

Estudio genético-molecular de glaucoma primario de ángulo abierto en una familia peruana sugiere nuevo locus para glaucoma

Maria Luisa Guevara Fujita¹, Rodolfo Pérez Grossmann², Carlos Murga Zamalloa¹, Wilder Castillo Herrera¹ y Ricardo Fujita¹

RESUMEN

La contribución de la genética molecular al estudio de enfermedades hereditarias es innegable. Existen numerosos reportes de genes responsables de enfermedades hereditarias que facilitan el diagnóstico, pronóstico y también la posibilidad de terapias cuando se conoce el defecto molecular involucrado. Además, hay cientos de enfermedades en donde la identificación del defecto molecular está cerca porque se han localizado regiones cromosómicas específicas en donde se sabe, residen genes responsables de estas enfermedades. Una estrategia es precisamente, refinar paulatinamente está ubicación a fin de caracterizar el defecto molecular, todo ello con miras a establecer posibles tratamientos. El glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) es una enfermedad hereditaria que puede llevar a la ceguera si no hay un diagnóstico temprano y tratamiento. Hasta ahora, se conocen seis genes que son responsables de la enfermedad y nuestro grupo está trabajando en la caracterización genético-molecular de GPAA en familias peruanas usando marcadores microsatélites a fin de caracterizar su asociación con los seis grupos de marcadores. Reportamos el hallazgo de una familia peruana afectada con GPAA que no segrega con ninguno de los marcadores microsatélites de las diferentes regiones cromosómicas que se sabe están asociadas con la enfermedad. Esto apunta a la existencia de un nuevo locus responsable del GPAA en esta familia.

Palabras claves: glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA), marcadores microsatélites, ligamiento genético, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Molecular genetic studies are increasingly important for the study of hereditary diseases and its contribution is well known. There are several hundred reports of genes responsible of genetic diseases that help in diagnosis, prognos-

is and possible treatment when the molecular defect is known. Primary open-angle glaucoma (POAG) is a hereditary disease that can lead to blindness if untreated. There are six known loci that can cause it and our group is working on the characterization of Peruvian families using microsatellite markers located on regions known to harbor glaucoma genes. We found a Peruvian family that does not segregate with any of the markers located near known glaucoma loci. This would account for a new locus responsible for the disease in this family.

Keys words: primary open-angle glaucoma (POAG), microsatellites, genetic linkage, molecular diagnosis

INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una enfermedad progresiva, indolora, que puede llevar a la ceguera si no se detecta y trata a tiempo. Se sabe que es la segunda causa de ceguera en los Estados Unidos entre la población afroamericana y la tercera entre la población caucásica. Una de las formas más frecuentes es el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) que se desarrolla a partir de los 40-50 años⁴. Datos en el Perú indican que es la segunda causa de ceguera en nuestra población y en campañas realizadas para despistaje de glaucoma se observa hasta un 7% de casos de glaucoma en la población estudiada (Rodolfo Pérez-Grossman observaciones no publicadas). Esta preponderancia nos indica la importancia del diagnóstico de glaucoma y la difusión que se debe dar para que la enfermedad no progrese a ceguera parcial o total en nuestra población.

La enfermedad es causada por una neuropatía óptica que produce la muerte de los axones provenientes de las células ganglionares de la retina¹. La mayoría de glaucomas se presenta con presiones oculares elevadas, de curso lento, indoloro y no se acude a consulta si no cuando comienza la pérdida de la visión periférica, evidencia de daño irreversible al nervio óptico⁹. Además se conocen

¹Centro de Genética y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de San Martín de Porres, Lima-Perú.

²Instituto de Glaucoma y Catarata, Lima-Perú.

casos de glaucoma de presiones normales, que son responsables, en algunas poblaciones, de 3.6% de los casos de GPAA, como se indica en el estudio Tajimi, realizado en Japon⁶. El tratamiento para la enfermedad consiste en la administración de medicamentos con la idea de reducir la presión intraocular y si no hay respuesta al tratamiento, se puede recurrir a la cirugía para facilitar el drenaje del humor acuoso que causa el incremento de la presión ocular. La prevalencia del glaucoma en el ámbito mundial es de 1% sin embargo, cuando un individuo está afectado, el riesgo de que otro individuo de su familia desarrolle glaucoma, aumenta de 4-16%¹¹.

Se han reportado diferentes tipos de herencia para esta enfermedad y hasta ahora hay seis regiones cromosómicas que albergan genes para glaucoma primario de ángulo abierto, las cuales se denominan sucesivamente desde GLC1A hasta GLC1F. Dos genes correspondientes a los loci GLC1A y GLC1E ya han sido identificados. El primero de ellos es el gen GLC1A que es responsable de glaucoma juvenil y adulto y fue ubicado en 1q24.3 por análisis de ligamiento^{13,11,14} y cuyo nombre es TIGR (por sus siglas en inglés Trabecular Meshwork Inducible Glucocorticosteroid Response) que codifica para una proteína de 501 aminoácidos y que es responsable de 3-5% de los casos de POAG¹². Otro gen es el de la optineurina (OPTN) que se ubica en 10p14-15 y cuya proteína está compuesta de 577 aminoácidos. La proteína parece jugar un rol neuroprotector en el ojo y el nervio óptico y cuando está mutada, ocasiona la neuropatía típica del glaucoma. Esta alteración se presenta en 16% de los casos de glaucoma de presiones normales¹⁰.

Una forma de estudiar la causa de una enfermedad hereditaria es mediante estudios de ligación genética (*linkage*) que se basa en la asociación de marcadores moleculares a una enfermedad o carácter dentro de una misma región cromosómica. Cuanto más cerca están, la posibilidad de que se separen es menor y por lo tanto, se heredan o cosegregan como un mismo bloque o segmento cromosómico. Si estos marcadores están en distintos cromosomas o lejos en el mismo cromosoma, segregan al azar (recombinación)⁸. Por medio del análisis de *linkage*, se trata de localizar una enfermedad asociándola por cosegregación a marcadores microsatélites que se reparten en todo el genoma. De esta manera se ha logrado determinar, para el caso del glaucoma primario de ángulo abierto, que existen seis regiones cromosómicas que albergan genes de glaucoma. Si se nota que una persona afectada hereda esa región de sus ancestros afectados, se puede asumir que recibirá el gen mutado, y por ende tiene altísimas probabilidades de desarrollar la enfermedad. Así, el *linkage* puede predecir qué individuos portan la mutación

antes de manifestar la enfermedad⁵. Mediante este tipo de análisis, nuestro grupo está estudiando varias familias afectadas y queremos caracterizar con qué región cromosómica conocida por tener genes de glaucoma están segregando. En este trabajo describimos una familia de tres generaciones con GPAA, provenientes de Pachacamac y su asociación de ligación genética con los marcadores que representan los 6 loci conocidos para esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hallazgos clínicos

Reportamos una familia peruana afectada con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) con presiones intraoculares elevadas y con resultados variables en respuesta al tratamiento. Los individuos afectados de la primera generación tienen presiones intraoculares (PIO) elevadas a pesar del tratamiento y en algunos se ha procedido a cirugía debido a que no responden al tratamiento de gotas tópicas indicado. En la segunda generación hay dos individuos afectados con PIO en el límite superior y evidencia de excavación del nervio óptico superior a 0.6. Un individuo de la tercera generación también presenta PIO elevada y daño al nervio óptico por lo que se le prescribió gotas y chequeos periódicos a fin de monitorear la evolución de la enfermedad. Los exámenes realizados comprenden medida de la presión intraocular, excavación del nervio óptico y en algunos casos campo visual. El heredograma indica una herencia de tipo autosómico dominante con individuos afectados en tres generaciones, los números corresponden a la identificación de individuos-familias en el registro de nuestro laboratorio (ver Fig. 1).

Análisis molecular

Extracción de DNA

Los individuos del estudio firmaron un consentimiento informado y se les tomó 3-5 ml de sangre venosa en tubos con EDTA (anticoagulante) para el análisis molecular. Las muestras son refrigeradas y la extracción del DNA se realiza brevemente de la siguiente manera. Lavados sucesivos de las células en solución hipotónica TE 20:5, lisis de núcleos con sarkosyl y adición de proteinasa K para luego precipitar la muestra y aislar la medusa de DNA. Este DNA es transferido a tubos eppendorf y resuspendido en buffer TE 10:1 a una concentración aproximada de 200 ng/ul².

El DNA obtenido de cada individuo es codificado y guardado a 4°C en condiciones de confidencialidad.

Análisis de segregación de marcadores polimórficos de regiones conocidas para GPAA.

El análisis de ligamiento se hace con marcadores genéticos de diferentes regiones cromosómicas. Con ellos, se hacen reacciones de amplificación PCR (reacción en

HEREDOGRAMA DE LA FAMILIA CON GPAA DE NUESTRO ESTUDIO

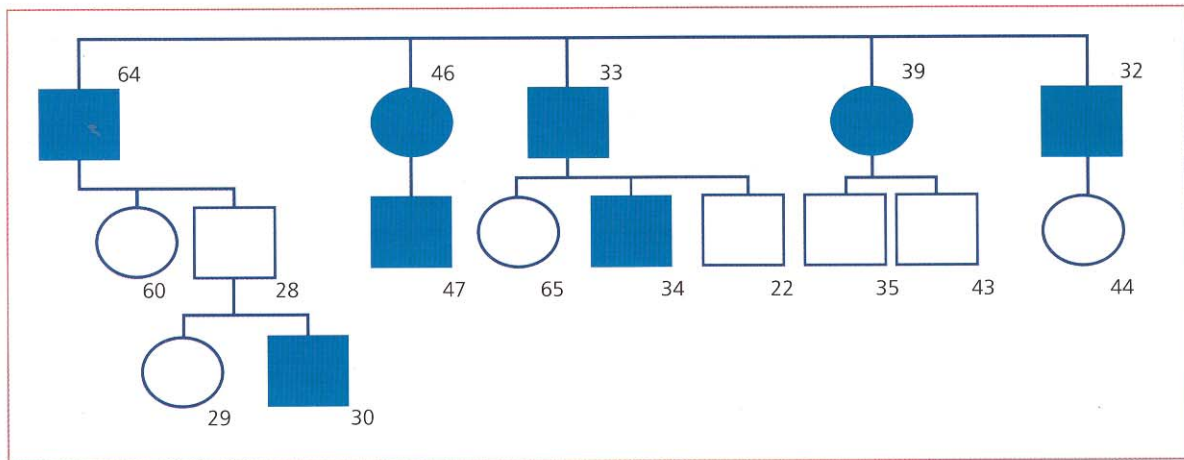


Figura 1: Heredograma de la familia de Pachacamac

cadena de la polimerasa). El programa de amplificación se hace en un termociclador Amplifon II (Thermolyne) bajo las condiciones siguientes: denaturación a 94°C por 5 minutos, 94°C por 30seg, 53-62°C por 30 seg y 72°C por 20 seg con 30-35 ciclos de amplificación. Luego sigue una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos obtenidos luego del protocolo de amplificación se corren en geles de agarosa al 1% y después en geles denaturantes de acrilamida al 6% para ser separados y luego teñidos usando tinción de plata.

Con los marcadores microsatélites usados se determinó si había ligación genética (*linkage*) entre el marcador y la enfermedad. La ligación se manifiesta cuando uno de los alelos es común a los familiares afectados, lo que señala que el gen está en el mismo segmento cromosómico. La recombinación se manifiesta cuando los pacientes reciben aleatoriamente cualquier alelo, lo que indica que el gen no está en el mismo segmento cromosómico que el marcador ⁵.

RESULTADOS

Se usaron los marcadores polimórficos microsatélites correspondientes a los 6 loci reportados. En el cuadro 1 se describe los marcadores D1S1158, D1S370 que están en el cromosoma 1 flanqueando el locus GLC1A, D2S2264 y D2S2161 para el locus GLC1B en el cromosoma 2, D3S1664 y D3S1744 para el locus GLC1C en el cromosoma 3, D8S588 y D8S592 para GLC1D en el cromosoma 8, D10S1779 y D10S1664 para GLC1E en el cromosoma 10 y D7S505 para el cromosoma 7. En los marcadores correspondientes a las seis regiones cromosómicas conocidas por tener genes de glaucoma, se observó recombinación.

Esta exclusión se ha realizado con un mínimo de tres (3) marcadores microsatélites para cada región cromosómica, evidencia muy fuerte de que el glaucoma que esta familia tiene, no corresponde a ninguna de las regiones cromosómicas conocidas (Cuadro 1).

El análisis detallado del Cuadro 2 muestra las recombinaciones en los distintos individuos afectados. Así en D1S1158 el paciente 30 tiene alelos 1 y 4 mientras que varios parientes afectados son 2,2. Igualmente, en la inspección de todos los marcadores estudiados hay recombinación (que se ve como falta de alelos comunes) entre los diferentes individuos con glaucoma.

CUADRO 1

Set de marcadores microsatélites
usados para el estudio

Marcador SSR		Observaciones
D1S1158; D1S370	(cromosoma 1-GLC1A)	recombinación
D2S2264; D2S2161	(cromosoma 2- GLC1B)	recombinación
D3S1664; D3S1744	(cromosoma 3- GLC1C)	recombinación
D8S588; D8S592	(cromosoma 8- GLC1D)	recombinación
D10S1779; D10S1664	(cromosoma 10-GLC1E)	recombinación
D7S505	(cromosoma 7-GLC1F)	recombinación

CUADRO 2

Recombinación entre marcadores microsatélites asociados a los 6 loci de GPAA y el glaucoma en la familia del estudio

Marcador											
Paciente	D1S1158	D1S370	D2S2161	D2S2264	D3S1664	D3S1744	D7S505	D8S588	D8S592	D10S1779	D10S1664
64	1,2	4,4	1,4	3,3	5,9	3,5	2,2	3,3	2,3	2,3	1,2
30	1,4	2,3	2,4		1,9					3,3	2,2
46	2,2	2,4	1,1	1,1	5,9	3,5	2,3			1,1	1,2
47	2,3	1,4	1,3		5,8					1,1	
33	2,2	2,4	1,2	1,3	5,9	3,4	2,3			1,1	2,2
34	2,2	2,2	1,3	1,2	1,5	3,4				1,1	2,3
39	2,2	2,4	1,1		5,9	4,5				1,2	1,1
32	1,2	2,2	1,2	1,3	2,5	4,5				1,1	2,2

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El glaucoma es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una degeneración progresiva del nervio óptico y que causan ceguera irreversible si no son detectados y tratados a tiempo. Existe una amplia gama de medicamentos que se utilizan dependiendo del tipo de glaucoma o cirugía en casos en que la medicación no es efectiva. El mayor factor de riesgo para la enfermedad es la presión intraocular elevada que conlleva a un deterioro del nervio óptico y la consiguiente alteración del campo visual. La enfermedad presenta heterogeneidad clínica (edad de inicio, formas de tratamiento) y genética¹².

Para el GPAA se han descrito hasta ahora seis regiones cromosómicas que portan genes responsables de la enfermedad. La importancia de estos estudios radica en que se puede determinar con años de anticipación, la existencia de una mutación que puede ser causal de esta patología. Esto permite iniciar tratamientos o sugerir al paciente chequeos antes de que haya manifestación de daño al nervio óptico⁷.

Nosotros venimos trabajando en el análisis de familias con marcadores microsatélites de las seis regiones cromosómicas que portan genes de glaucoma con el fin de asociar o excluir las regiones dependiendo de si los marcadores cosegregan o recombinan con la enfermedad. Así, hemos reportado el ligamiento de glaucoma a la región GLC1B en el cromosoma 2p12-13 (3,5) en una familia de Chíncha. En el presente trabajo reportamos el hallazgo de una familia Peruana de Pachacamac con GPAA que no segrega con ninguno de los marcadores microsatélites conocidos por

estar asociados a regiones cromosómicas conocidas por tener genes de glaucoma. Esta familia tiene una presentación clínica con PIO altas, que no responden bien al tratamiento. Así algunos de los individuos afectados ya han sido operados con el fin de controlar el curso de la enfermedad.

Este trabajo indica la heterogeneidad genética en GPAA y significa un aporte al conocimiento de la genética molecular del glaucoma a partir de una familia peruana. A continuación se necesita buscar marcadores por medio de la técnica genomewide scan usando cientos de microsatélites provenientes de todos los lugares del genoma para encontrar alguno que muestre cosegregación con glaucoma en esta familia.

María Luisa Guevara F.
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín Porres

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Alward, W.L. Medical management of glaucoma. The New England Journal of Medicine 339(18) pp1298-1307, 1998.
- 2 Fujita, R. Localisation du gène de l'ataxie de Friedrich par sa liaison génétique et physique avec les loci D9S5 et D9S15. Tesis para optar el grado de Doctor de la Universidad Louis Pasteur, opción Biología Molecular, 1991.
- 3 Fujita, R., Guevara-Fujita, M.L., Pérez-Grossmann, R., Richards, J.E. Cosegregation of glaucoma with locus GLC1B (2q12-2q13) in a Peruvian family with heterogeneous onset and a recombination within the critical re-

- gion. A1570 The Am. J. of Hum. Genet. 71(4) p. 439, 2002.
- 4 Grehn, F. World health problem of glaucoma. Journal of Glaucoma 10 (suppl.1) p. S2-S4, 2001.
- 5 Guevara-Fujita M.L., Pérez-Grossmann, R., Vargas, E. y Fujita, R. Mapeo cromosómico y refinamiento de la localización de un gen de glaucoma en 2cen-2q12 en una familia peruana: avances hacia la identificación del gen GLC1B Horizonte Médico 3(1-2)p. 28-33, 2003.
- 6 Kitazawa, Y. Twenty years of normal tension glaucoma in Japan. Celebrating the 20th anniversary of IGR International Glaucoma Review 6(1) p. 5, 2004.
- 7 Lichter, P.R. Genetics of the glaucomas. Journal of Glaucoma 10 (suppl.1) p. S13-S15, 2001.
- 8 Payne, S.J. Microsatellite analysis (cap.4) En: Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. Ed. Graham R. Taylor p. 31-44, 1997.
- 9 Quigley, H.A. Open-angle glaucoma. The New England Journal of Medicine 328(15) p. 1097-1116, 1993.
- 10 Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G. y col. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin Science 295(5557) pp 1077-1080, 2002.
- 11 Richards, J.E., Lichter, P.R., Boehnke, M., Uro, J.L.A. y col Mapping of a gene for autosomal dominant juvenile onset. Open-angle glaucoma to chromosome 1q. Am. J. Hum. Genet. (54) p. 62-70, 1994.
- 12 Sarfarazi, M. Recent advances in molecular genetics of glaucomas. Human Molecular Genetics 6(10)pp 1667-1677, 1997.
- 13 Sheffield, V.C., Stone, E.M. Alward, W.L., Crack, A.R. y col genetic linkage of familial open-angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. Nature Genetics 4: 47-50, 1993.
- 14 Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L., Nguyen, T.D. y col. Identification of a gene that causes primary open-angle glaucoma. Science 275 p. 668-670, 1997.

Agradecimiento: Dedicado a los familiares participantes en el estudio por su entusiasmo y apoyo. Esta investigación se viene realizando gracias a fondos provenientes de la Universidad de San Martín de Porres y a una subvención del año 2002-2003 del CONCYTEC (contrato de subvenciones 240-2003-CONCYTEC-OAJ).