



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -857 C/T EN LA REGIÓN
PROMOTORA DEL GEN FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
ALFA (TNF-ALFA) CON GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO
ABIERTO EN PACIENTES PERUANOS**

**PRESENTADA POR
PAOLA LISETT RONDÁN GUERRERO**

**TESIS PARA OPTAR PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO CIRUJANO**

LIMA – PERÚ

2013



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada
CC BY-NC-ND**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



USMP
UNIVERSIDAD DE
SAN MARTÍN DE PORRES

FACULTAD DE
MEDICINA HUMANA

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE PRE GRADO

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -857 C/T EN LA REGIÓN
PROMOTORA DEL GEN FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
(TNF-ALFA) CON GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO
EN PACIENTES PERUANOS**

TESIS

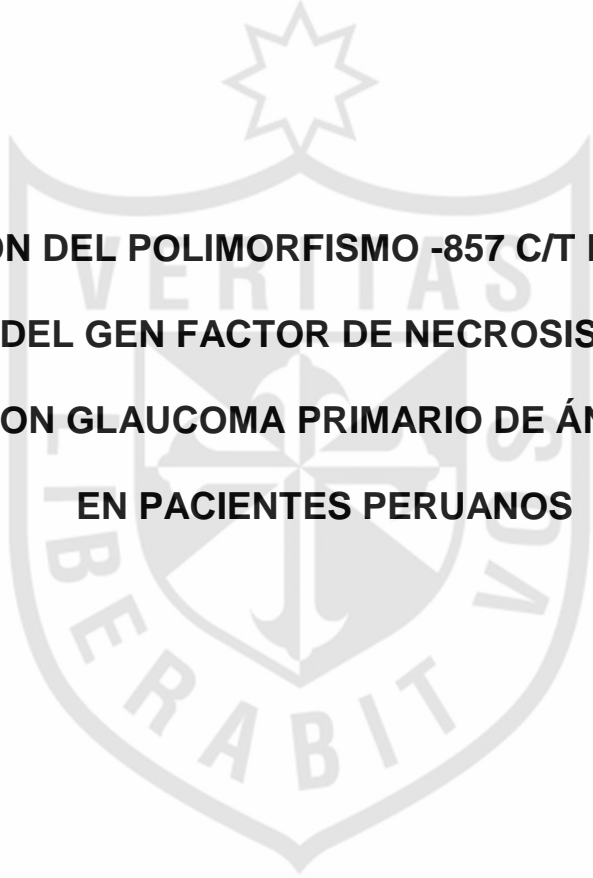
**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO
DE MÉDICO CIRUJANO**

PRESENTADO POR:

PAOLA LISETT RONDÁN GUERRERO

LIMA - PERÚ

2013



**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -857 C/T EN LA REGIÓN
PROMOTORA DEL GEN FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
(TNF-ALFA) CON GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO
EN PACIENTES PERUANOS**

ASESORES Y MIEMBROS DEL JURADO

ASESORES:

Dr. Benjamín Castañeda Castañeda

Director del Instituto de Investigación

Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres

Mg. PhD. María Luisa Guevara Gil

Bióloga genetista del Centro de Genética y Biología Molecular

Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres

Blgo. Oscar Acosta Conchucos

Biólogo genetista del Centro de Genética y Biología Molecular

Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres

PRESIDENTE DEL JURADO:

Dr. Benjamín Castañeda Castañeda

Director del Instituto de Investigación

Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. José Carhuanchó Aguilar

Docente de la Facultad de Medicina Humana USMP

Asistente de la Dirección Académica de Ciencias Básicas

Dr. José Francisco Parodi García

Docente de la Facultad de Medicina Humana USMP

Director del Centro De Investigación del Envejecimiento (Cien)

DEDICATORIA

A mi querida familia por su incondicional apoyo,
a mis padres Max y Ruth porque son el mejor ejemplo a seguir y
me enseñaron a esforzarme siempre para lograr mis metas,
a mi hermana Faviola porque me inspira a ser mejor día a día.

A la Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina de la Universidad
de San Martín de Porres porque sus enseñanzas y ánimos por la
investigación me dieron la motivación y confianza necesaria para
poder realizar esta tesis.

Espero poder llenarlos siempre de orgullo.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mis asesores por el tiempo y paciencia puesto en este trabajo, sin duda su apoyo y guía fue fundamental para poder culminar con éxito esta investigación.

Agradezco también a la Universidad de San Martín de Porres y al Instituto de Investigación de la universidad por haberme permitido trabajar en el Centro de Genética y Biología Molecular USMP, donde esta investigación se llevó a cabo.



ÍNDICE

PORTADA	I
TÍTULO	II
ASESOR Y MIEMBROS DEL JURADO	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE DE CONTENIDO	VI
INDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- MATERIAL Y METODO.....	7
III.- RESULTADOS.....	13
IV.- DISCUSION	17
V.- CONCLUSIONES.....	21
VI.- RECOMENDACIONES.....	22
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	23
ANEXOS.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

FIGURA N°1.- Causas de ceguera a nivel mundial.	2
FIGURA N°2.- Muestra de amplificados TNF-857 en gel agarosa al 1,3%.	9
FIGURA N°3.- Genotipos -857 C/T en la Región Promotora del TNF-alfa.	10
FIGURA N°4.- Muestras TNF-857 digeridos en gel poliacrilamida al 6% denaturante.	11
TABLA N°1.- Características de los pacientes con GPAA y controles	13
TABLA N°2.- Distribución genotípica del polimorfismo -857 TNF-alfa en pacientes con GPAA y controles.	14
TABLA N°3.- Distribución alélica Del Polimorfismo -857 TNF-alfa en pacientes con GPAA y controles.	15
TABLA N°4.- Distribución de genotipos del polimorfismo -857 TNF-alfa en pacientes con GPAA y controles según genero.	16

RESUMEN

Objetivo: Establecer la asociación del polimorfismo -857 C/T en la región promotora del gen factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) con el diagnóstico de GPAA en pacientes peruanos del Instituto Nacional de Oftalmología del Perú (INO).

Materiales y métodos: Se realizó un estudio analítico, observacional de tipo casos-contróles, entre Julio y Diciembre 2012, se trabajó con muestras del Banco de ADN Genómico del Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Se evaluó la asociación de variables, mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2), se utilizó el software SPSS v.15 ® y el programa Arlequín de Genética Poblacional.

Resultados: Se trabajo con 84 casos y 84 controles, la edad promedio en ambos grupos era 64 años, 36% eran hombres y 64% mujeres. Se observaron frecuencias similares (42,9 y 45,2%) respecto al genotipo CC en los casos y controles. Una mayor diferencia de las frecuencias (19,1 y 10,8%) fue observada en el genotipo TT. El alelo T presentó mayor frecuencia en los casos con respecto a los controles (38,1 y 32,8%). ($p>0,05$).

Conclusión: El genotipo CC y el alelo C fueron los más frecuentes en pacientes con GPAA y en controles, sin embargo el alelo T tiene una frecuencia elevada en esta muestra peruana respecto a otras poblaciones del mundo. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos y alelos TNF -857 entre los casos y controles evaluados.

Palabras clave: Glaucoma primario de ángulo abierto, TNF-alfa, polimorfismo -857 TNF-alfa.

ABSTRACT

Objective: To establish the association of the polymorphism -857 C / T in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene (TNF-alpha) with Peruvian patients diagnosed with Primary Open Angle Glaucoma of the National Eye Institute of Peru (INO).

Materials and methods: An analytical, observational, case-control was performed, between July and December 2012. We worked with samples of genomic DNA from the Center of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Human Medicine, University of San Martin de Porres. The association of variables was evaluated by chi-square test (X^2), we used the SPSS software v.15 ® and the population genetics software Arlequin.

Results: 84 cases and 84 controls were evaluated, the average age in both groups was 64 years, 36% were male and 64% female. Similar frequencies of the CC genotype were observed (42.9 and 45.2%) comparing the case and control group ($p > 0.05$). A major difference of the frequencies (19.1 and 10.8%) was observed in the TT genotype. The T allele had a higher frequency in cases compared to controls (38.1 and 32.8%) ($p > 0.05$).

Conclusion: The CC genotype and C allele were more frequent in patients with POAG and controls, however the T allele has a high frequency in this Peruvian sample than other populations of the world. No significant differences were found between TNF -857 genotypes and alleles between cases and controls evaluated.

Keywords: primary open-angle glaucoma, TNF-alpha, TNF-alpha -857 polymorphism.

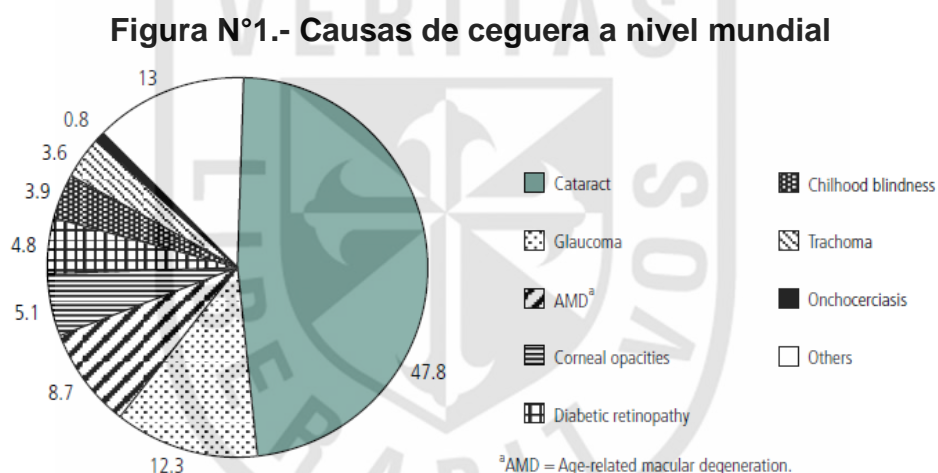
I.- INTRODUCCION

El glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) es un grupo heterogéneo de neuropatías ópticas crónicas y progresivas¹ con una compleja base genética², que tienen en común cambios morfológicos caracterizados por el daño progresivo de las células ganglionares de la retina y sus axones² (nervio óptico). La alteración del disco óptico conocida como excavación glaucomatosa, asociada a un ángulo abierto de la cámara anterior por gonioscopia³ y la ausencia de otras enfermedades oculares o anomalías congénitas, caracterizan el diagnóstico de GPAA¹. Esta degeneración celular conlleva a una reducción asintomática y progresiva del campo visual⁴, llevando a una ceguera que por lo general es bilateral². (Anexo 1)

La prevalencia de glaucoma en EE.UU es de 1,86%⁵, y en población hispana varia de 1,97% a 2,1%^{6,7}, reportando el 15% de las causas de ceguera a nivel mundial⁸, porcentaje que posiciona al glaucoma como la segunda causa mas frecuente de ceguera después de la catarata^{9,10}. Incluso algunos estudios realizados en poblaciones hispanas, reportan al glaucoma como la primera causa de ceguera¹¹.

En el Perú, el glaucoma es la segunda patología con mayor prevalencia en el Instituto Nacional de Oftalmología del Perú (11%), superada solo por las ametropías (44%)¹².

De los diferentes tipos de glaucoma, el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) es el más común². Reportes recientes estiman que para el año 2010 habían 60,5 millones de personas GPAA, de los cuales el 6,7% se encontraba en Latinoamérica y el Caribe⁸.



Fuente: Global data on visual impairment in the year 2002. Organización Mundial de la Salud⁸.

Se estima que en el mundo para el año 2020, habrán 79,6 millones de afectados¹⁰, lo que significaría 11,2 millones de personas con ceguera bilateral⁴; siguiendo un aumento progresivo desde 1990 donde el glaucoma era causante de 5,2 millones casos de ceguera bilateral⁸. Esto indica que la prevalencia de esta enfermedad esta en constante aumento². Sin embargo, el alcance del problema es probablemente más grande de lo que estas cifras sugieren, ya que una proporción

sustancial de individuos permanecen sin diagnosticar o tratados inadecuadamente².

Muchos de los pacientes con glaucoma desconocen de su enfermedad y no es hasta que se realizan estudios oftalmológicos por otra razón cuando son diagnosticados¹³. Esto se debe a que la pérdida de la visión usualmente no se percibe hasta que la enfermedad está bastante avanzada².

Debido a que la enfermedad es tratable, y debido a que el deterioro visual causado por el glaucoma es irreversible, la detección temprana es esencial². Sin embargo actualmente el tamizaje de glaucoma tiene un costo-beneficio muy elevado en la población general¹⁴, pero en poblaciones de alto riesgo como la población adulta, personas con historia familiar de glaucoma, presencia de factores genéticos, Afroamericanos e Hispanos, el costo-beneficio del tamizaje disminuye, ya que la prevalencia de esta enfermedad es mayor en estos individuos.^{3,14}

Es en este punto donde la genética molecular ha cobrado importancia, ya que desde hace unos años se han realizado estudios para la identificación de variantes genéticas que predisponen al glaucoma de ángulo abierto, las cuales facilitarían el diagnóstico precoz y el seguimiento de las personas en situación de riesgo, permitiendo el tratamiento del glaucoma a tiempo.

A la fecha se ha identificado la asociación de 3 genes con GPAA: Miocilina (*MYOC*), Optineurina (*OPTN*) y *WDR36*. Aunque el papel exacto de *MYOC* y

OPTN en la patogénesis del glaucoma no está claro, los estudios han demostrado que la Miocilina tiene un papel en la organización del citoesqueleto y la remodelación de la matriz extracelular¹⁵, así como en la homeostasis de la malla trabecular¹⁶, mientras la Optineurina está implicada en la neuroprotección de las células ganglionares retinianas (RGC) mediante la reducción de su susceptibilidad a la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno¹⁵. En cuanto al *WDR36*, su mecanismo de acción está relacionado al procesamiento nucleolar del 18s rRNA y es por lo tanto requerido en la biogénesis de los ribosomas. Una falla en su función lleva a la activación de la vía p53 de respuesta a estrés¹⁵. Recientemente se ha reportado un nuevo gen, el NTF4, implicado en el 1,7% de pacientes con GPAA de origen europeo. Esta proteína tendría un rol en la protección de las RGC mediante la activación de los receptores de la Tirosina quinasa B presentes en estas células¹⁶.

Sin embargo, las mutaciones en estos genes representan sólo una pequeña fracción de los pacientes con GPAA (10%)¹⁵, situación que induce a seguir estudiando su asociación con otros genes, entre ellos el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa), una citoquina proinflamatoria y un potente inmunomediador fundamental en los mecanismos de la inmunidad innata y adquirida¹⁷.

El gen TNF-alfa humano está localizado en el cromosoma 6 en una región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Es producido mayormente por los monocitos y macrófagos, pero también por linfocitos T y células epiteliales en respuesta a un estímulo¹⁸. En el cerebro y ojo, es producida por las células

microgliales⁴. El estudio de la regulación de la expresión de esta citoquina y sus vías de señalización ha demostrado que a pesar de su función primaria en la activación de la respuesta inmune innata, su producción inapropiada conlleva a generar efectos citotóxicos e inflamatorios negativos, llegando incluso a la destrucción tisular y al daño de órganos¹⁹.

Estudios realizados entre glaucoma y TNF han encontrado resultados que indicarían una asociación entre ambos. Por ejemplo se han encontrado niveles elevados de TNF respecto a los valores normales en el humor acuoso de pacientes con glaucoma²⁰, y también en estudios comparativos frente a pacientes con catarata²¹, asimismo se ha encontrado una correlación positiva significativa entre esta concentración de TNF en el humor acuoso y la severidad de pérdida del campo visual²².

En cuanto a estudios de polimorfismo del TNF, el más estudiado ha sido el polimorfismo -308. Un estudio realizado en población turca encontró asociación de este polimorfismo y glaucoma²³, asimismo este polimorfismo se ha visto relacionado con glaucoma pseudoexfoliativo en población egipcia²⁴.

Estudios específicamente realizados con el polimorfismo TNF-857, el cual será estudiado en el presente trabajo, indican que el Alelo T es un activador transcripcional mucho mas fuerte que el Alelo C²⁵ (Anexo N°2). Un estudio realizado en el Reino Unido encontró asociación significativa de este polimorfismo con Uveitis Aguda Anterior²⁶. En Iran se encontró que el polimorfismo -857 seria un marcador genético que influye en la susceptibilidad a tuberculosis²⁷, además se ha reportado que el alelo T en interacción con variantes genéticas de la Optineurina, por ejemplo, puede incrementar el riesgo de glaucoma²⁸.

Establecer la asociación de este polimorfismo con el GPAA sería de mucha utilidad preventiva en poblaciones con una alta frecuencia del Alelo T²⁹. En una población Quechua del Cuzco se ha encontrado una frecuencia elevada (mayor del 30%) del alelo T del polimorfismo TNF-857, diferente a otras poblaciones del mundo, tales como las caucásicas, africanas y asiáticas, en donde la frecuencia de este alelo fue mucho menor²⁹.

Por ello, es importante estudiar este polimorfismo en una muestra de pacientes peruanos, y establecer estudios de asociación genética con GPAA, para considerarlo como un factor genético que sirva para la prevención mediante un tamizaje precoz y la detección temprana de la enfermedad en nuestra población.

En esta perspectiva, la presente investigación tuvo como objetivo principal establecer la asociación del polimorfismo -857 C/T en la región promotora del gen factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) con el diagnóstico de GPAA en pacientes peruanos del Instituto Nacional de Oftalmología del Perú. Además se planteó como objetivos específicos establecer las frecuencia de genotipos (CC, CT, TT) y alelos (C, T) y establecer si un genotipo o alelo esta asociado a GPAA en la muestra evaluada.

II.- MATERIAL Y METODOS

1. Diseño Metodológico y tipo de investigación.

Este estudio fue un estudio analítico, observacional de tipo casos-controles, realizado entre Julio y Diciembre 2012 en el Centro de Genética y Biología Molecular (CGBM) de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (FMH-USMP). Se trabajó con muestras del Banco de ADN Genómico del CGBM FMH-USMP, que correspondían a pacientes con GPAA (ver criterios de inclusión) del Instituto Nacional de Oftalmología (INO) y sus respectivos controles (personas que asistían al mismo instituto por otra patología que no fuera GPAA) pareados por sexo y edad, todos con acreditación voluntaria de su participación, por medio de un consentimiento informado (ANEXO N°3). Para el cálculo de la muestra se utilizó el programa Quanto (especializado para estudios de asociación genética). Se consideró un Riesgo de 2,86, una prevalencia de glaucoma de 2,1% en población hispana⁷, y 30% de frecuencia promedio del alelo T del TNF-857 para poblaciones andinas²⁹. El resultado obtenido fue un tamaño de muestra mínimo de 82 casos y 82 controles.

Los criterios de inclusión fueron edad mayor de 18 años, diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto (ángulo iridio-corneal abierto, presión intraocular mayor a 22mmHg (en dos medidas), campo visual alterado y paquimetría

alterada), haber firmado el Consentimiento Informado. Los criterios de exclusión fueron Glaucoma secundario (desarrollado como consecuencia a otras enfermedades o por trauma ocular).

2. Recolección de muestras de ADN.

Se seleccionaron las muestras existentes en el banco de ADN del proyecto E 1001 2010 016 “Análisis de mutaciones en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto” del Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular de la Universidad de San Martín de Porres, las cuales provenían de pacientes con GPAA del Instituto Nacional de Oftalmología (según criterios establecidos) y sus respectivos controles pareados por sexo y edad en función de los criterios de inclusión y exclusión ya mencionados.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del polimorfismo TNF-857 del factor de necrosis tumoral alfa.

Se utilizó la técnica PCR para amplificar un segmento de 131 pares de bases (pb) la región promotora del gen TNF-alfa, utilizando un termociclador y aplicando la metodología estándar.

En la reacción de amplificación se utilizaron 0,5µl de ADN genómico, 1µl 10x PCR Buffer (NH₄), 0.08µl de mezcla de dNTPs 10 mM, 0,6 µl de MgCl₂ 25 mM; 2 pmoles de cada primer (directo y reversa) y 0,5U de Taq ADN polimerasa Fermentas, en un volumen total de 10µl.

Los primers (cebadores u oligonucleótidos que sirven para la amplificación del ADN) fueron: Primer Directo: 5'-AAGTCGAGTATGGGGACCCCCCGTTAA-3' y Primer Reverse: 5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'.

Las condiciones del PCR fueron: denaturación a 94° por 5 minutos, 30 ciclos a 94° por 30 segundos, temperatura de alineamiento a 64° por 30 segundos y 72° por 30 segundos, y un último paso de extensión final a 72° por 10 minutos (según Funayama y adaptada a las condiciones de laboratorio)²⁸. Para verificar la amplificación, se realizó una corrida electroforética de 5 µl de cada producto en geles de agarosa al 1,3% y teñidos con bromuro de etidio. (Figura N°2)

FIGURA N°2.- Muestra de amplificados TNF-857 en gel agarosa al 1,3%



PM: Marcador de peso molecular

4. Genotipaje del polimorfismo -857 del gen TNF alfa, por la técnica PCR-RFLP (PCR - Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción).

Los productos de PCR del polimorfismo -857 C/T del gen TNF-alfa, fueron sometidos al proceso de restricción enzimática (RFLP), el cual determinó los diferentes genotipos del polimorfismo -857 C/T del gen TNF-alfa.

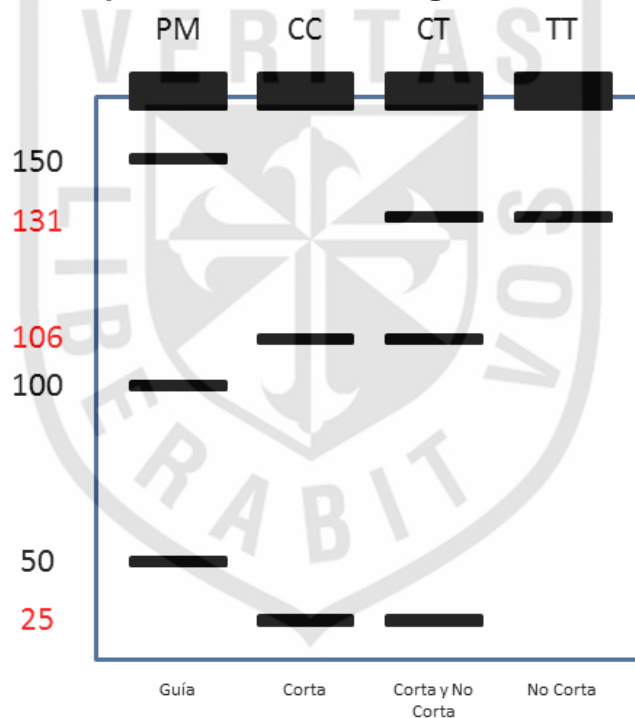
Esto consistió en la aplicación de enzimas de restricción o de reconocimiento de bases específicas y según el caso, determinaron la presencia o ausencia de la mutación (SNP).

Se empleó la enzima HincII (Fermentas) para la restricción enzimática, preparándose una mezcla con 5 ul del producto de PCR, 2,25 ul de buffer Tango

(Fermentas), 0,6 ul de enzima HincII, 4,5 ul de agua e incubación por 16 horas a 37°C.

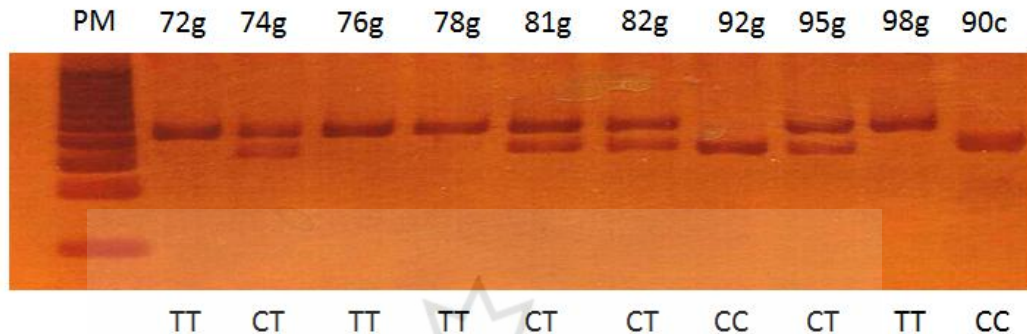
Se determinaron los genotipos mediante una corrida de electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones denaturantes (UREA) con voltaje de 300 mv por aproximadamente 30 minutos, y posterior tinción con nitrato de plata. Los genotipos observados fueron: homocigoto silvestre CC (fragmentos 106 bp. y 25bp, con corte), homocigoto mutante TT (fragmento de 131 bp, sin corte) y el heterocigoto CT. (Figura N°3 y Figura N°4).

Figura N°3.- Genotipos -857 C/T en la Región Promotora del TNF-alfa



Ejemplo de la visualización de los diferentes genotipos determinados por la técnica PCR-RFLP mediante el corte (o no) con la enzima de restricción HincII. PM: Marcador de Peso Molecular

Figura N°4.- Muestras TNF-857 digeridos en gel poliacrilamida al 6% denaturante



PM: Marcador de peso molecular de 25pb

5. Análisis de los datos

Se obtuvieron las frecuencias y proporciones de las variables cualitativas, y las medidas de tendencia central de las variables cuantitativas.

Se aplicó la estadística inferencial para evaluar la asociación de variables, mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2).

Se utilizó el software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) v.15 ® para el procesamiento y análisis de datos, y el programa Arlequín de Genética Poblacional para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg y calcular frecuencias genotípicas y alélicas.

6. Aspectos éticos

Todos los procedimientos del presente estudio preservaron la integridad y los derechos fundamentales de los pacientes sujetos a investigación, de acuerdo con los reglamentos y normas éticas del Comité institucional de ética y la Declaración de Helsinki de 1975, enmendada en 1983. Se garantiza la confidencialidad de los

datos obtenidos. Todos los participantes firmaron un Consentimiento Informado para la utilización de su ADN, pudiéndose negar en cualquier momento. Se contó con la aprobación de la Dirección de Postgrado para su realización.



III.- RESULTADOS

Se evaluó el polimorfismo -857 C/T en la región promotora del gen factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) en 84 pacientes con diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA), y en 84 controles, obteniéndose los siguientes resultados reportados en tablas y figuras.

Tabla N° 1.- Características de los pacientes con GPAA y controles

Variable	Casos GPAA (n=84)	Controles (n=84)
Edad promedio (años)	63,56	63,67
Rango (años)	18 – 85	20 - 85
Hombres (%)	30 (36)	30 (36)
Mujeres (%)	54 (64)	54 (64)

La media de la edad para los casos fue de 64 años (rango 18-85) y en los controles la media también fue 64 años (rango 20-85), en cuanto al género se encontró que un 36% eran hombres y el 64% eran mujeres tanto en los casos como en controles (Tabla N° 1).

Tabla N° 2.- Distribución genotípica del polimorfismo -857 TNF-alfa en pacientes con GPAA y controles.

Genotipo	Casos GPAA n (%)	Controles n (%)	p *
CC	36 (42,9%)	38 (45,2 %)	
CT	32 (38,0 %)	37 (44,0 %)	0,305
TT	16 (19,1 %)	9 (10,8 %)	
Total	84 (100,0%)	84 (100,0%)	

Los frecuencias genotípicas en los Casos ($\chi^2=3.107$, $p=0.1830$) y Controles ($\chi^2=0.000$, $p=1.000$) se encuentran en Equilibrio de Hardy-Weinberg.

No se encontró desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos examinados. Se observaron frecuencias similares (42,9 y 45,2%) respecto al genotipo CC en los casos y controles. Una mayor diferencia de las frecuencias fue observada en el genotipo TT (19,1 y 10,8%) entre los casos y controles, una tendencia similar se observó para el genotipo CT.

En general, se observaron diferencias en las frecuencias de los genotipos, principalmente en los genotipos CT y TT, entre los casos y controles, pero no fueron estadísticamente significativas ($p=0,305$), por lo que se asume que no existe asociación entre los genotipos del polimorfismo -857 TNF-alfa y el GPAA en la muestra evaluada. (Tabla N° 2).

Tabla N° 3.- Distribución alélica del polimorfismo -857 TNF-alfa en pacientes con GPAA y controles

Alelos	Casos GPAA n (%)	Controles n (%)	p *
C	104 (61,9 %)	113 (67,2 %)	0,362
T	64 (38,1 %)	55 (32,8 %)	
Total	168 (100,0%)	168 (100,0%)	

* Según prueba $\chi^2=0,832$

En cuanto a la distribución alélica del polimorfismo -857C/T TNF-alfa, se observaron frecuencias similares (61,9 y 67,2%) respecto al alelo C en los casos y controles. Se observó una mayor frecuencia del alelo T en los casos con respecto a los controles (38,1 y 32,8%).

En general, se observaron diferencias en las frecuencias de los alelos, entre los casos y controles, pero no fueron estadísticamente significativas ($p=0,362$), por lo que se asume que no existe asociación entre los alelos del polimorfismo -857 TNF-alfa y el GPAA en la muestra evaluada. (Tabla N° 3).

Tabla N° 4.- Distribución de genotipos del polimorfismo -857 TNF-alfa en pacientes con GPAA y controles según género

Genero	Genotipo	Casos n (%)	Controles n (%)	<i>p</i>
FEMENINO	CC	22 (40,7)	24 (44,4)	0,261*
	CT	21 (38,9)	25 (46,3)	
	TT	11 (20,4)	5 (9,3)	
	Total	54	54	
MASCULINO	CC	14 (46,7)	14 (46,7)	0,926**
	CT	11 (36,7)	12 (40)	
	TT	5 (16,7)	4 (13,3)	
	Total	30	30	

* Según prueba $\chi^2=2.684$, ** Según prueba $\chi^2=0.154$

En el análisis comparativo según género, las mujeres presentaron una frecuencia del genotipo homocigoto CC en un porcentaje similar tanto en casos como en controles. Se observó una mayor frecuencia del genotipo homocigoto TT en pacientes mujeres respecto a controles (20,4 y 9,3%). (Tabla N°4)

En cuanto a los varones, los resultados fueron similares a lo reportado en mujeres, la frecuencia del genotipo homocigoto CC fue la misma (46,7%) tanto en casos como en controles. La frecuencia del genotipo homocigoto TT fue mayor en casos que en controles (16,7 y 13,3% respectivamente). (Tabla N°4).

Estas diferencias de los genotipos según género, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$).

IV.- DISCUSION

La posibilidad de una predisposición genética del glaucoma fue descrita por primera vez en 1842 por Benedict³⁰, y no fue hasta hace algunos años en los que 3 genes han sido identificados como causales de la enfermedad: Miocilina, Optineurina y WDR36. Sin embargo, las mutaciones en estos genes están relacionadas con aproximadamente el 10% de pacientes con GPAA³¹. Esto ha fomentado seguir investigando el patrón genético de esta enfermedad, y actualmente uno de los métodos mas utilizados para este fin son los Estudios de Asociación de todo el Genoma (GWAS) que utiliza Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs), los cuales son una variación específica en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (en nuestro caso Citosina (C) y Timina(T)), en al menos el 1% de la población³². Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc.

Actualmente la utilidad y aplicabilidad de estos polimorfismos es poder identificar marcadores genéticos para rasgos complejos de algunas enfermedades²⁹, pero en un futuro no muy lejano podrían ser útiles para detectar susceptibilidad a una

enfermedad con solo analizar una muestra de ADN³¹, y de esta manera tener un manejo individualizado tanto para la prevención y tratamiento de la enfermedad.

Se ha postulado la existencia de un componente inmunoinflamatorio relacionado al glaucoma, en el cual el TNF-alfa sería una de las citoquinas mayormente involucradas, razón que motivó el estudio de sus diferentes polimorfismos.

Este trabajo se enfocó en el polimorfismo TNF-alfa que afecta a la posición -857 de su región promotora, el cual define alelos que se asocian con la presencia y/o severidad de algunas enfermedades, entre ellas el glaucoma^{26,29}. El Alelo T se comporta como un activador transcripcional mucho más fuerte que el Alelo C²⁵, lo cual originaría un mayor daño neurodegenerativo por medio de mecanismos fisiopatológicos en los cuales participa el TNF-alfa: producción incrementada de Oxido Nitrico, la inducción de apoptosis a través de la ocupación del receptor TNF-alfa 1, remodelación del tejido y daño tisular³³.

Los resultados hallados en este estudio reportan una mayor frecuencia del genotipo CC en pacientes con glaucoma, resultados que concuerdan con otros trabajos realizados^{26,28}, observándose además una mayor frecuencia del genotipo TT en pacientes con GPAA que en controles, lo cual también se presenta en los estudios mencionados, pero presentándose en mayor frecuencia en comparación a pacientes con GPAA de otras poblaciones como la japonesa donde la frecuencia del genotipo TT llega solo al 5,2%²⁸. Sin embargo estas diferencias en esta muestra japonesa no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), tal como en nuestro estudio.

En cuanto a la distribución alélica del polimorfismo, se encontró una predominancia del alelo C, siendo mucho más elevado en los controles ($p > 0,05$). El alelo T estuvo presente en aproximadamente un tercio de ambas muestras de casos y controles, lo cual concuerda con los resultados de algunos estudios que muestran una frecuencia elevada del alelo T del polimorfismo TNF-857 C/T en población Quechua peruana y población amerindia Paez de Colombia⁴, en comparación a otras poblaciones como las caucásicas, africanas y asiáticas²⁹. El alelo T del polimorfismo -857 del TNF-alfa que está asociado a una mayor actividad transcripcional con respecto al alelo C²⁵, presenta una frecuencia alta en pacientes peruanos con GPAA, así como en controles.

En el análisis por género se observó una mayor frecuencia del genotipo CC, seguido del CT y TT, tanto en hombres como en mujeres de los casos y los controles, sin embargo se vuelve a apreciar un mayor porcentaje del genotipo TT en pacientes con GPAA a comparación de los controles, pero que no es significativo ($p > 0,05$). Estos resultados son similares a otros estudios realizados sobre la asociación de género y glaucoma primario de ángulo abierto en pacientes adultos, en los cuales no se encontraron diferencias significativas⁷.

Si bien los resultados encontrados no mostraron asociación entre el polimorfismo -857 TNF-alfa con glaucoma en pacientes peruanos, esto podría deberse a que el glaucoma tiene un componente heterogéneo de múltiples genes y factores ambientales que podrían interactuar para la aparición de la enfermedad³¹. Esto sugiere que deben existir otros factores genéticos o ambientales implicados en la génesis del glaucoma primario de ángulo abierto. Un ejemplo es un estudio

realizado en Japón donde se encontró interacción entre el polimorfismo -857 C/T TNF-alfa y polimorfismos en el gen de Optineurina (c.412G/A y c.603T/A), el cual incrementa el riesgo de desarrollar glaucoma o probablemente la progresión de la enfermedad en pacientes con GPAA. Esta interacción se debería a una mayor producción de optineurina ocasionada por el TNF, y que en condiciones de mayor actividad transcripcional del TNF (asociada a la presencia al alelo T), esta proteína se encontraría incrementada.

Además, estos resultados se podrían deber a la variabilidad genética de las personas evaluadas, debido a que los SNPs en el gen TNF-alfa ocurren con distintos patrones en poblaciones étnicamente diferentes²⁹, y que en una población como la nuestra en donde existe mestizaje, por hechos históricos y culturales, es un factor muy importante a tomar en cuenta. No contar con la procedencia étnica de la muestra es una de las limitaciones del estudio.

Este estudio es el primero que se realiza en pacientes peruanos, y sienta las bases para futuras investigaciones en este campo.

V.- CONCLUSIONES

No se encontró asociación del polimorfismo -857 C/T en la región promotora del gen factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) con glaucoma primario de ángulo abierto en pacientes peruanos.

El genotipo CC y el alelo C del polimorfismo -857 TNF-alfa fueron los más frecuentes en pacientes con GPAA y en controles, sin embargo el alelo T tiene una frecuencia elevada en esta muestra peruana respecto a otras poblaciones del mundo.

No hay diferencias entre genotipos según género masculino o femenino.

VI.- RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar futuros estudios que involucren diferentes genes, como la Optineurina, Miocilina, en interacción con el polimorfismo -857 del TNF-alfa, para establecer factores de riesgo genético, ya que el glaucoma parece ser un desorden heterogéneo en el que interactúan múltiples mutaciones de baja penetrancia.

Se recomienda evaluar otros SNPs dentro del gen TNF-alfa, incluyendo al polimorfismo -857, en pacientes peruanos, ya que la elevada prevalencia de este polimorfismo en nuestra población le puede conferir potencial como marcador genético.

Se recomienda incluir como variable la procedencia étnica en posteriores investigaciones, pues es un factor importante en poblaciones como la peruana.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. European Glaucoma Society. Terminology and guidelines for Glaucoma. Third Edition. Savona, Italy: Dogma Editorial; 2008.
2. Weinreb R, Khaw P. Primary open-angle glaucoma. Lancet. 2004; 363(9422): 1711-1720.
3. American Academy of Ophthalmology. Preferred Practice Pattern: Primary Open-Angle Glaucoma. 2010.
4. Ray K, Mookherjee S. Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. Journal of Genetics. 2009; 88(4): 451-467.
5. Friedman DS, Wolfs RC, O'Colmain BJ, Klein BE, Taylor HR, West S, Leske MC, Mitchell P, Congdon N, Kempen J, The Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of Open-Angle Glaucoma Among Adults in the United States. Archives of Ophthalmology. 2004; 122: 532-38.
6. Anton A, Andrada MT, Mujica V, Calle MA, Portela J, Mayo A: Prevalence of primary open-angle glaucoma in a spanish population: The Segovia study. Journal of Glaucoma. 2004; 13: 371–376.
7. Harry A. Quigley, MD; Sheila K. West, MD; Jorge Rodriguez, MD; Beatriz Muñoz, MD; Ronald Klein, MD; Robert Snyder, MD. The Prevalence of

- Glaucoma in a Population-Based Study of Hispanic Subjects. *Archives of Ophthalmology*. 2001; 119(12):1819-26.
8. Thylefors B, Negrel A. The global impact of glaucoma. *Bulletin of the World Health Organization*. 1994; 72: 323–326.
 9. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R et al. (2004) Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of The World Health Organization*. 2004; 82(11): 844-851.
 10. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology*. 2006; 90: 262–267.
 11. Rodriguez J, Sanchez R, Muñoz B, West S, Broman A, Snyder R, Klein R, Quigley H. Causes of Blindness and Visual Impairment in a Population-based Sample of U.S. Hispanics. *Ophthalmology*. 2002; 109(4): 737-743.
 12. *Boletín Epidemiológico, Instituto Nacional de Oftalmología*. 2008; 2.
 13. Lemmela S. *Molecular Genetics Of Primary Open Angle Glaucoma And Exfoliation Syndrome [Tesis para optar el grado de Doctor en Genética Medica]*. Helsinki: Universidad de Helsinki; 2009.
 14. Hernandez RA, Burr JM, Vale LD. Economic evaluation of screening for open-angle glaucoma. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*. 2008; 24:203-11.
 15. Rao K, Nagireddy S, Chakrabarti S. Complex genetic mechanisms in glaucoma: An overview. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2011; 59(Suppl1):31-42.
 16. Vithana E, Nongpiur M, Venkataraman D, Chan S, Mavinahalli J, Aung T. Identification of a novel mutation in the NTF4 gene that causes primary

- open-angle glaucoma in a Chinese population. *Molecular Vision*. 2010; 16:1640-1645.
17. Aguilon J, Cruzat A, Cuenca J, Cuchacovich M. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. *Revista Médica de Chile*. 2002; 130(9).
18. Bayley J, Ottenhoff T, Verweij C. Is there a future for TNF promoter polymorphisms?. *Genes and Immunity*. 2004; 5: 315-329.
19. Schottelius A, Moldawer L, Dinarello C, Asadullah K, Sterry W, Edwards C. Biology of tumor necrosis factor-alpha – implications for psoriasis. *Experimental Dermatology*. 2004; 13: 193-222.
20. Balaiya S, Edwards J, Tillis T, Khetpal V, Chalam K. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels in aqueous humor of primary open angle glaucoma. 2011; 5: 553-556.
21. Sawada H, Fukuchi T, Tanaka T, Haruki A. Tumor Necrosis Factor-alpha Concentrations in the Aqueous Humor of Patients with Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010; 51(2): 903-6.
22. Ghanem A, Arafa L, Elewa A. Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-6 levels in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2010; 1(3): 1000116.
23. Bozkurt B, Mesci L, Irkec M, Ozdag B, Sanal O, Arslan U, Ersoy F, Tezcan I. Association of tumour necrosis factor-alpha -308 G/A polymorphism with primary open-angle glaucoma. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2011;doi: 10.1111/j.1442-9071.2011.0259.
24. Abdel M, Fahmy I, Labib H, Khalaf N. Association of tumour necrosis factor alpha gene polymorphism with pseudoexfoliative glaucoma in the egyptian

- population. *International Journal of Academic Research*. 2011; 3(1):167-172.
25. Lv K, Chen R, Cai Q, Fanf M, Sun S. Effects of a Single Nucleotide Polymorphism on the Expression of Human Tumor Necrosis Factor- α . *Scandinavian Journal of Immunology*. 2006; 64:164-169.
26. Kuo N, Lympany P, Menezo V, Lagan A, John S, Yeo T, Liyanage S, Bois R, Welsh K, Lightman S. TNF -857, a Genetic Risk Marker for Acute Anterior Uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2005; 46(5): 1565-1571.
27. Anoosheh S, Farnia P, Kargar M. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. Association between TNF- α (-857) Gene Polymorphism and Susceptibility to Tuberculosis. 2011; 13(4):243-248.
28. Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, Suzuki K, Ideta H, Nakamoto K, Tanibara H, Kanamoto T, Mishima H, Fukuchi T, Abe H, Iwata T, Shimada N, Kudoh J, Shimizu N, Mashima Y. Variants in Optineurin Gene and their association with Tumor Necrosis Factor- α Polymorphisms in Japanese Patients with Glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2004; 45(12): 4359-67.
29. Baena A, Leung JY, Sullivan AD, Landires I, Vasquez-Luna N, Quiñones-Berrocal J, Fraser PA, Uko GP, Delgado JC, Clavijo OP, Thim S, Meshnick SR, Nyirenda T, Yunis EJ, Goldfeld AE. TNF- α promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. *Genes and Immunity*. 2002; 3: 482-487.
30. Booth A., Churchill A., Anwar R., Menage M., Markham A. The genetics of primary open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 1997 May, 81(5): 409-414.

31. Fuse N. Genetic Bases for Glaucoma. *Tohoku Journal of Experimental Medicina*. 2010; 221:1-10.
32. Carlson B. SNPs A Shortcut to Personalized Medicine. *Biomarket Trends*. 2008; 28(12).
33. Yan X, Tezel G, Wax M, Edward D. Matrix Metalloproteinases and Tumor Necrosis Factor alpha in Glaucomatous Optic Nerve Head. *Archives of ophthalmology*. 2000; 118: 666-673.



ANEXOS

ANEXO N°1.- Hallazgos clínicos característicos del Glaucoma Primario de Angulo Abierto

Evidencia de signos de daño del nervio óptico

Anormalidades estructurales del disco óptico o de la fibra nerviosa retinal.

Adelgazamiento difuso, estrechamiento focal, o escotaduras del anillo neural (borde del disco óptico), especialmente en los polos superior e inferior.

Progresión documentada del adelgazamiento del borde neuroretinal con un asociado incremento de la excavación del disco óptico.

Anomalías difusas o localizadas de la capa de fibras nerviosas a nivel peripapilar, especialmente en los polos superior e inferior.

Hemorragias del anillo neural (borde del disco) o de la capa de fibras nerviosas peripapilar de la retina.

Asimetría del anillo neural del Nervio Óptico de ambos ojos consistente con pérdida de tejido neural.

Anomalías del campo visual identificadas en una sucesión de exámenes considerados como una representación válida del estado funcional del individuo.

Daño en el campo visual consistente con lesión de la capa de fibras nerviosas de la retina (escalón nasal, defecto arqueado o depresión en puntos paracentrales).

Pérdida de campo visual asimétrica entre los hemicampos visuales superior e inferior (en casos leves o moderados).

Ausencia de otras causas de daño del campo visual

Inicio en la edad adulta

Ángulos camerulares (anteriores) abiertos a la evaluación gonioscópica

Ausencia de otras explicaciones de neuropatía óptica glaucomatosa (Pseudoexfoliación, dispersion pigmentaria, uveitis etc)

Adaptado de American Academy of Ophthalmology. Preferred Practice Pattern. Primary Open-Angle Glaucoma. 2010³.

ANEXO N°2.- Genotipos -857 C/T en la Región Promotora del TNF-alfa

Banda (pb)	Alelos	Genotipo	Fenotipo
106 25pb.	2 alelos C	CC (Homocigoto silvestre)	Menor actividad transcripcional del gen TNF alfa -857.
131 106 25 pb	1 alelo C 1 alelo T	CT (Heterocigoto)	Actividad transcripcional intermedia del gen TNF alfa -857.
131 pb	2 alelos T	TT (Homocigoto mutante)	Mayor actividad transcripcional del gen TNF alfa -857.

Ejemplo de los diferentes genotipos determinados por la técnica PCR-RFLP mediante el corte (o no) con la enzima de restricción HincII.

ANEXO N°3.- Consentimiento Informado

Consentimiento utilizado en el proyecto E 1001 2010 016 “Análisis de mutaciones en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto”.

LIBRE CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE INFORMADO

ESTUDIO DE IDENTIFICACION DE GENES EN GLAUCOMA

Estimado Paciente:

El glaucoma es una enfermedad común en nuestro país y se presenta en personas mayores de 40 años o en algunos casos en pacientes más jóvenes. En el mundo, se estima que hay más de 66 millones de personas afectadas por la enfermedad. Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida progresiva e indolora de la visión, lo que causa ceguera si la enfermedad no se detecta y trata a tiempo. Es una enfermedad con una carga hereditaria.

¿Por qué se está haciendo esta investigación?
Porque la causa genética es muy importante e interacciona con los factores ambientales y el estilo de vida que lleva la persona.

¿Cuál es el objetivo de la investigación?
Los objetivos de la investigación son identificar las características y genética de la enfermedad que Ud. padece.

Entrarán al estudio los participantes elegidos

- Pacientes diagnosticados con glaucoma y familiares consanguíneos.

¿En qué consiste su participación?
Deberá acercarse al Servicio de Glaucoma del Instituto Nacional de Oftalmología en donde el Oftalmólogo que participa del estudio le interrogará, examinará y tomará una muestra de sangre de la vena. La sangre servirá para conocer el (los) gen (es) que buscamos.

¿En qué tiempo participará en el estudio?
En una sola visita al oftalmólogo. Posteriormente Ud. sabrá su resultado, el cual no va a ser de inmediato, por su proceso laborioso. Estos exámenes genéticos se realizarán en la Facultad de Medicina de la Universidad San Martín de Porres.

¿Cuáles son las ventajas de participar en este estudio?
Podrá conocer los detalles de la herencia de gen(es) responsables de glaucoma, esta información servirá para predecir la posibilidad de la enfermedad en sus familiares directos y le proporcionará información para que Ud. pueda acudir a chequeos médicos en forma periódica para monitorear la evolución de su enfermedad.

¿Cuánto tiempo participaré en este estudio?
Sólo requeriremos su colaboración en una oportunidad, en una de las consultas que su médico tratante le solicite entrar al estudio. Las pruebas se realizan en sangre, por lo que sólo necesitamos extraer una pequeña cantidad de sangre equivalente a 5 centímetros cúbicos, alrededor de una sola jeringa o aproximadamente unas tres cucharas de sangre. Estas muestras serán enviadas a un laboratorio especializado, que con aparatos muy avanzados permitirá estudiar los factores hereditarios que normalmente no se hacen de rutina en los pacientes con glaucoma y que pueda permitir asimismo la investigación de otras enfermedades hereditarias, para lo cual contamos con el apoyo del laboratorio de la Facultad de Medicina de la USMP:

¿Qué desventajas puedo obtener de esta investigación?
No existe ninguna desventaja. Solamente el tiempo empleado en los exámenes, de aproximadamente 30 minutos y el dolor del hincón para tomar la muestra de sangre, que a veces se acompaña de un moretón.

¿Puedo retirarme del estudio?
Ud. tiene garantizado el hecho de retirarse, sólo deberá poner en conocimiento del médico tratante su negativa a participar en cualquier momento del estudio, si Ud. por consideraciones personales o de cualquier índole desee retirarse, bastará con comunicarlo. No existirá ningún tipo de penalidad y garantizamos que continuara su atención rutinaria sin ninguna modificación.

¿Tendré que realizar algún pago por los exámenes y estudios?

No, Ud. no tendrá que realizar pago alguno. Los costos de los exámenes están cubiertos por el presupuesto del presente proyecto.

¿A quién puedo recurrir para preguntar acerca de una duda?

Podrá recurrir en cualquier momento y en principio a su medico tratante, luego podrá solicitar la información requerida por teléfono directamente al:

- Dr. Amador Vargas, Presidente del Comité de Ética, USMP Tel 99098514
- Mg. María Luisa Guevara, Investigadora Responsable Tel 365-2300 anx. 152
- Dr. Ricardo Fujita Alarcón , Director Centro de Genética, USMP Tel 365-2300 anx. 152
- Dr. Enrique Vargas Gonzáles, Jefe del Servicio de Glaucoma, Instituto Nacional de Oftalmología, Telf. 4257700, anexo 34

Participación voluntaria:

Su participación en el estudio será totalmente voluntaria y si Ud. decide no participar no se verá afectada (o) en ningún aspecto de su atención, teniendo los mismos derechos como paciente. La única diferencia es que no se le realizará la entrevista y no se le tomará la muestra para los análisis que tienen que ver estrictamente con este estudio.

¿Es posible que mi sangre obtenida de esta prueba pueda ser utilizada para el análisis genético de otras enfermedades?

Su muestra será archivada en un lugar seguro dentro del laboratorio de la Facultad de Medicina de la USMP. Se codificará los resultados por razones de seguridad y sólo se revelarán a su pedido y/o por razones que garanticen su propio interés.

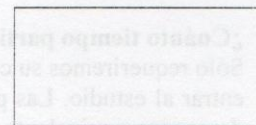
DECLARACION DEL PACIENTE:

“He leído y entendido la información prestada por mi médico tratante y escrita en este documento. También afirmo que he tenido la oportunidad de hacer algunas preguntas y resolver algunas dudas. Por lo que acepto libre y voluntariamente participar en esta investigación”.

Nombre del paciente:

Documento de Identidad.....

Rubrica:..... Huella digital



Nombre y apellidos del testigo:.....

Documento de Identidad:.....

Rubrica:.....

Lima.....de.....del.....

ASÍ MISMO AUTORIZO A QUE SI FUERA CONVENIENTE MI SANGRE PUEDE SER UTILIZADA PARA EL ANALISIS DE OTRAS ENFERMEDADES HEREDITARIAS DIFERENTES DEL PRESENTE ESTUDIO.

Nombre del paciente:

Documento de Identidad.....

Rubrica:..... Huella digital

Nombre y apellidos del testigo:.....

Documento de Identidad:.....

Rubrica:.....

Lima,.....de.....del.....

