de secuencias de los genes MYOC y OPTN para algunos miembros de esta familia, se encontraron algunos cambios, como el polimorfismo Arg76Lys en el exón 1 de MYOC en la paciente 086. Este polimorfismo se había detectado previamente en CSGE como un patrón alterado de bandas, y también fue estudiado en varios miembros de la familia E, y se observó en individuos sanos y afectados. Además, se reportó delecciones en el intrón 5 (del T en +30) así como cambios en el intrón 7 (cambio G/A en +24 y C/T en -5) del gen de OPTN en los pacientes 085 y 086.

*Familia G:* El análisis de segregación de marcadores microsatélites mostró una asociación de marcadores del cromosoma 1 (locus GLC1A) con el glaucoma en los afectados. Los otros marcadores de las demás regiones cromosómicas presentaron recombinaciones. Los LODs consistentemente más altos, fueron para los marcadores de la región GLC1A (ej. D1S1589 con 0.7).

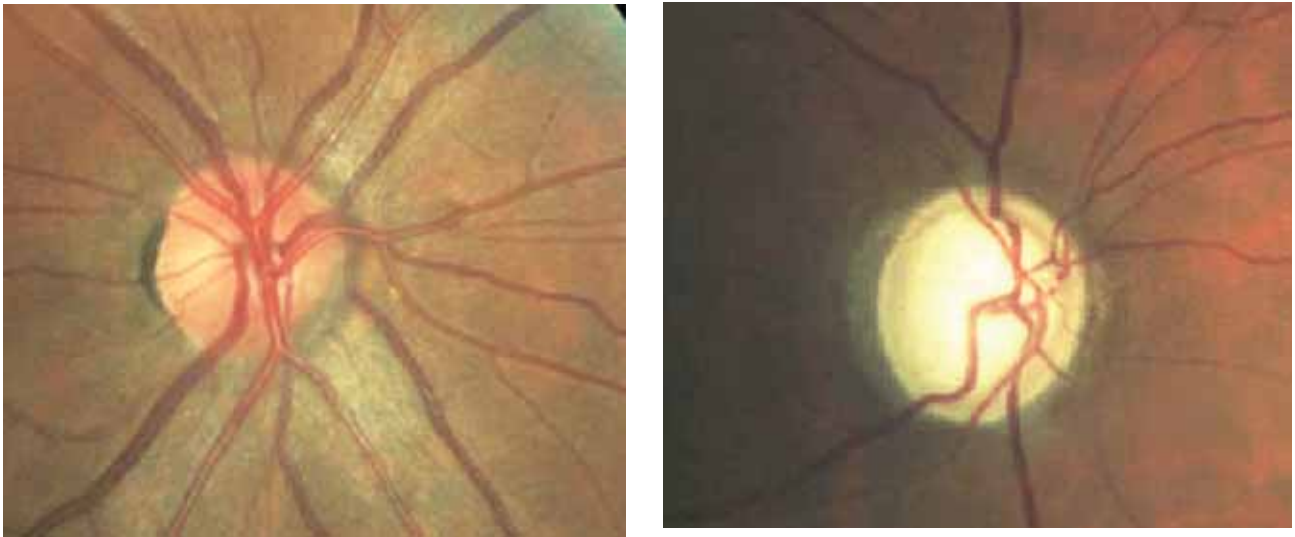
Las muestras de esta familia, analizadas mediante la técnica CSGE, mostraron un patrón de bandas con migración diferencial en individuos de la familia G en relación a controles, lo que evidenciaba un polimorfismo o una mutación.

El hallazgo de una mutación fue corroborado posteriormente por secuenciación directa del exón 3 del gen MYOC en GLC1A. Esta corresponde a la mutación N480K, responsable del glaucoma que les afecta. En los otros exones de MYOC o en los de OPTN no se observaron cambios (30).

**Tabla 1.**  
Relación de marcadores microsatélites analizados en la familia.

Cromosoma 1	Cromosoma 2	Cromosoma 3	Cromosoma 7	Cromosoma 8	Cromosoma 10
D1S1625 Recombina	D2S2161 Recombina	D3S1664 Recombina	D7S505 Recombina	D8S1830 Recombina	D10S1729 Cosegrega
D1S1158 Recombina	D2S2264 Recombina	D3S1535 Recombina	D7S2442 Cosegrega	D8S1122 Recombina	D10S179 Recombina
D1S397 Cosegrega	D2S135 Recombina	D3S1744 Recombina	D7S642 Cosegrega	D8S1471 Recombina	D10S189 Recombina
D1S1165 Cosegrega	D2S1897 Recombina		D7S2439 Recombina	D8S592 Recombina	D10S1779 Recombina
D1S370 Recombina			D7S483 Cosegrega		D10S2325 Recombina
					D10S1216 Recombina

Figura 1.



Imágenes que muestran cabeza del nervio óptico normal (lado izquierdo) y afectado (lado derecho), con una excavación profunda del nervio. Fotos cortesía del doctor R. Pérez-Grossmann.

Figura 2.  
Heredograma de la familia 004 (D).

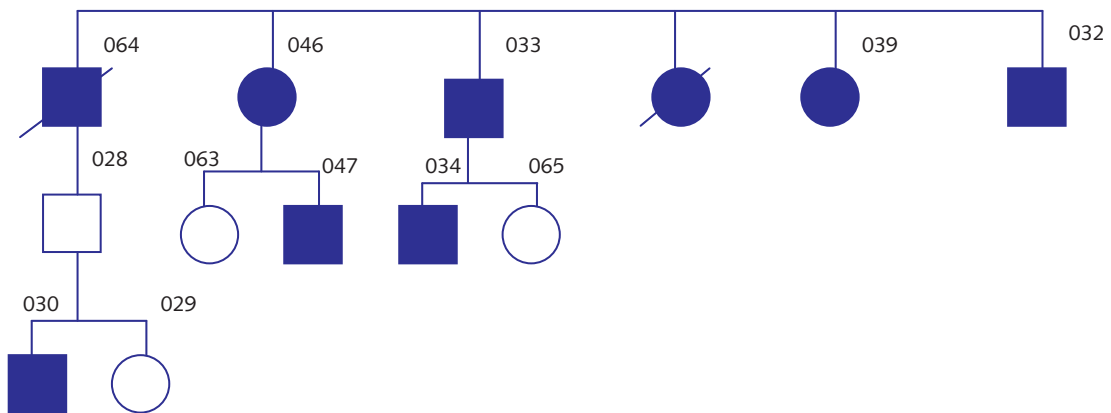


Figura 3.  
Heredograma de la familia 005 (E).

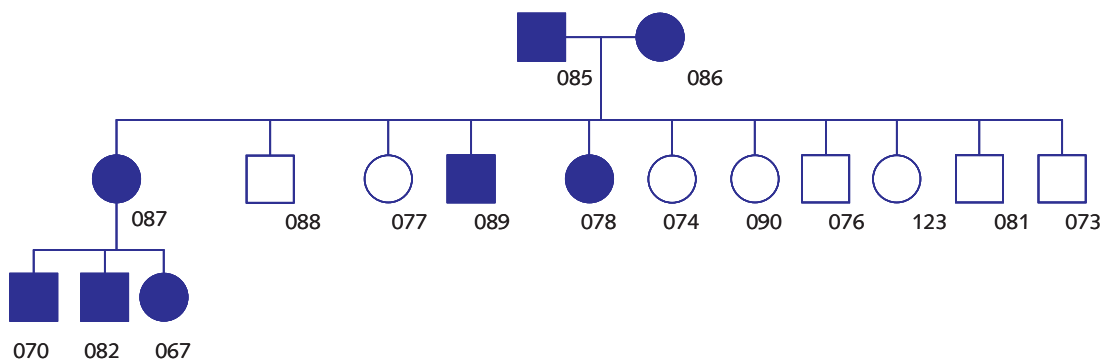


Figura 4.  
Heredograma de la familia 007 (G).

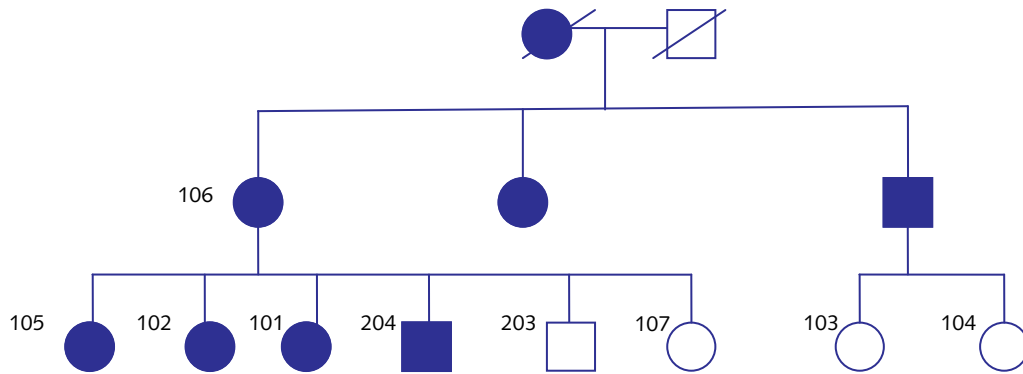
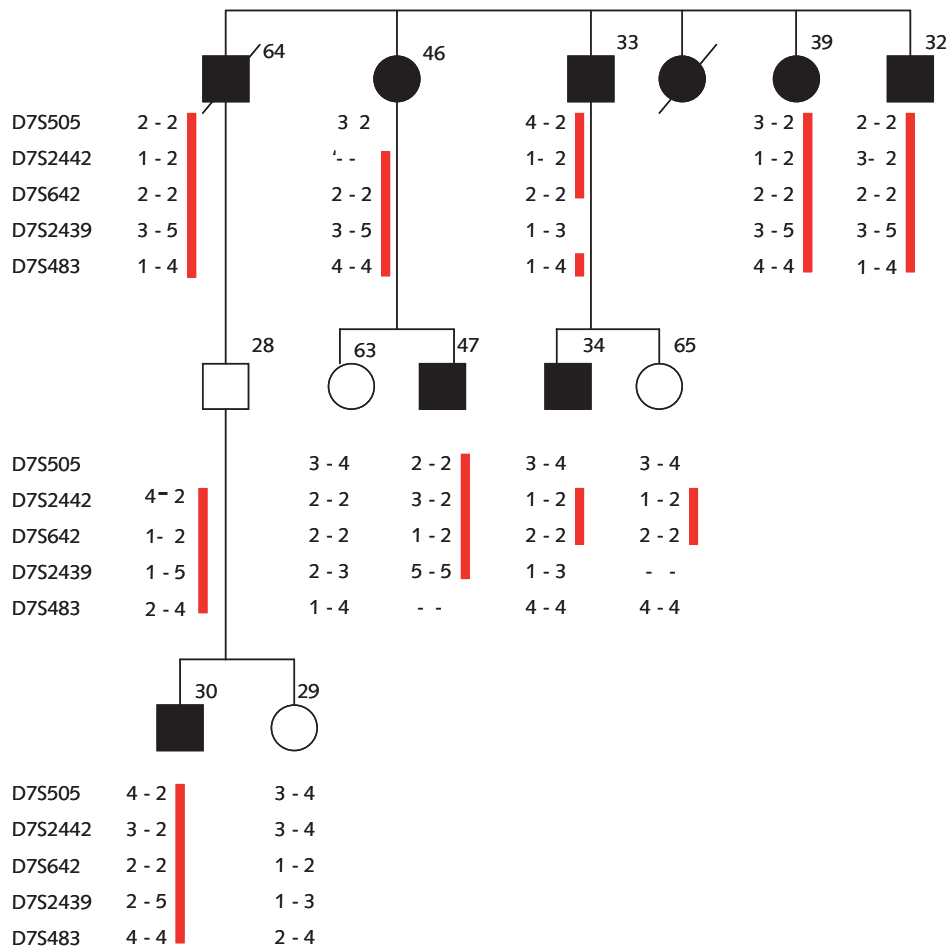
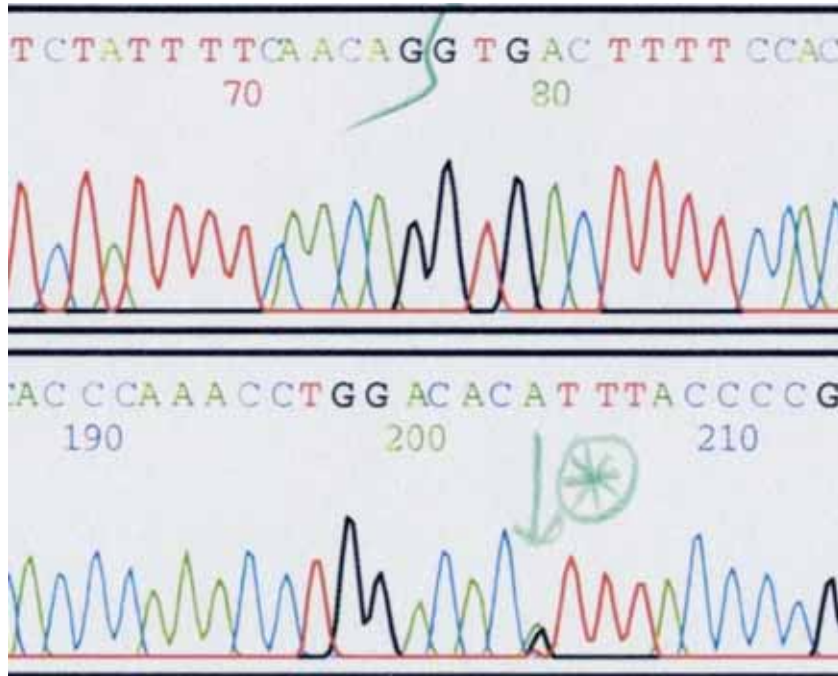


Figura 5.



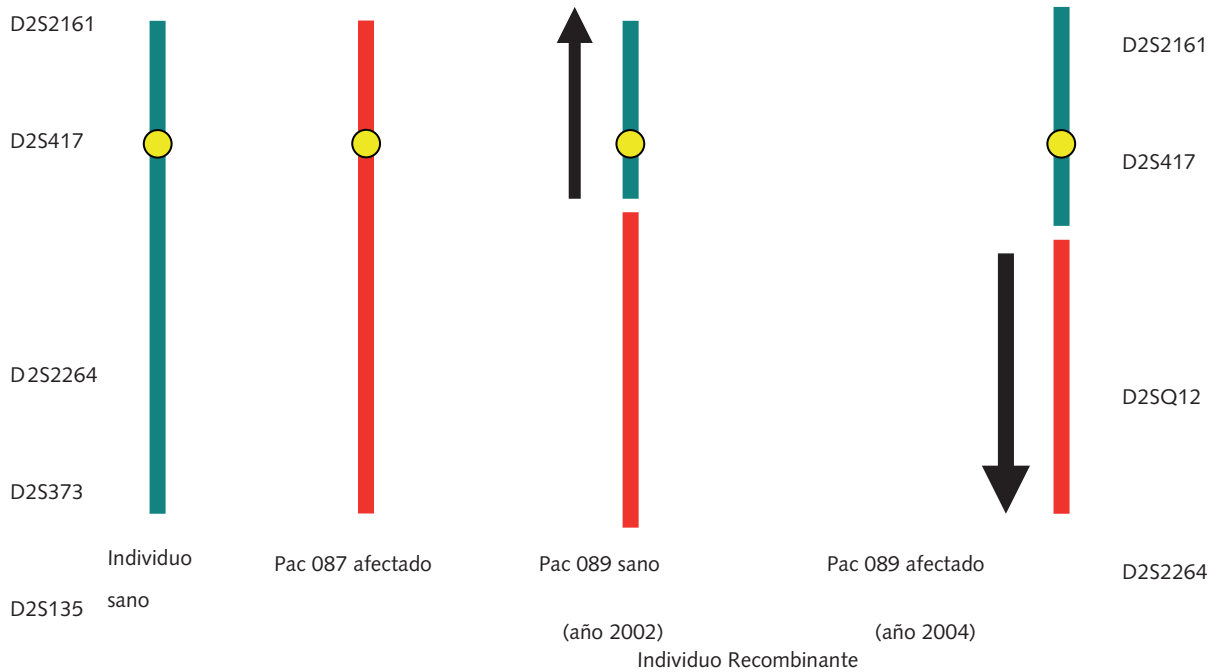
Cromosoma 7: Haplotipo más probable, explica la herencia de GPAA en esta familia es (2-2-2-5-4). Se postula una recombinación en el individuo 33 entre D7S642 y D7S2439 y en el individuo 34 una recombinación entre D7S505 y D7S2442. Esta hipótesis recortaría la región crítica en 2.6 cM del 5.3 cM reportado previamente<sup>35</sup>.

Figura 6.



Secuencia parcial del exón 4 de OPTN en el paciente 046 (familia D) Polimorfismo Thr34Thr (cambio sinónimo de codón). El cambio es G/A (ACA) (ACG).

Figura 7.



Determinación de la región crítica de GLC1B por diagnóstico clínico del individuo recombinante (089) y la adición del marcador D2QQ12. La dirección de la flecha negra indica la región donde se encuentra el gen responsable de GPA.



## DISCUSIÓN

El glaucoma que afecta a las familias peruanas estudiadas, está ocasionado por mutaciones en genes, que se encuentran en diversas regiones cromosómicas.

La determinación clínica de los pacientes que se llevó a cabo con diversos exámenes oftalmológicos y la elaboración del heredograma permitió seguir el análisis de segregación de los marcadores microsatélites usados en el estudio. El diagnóstico clínico adecuado es imprescindible, porque constituye la base del estudio genético-molecular y un error o ambigüedad puede crear una falsa recombinación genética. Además, es necesario hacer un seguimiento, porque aquellos individuos que aparecen como no afectados en la evaluación inicial pueden estar afectados en exámenes posteriores, lo que modifica el análisis de segregación de marcadores moleculares en las familias.

*Familia D:* Se encontró ligamiento al locus GLC1F en 7q35-q36. La asociación de marcadores se vio dificultada por lo poco informativos que son estos marcadores dinucleótidos en la familia. Se determinó ligamiento con los marcadores microsatélites dinucleótidos D7S2442, D7S642 y D7S483 y una recombinación con el marcador D7S2439.<sup>35</sup> Esta familia constituye el segundo reporte de GPAA en GLC1F a nivel mundial, con un LOD de 1.167 en el marcador D7S2439.

La construcción de haplotipos nos permitió visualizar los eventos de segregación y recombinación genética. El haplotipo generado con los marcadores dentro del locus GLC1F mostró la recombinación en los individuos 033 y su hijo afectado 034, dentro de la región crítica de 5.3 cM reportada previamente<sup>36</sup>, lo que refinaría la región crítica a 2.6 cM.

Análisis de secuencia para MYOC y OPTN mediante CSGE y secuenciación directa, no mostraron variantes causales de GPAA en estos genes.

*Familia E:* La segregación de marcadores microsatélites permitió determinar ligamiento a la región GLC1B en 2cen-q13. Este es el tercer caso de glaucoma en GLC1B,<sup>34</sup> después del de familias inglesas y canadienses.<sup>37, 38</sup> En el análisis de segregación de microsatélites se encontró un recombinante que no habría heredado del padre la región cromosómica afectada, lo que nos permitió refinar la región GLC1B. Nuestra hipótesis es que el gen causal está en GLC1B por el LOD más alto, pero principalmente por la edad de inicio del abuelo, sin descartar la presencia de otros genes moduladores en otros cromosomas.

En el análisis de secuencias para MYOC y OPTN se encontró un polimorfismo Arg76Lys (cambio AGA a AAA) en el exón

1 de MYOC en la abuela (afectada a los 74 años) y algunos hijos y nietos de esta familia (afectados y sanos). Este polimorfismo ha sido reportado en estudios poblacionales y se le considera una variante normal.<sup>26</sup> El análisis de segregación en esta familia mostró que todos los afectados que además tienen la variante Arg76Lys tienen una enfermedad severa.

Se especula que esta mutación podría jugar un rol modulador en el curso y la severidad de la enfermedad, con un efecto modificador del fenotipo, pues se han descrito otros polimorfismos asociados a glaucoma primario de ángulo abierto, como es el caso del polimorfismo Arg72Pro del gen p53, que está presente en los casos de GPAA en mayor proporción que en los controles. Además, sería interesante evaluar el polimorfismo no sólo en individuos sino también en familias, con el fin de evaluar el probable rol del mismo en la enfermedad.<sup>29, 39,40</sup>

*Familia G:* Los pacientes evaluados presentaban un glaucoma severo, que había llevado a la ceguera en varios miembros de la familia. La segregación de marcadores microsatélites de las seis regiones mostró ligamiento a GLC1A (LOD 0.7) y recombinación en las otras regiones estudiadas. El análisis de secuencia en MYOC o en OPTN, mostró una mutación en el exón 3 de miocilina, pero ningún otro cambio adicional.

La mutación presente en esta familia, es similar a la más frecuente, reportada en poblaciones de Europa (Francia y Holanda), con la diferencia de que el mismo aminoácido cambiado se debe, en el caso de nuestra familia, a un nucleótido distinto (C/G).<sup>30</sup>

La recurrencia de esta mutación es una pregunta pendiente, pudiendo especularse si podría tener alguna ventaja selectiva como se ha observado para otros genes.

Además, se pudo realizar el diagnóstico presintomático con la técnica CSGE y posterior análisis de mutaciones del gen MYOC.<sup>41</sup>

Debemos enfatizar la importancia de los estudios a nivel genético-molecular en el caso del glaucoma, pues la enfermedad detectada a tiempo puede ser controlada. Si se conoce la mutación causal, el paciente y sus familiares pueden recibir tratamiento y exámenes oftalmológicos más frecuentes. Esto es especialmente importante en los casos de glaucoma juvenil, donde el diagnóstico molecular precoz es de gran importancia.

Dependiendo de la mutación causal, el curso de la enfermedad será más o menos severo. Así por ejemplo, se sabe que la mutación causal Pro370Leu de miocilina, provoca un glaucoma severo de inicio juvenil, que requiere cirugía

para controlarlo, mientras que la mutación Phe369Leu es de inicio adulto (mayor a 50 años), y la presión intraocular puede controlarse con medicamentos, por lo que es una forma leve de glaucoma de inicio tardío.<sup>6,42</sup>

Los factores genéticos y ambientales pueden modificar la expresión de una mutación en el desarrollo de la enfermedad, y en ese sentido nuestra población brinda un acervo genético poco estudiado. Este trabajo es un aporte al conocimiento de la genética del glaucoma, en una muestra de la población peruana.

## CONCLUSIONES

Se encontró una asociación de glaucoma con loci previamente descritos por otros autores, que corresponden a las regiones cromosómicas GLC1A, GLC1B y GLC1F, lo que confirma heterogeneidad genética de GPAA en el Perú. La mutación Asn480Lys está presente en los miembros afectados de una familia estudiada y permitió el diagnóstico presintomático de un paciente, lo que demuestra la utilidad del estudio genético-molecular para GPAA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mendelian inheritance in Man Online (OMIM) TM. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.
- Alward W. Medical management of glaucoma. *The New England Journal of Medicine*. 1998; (339) 18:1298-1307.
- Raymond V. Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five "GLC" loci. *American Journal of Human Genetics*. 1997; 60:272-277.
- Dreyer E, Lipton S. New perspectives on glaucoma. *The Journal of the American Medical Association*. JAMA. 1999; 281(4):306-308.
- Lee D, Higginbotham E. Glaucoma and its treatment: a review. *American Journal of Health-System Pharmacology*. 2005; 62:691-699.
- Lichter P. Genetics of the glaucomas. *Journal of Glaucoma*. 2001; (10) (Suppl1):S13-S15.
- Sheffield V, Stone E, Alward W, Drack A, Johnson A, Streb L y Nichols B. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nature Genetics*. 1993; (4):47-50.
- Stone E, Fingert J, Alward W, Nguyen T, Polansky J, Sunden S., Nishimura D, Clark A, Nystuen A, Nichols B, Mackey D, Ritch R, Kalenak J, Craven E y Sheffield V. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997; 275:668-670.
- Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Héon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Pitts R y Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002; 295:1077-1082.
- Monemi S, Spaeth G, Da Silva A, Popinchalk S, Iltchev E, Liebman J, Ritch R, Héon E, Pitts R, Child A y Sarfarazi M. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Human Molecular Genetics*. 2005; (14) 6:725-733.
- Craig J y Mackey D. Glaucoma genetics: where are we? Where will we go?. *Current opinion in Ophthalmology*. 1999; (10):126-134.
- Brézin A, Béchetoille A, Hamard P, Valtot F, Berkani M, Belmouden A, Adam M, Dupont de Dinechin S, Bach J y Garchon H. Genetic heterogeneity of primary open angle glaucoma and ocular hypertension: linkage to GLC1A associated with an increased risk of severe glaucomatous optic neuropathy. *Journal of Medical Genetics*. 1997;34:546-552.
- Sarfarazi M. Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Human Molecular Genetics*. 1997; (6)10:1667-1677.
- Alward W, Kwon Y, Khanna C, Johnson A, Hayreh S, Zimmerman B, Narkiewicz J, Andorf J, Moore P, Fingert J, Sheffield V y Stone E. Variations in the myocilin gene in patients with open angle glaucoma. *Archives in Ophthalmology*. 2002; 120: 1189-1197.
- Aung T, Ebenezer N, Brice G, Child A, Prescott Q, Lehmann O, Hitchings R y Bhattacharya S. Prevalence of optineurin sequence variants in adult primary open angle glaucoma: implications of diagnostic testing (online). *Journal of Medical Genetics*. 2003; (40) 8: e101.
- Wilson M y Martone J. Epidemiology of Chronic Open-Angle Glaucoma. En: Ritch, R., Shields M y Krupin T. *The Glaucomas USA* Mosby 1996; 753-768.

17. Herndon L, Challa P y Allingham R. Glaucoma in Ghana, West Africa: clinical features and the role of mutations in myocilin. *Ophthalmological Clinical North America*. 2003; 16:631-637.
18. Nemesure B, Jiao X, He Q, Leske M, Wu S, Hennis A, Mendell N, Redman J, Garchon H. The Barbados Family Study Group. A genome-wide scan for primary open-angle glaucoma (POAG): the Barbados Family Study of Open-Angle Glaucoma. *Human Genetics*. 2003; 112:600-609.
19. Egbert, PR. Glaucoma in West Africa: a neglected problem. *British Journal of Ophthalmology*. 2002; 86:131-132.
20. Ntim-Amponsah CT., Amoaku, WMK., Ofofu-Amaah, S., Ewusi, RK., Idirisuriya-Khair, R Nyatepe-Coo E y Adu-Darko M. Prevalence of glaucoma in an African population. *Clinical Study Eye*. 2004;18:491-497.
21. AGIS investigators. The advanced glaucoma intervention study (AGIS) The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *American Journal of Ophthalmology*. 2000; 130(4):429-440.
22. Ellis JD, Evans JMM, Ruta DA, Baines PS, Leese G, MacDonald TM y Morris AD. Glaucoma incidence in an unselected cohort of diabetic patients: is diabetes mellitus a risk factor for glaucoma? *British Journal of Ophthalmology*. 2000; 84:1218-1224.
23. Fujita R. Localisation du gène de l'ataxie de Friedreich par sa liaison génétique et physique avec les loci D9S5 et D9S15. Tesis para optar el grado de Doctor de la Universidad Louis Pasteur (Biología Molecular). 1991.
24. Greenlee EC, Fingert JH y Kwon YH. A patient's guide to glaucoma Eds YH Kwon y P Duffel pp 1-20. [Citado: 10-02-11]. Disponible en <http://www.medrounds.org/medrounds.org/>. 2006.
25. Ayala-Lugo RM, Pawar H, Reed DM, Lichter PR, Moroi SE, Page M, Eadie J, Azocar V, Maul E, Ntim-Amponsah C, Bromley W, ObengNyarkoh E, Johnson T, Guckian-Kijek T, Downs CA, Johnson JM, Perez-Grossmann R, Guevara-Fujita ML, Fujita R, Wallace MR y Richards JE. Variation in optineurin (OPTN) allele frequencies between and within populations. *Molecular Vision*. 2007; 13:1 51-163.
26. Fingert JH, Héon E, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J, Kawase K, Hoh ST, Buys YM, Dickinson J, Hockey RR, Williams-Lyn D, Trope G, Kitazawa R, Ritch R, Mackey DA, Alward WLM, Sheffield VC y Stone EM. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Human Molecular Genetics*.1999; 8:899-905.
27. Cuadrado A y Quiroz F. Pacientes sospechosos de glaucoma: resultados tras siete años de seguimiento. *Revista Peruana de Oftalmología (Sociedad Peruana de Oftalmología)*. 1998; 22 (1):19-24.
28. The Human Genome Database (GDB). Database in Genome Segment Query. [Acceso: 10-02-11]. Disponible en <http://www.gdb.org/gdb-bin/Genome>.
29. Guevara-Fujita ML, Pérez-Grossmann R, Murga Zamalloa C, Castillo Herrera W y Fujita R. Estudio genético-molecular de glaucoma primario de ángulo abierto en una familia peruana sugiere nuevo locus para glaucoma. *Horizonte Médico*. 2005; (5)1:23-27.
30. Guevara-Fujita ML, Pérez-Grossmann RA, Estrada-Cuzcano A, Pawar H, Vargas E, Richards JE y Fujita R. Recurrent myocilin Asn480Lys glaucoma causative mutation arises de novo in a family of Andean descent. *Journal of Glaucoma*. 2008; (17)1:67-72.
31. Ganguly A, Rock M y Prockop D. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1993; 90:10325-10329.
32. Williams IJ, Abuzenadah A, Winship PR, Preston FE, Dolan G, Wright J, Peake IR y Goodeve AC. Precise carrier diagnosis in families with haemophilia A: use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1998; 79: 723-726.
33. Lindner TH y Hoffmann K. EasyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two-/multipoint linkage analyses. *Bioinformatics*. 2005; 21(3):405-407.
34. Fujita R, Guevara-Fujita ML, Perez-Grossmann R y Richards J. Cosegregation of glaucoma with locus GLC1B (2q12-q13) in a Peruvian family with heterogenous onset and a recombination within the critical region (A

- 1570). *American Journal of Human Genetics*. 2002; 71(4):439.
35. Pérez-Grossmann RA, Guevara-Fujita ML, Murga-Zamalloa C, Castillo-Herrera W, Richards JE y Fujita R. Genetic analyses in a three generation Peruvian family suggests POAG is linked to GLC1F in chromosome 7. Resumen en el First World Glaucoma Congress. Viena-Austria Julio PO 031. 2005.
  36. Wirtz MK, Samples JR, Rust K, Nording L, Schilling K, Acott TS y Kramer P. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-36 *Archives of Ophthalmology*. 1999;117: 237-241.
  37. Stoilova D, Child A, Trifan OC, Pitts Crick R, Coakes RL y Sarfarazi M. Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region *Genomics*. 1996; 36:142-150.
  38. Raymond V, Faucher M, Dubois S, Coté G, Anctil JL y Morissette J. Localization of a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to the GLC1B locus at chromosome 2cen-q13 in a French-Canadian family (A2503). *American Journal of Human Genetics*. 1999; 65(4):A441.
  39. Lin HJ, Chen WC, Tsai FJ y Tsai SW. Distributions of p53 codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma. *British Journal of Ophthalmology*. 2002; 86:767-770.
  40. Hewitt AW, Craig JE y Mackey DA. Complex genetics of complex traits: the case of primary open-angle glaucoma. *Clinical and experimental Ophthalmology*. 2006; 34:472-484.
  41. Pérez-Grossmann RA, Guevara-Fujita ML, Estrada-Cuzcano A, Pawar H, Richards JE y Fujita R. Recurrent myocilin Asn480Lys glaucoma causative mutation arises de novo in a family of Andean descent . Poster B930 En: Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). 2007.
  42. Ishikawa K, Funayama T, Ohtake, Y, Tanino T, Kurosaka D ,Suzuki K, Ideta H, Fujimaki T, Tanihara H, Asaoka R, Naoi N, Yasuda N, Iwata T y Mashima Y. Novel MYOC gene mutation, Phe369Leu, in Japanese patients with primary open-angle glaucoma detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Glaucoma*. 2004; 13(6):466-471.