



Universidad de Valladolid

TRABAJO FIN DE MASTER

2013

SNP 309 del gen MDM2, como marcador de riesgo de la Vitreorretinopatía Proliferante
Proyecto Retina 4



Alumno Master de Retina

Salvador Pastor Idoate

05/07/2013





AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA EXPOSICIÓN PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

(Art. 6.2 del Reglamento de la UVA sobre la Elaboración y Evaluación del Trabajo Fin de Máster)

D./Dña. JOSÉ CARLOS PASTOR JIMENO en calidad de Tutor del alumno

D. /Dña. SALVADOR PASTOR IDOATE

Máster en RETINA del I.O.B.A, Universidad de Valladolid

Curso académico: 2012-2013

CERTIFICA haber leído la memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado **“SNP 309 del gen MDM2, como marcador de riesgo de la Vitreorretinopatía Proliferante. Proyecto Retina 4 “** y estar de acuerdo con su exposición pública en la convocatoria de Julio 2013.

En Valladolid a 18 de Junio de 2013

Vº Bº

Fdo.:

El/La Tutor/a

INDICE

RESUMEN _____ iError! Marcador no definido.

INTRODUCCIÓN _____ iError! Marcador no definido.
 Estudios previos _____ **iError! Marcador no definido.**
 Inflamación y muerte celular _____ **iError! Marcador no definido.**
 Diferencias entre los procesos de necrosis y apoptosis ___ **iError! Marcador no definido.**
 Complejos de señalización TNF _____ **iError! Marcador no definido.**
 SNP rs2279744 _____ **iError! Marcador no definido.**

HIPÓTESIS _____ iError! Marcador no definido.

OBJETIVOS: _____ iError! Marcador no definido.

MATERIAL Y METODOS _____ iError! Marcador no definido.
 Diseño y población de estudio _____ **iError! Marcador no definido.**
 Estudio de asociación genética _____ **iError! Marcador no definido.**
 Interacción genética _____ **iError! Marcador no definido.**
 Genotipado _____ **iError! Marcador no definido.**
 Análisis estadístico _____ **iError! Marcador no definido.**

RESULTADOS _____ iError! Marcador no definido.
 Estudio de asociación genética _____ **iError! Marcador no definido.**
 Fase I: distribución genotípica del polimorfismo en España y Portugal ___ **iError! Marcador no definido.**
 Fase II: distribución genotípica del polimorfismo en UK y Holanda _____ **iError! Marcador no definido.**
 Análisis de frecuencias alélicas _____ **iError! Marcador no definido.**
 Interacción Genética _____ **iError! Marcador no definido.**

DISCUSIÓN _____ iError! Marcador no definido.

TABLAS _____ iError! Marcador no definido.
 Tabla 1. Características clínicas de la muestra global ___ **iError! Marcador no definido.**
 Tabla 2. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas **iError! Marcador no definido.**
 Tabla 3. Modelos de herencia _____ **iError! Marcador no definido.**
 Tabla 4. Distribución del polimorfismo SNP 309 en la muestra global ___ **iError! Marcador no definido.**
 Tabla 5. Interacción genética _____ **iError! Marcador no definido.**

BIBLIOGRAFÍA _____ iError! Marcador no definido.

ANEXO-1 DIFUSIÓN DE RESULTADOS _____ iError! Marcador no definido.
 Comunicación a congresos _____ **iError! Marcador no definido.**
 Premios _____ **iError! Marcador no definido.**



RESUMEN

Propósito: comparar la distribución del polimorfismo 309 del gen *MDM2* entre pacientes europeos sometidos a cirugía del desprendimiento de retina (DR) en relación con el posterior desarrollo de una vitreoretinopatía proliferante (VRP).

Diseño: Como parte del proyecto Retina 4 (estudio Europeo multicéntrico, para el análisis del componente genético de la VRP), se llevo a cabo un estudio de asociación genética entre casos y controles.

Participantes y controles: Se han genotipado 555 muestras de DNA procedentes de 134 pacientes con VRP secundaria a DR y 421 pacientes con DR sin VRP.

Metodología: se analizó el polimorfismo (rs2279744) del gen *MDM2*, utilizando un *primer* específico mediante la técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) en dos fases. Se estudio la proporción de los distintos genotipos, las frecuencias alélicas y los portadores homocigotos de Guanina (G) entre las diferentes muestras de los distintos países participantes (España, Portugal, Holanda y Gran Bretaña). También se comparó el genotipo y los portadores homocigotos (G/G) entre los casos y controles en la muestra global. Además se analizó la interacción genética entre los polimorfismos rs2279744 del gen *MDM2* y el rs1042522 del gen *p53*, previamente estudiado por nuestro grupo.

Principales variables: Asociaciones significativas simples con VRP.

Resultados: Al analizar las frecuencias genotípicas de la posición 309 del intron 1 del gen *MDM2*, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$, Fisher test) entre los casos y controles de España y Portugal (Fase I), y también entre los casos y controles de Holanda y Gran Bretaña (Fase II). El análisis de los portadores homocigotos G/G entre casos y controles reveló diferencias entre España [35.1-53.0]/[22.6-32.9], Portugal [39.0-74.4]/[21.4-38.9], Holanda [40.6-66.3]/[25.3-38.8] y Gran Bretaña [37.5-62.4]/[23.3-34.2]. La odds ratio de los portadores G/G en las muestras conjuntas de España y Portugal fue de 5.4 (95% CI: 2.2-12.7, $p < 0.05$), mientras que la odds ratio de los portadores de G/G en las muestras conjuntas de Holanda y Gran Bretaña fue de 7.3 (95% CI: 2.8-19.1 $p < 0.05$). Todos los controles se encontraban bajo el equilibrio Hardy-Weinberg.

Considerando la muestra globalmente, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las frecuencias genotípicas entre los casos (GG: 21.6%, TG: 54.5%, TT: 23.8%) y los controles (GG: 7.3%, TG: 43.9%, TT: 48.7%) y también en el análisis de los portadores homocigotos G/G, entre los controles (95% CI: 26.2-32.4) y los casos (95% CI: 42.9-54.8). La OR de los homocigotos G/G en la muestra global fue de 5.9 (95% CI: 3.2-11.2).

Conclusiones: Los resultados indican que los portadores de la variante alelica G del polimorfismo 309 del gen *MDM2*, tienen un alto riesgo de desarrollar VRP tras un DR. No obstante, son necesarios más estudios para entender el papel de este polimorfismo en el desarrollo de la VRP.

Además este estudio pone de relieve el papel de la genética como herramienta útil en la identificación de pacientes de alto riesgo que podrían ser sensibles a VRP y por lo tanto, la posibilidad de que pueda ser utilizado como un posible biomarcador de riesgo de VRP tras un DR.



INTRODUCCIÓN

La vitreorretinopatía proliferante (VRP) (identificada desde 1983 como una entidad independiente)¹ es considerada un proceso de *cicatrización exagerado* de la retina inducido por una rotura retiniana, en donde los procesos inflamatorios y fibróticos parecen tener un papel fundamental en su patogénesis²⁻⁷. La consecuencia final de este proceso patológico es: la *formación de membranas contráctiles*, en la cavidad vítrea, en la interfase vitreorretiniana, en la propia retina y a veces en el espacio subretiniano⁸ y la *alteración anatómica de la retina*, lo que conduce en la mayoría de los casos a un nuevo desprendimiento de la retina y aparición de nuevas roturas².

Se calcula que la incidencia de desprendimientos de retina (DR) es de 2 nuevos casos/10.000 habitantes y año⁹⁻¹¹. Aproximadamente unos 10.000 casos nuevos al año en España, de los que un 10% de ellos son bilaterales, aunque no simultáneos.

A pesar de los grandes avances de la cirugía vitreorretiniana, cerca de un 5-10% de los pacientes con DR regmatógeno desarrollan una VRP, que sigue siendo la complicación grave más frecuente de esta cirugía^{2, 12-14}. Esta cifra se obtiene de los datos ya publicados con anterioridad de los DR regmatógenos no complicados, pero la VRP, aparece con mayor incidencia en otras condiciones vitreorretinianas; por ejemplo en los desgarros retinianos gigantes (a menudo excluidos de las series de DR primarios), donde la incidencia varía desde un 16% hasta un 41%¹⁵⁻¹⁹. En los traumatismos penetrantes en donde la fisiopatología de la VRP se ve alterada por factores adicionales como: mayor rotura de barreras hematorretinianas, presencia de sangre en vítreo, y la existencia de uveítis. La incidencia de VRP en estos casos se estima que oscila en torno a un 10% hasta un 45%²⁰⁻³⁰. También se ha convertido en una complicación importante en la cirugía de translocación retiniana, donde se estima una incidencia del 18% al 23%, sobre todo cuando se lleva a cabo una retinotomía de 360°, si bien su incidencia disminuye cuando se realizan retinotomías menos extensas³¹.

Esta entidad tiene por tanto una importante **repercusión anatómica y funcional**, ya que su aparición reduce las tasas de reaplicación desde un 98% (según las series)³²⁻³⁴ hasta un 60-70%³⁵⁻³⁶ y con poco éxito funcional en la mayoría de los casos reaplicados³⁷⁻⁴⁰. El resultado visual binocular en estos ojos es a menudo igualmente insatisfactorio.



En un estudio realizado por Andenmatten y Gonvers⁴¹ donde analizaron los resultados de cuarenta y cuatro pacientes tratados con éxito de VRP tras DR y con ojos contra laterales sanos, se encontró que sólo catorce tenían algún grado de estereopsis, que en quince pacientes había un estrabismo manifiesto, treinta padecieron fotofobia, ocho diplopía y veinte de ellos tenían que cerrar sus ojos operados en el desempeño de tareas manuales. Veinticinco de los cuarenta y cuatro pacientes describieron su confort visual como medio a malo. Además la VRP, conlleva una **repercusión económica**, ya que incrementa el coste medio para una intervención de DR⁴² y una **repercusión terapéutica** ya que obstaculiza el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de enfermedades retinianas como la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)⁴³⁻⁴⁶, si están basadas en procedimientos quirúrgicos. (El porcentaje de pacientes de más de 65 años que sufren DMAE en Europa es más del 50%, siendo en España de un 13%. (26.000 casos nuevos/año de DMAE)).

La mayoría de las investigaciones han intentado identificar los factores de riesgo clínicos asociados al desarrollo de la VRP, sin embargo, estas variables no terminan de explicar completamente su probabilidad de aparición⁴⁷. Dado que la VRP es una respuesta inflamatoria celular, al igual que en otras enfermedades inflamatorias, la susceptibilidad genética puede tener un papel importante. Nuestro grupo, ha descrito en estos últimos años, la contribución del componente genético⁴⁸⁻⁵¹ al desarrollo de esta entidad asumiendo su carácter de enfermedad compleja⁵².

Se han descrito cuatro modelos básicos para describir la interacción entre factores genéticos y ambientales⁵³:

Modelo 1: ninguno de los factores por separado aumenta el riesgo y es necesaria la combinación de ambos.

Modelo 2: el genotipo incrementa el efecto de un factor de riesgo ya existente.

Modelo 3: un factor ambiental incrementa el efecto de un factor genético ya presente.

Modelo 4: ambos factores influyen en el riesgo por separado, pero la influencia es mayor si se combinan.

Por lo tanto la combinación de los distintos factores de riesgo: genéticos, ambientales y clínicos, contribuyen al factor de riesgo individual.

Las variantes génicas no sólo modifican el riesgo sino que también actúan sobre la evolución de enfermedad y el carácter de la respuesta a los tratamientos⁵⁴.

El conocimiento de la secuencia completa del genoma humano y la aplicación de nuevas técnicas moleculares han generado una importante información acerca de los marcadores genéticos asociados con el desarrollo de enfermedades. Las enfermedades inflamatorias oculares tienen especial interés en estos estudios dada su importancia como problema de salud a nivel mundial. El estudio de las enfermedades multifactoriales desde el punto de vista genético, se basa en el estudio de las variaciones del genoma.

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ADN es compartida entre dos individuos diferentes. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos (diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades), radica en el 0.1% restante. A este tipo de variaciones genéticas se las conoce con el nombre de polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN. Se diferencian terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Cuando una mutación es tan frecuente que aparece al menos cada 100 copias, se denomina polimorfismo⁵⁵. Hay distintos tipos: deleciones, inserciones, cambios de una base por otra. Los más frecuentes son los polimorfismos de una sola base o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Su frecuencia y distribución en el genoma, así como la relativa facilidad de su estudio les convierte en eficaces herramientas para localizar genes o regiones genómicas que pudiesen ser responsables de algún tipo de enfermedad o del incremento de susceptibilidad de ciertos individuos a padecerla⁵⁶. Actualmente en el dbSNP (base pública de SNPs) se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN. La densidad de SNPs en el genoma se estima que es de uno cada 200 pares de bases (pb), así que hay más de un millón de posibles lugares de variación, siendo el número aproximado de SNPs en la región exónica de 20.000 a 60.000⁵⁷⁻⁵⁸. Si bien, muchos de los cambios son neutros lo que dificulta la identificación funcional de los SNPs⁵⁹⁻⁶⁰; no obstante se cree que el 50% de los casos producen un cambio de aminoácido y que en el 45% de los casos este cambio es no conservativo.

Al igual que lo que ocurre con los SNPs de la regiones exónicas (cSNP) también pueden tener consecuencias funcionales los que aparecen en las regiones promotoras del gen (rSNP) (modulando la unión de factores de transcripción), en los intrones (iSNP) (modulando la estabilidad de la proteína), en los sitios de splicing o en regiones intragénicas (gSNP)⁶¹.



Un dato interesante de los SNPs es que a diferencia de otro tipo de marcadores como los micro satélites, presentan una tasa menor de mutación por lo que son de gran ayuda en los estudios de genética de poblaciones. Un nivel adicional de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuales están compuestos por un conjunto de SNPs a lo largo de un mismo cromosoma que son heredados como una unidad. La diferencia entre los SNPs individuales y los haplotipos, es que los alelos en estos últimos son asignados a un cromosoma. Son de gran utilidad, ya proporcionan información acerca de la recombinación (intercambio físico de ADN durante la meiosis).

Estudios previos

Desde el año 2005, una de las líneas de investigación del grupo de retina del I.O.B.A de Valladolid (España) está centrada en el estudio de la inflamación y la reparación retiniana en procesos como la VRP. A partir de estudios previos realizados en esa línea, se ha logrado identificar factores clínicos de riesgo⁴⁷ y genético⁴⁸⁻⁵¹ de desarrollo de VRP tras un DR.

Uno de estos trabajos ha permitido identificar una asociación significativa entre la VRP y cuatro genes implicados en la cascada de la inflamación: TNFA, TNFR2, SMAD7 y PIK3CG. De todos los marcadores analizados en estos genes, hay uno que resulta de especial interés: el *rs2229094* (T→C). Se trata de un SNP que mostró una asociación con el desarrollo de la VRP, tanto en el análisis simple como en el haplotípico, en donde se encontró presente en el 100% de las asociaciones significativas⁴⁹. Además, no se observó en ninguna de las asociaciones no significativas.

En un trabajo posterior en el que se ajustaron modelos de predicción de riesgo de VRP, basándose en las asociaciones encontradas, este SNP se identificó siempre en los modelos que eran más predictivos, siendo a su vez el mejor clasificador de pacientes con VRP, cuando se analizó de forma independiente entre los otros 230 SNPs estudiados⁶².

Por otro lado, basándose en estudios realizados sobre el sistema nervioso central (SNC) en los que se concluía la existencia de una asociación entre determinados genes implicados en la muerte celular y los pacientes que habían sufrido un accidente isquémico⁶³, y partiendo de la premisa, de que el comportamiento retiniano bajo situaciones de isquemia, como es el caso del DR, debe ser similar al del SNC, se ha estudiado, junto con la colaboración del departamento de genética y el centro de investigación del cáncer de la universidad de Salamanca, el posible papel de los genes implicados en la muerte celular y la VRP.

De especial interés es el polimorfismo *rs1042522 (R→P)*. Se trata también de un SNP del gen *p53*, que ya en un primer estudio de asociación simple (a nivel de SNP) ha mostrado una asociación significativa con la VRP⁵⁰, por lo que la muerte celular podría desempeñar junto con los procesos fibróticos e inflamatorios un papel decisivo en el desarrollo de la VRP.

Hay que recordar que aunque los estudios de asociación permiten establecer las diferentes frecuencias de ciertos polimorfismos en poblaciones afectas y en las controles, el mayor problema que presenta es el hallazgo de falsos positivos⁶⁴. Además ciertos marcadores pueden tener un efecto en ciertas poblaciones y no en otras. Por todo esto, muchas veces ocurre que las asociaciones encontradas en algunas poblaciones no son definitivas⁶⁵, por lo que la replicación de estos estudios es un paso imprescindible en el estudio de la genética humana.

La mayor parte de los SNP que se encuentran distribuidos por el genoma son mutaciones silenciosas que no tienen consecuencias sobre el fenotipo de los individuos, pero alrededor de un 20% de los polimorfismos detectados hasta la fecha se encuentran en regiones génicas que pueden tener información esencial para el funcionamiento de proteínas transportadoras, receptores celulares o de enzimas que participen en metabolismo de fármacos. Es decir, el desarrollo de diversas patologías puede estar directamente relacionado con la presencia de SNP en zonas del genoma que afectan a elementos funcionales del mismo. Así los polimorfismos: *rs2229094 (T→C)*⁴⁹, *rs1042522 (R→P)*⁵⁰, y el polimorfismo del presente estudio: *rs2279744 (G→T)*, podrían estar implicados en el tipo de respuesta del tejido retiniano que se desencadena a partir de un DR.

Inflamación y muerte celular

Los procesos de reparación tisular conllevan siempre un incremento de las células inflamatorias en el lugar de reparación. Aunque la respuesta inflamatoria es esencial para la defensa frente a la invasión de microorganismos, estudios recientes realizados en numerosos organismos han demostrado que no es estrictamente esencial para el proceso de reparación tisular. Pudiendo ser la causa de respuestas fibróticas.

Esta inflamación podría contribuir no sólo a procesos de cicatrización sino ser la base de patologías fibróticas en otros tejidos.

Como ya se mencionó anteriormente la VRP, es considerada un proceso de respuesta cicatricial e inflamatorio exagerado, y estudios anteriores dividen su



desarrollo en tres fases: *inflamación, proliferación celular y modulación de la cicatrización*².

La etapa de *inflamación* comienza después de la rotura retiniana y el posterior DR, dando lugar a la ruptura de barreras hemato-oculares, llegada de plaquetas y liberación de factores quimiotácticos como el *Platelet-derived growth factor (PDGF)* que actúa tanto como agente quimiotáctico para células mesenquimales, gliales y del EPR, como agente estimulador de síntesis y depósito de colágeno, *transforming growth factor beta (TGF-β)* que también es liberado por las propias células del EPR, y que además de actuar como un factor autocrino negativo e inducir más expresión de PDGF, media sus efectos a través de las proteínas reguladoras SMADs implicadas en mecanismos profibróticos. Y el *epidermal growth factor (EGF)* capaz de inducir proliferación en células epiteliales, fibroblastos y células gliales^{2,6,66}. Posteriormente son atraídos los polimorfonucleares y los monocitos sanguíneos que liberan más agentes quimiotácticos para las células del EPR, las células gliales y los fibroblastos, así como factores nuevos factores de crecimiento que inducen más proliferación y síntesis de colágeno³. Además en esta etapa debido a la separación de la retina del EPR se producen también fenómenos isquémicos y como consecuencia de ello muerte celular, sobre todo de células fotorreceptoras, aportando en la mayoría de los casos más inflamación al proceso. Y también se ha descrito cambios en las células de Müller, astrocitos, así como en las neuronas de segundo y tercer orden, las células bipolares y ganglionares, sufriendo las primeras una hipertrofia en un intento de ocupar los espacios dejados por la pérdida de los fotorreceptores y por el resto de las neuronas, mediante una extensión de sus procesos dendríticos⁶⁷.

En la etapa de *proliferación celular* tiene lugar la proliferación, la metaplasia⁶⁸ y fenómenos de transdiferenciación del EPR hacia mio-fibroblastos o macrófagos que formaran parte de las membranas tanto epi, sub como intra-retinianas⁶⁹⁻⁷⁰. Y en la última etapa la *modulación de los tejidos*, es donde se produce la contracción de las membranas previamente formadas dando lugar a un acortamiento retiniano que originara distorsión y la formación de nuevas roturas⁷¹.

La *muerte celular* es una respuesta celular fundamental que juega un importante papel en la conformación de nuestro organismo, y es por tanto fundamental durante el desarrollo de órganos y sistemas, y en la regulación de la homeostasis de los tejidos eliminando células no deseadas.

Se han descrito 3 tipos principales de muerte celular: la apoptosis (tipo I), la muerte celular asociada con la autofagia (Tipo II) y la necrosis (tipo III)⁷²⁻⁷³.

La *apoptosis o muerte celular programada*, es un proceso de muerte celular programado que se caracteriza por la ausencia de una respuesta inflamatoria y por ser un proceso complejo en el que intervienen multitud de mediadores en su regulación. Clásicamente se diferencian dos vías de activación de la apoptosis: la *intrínseca o mitocondrial*, y la *vía extrínseca*⁷² (Figura-1). En estas vías intervienen las caspasas, que son las principales proteasas implicadas en la inducción, ejecución y propagación de la apoptosis. Las caspasas se pueden clasificar en: iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y efectoras (3, 6 y 7). De este modo las primeras activarían a las segundas, y éstas a su vez desencadenarían el proceso de muerte celular.

La *vía intrínseca* se desencadena por reacciones de estrés intracelular que actúan sobre las mitocondrias (daños en el ADN, estrés del retículo endoplasmático, etc.) y que dan lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial. Esta permeabilización puede producirse por la apertura de los poros MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) o por la formación de canales específicos en la membrana mitocondrial externa⁷⁴. De esta manera, la alteración del potencial transmembrana y, la consecuente liberación de factores proapoptóticos desde el espacio intermembrana, conducen a la muerte celular. Entre los factores proapoptóticos que se liberan al citosol, destaca el citocromo C, que induce la maduración proteolítica de la caspasa 9, que a su vez es capaz de activar a las caspasas efectoras^{72,74-75}. Sin embargo, la permeabilización de la membrana mitocondrial también puede desencadenar la muerte celular por procesos independientes a la activación de las caspasas, como sucede a través la vía de la necrosis programada o necroptosis.

La activación de la *vía extrínseca* comienza cuando se produce la unión de determinados ligandos, como el TNF α (tumor necrosis factor alfa) y el FasL (Fas ligand o CD95L, perteneciente a la familia del TNF) con sus receptores de membrana específicos, como el TNFR1 (*TNF receptor 1*) o el Fas/CD95 (receptor del FasL). Ambas moléculas se han encontrado en concentraciones elevadas durante los procesos de degeneración retiniana, lo que sugiere su implicación en la muerte de células retinianas tras un DR⁷⁶⁻⁷⁷. Como consecuencia de la unión de estos ligandos con los receptores, se produce la activación de los factores intermedios, como son el FADD (*Fas Associating Death Domain*) o el TRADD (*TNF Receptor Associating Death Domain*), que darán lugar a la formación de un complejo de activación de señales de muerte celular^{72-75,78}. Este complejo, a su vez, activa a las caspasas iniciadoras (pro-caspasas 8 y 10).



Finalmente, ambas vías convergen para desencadenar la activación de las caspasas efectoras (3, 6 y 7) por medio de la caspasa 9 en la vía intrínseca, y de la caspasa 8 en la vía extrínseca^{74,78}.

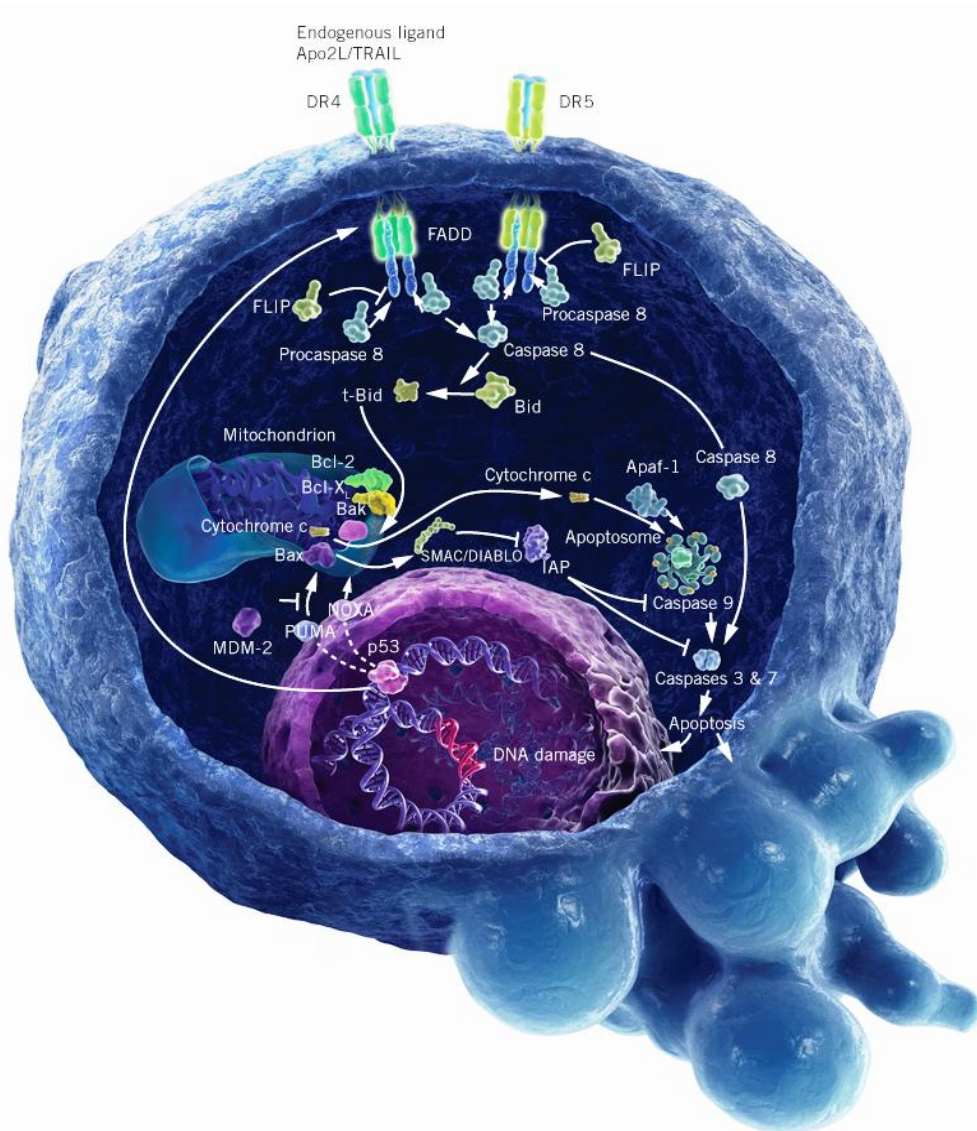


Figura-1. Esquema de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

En la vía extrínseca la interacción del receptor de muerte con sus ligandos ($\text{TNF}\alpha$ y el FasL) activa las caspasa-8 y -10 mediante complejos de proteínas adaptadoras como FADD. Estas caspasas iniciadoras a continuación activarán las caspasa efectoras-3, -6 y -7, conduciendo al proceso de la muerte. En la vía mitocondrial, los estímulos de la muerte, proceden o de reacciones de estrés intracelular (ROS) que actúan sobre las mitocondrias y que dan lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP), junto con la liberación del citocromo C al citosol. O a través de la cascada de señales que se desencadena en la vía necroptosis, cuyo activador principal es el $\text{TNF}\alpha$ o por la liberación de los efectores de muerte celular independientes como factor de activación de la apoptosis (AIF) y endonucleasa G (EndoG) o bien directamente mediante la transducción de genes proapoptóticos como Bax y Bak (proceso regulado por el p53) que conducen la liberación del citocromo C, Smac / Diablo, y otros factores apoptogénicos. El citocromo C una vez en el citosol, induce la oligomerización de Apaf-1 que posteriormente activará la procaspasa-9. La caspasa-9 es la caspasa iniciadora de la vía intrínseca que posteriormente activará las caspasas efectoras conduciendo al proceso de la apoptosis. Además las dos vías se relacionan entre ellas a través de la caspasa -8, que puede activar la proteína citosólica Bid que promueve la MMP a través de la proteína Bax.

Imagen: *Dysregulation of Apoptosis. BioOncology. Genetech. Copyright 2009.*



En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones inflamatorias, ni procesos cicatriciales en los tejidos. Considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades⁷⁸⁻⁷⁹.

Por otra parte, alteraciones en la apoptosis constituyen un factor importante en muchos estados patológicos humanos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, daño isquémico, trastornos autoinmunes y muchos tipos de cáncer. Además, se ha descrito que una desregulación de los mecanismos de apoptosis durante la cicatrización de heridas puede conducir a formas patológicas de la curación tales como cicatrices y fibrosis excesiva⁷⁹.

Estudios previos han señalado que la muerte de los fotorreceptores que ocurre tras un DR y la consiguiente disminución de la agudeza visual posterior, podría estar causada por la apoptosis y por la activación de otras vías de muerte de celular, tales como la necrosis programada cuando las vías de la apoptosis se inhiben por algunos fármacos^{75,80}. Y también, en un estudio reciente, se ha sugerido la posibilidad de que un aumento en la expresión de moléculas solubles de apoptosis y moléculas de adhesión en el momento de la cirugía de un DR podría asociarse con el desarrollo posterior de la VRP⁸¹. Sin embargo, en ese mismo estudio, se ha descrito, que los cuerpos apoptóticos derivados de endotelio capilar retiniano inducen la liberación de citocinas y quimiocinas proangiogénicas, así como la expresión de moléculas de adhesión favorecedoras del reclutamiento de células endoteliales progenitoras que podrían favorecer los procesos de reparación retiniana⁸¹.

Uno de los principales reguladores y activadores de la apoptosis es el gen p53 (Figura-2), que es crucial para la reparación celular de mutaciones genómicas que pueden dar lugar al desarrollo de tumores. Es bien conocido su papel para inducir la detención del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia, o la diferenciación celular tras el stress⁸².



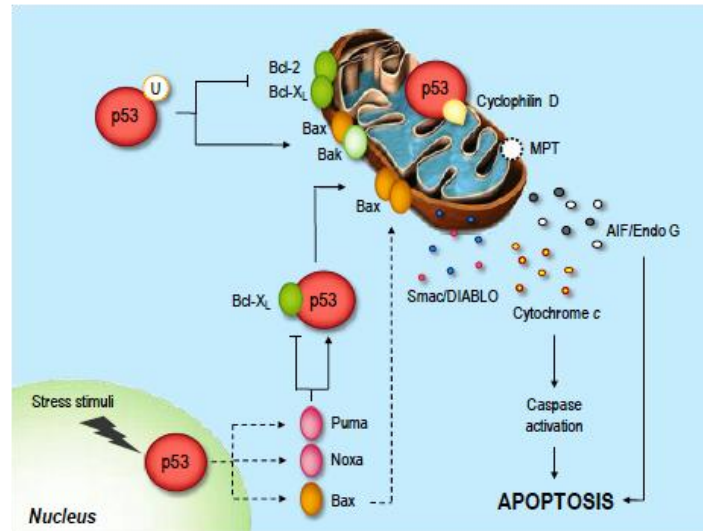


Figura-2. Esquema de las vías apoptóticas citosólica y mitocondrial del p53.

En la vía citosólica el p53 puede producir la apoptosis a través de las 2 vías de muerte celular, mediante el aumento en la transcripción de genes pro-apoptóticos, incluyendo miembros de la familia Bcl-2, como *bax*, *noxa* y *puma* (vía intrínseca) que activarían el p53 citosólico inactivado por Bcl-X_L y la posterior translocación de bax a la membrana mitocondrial, como por la vía extrínseca incrementar la transcripción de receptores de muerte (Fas) en la superficie celular. En la vía mitocondrial, el p53 induce la oligomerización de factores apoptóticos Bax y Bak, los cuales inhiben los efectos anti-apoptóticos de Bcl-2 y Bcl-XL, aumentando los niveles de p53 activo en el citosol. Además forma complejos con la Ciclofilina D en la membrana mitocondrial interna lo que conduce a una disrupción de la membrana con la consiguiente liberación de factores apoptóticos.

Imagén: *Function of nuclear steroid receptors in apoptosis: role of ursodeoxycholic acid*, 497-501, Copyright 2007.

Se han descrito numerosos SNPs y otras variaciones polimórficas en el gen p53. El polimorfismo del codón 72 de p53 regula la interacción con NF- κ B y la transactivación de genes implicados en la apoptosis, la inmunidad y la inflamación, y se ha asociado con varios tipos de cáncer y procesos inflamatorios⁸³⁻⁸⁶.

Este polimorfismo, aparece en los humanos bajo dos variantes: arginina (Arg) y prolina (Pro). La variante Arg / Arg codifica una proteína altamente pro-apoptótica, mientras que la variante Pro / Pro tiene el efecto contrario^{84,87-88}. Esta propiedad, se correlaciona con una mayor capacidad para interactuar con la proteína "murine double minute 2 (mdm2)", proteína que facilita su exportación nuclear y localización mitocondrial^{87,89}. Además se han publicado otras diferencias entre estas dos variantes de p53: como la distinta capacidad de unirse a los componentes de la maquinaria transcripcional, diferencias para activar la transcripción, para inducir la apoptosis, o para reprimir la transformación de las células primarias⁹⁰.

Además de su relación con los tumores y procesos inflamatorios, estudios recientes efectuados sobre el sistema nervioso central, han demostrado que este polimorfismo del p53 está relacionado con un peor pronóstico funcional en aquellos pacientes que han sufrido un accidente isquémico o hemorrágico cerebral⁶³ y

además estudios anteriores han demostrado que la apoptosis es una de las principales causas de pérdida neuronal después de un trauma, isquemia o procesos neurodegenerativos del sistema nervioso central⁷⁵. Estos hallazgos deberían ser muy relevantes para la patología retiniana, ya que el tejido retiniano tiene un comportamiento similar al del tejido cerebral, incluyendo los procesos cicatriciales^{2,91}. Al producirse el DR, las capas más externas de la retina pierden el contacto con el EPR subyacente y con los vasos coroideos, encargados de su soporte metabólico y nutricio de estas capas, lo que conduce a una situación de isquemia e hipoxia relativa de la capa de los fotorreceptores. Estos factores promueven un aumento en los niveles de p53 y la activación de los diversos mecanismos de muerte celular^{75,92}.

Nuestro grupo en el año 2012 describió una asociación entre el polimorfismo del codón 72 del p53 y la VRP⁵⁰. De acuerdo con esos resultados, los portadores del alelo Pro, que se asocia con una disminución de la función apoptótica de p53, tienen un mayor riesgo de VRP tras un DR.

Además, recientemente se ha descrito que un aumento del nivel de p53 y la activación de varios mecanismos de muerte celular podrían también formar parte en los mecanismos fisiopatogénicos tanto del DR como de la VRP, y cómo su aumento local en el vítreo mediante el uso de inhibidores de MDM2, parece ser un enfoque prometedor como profilaxis en DR experimentales y también en VRP experimentales⁹³.

La *autofagia*, es ante todo un mecanismo de supervivencia que se activa en las células privadas de nutrientes o de factores de crecimiento esenciales. Si esta condición es mantenida en el tiempo, las células terminan muriendo bien por este mecanismo o por mecanismos con las características de la apoptosis o la muerte celular necrótica, dependiendo del estímulo y del tipo de célula⁷²⁻⁷³.

Por el contrario, el tercer mecanismo de muerte celular denominado: *necrosis*, aparece frecuentemente como consecuencia de una agresión celular, en donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP, junto con una pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular⁷²⁻⁷³.

Este fenómeno se acompaña de una fuerte atracción de células inflamatorias, así como de una mayor muerte celular en las áreas vecinas, originando una reacción inflamatoria y fibrótica en el órgano afectado⁷²⁻⁷³.



Diferencias entre los procesos de necrosis y apoptosis

Diferencias	Necrosis	Apoptosis
<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones • Tamaño celular • Membrana citoplasmática • Mitocondria • Degradación del ADN • Requerimiento energético • Reacción inflamatoria 	<ul style="list-style-type: none"> • Patológica • Edema • Lisis, rotura • Hinchazón • Aleatoria • No • Si 	<ul style="list-style-type: none"> • – Fisiológica • – Alteraciones patológicas • Retracción • Expresión de glucoproteínas • Rotura funcional • Ordenada • Si • No

Aunque la necrosis ha sido considerada como un proceso agudo y como una forma incontrolada de muerte celular, se ha documentado en estos últimos años que parte de los procesos necróticos podrían llevarse a cabo a través de un mecanismo programado denominado necroptosis o necrosis programada.

La necroptosis (Figura-3), es un mecanismo de eliminación celular, caspasa independiente, que posee las características morfológicas de la necrosis, pero a diferencia de ella, es activada bajo la estimulación de TNFA, FasL, y TRAIL, los mismos ligandos con capacidad de activar también la apoptosis⁹⁴⁻⁹⁶. La necroptosis se ha visto implicada en los procesos que median en la excitotoxicidad neuronal, la cual se desarrolla en enfermedades neuronales como el Alzheimer y el Parkinson, pero también está relacionada con las degeneraciones neuronales agudas, como las que ocurren tras accidentes cerebrovasculares⁹⁷. El mecanismo por el cual se determina la decisión celular de seguir la apoptosis o la necroptosis, así como los mecanismos que se llevan a cabo en la necroptosis es todavía objeto de investigación.

Complejos de señalización TNF

Las linfotoxinas y el TNF son miembros de la familia TNF *superfamily* (TNFSF), una diversificada familia de ligandos con sus correspondientes receptores, definidos por dominios ricos en cisteína (DRCs)⁹⁸⁻¹⁰⁰. Juegan un papel importante en diversos eventos celulares tales como: la proliferación celular, la diferenciación así como en los procesos de muerte celular, lo que sugiere la existencia de diferentes complejos de señales o vías de señalización. Ejercen sus acciones a través de su unión a receptores celulares como el TNFRI y el TNFRII, y aunque la mayoría de los procesos mediados por las citoquinas proinflamatorias pueden ser regulados por

cualquiera de los 2 receptores, la supervivencia celular, la apoptosis y la necrosis son inducidas principalmente por el TNFRI⁹⁸⁻¹⁰⁰.

La familia de receptores de la muerte celular juega un papel crítico en la regulación del número de células y en la eliminación de las células dañadas o infectadas por virus. La activación por parte de estimuladores agonistas provoca el desencadenamiento de 3 vías de señalización, las cuales tienen el mismo punto común, el dominio de muerte celular receptor-interacting protein 1(RIP1) kinase^{94-96, 101-103}(Figura-3).

Bajo condiciones competentes de apoptosis, la estimulación por parte del TNFA, induce la formación de 2 complejos proteicos secuenciales, el complejo I y el complejo IIa, lo que conduce a la activación de NF-κB y a la apoptosis respectivamente. Pero bajo condiciones deficientes de apoptosis o cuando las células son infectadas por ciertos virus, RIP1 interacciona con RIP3 para formar el complejo IIB, lo que conduce a la necroptosis^{94-96,101-103}.

RIP1 y RIP3 pertenecen a la familia de serina-treonina kinasas, que juegan un papel importante tanto en la inmunidad innata como la adquirida. RIP1 consta de 671 aminoácidos y RIP3 consta de 518 aminoácidos. Su estructura consiste en un dominio N terminal kinasa, con los sitios de fosforilación necesarios para la necrosis, en Ser 161 y Ser 199 en RIP1 y RIP3 respectivamente, así como el sitio de poliubiquitinación en Lys 377 en RIP1 para la activación de NFκB, un dominio intermedio, un dominio RHIM (a RIP homotypic interaction motif), por él que se unen las kinasas y un dominio de muerte celular en disposición C terminal en RIP1⁹⁴.

Estudios previos han identificado unos compuestos químicos llamados necrostatinas (Nec1) capaces de inhibir la actividad de RIP1, impidiendo la unión de RIP1 y RIP3 al complejo IIB, bloqueando así la necrosis sin afectar a la activación de NFκB, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) o c-Jun N-terminal kinase (JNK)⁹⁴.

La estimulación de TNFRI por TNFA provoca un cambio conformacional en el receptor, lo que permite la formación de un complejo en la membrana citoplasmática en el lado intracelular, el llamado Complejo I, el cual incluye la *TNFRI-associated death domain protein* (TRADD), la cual sirve de plataforma para reclutar más proteínas de adaptación como la *FAS-associated death domain protein* (FADD), *TNFR-associated factor* (TRAF2/TRAF5), RIP1 y el *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAP1/cIAP2). TRAF2 estabiliza cIAP1 y cIAP2 evitando su autoubiquitinación, mientras que por otro lado RIP1 es K-63 poliubiquitada en



K377 por cIAP1 y cIAP2, evento que le permite actuar como un andamiaje a su vez para el complejo *transforming growth factor- β - activated kinase-1*(TAK-1) y TAK-1 binding protein 2/3 (TAB2/3) y el complejo de inhibidores de $\kappa\beta$ Kinase (IKK), este último consiste en NF $\kappa\beta$ *essential modulator* (NEMO), IKK α y IKK β . El ensamblaje del complejo IKK a TAK-1 activa NF $\kappa\beta$, mediante una fosforilación, una poliubiquitinación K-48 y una degradación proteosómica del inhibidor $\kappa\beta$. Posteriormente NF $\kappa\beta$ se transloca al núcleo celular y provoca la transcripción de varios genes, cuyo fin es mantener la supervivencia celular (a). Existe un mecanismo de regulación negativa del NF $\kappa\beta$ mediante la producción de desubiquitininas A20 o CYLD, cuya diana es la RIP1, provocando la 63-K desubiquitinación y la inactivación de NF $\kappa\beta$ ¹⁰¹⁻¹⁰³.

Dependiendo de las condiciones celulares y los mecanismos de regulación postranslacionales el Complejo I cambia de forma, mediante la desubiquitinación de RIP1 y su internalización hacia el citosol, formando los *cytosolic death-initiating signaling complexes* (DISCs) o Complejos II (b y c)¹⁰¹⁻¹⁰³.

En presencia de FADD y caspasas, el complejo que se forma es el IIa, que conduce a la apoptosis celular, ya que la activación de las caspasas imposibilita la unión de RIP1 y RIP3 (b). Mientras que en presencia de inhibidores de las caspasas, en su ausencia o en presencia de FADD o de SMAC *mimetic* (proteínas mitocondriales liberadas durante la apoptosis celular que contrarrestan IAPs mediante la autoubiquitinación y degradación proteosómica, lo que favorece la desubiquitinación de RIP1 y la formación de complejos II) se favorece la formación de Complejos IIb y la necrosis celular (c). Además existen otras vías de señalización intercelular que pueden conducir a la formación del complejo IIb o *necrosoma*, como es la vía del receptor de las células T-TLR3 (e) o la vía de activación LPS-TLR4 (h) a través de la formación de otros complejos de muerte celular o *rioptosomas*¹⁰³.

Es por lo tanto necesario realizar estudios para analizar el papel de estas diferentes estructuras así como de las diferentes vías de señalización en el posible desarrollo de la VRP. Así como el análisis de diferentes compuestos como: los inhibidores de las caspasas, o inhibidores de la RIP1(necrostatinas), ya que podrían ser futuras dianas terapéuticas en la profilaxis de la VRP, puesto que estudios previos de modelos de isquemia retiniana en ratas han arrojado resultados esperanzadores como agentes neuroprotectores^{94,102}.



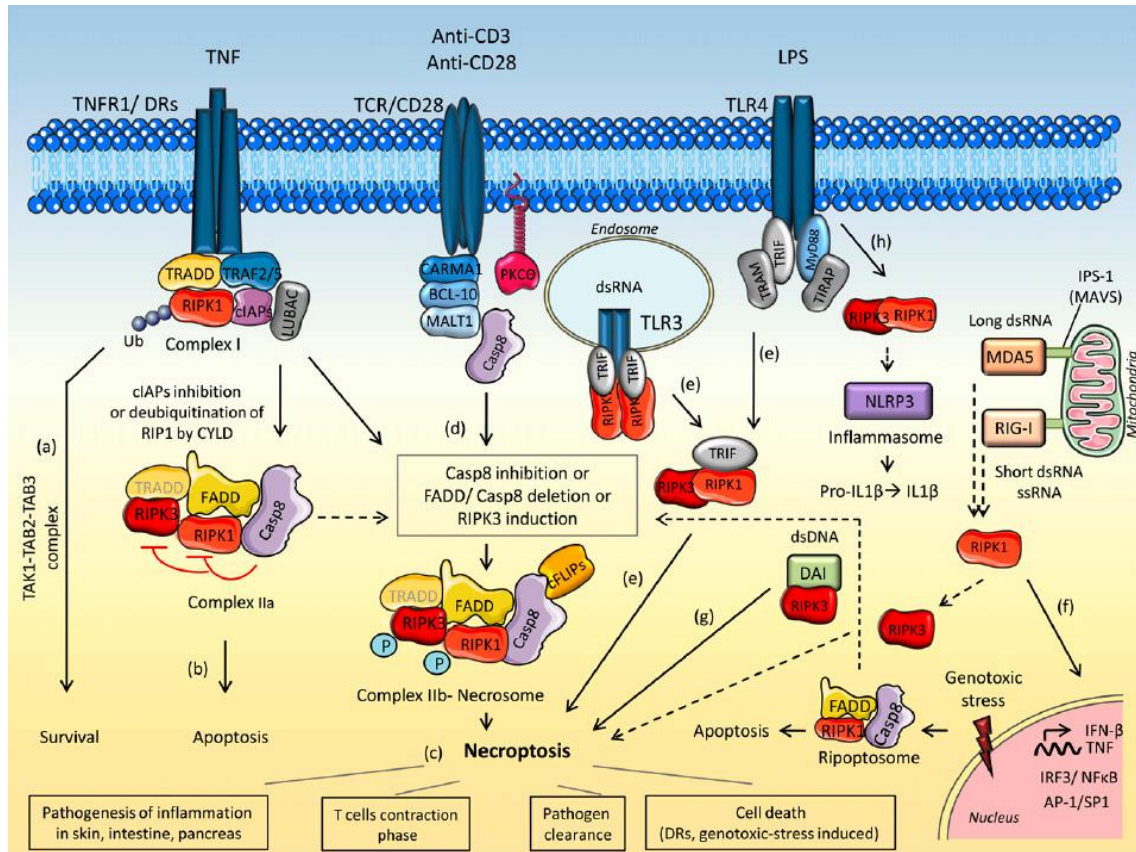


Figura-3. Descripción general de la formación del necrosoma y ripoptosoma en respuesta a diferentes estímulos

La necroptosis puede ser inducida por diversos estímulos que son reconocidos por receptores específicos. La unión del TNF a su receptor (TNFR1/TNFR2), media una señalización intracelular que puede desencadenar diferentes respuestas: la supervivencia celular (a), la apoptosis (b), o de la necroptosis (c). La estimulación de TNFR1 por TNFA provoca un cambio conformacional en el receptor, lo que permite la formación de un complejo en el citoplasma en el lado intracelular, el llamado Complejo I. Dependiendo de las condiciones celulares, el complejo I termina con la estimulación de NFκB, el cual se transloca al núcleo celular y provoca la transcripción de varios genes, cuyo fin es mantener la supervivencia celular (a) o bien cambia de conformación, mediante la desubiquitinación de RIP1 y se internaliza hacia el citosol, formando los *cytosolic death-initiating signaling complexes* (DISCs) o Complejos II (b y c).

El complejo IIb, también llamado necrosoma, se forma bajo algunas condiciones celulares, tales como la presencia de RIPK3 o en aquellas en las que esta reducida la actividad de la caspasa-8, en que se favorece la unión entre RIPK3 y RIPK1, permitiendo una fosforilación recíproca (c). Este complejo también se puede formar a través de la estimulación de la vía del receptor de células T-TLR3 (d).

El complejo Citosólico FADD-RIPK1-caspasa-8 (ripoptosoma), puede ser formado después de la estimulación del receptor de células T, TLR3 (e), así como en respuesta al estrés genotóxico y después de la estimulación de LPS-TLR4 (h). La activación del ripoptosoma promueve la apoptosis, pero también bajo condiciones específicas de inactivación de la caspasa-8, puede inducir la formación de necrosoma (flecha discontinua). Además la estimulación de LPS-TLR4, conlleva la producción de pro-IL1b y su transformación en la citoquina proinflamatoria activa (IL-1).

RIPK1 también puede mediar la señales proinflamatorias mediante la activación de factores de transcripción como: NF-κB o AP-1-SP1 (f). Los receptores citoplasmáticos (DAI-I, RIG-I, y MDA5) y endosomales (TLR3, TLR7-8 y TLR9) de ácidos nucleicos activan NFκB y NF-κB, lo que conduce a la producción de IFN-β que participa en respuestas antivirales (f).

Imagen: *Immunity*. 2013 Feb 21;38(2):209-23.



SNP rs2279744

En las células que no están bajo situación de stress celular, la proteína p53 está presente en niveles muy bajos debido a su continua degradación en gran parte mediada por la proteína mdm2. Además p53 es una proteína muy inestable con una vida media de entre 5 y 30 minutos. Es importante destacar que el gen *MDM2* es un gen de respuesta a *p53*, es decir, es un producto inducible por el gen *p53*. Por ello, cuando *p53* está estabilizado, la transcripción de *MDM2* es inducida, con lo que aumentan los niveles de proteína Mdm2 en la célula. Así pues, las dos moléculas están vinculadas entre sí a través de un bucle de realimentación negativo de autorregulación destinado a mantener los niveles de p53 celulares bajos en ausencia de una respuesta de estrés no letal. Por el contrario, una característica de muchas de las vías de estrés celular, tales como daño del ADN, la hipoxia, la isquemia, acortamiento de los telómeros, y la activación de oncogenes es la rápida estabilización de p53 evitando a si su rápida degradación¹⁰⁴.

El gen *MDM2* es el regulador negativo más importante del *p53* y en los seres humanos parece tener dos regiones promotoras-potenciadoras (Figura-4) que regulan los niveles de ARNm de *MDM2*. El primer promotor se localiza en el primer exón (5') y es probable que regule los niveles basales de *MDM2* en una célula no estresada. La segunda región del promotor se encuentra en el primer intrón y esta región aumenta la expresión de *MDM2* después de una respuesta de *p53*¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

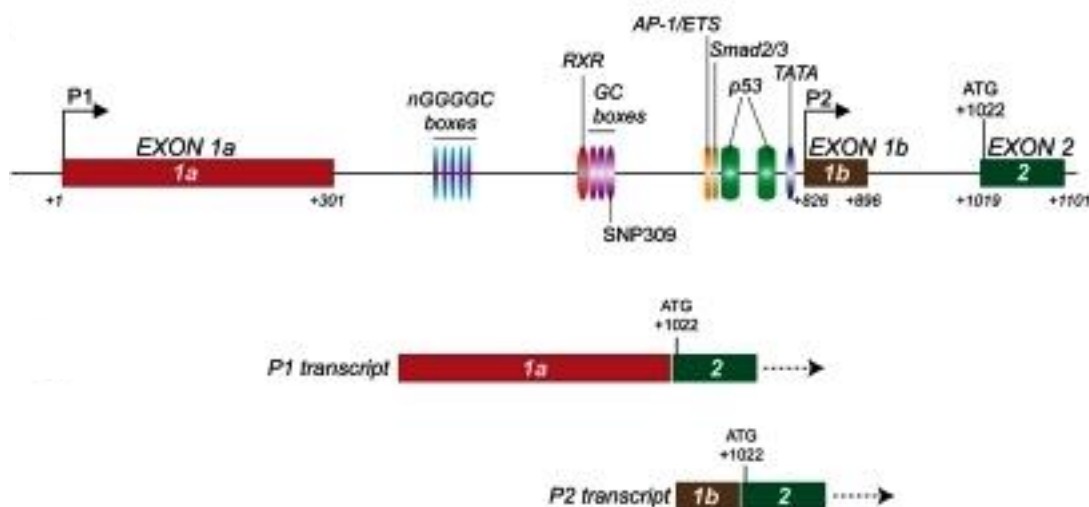


Figura-4. Esquema de las regiones promotoras del gen *MDM2*.

MDM2 está regulado transcripcionalmente por múltiples vías. Hay dos promotores que actúan en la regulación de la expresión de *MDM2*. El promotor P1 controla la expresión basal de *MDM2* y está en el exón 1^a. El promotor P2 está localizado en el primer intrón y su punto de partida para su transcripción es un exón suplente llamado 1b. El promotor P2 es inducible, y está regulado por una variedad de factores de transcripción, incluyendo RXR, AP-1, la familia Ets, Smad2 y Smad3, así como la propio *p53*. Dentro del intrón se localizan 3 cajas GC de control de la expresión de *MDM2*. Las cajas GC se caracterizan por ser sitios de unión de factores de transcripción. Una de ellas, contiene el sitio de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP309) que influye en la unión del factor de transcripción Sp-1.

Imagen: *Cancer Res.*2005.1;65(13):5481-4

Este intrón se compone de 524 nucleótidos y contiene al polimorfismo T309G *MDM2* con el cambio de T > G en el nucleótido 309. La variante de G / G aumenta la afinidad de unión por un factor de transcripción, llamado Sp1, lo que se asocia con un aumento de la expresión del ARNm de *MDM2*, dando como resultado la producción de altos niveles de la proteína de mdm2; la formación de complejos transcripcionalmente inactivos de *p53-MDM2* y una consecuente disminución de la actividad de la vía de *p53* (Figura-5)¹⁰⁴⁻¹⁰⁸. Curiosamente, los niveles elevados de *MDM2* no reducen los niveles de *p53* en las células no estresadas, mientras que el bloqueo de la unión de *p53* a *mdm2*, mediante el uso de inhibidores de *mdm2*, promueve la apoptosis. Por lo que también se hacen necesarios futuros estudios sobre moléculas o compuestos inhibidores de *MDM2*, ya que también podrían formar parte de futuras dianas terapéuticas de la VRP. Además, estudios previos in vivo e in vitro de modelos de VRP ya han aportado resultados esperanzadores⁹³.

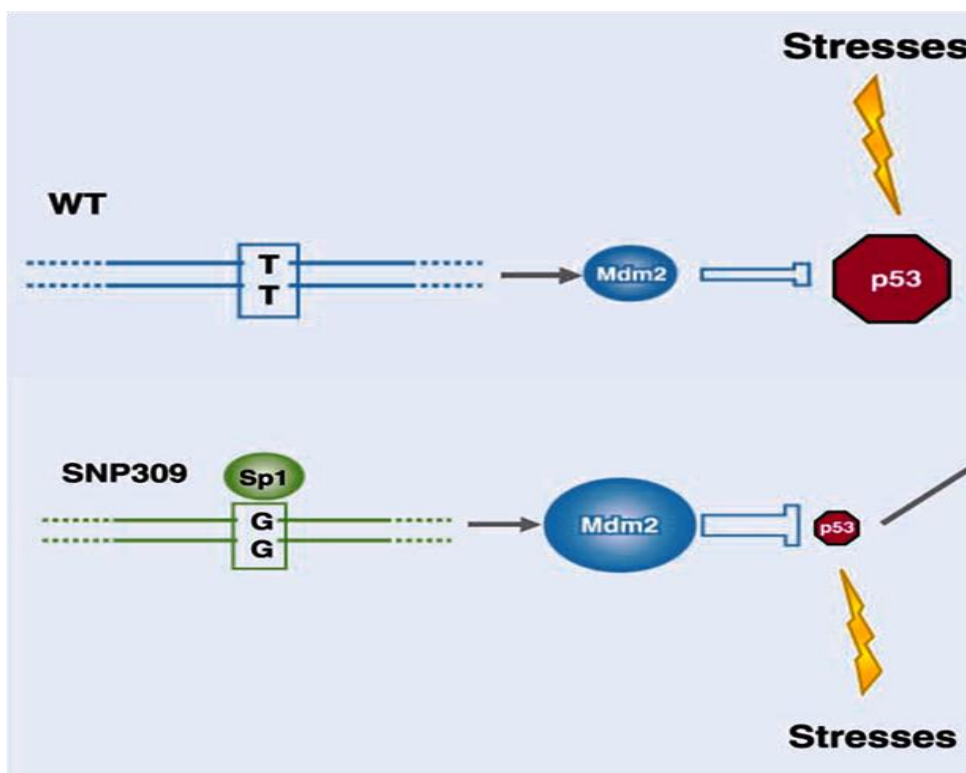


Figura-5. Esquema de funcionamiento de los alelos T y G del polimorfismo 309 del gen *MDM2*.

El alelo G del SNP309 eleva el nivel basal de *MDM2* en las células. Esto se debe a la unión mejorada entre el factor de transcripción SP1 con el sitio promotor *Mdm2*. Los mayores niveles basales de *MDM2* en células atenúan las respuestas apoptóticas del gen *p53* que se producen en condiciones normales en respuesta a diferentes estímulos como: daños en el ADN y otras agresiones ambientales. Por lo tanto, en aquellos individuos con un genotipo G / G en SNP309, el porcentaje de células sometidas a la apoptosis o a parada del ciclo celular en respuesta a un estrés genotóxico es baja.

Imagen: *Cancer Res.*2005.1;65(13):5481-4

El propósito de este estudio ha sido analizar la distribución del polimorfismo 309 en el primer intron del gen *MDM2*, y valorar la posible interacción genética con el polimorfismo del codón 72 del gen p53 previamente analizado, en una amplia muestra consecutiva de pacientes con DR regmatigeno con o sin VRP, reclutados desde distintos centros europeos a través de un proyecto denominado proyecto Retina 4.



HIPÓTESIS

El cambio en la variante alélica mayoritaria (T) por la variante alélica minoritaria (G) del polimorfismo 309 del gen *MDM2*, que da lugar a un incremento en la expresión de mRNA de *MDM2* y por lo tanto un incremento en la inhibición del p53, está asociada con el desarrollo de VRP.

OBJETIVOS:

Para alcanzar ésta hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos:

- 1- Organizar y consolidar un grupo de trabajo de investigación, integrado por el grupo de investigación de retina del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (I.O.B.A, Universidad de Valladolid) y el departamento de genética de la facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca para llevar a cabo el estudio del polimorfismo *rs2279744(T→G)* del gen *MDM2*.
- 2- Puesta a punto de la técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism).
- 3- Amplificación genómica del DNA con primer específicos.
- 4- Digestión de los distintos fragmentos de DNA con enzima de restricción y separación mediante electroforesis en gel de Agarosa.
- 5- Identificar cada una de las variantes alélicas estudiadas y analizar los resultados obtenidos.

MATERIAL Y METODOS

Diseño y población de estudio

El estudio de asociación se llevó a cabo con 550 pacientes (procedentes del proyecto Retina 4), de 7 centros distintos: 3 en España, 2 en Portugal, 1 en Gran Bretaña y 1 en Holanda. Todos los participantes fueron pacientes sometidos a cirugía de DR regmatógeno.

Este estudio fue aprobado previamente por los distintos comités éticos y de investigación de cada centro participante siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes recibieron previamente a su inclusión en el estudio un consentimiento informado por escrito.

Este trabajo fue realizado en 2 fases: en la primera, se realizó un estudio de asociación genética analizando el polimorfismo T309G (rs2279744) localizado en el gen *MDM2*. En la segunda fase, se investigó la posible interacción genética entre este polimorfismo y el polimorfismo del codón 72 del gen *p53* (rs10425229) previamente estudiado.

Estudio de asociación genética

El estudio de asociación fue llevado a cabo con 550 muestras de DNA, procedentes del estudio de replicación del proyecto Retina 4.

Con el fin de atenuar las posibles falsas asociaciones, la muestra global fue dividida en sub-muestras de acuerdo con el país de procedencia. En el primer paso se analizaron las muestras de España y Portugal y tras obtener resultados significativos se procedió a realizar el segundo paso del estudio, donde se analizaron las muestras de Holanda y Gran Bretaña. Para comparar si existían diferencias relacionadas con la localización geográfica en el análisis de la odds ratio, se consideraron a España y Portugal como países del Sur y a Holanda y Gran Bretaña como países del Norte.

Una información detallada acerca de los criterios de exclusión y de inclusión se encuentran explicados en una publicación previa⁵⁰. En resumen: todos los participantes fueron pacientes sometidos a cirugía de DR regmatógeno. Los criterios de exclusión en el momento de la cirugía fueron: menores de 18 años; DR traumáticos, traccionales exudativos o iatrogénicos; DR secundarios a agujeros maculares o desgarros gigantes (mayores de 3 husos horarios) y VRP mayores del grado B (Clasificación de Machermer)¹³. Aquellos pacientes que tras 3 meses de seguimiento no desarrollaron VRP fueron incluidos como grupo control, mientras que aquellos que desarrollaron VRP grado C1 o mayor de acuerdo con la clasificación de Machermer, tras los 3 meses de seguimiento fueron incluidos en el grupo de los casos.

Interacción genética

Se analizó la interacción entre los polimorfismos rs2279744 y rs1042522 localizados en los genes *MDM2* y *p53* respectivamente. Los datos obtenidos del análisis del codón 72 del gen *p53*, han sido previamente analizados en un trabajo anterior⁵⁰ sobre las mismas muestras que para el análisis del polimorfismo del gen *MDM2*. Se analizaron con especial interés los grupos de portadores homocigotos de

Pro del polimorfismo rs1042522 y los portadores G/G del rs2279744, tanto en la muestra global como en el análisis de sub-muestras de los diferentes países.

Genotipado

El genotipado del polimorfismo rs2279744 del gen *MDM2* se llevó a cabo en la Unidad de Medicina Molecular del departamento de genética de la Universidad de Salamanca, desconociendo los investigadores en todo momento el estado clínico de los pacientes. Se utilizó la técnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

El polimorfismo *MDM2* 309 se detectó mediante amplificación genómica del DNA usando como forward primer: 5'-GAGGTCTCCGCGGGAGTTC-3' y como reverse primer: 5'- CTGCCCCACTGAACCGGC-3'. El intron 1 del gen *MDM2* fue amplificado en un fragmento de 155 pares de bases (pb) y que posteriormente, se digirió con una endonucleasa de restricción *MspA1I* (New England Biolabs, Inc.®).

Las reacciones de PCR fueron realizadas con: 50-µl de Mastermix, conteniendo 100-200 ng de target de ADN, 20 pmol de cada primer, 2.5 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP y 1.25 U de HotMaster *Taq* DNA polymerase (5 Prime GmbH, Hamburg, Germany). El DNA fue amplificado siguiendo los siguientes pasos: una fase inicial de desnaturalización a 94°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos a 55°C durante 45 s, 68°C durante 1 min, 94°C durante 30 s y una fase final de anillamiento a 55°C durante 30 s con 5 min de elongación a 72°C.

Los fragmentos resultantes se separaron en gel de agarosa al 3.5% y los fragmentos teñidos con bromuro de etidio se analizaron bajo una fuente de UV, utilizando el sistema de análisis de imagen de Kodak Digital Science ID (Figura-6).

Después de la digestión, los fragmentos de PCR que contienen los alelos G y T, migran en el gel de agarosa como tres fragmentos de 101, 46 and 8 bp para los homocigotos G (GG), 2 fragmentos de 157 y 8 pb para los homocigotos T (TT) y 3 fragmentos de 157, 101 y 46 pb para los heterocigotos (TG).

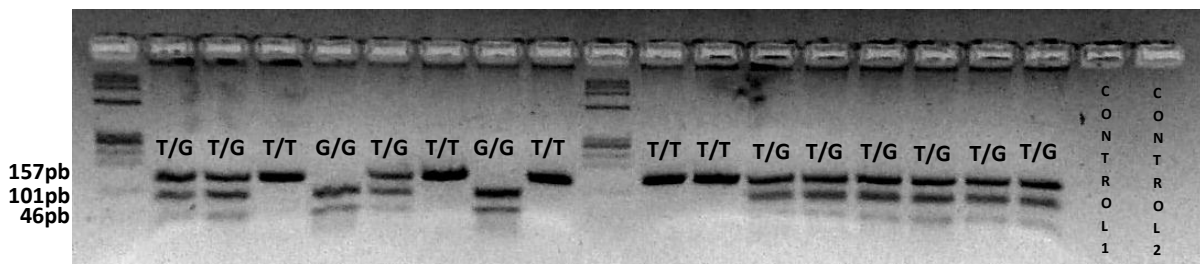


Figura.6: Amplificación por PCR-RFLP y posterior digestión con endonucleasa de restricción *MspAI* del polimorfismo *MDM2* SNP309. El alelo T no es cortado por la enzima de restricción y da lugar a una única banda de 157 bp. El alelo G es cortada por la enzima en 2 fragmentos de 101 y 46 bp. Los heterocigotos TG dan 3 bandas de 157, 101 y 46 bp.



Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo en dos fases. La calidad de los datos en el control de Hardy-Weinberg de las sub-muestras se evaluó mediante la prueba de Chi-Cuadrado. Se estimaron las frecuencias genotípicas en cada submuestra. Se analizaron las proporciones de los genotipos homocigotos y los grupos G/G entre los sub-muestras. Además, se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas entre los casos y controles en la muestra global. Para el análisis de la interacción genética se usaron los datos procedentes de los pacientes portadores de la variante Pro del polimorfismo rs1042522 más el alelo G/G del polimorfismo rs2279744 en las sub-muestras de los diferentes países y en la muestra de la población general.

La asociación se determinó mediante la prueba de Chi-cuadrado y la prueba de Fisher. La fuerza de asociación se midió utilizando la odds ratio (OR) y los intervalos de confianza (IC) al 95%. Se consideraron dos modelos de herencia: el modelo Co-dominante, en el cual cada genotipo aporta un riesgo diferente y no aditivo, y el modelo Recesivo, en el que dos copias del alelo G son necesarias para cambiar el riesgo. El criterio de información de Akaike (AIC)¹⁰⁹ se utilizó con el fin de elegir el modelo de herencia que mejor se ajustó a los datos. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 16.0 para Macintosh y se utilizó el software R (GNU Software Foundation proyecto)¹¹⁰.



RESULTADOS

Estudio de asociación genética

Se analizaron un total de 555 muestras de ADN de sangre periférica, incluyendo 134 casos y 421 controles (203 de España (36,57%), 68 de Portugal (12,25%), 121 de Holanda (21,80%) y 163 en el Reino Unido (29,36%). En el análisis de las características clínicas de la muestra global se observaron algunas asociaciones significativas. El grupo control fue significativamente mayor que los casos (p -valor $<0,0001$), con diferencia entre las medianas de 6 años (IC del 95%: 3.39 a 8.31). Se encontró una asociación significativa en los pacientes con antecedentes de VRP en el otro ojo en el grupo de casos. También se analizó el estado del cristalino, ya que la afaquia se ha relacionado con una mayor incidencia de VRP (Tabla-1). No hubo asociaciones significativas con las variables sexo, raza, ojo afectado o estado del cristalino. No hubo diferencias con respecto a la localización geográfica o centro del que procedían los pacientes.

No hubo fracasos en el proceso de determinación del genotipo, con una tasa de replicación global del 96,21%. Además, con el fin de asegurar la exactitud de los resultados específicos de los alelos, se seleccionó aleatoriamente una muestra de PCRs y fueron evaluadas por un investigador independiente, desconociendo en todo momento la situación de los pacientes. Todas las sub-muestras de los grupos control verifican el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Fase I: distribución genotípica del polimorfismo *MDM2* 309 en España y Portugal

Las frecuencias de los genotipos de cada país se muestran en la Tabla.2. La comparación de las proporciones de los diferentes genotipos de España y Portugal mostraron una diferencia significativa ($p <0,05$) entre los casos y controles. También se observó una diferencia significativa ($p <0,05$) en los portadores homocigotos del alelo G entre los grupos de control (IC homocigotos G/G: España [22,6-32,9], Portugal [21,4-38,9]) y el grupo de los casos (IC homocigotos G/G: España [35,1-53,0], Portugal [39,0-74,4]).

La odds ratio de portadores G/G de España y Portugal juntos teniendo en cuenta un modelo co-dominante (T / T, T / G y G / G) (AIC = 307,7 vs 311,4 de un modelo recesivo) fue de 5,4 (IC del 95%: 2,3 a 12.7) (Tabla.3).

Fase II: distribución genotípica del polimorfismo *MDM2* 309 en UK y Holanda

Las frecuencias de los genotipos de los pacientes del Reino Unido y Holanda se muestran en la Tabla.2. La distribución de genotipos entre los sujetos de esos países mostró diferencias estadísticamente significativas. Cuando se analizaron los portadores homocigotos G/G entre los casos y controles, también se observaron diferencias significativa entre los grupos control (IC homocigotos G/G: Holanda [25,3-38,8], Reino Unido [23,3-34,2]) y los casos (IC homocigotos G/G: Holanda [40,6-66,2], Reino Unido [25,3-38,8]). Además, se encontraron diferencias en la distribución odds ratio al analizar los portadores homocigotos de la variante G del



Reino Unido y Holanda juntos, considerando un modelo co-dominante (AIC = 277,8 vs 288,4 de un modelo recesivo) (odds ratio de 7,3 (95% IC: 2,8 a 19,1) (Tabla.3).

Cuando se agruparon todas las muestras, se encontraron (Table.4) diferencias significativas en la distribución de genotipos entre los casos y los controles ($p < 0,05$). También los homocigotos portadores de la variante G fueron más frecuentes en los casos de VRP (CI: 42,9-54,8) que en el grupo controles (IC: 26.2-32 .4). La odds ratio de la variante G de la muestra global mediante un modelo co-dominante (AIC = 584,1 frente a 598,7 de un modelo recesivo) fue de 5,9 (IC del 95%: 3.2 a 11.2) (Tabla.3).

Análisis de frecuencias alélicas

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de las frecuencias alélicas, entre los casos y los controles de las sub-muestras de los diferentes países. (Tabla.2).

Interacción Genética

Cuando se analizó la muestra global, sólo se encontraron 16 pacientes (2,91%), con los dos genotipos (portadores Pro más variante G) (8 pacientes de España y Portugal, y 8 pacientes del Reino Unido y Holanda). Se encontró una diferencia significativa en la distribución de genotipos entre los casos y controles ($p < 0.0001$) en la muestra global. La odds ratio de portadores Pro y G de la muestra global fue de 10,19 (IC del 95%: 3,2 a 31,9) (Table.5).

Al analizar las sub-muestras también se encontraron diferencias significativas en la distribución de genotipos entre los controles y los casos de España y Portugal juntos ($p = 0,0006$) y el Reino Unido y Holanda juntos ($p < 0,01$). La odds ratio de portadores Pro y G del Reino Unido y Holanda juntos fue 6,5 (IC del 95%: 1,5 a 28,2), mientras que, la odds ratio de los portadores Pro y G de España y Portugal juntos fue 20,4 (IC del 95%: 2,4 a 169,5) (Table.5).

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que los portadores homocigotos G/G del SNP 309 españoles y portugueses tienen un riesgo 5,4 veces mayor de VRP después de un DR que los que portan el alelo T. Esta observación se confirmó también en la población holandesa y británica (odds ratio 7.3 (95 % IC: 2,8-19,1) Curiosamente, cuando se analizaron los portadores de las variantes Pro más G en los sujetos de la muestra global, se observó un efecto adicional. (odds ratio de 10,19 (IC del 95%: 3,2 a 31,9). Pero ambos polimorfismos sólo estuvieron presentes en 16 de los 555 pacientes. Aunque los resultados fueron significativos también en este último análisis, se ha considerado que 16 sujetos son una muestra demasiado pequeña para obtener conclusiones absolutas, por lo que son necesarios más estudios para conocer el riesgo potencial absoluto de este posible efecto aditivo.

La VRP se considera una enfermedad multifactorial⁴⁸⁻⁴⁹, que probablemente sea el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. La dificultad en la identificación de pacientes en riesgo de desarrollar VRP tras un DR mediante las características clínicas⁴⁷ justifica los esfuerzos para encontrar otros biomarcadores y entre ellos los genéticos⁴⁸⁻⁵⁰. Una sencilla prueba genética podría identificar a los pacientes de alto riesgo antes de la cirugía del DR, lo que podría dar lugar al desarrollo y ejecución de terapias más personalizadas.

La apoptosis juega un papel crucial en diversos procesos de desarrollo, en la eliminación de células invadidas por patógenos y también está implicada en la eliminación de las células inflamatorias y la evolución del tejido de granulación en la cicatrización⁷⁹. Por otra parte, una apoptosis inapropiada es un factor importante en muchos estados patológicos humanos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, daño isquémico, trastornos autoinmunes y muchos tipos de cánceres. Además, se ha descrito que una alteración en los mecanismos de regulación de la apoptosis durante la cicatrización de heridas puede conducir a formas patológicas de la curación tales como cicatrices y fibrosis excesivas⁷⁹.

Como ya se ha mencionado la VRP se considera un proceso de cicatrización anormal inducido por una rotura retiniana y por la liberación a la cavidad vítrea de células del EPR en un entorno pro-inflamatorio intraocular apropiado⁴⁻⁷. Se caracteriza por varios cambios intrarretinianos y extrarretinianos. Uno de los más comunes es la formación de una matriz extracelular (MEC), producida por las células del EPR activadas por citoquinas (las células del EPR se transdiferencian en células mesenquimales) en la cavidad vítrea¹¹¹⁻¹¹². Esta serie de eventos culmina con la formación de membranas que se contraen, pudiendo provocar nuevos DR recurrentes traccionales. Sin embargo los cambios más graves son los que se originan en el interior de la retina inducidos por la estimulación de una gliosis reactiva, que provoca un acortamiento de la retina evitando su replicación quirúrgica⁶⁹. Algunas de estas citoquinas que activan las células del EPR como son: el factor de crecimiento transformante- β (TGF), y el factor de necrosis tumoral α (TNF), han sido estudiados previamente por nuestro grupo⁴⁸⁻⁴⁹.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la implicación de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis en los mecanismos fisiopatogénicos de la muerte de células retinianas después de un DR, y también, la existencia de otras vías, tales

como la necrosis programada, en las situaciones en las que la apoptosis esta inhibida⁷⁵. Además, un estudio proteómico de muestras vítreas humanas de pacientes que ha sufrido un DR y/o VRP ha indicado que el p53 podría estar involucrado en el proceso de la VRP¹¹³.

Recientemente, nuestro grupo ha publicado una asociación entre el polimorfismo Arg72Pro del Tp53 y la VRP⁵⁰. De acuerdo con esos resultados, los portadores del alelo Pro del gen p53, que se asocia con una disminución de la función apoptótica de p53, tienen mayor riesgo de VRP después de DR. Además, se ha informado que la supresión de la expresión de p53 podría ser un evento necesario en el desarrollo del DR y la VRP, y como el mantenimiento de los niveles de p53 con agentes tales como la Nutlin-3 (inhibidor de MDM2), que impide la interacción entre p53 y MDM2, podría ser eficaz en la profilaxis de la VRP⁹³.

El polimorfismo T309G de MDM2 afecta a la unión del factor de transcripción Sp1 y se asocia con un aumento de la expresión del ARNm de MDM2, con la consiguiente atenuación de la vía del p53¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Curiosamente, los niveles elevados de MDM2 no reducen los niveles de p53 en las células no estresadas y el bloqueo de la unión de p53 a MDM2, con el uso de inhibidores de MDM2, promueven la apoptosis¹¹⁴.

Además, se ha descrito que, en contraste con lo que ocurre con otros tipos de células de la retina, las células del EPR son resistentes a la apoptosis, al TNFA y al estrés oxidativo, factores que a su vez desencadenan la apoptosis en una amplia gama de células¹¹⁵⁻¹¹⁶. Estos factores, en el rango normal son generalmente ineficaces en este tipo de células, por lo que cabría pensar que aquellos pacientes que presentasen una disminución en los mecanismos de apoptosis, podrían facilitar la supervivencia de las células del EPR en un ambiente pro-inflamatorio además de favorecer la activación de otras vías de muerte celular más inflamatorias. Sin embargo, también se ha descrito que el uso de inhibidores de MDM2 produce un aumento de expresión de los factores pro-apoptóticos capaces de superar esta resistencia inherente de las células del EPR a la apoptosis¹¹⁴.

El polimorfismo T309G MDM2 por su acción antiapoptótica se ha asociado a varios tipos de cánceres¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ y también a los procesos inflamatorios¹¹⁷. Además se ha descrito que la asociación con otros polimorfismos del p53 (es decir, el polimorfismo del codón 72 del gen p53) aumenta el riesgo de desarrollo de varios tumores¹⁰⁶⁻¹⁰⁷.

Los resultados de este trabajo sugieren que los portadores del alelo G del polimorfismo T309G gen MDM2, asociados a una disminución de la función apoptótica de p53, tienen mayor riesgo de VRP después de DR. Podemos especular que la reducción de los niveles de apoptosis en células de la retina puede activar otras vías de muerte celular programada, como la necrosis, lo que aumentaría la inflamación intraocular después de DR, generando así una cascada de respuestas en los tejidos que generarían y amplificarían un microambiente hostil en el que las células del EPR pudiesen trans-diferenciarse a células mesenquimales-like, favoreciendo la producción de MEC. También es posible pensar que la disminución de los niveles de p53 es un punto de control fundamental en el DR y la VRP, y que la reciente formulación ocular de Nutlin-3, que puede administrarse por inyección subconjuntival¹¹⁸, podría ser un enfoque eficaz para lograr una profilaxis en la enfermedad de VRP.



Este estudio tiene algunas limitaciones. Una cuestión importante en un estudio de asociación es el tamaño de la muestra¹¹⁹. Probablemente, a diferencia de otros estudios de asociación, la muestra es demasiado pequeña y la potencia no es suficiente, como para extraer conclusiones absolutas. Sin embargo, en cuanto a la VRP, no se han encontrado en la literatura estudios de asociación genética más grandes y además la recogida de más muestras para lograr una mayor potencia del estudio sería un gran desafío dada la baja prevalencia de la VRP (5-10%). Otra limitación es que los casos eran más jóvenes que los controles, lo que podría ser considerado como un factor de confusión. Sin embargo, esta diferencia fue sólo de 6 años, lo que hace poco probable que esa diferencia responda a un cierto perfil genético. Y también hace poco probable que esos 6 años interfieran en los mecanismos de muerte celular de los sujetos a estudio.

Es importante señalar que los polimorfismos funcionales se consideran de interés, ya que nos permiten arrojar luz sobre las bases moleculares de diferentes patologías. Ellos también pueden ser objeto del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En este estudio de casos y controles, se ha identificado un SNP en el gen MDM2 que muestra una fuerte asociación con la VRP. Y aunque se han llevado a cabo el estudio en dos fases y con poblaciones de distintos países, estos resultados deben ser interpretados con cautela hasta que estos resultados se confirmen con otros estudios de replicación con el fin de confirmar su asociación, ya que uno de los principales escollos de los estudios de asociación genética son los falsos positivos^{64,119}.

En resumen, este estudio indica que la vía de p53 podría ser considerada como un factor de riesgo significativo en el desarrollo de la VRP después de un DR, y también pone de relieve el papel de estos SNPs (rs1042522 y rs2279744) como posibles marcadores de riesgo de la VRP.



TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de la muestra global

Características	CONTROLES	CASOS	Total	p valor
Raza	<i>n DR (%)</i>	<i>n VRP (%)</i>		
-Caucásico	370 (73.56%)	133 (26.44%)	503	0.0644
-Hispano-Americano	6 (46.15%)	7 (53.85%)	13	
-Hindu	7 (58.33%)	5 (41.67%)	12	
-Árabe-Norte África	6 (100%)	0	6	
-Sub-Saharianos	2 (50%)	2 (50%)	4	
-Asiáticos	3 (60%)	2 (40%)	5	
-Desconocidos			12	
			555	
Sexo				
-Hombre	248 (71.26%)	100 (25.37%)	348	0.362
-Mujer	135 (75%)	45 (31.42%)	180	
-Desconocidos			27	
			555	
Estado de la Lente (Fáquico)				
-Si	250 (74.63%)	85 (25.37%)	335	0.2333
-No	131 (68.58%)	59 (31.42%)	190	
-Desconocidos			30	
			555	



DR en el otro ojo				p-valor
-Si	32 (76.19%)	10 (23.81%)	42	0.5289
-No	355 (68.58%)	136 (31.42%)	491	
-Desconocidos			22	
			555	
VRP en el otro ojo				
-Si	0	5 (100%)	5	0.0057
-No	141 (26.70%)	387 (73.30%)	528	
-Desconocidos			22	
			555	
Localización geográfica				
-Países del Norte (UK+Holanda)	224 (78.87%)	60 (22.2%)	284	0.171
-Países del Sur (España+Portugal)	197 (72.7%)	74 (27.3%)	271	
			555	

Desprendimiento de Retina (DR)

Vitreorretinopatía proliferante (VRP)



Tabla 2. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas entre los diferentes países.

Países	Genotipo	Controles		Casos		p-valor Fisher's test	Alelos	Controles		Casos		95% IC Alelos		p-valor Chi Square test	OR*	IC OR 95%
										Controles	Casos					
España	T/T	72	50.0%	18	30.5%	0.003 ¹	GG TT	80 208	27.8% 72.2%	52 66	44.0% 56.0%	[22.6-32.9] [67.0-77.4]	[35.1-53.0] [46.9-64.9]	0.0012 ²	2.0	[1.31-3.19]
	T/G	64	44.4%	30	50.9%											
	G/G	8	5.6%	11	18.6%											
Portugal	T/T	27	51.0%	3	20.0%	0.038 ¹	GG TT	32 74	30.2% 69.8%	17 13	56.7% 43.3%	[21.4-38.9] [61.7-78.5]	[39.0-74.4] [61.0-25.6]	0.0156 ²	3.0	[1.31-6.95]
	T/G	20	37.7%	7	46.7%											
	G/G	6	11.3%	5	33.3%											
Uk	T/T	66	50.0%	7	22.6%	0.004 ¹	GG TT	76 188	28.8% 71.2%	31 31	50.0% 50.0%	[23.3-34.2] [65.7-76.6]	[37.5-62.5] [37.5-62.5]	0.0015 ²	2.4	[1.40-4.35]
	T/G	56	42.4%	17	54.8%											
	G/G	10	7.6%	7	22.6%											
Holanda	T/T	40	43.5%	4	13.8%	0.003 ¹	GG TT	59 125	32.0% 68.0%	31 27	53.5% 46.5%	[25.3-38.8] [61.1-74.8]	[40.6-66.2] [46.5-59.3]	0.0023 ²	2.4	[1.27-464]
	T/G	45	48.9%	19	65.5%											
	G/G	7	7.6%	6	20.7%											

¹ Fisher's test. Ho. Independencia entre los genotipos de los casos/controles entre los diferentes genotipos entre las sub-muestras. Se observaron diferencias significativas entre los casos y los controles de España y Portugal y también de Holanda y UK.

² Análisis de los portadores homocigotos G/G entre los diferentes países, mostrando una diferencia significativa en España y Portugal y en Holanda y UK.
OR : odds-ratio
United Kingdom (UK)



Tabla 3.

-Modelos de herencia en la muestra global
 -Resultados de las odds ratio usando un modelo co-dominante en las muestras España +Portugal y Holanda +UK

Modelo	Genotipo	Controles		Casos		OR*	CI OR 95%		p-value	AIC*
Co-dominante	T/T	205	48.7	32	24.0	1.00	-	-	<0.0001	584.1
	T/G	185	43.9	73	54.4	2.53	[1.59	4.01]		
	G/G	31	7.4	29	21.6	5.99	[3.20	11.24]		
Dominante	T/T	205	48.7	32	24.0	1.00	-	-	<0.0001	590.7
	T/G-G/G	216	51.3	102	76.0	3.03	[1.95	4.70]		
Recesivo	T/T-T/G	390	92.6	105	78.4	1.00	-	-	<0.0001	598.7
	G/G	31	7.4	29	21.6	3.47	[2.00	6.02]		
Sobre-dominante	T/T-G/G	236	56.1	61	45.6	1.00	-	-	<0.0334	613.0
	T/G	185	43.9	73	54.4	1.53	[1.03	2.26]		
España+Portugal		99	50.25	21	28.38	1.00	-	-	0.0003	307.7
		84	42.64	37	50.0	2.08	[1.13	3.82]		
		14	7.11	16	21.62	5.44	[2.30	12.7]		
Holanda+UK		106	47.32	11	18.33	1.00	-	-	<0.0001	277.8
		101	45.09	36	60.0	3.43	[1.66	7.11]		
		17	7.59	13	21.67	7.30	[2.80	19.01]		

OR* (odds ratio)

AIC*(Akaike Information Criterion); La AIC es una medida de la bondad relativa de ajuste de un modelo estadístico. Por lo general, se puede utilizar para la identificación de un modelo óptimo en una clase de modelos de la competencia. Dado un conjunto de modelos candidatos para los datos, el modelo preferido es el que tiene el valor mínimo AIC.

Tabla. 4. Distribución del polimorfismo SNP 309 en la muestra global. Fisher´s test.

Genotipos	T/T	T/G	G/G	Total	P value	CI 95%*
Casos	32 (23.9%)	73 (54.5%)	29 (21.6%)*	134 (100%)	<0.0001	[42.9-54.8]*
Controles	205 (48.7%)	185 (43.9%)	31 (7.4%)	421 (100%)		[26.2-32.4]*
Total	237	258	60	555		

*Análisis de los portadores homocigotos G/G entre los casos/controles.



Tabla.5

-Análisis de la interacción genética entre el SNP del codon 72 de p53 (rs 1042522) y el polimorfismo T309G de MDM2 (rs2279744) en la muestra global y en las submuestras de los diferentes países.

-Resultados de los pacientes portadores de los dos polimorfismos (variantes Pro+G) (2.91%).

Genotipo	Muestra	Controles	Casos	OR*	IC OR 95%	p-value
Pro/Pro + G/G	Global	4	12	10.19	3.2-31.9	<0.0001
	España+Portugal	1	7	20.4	2.4-169.5	0.0006
	Holanda+UK	3	5	6.5	1.5-28.2	<0.01

OR* (odds ratio)

IC (Intervalo de Confianza)

UK (United Kingdom)



BIBLIOGRAFÍA

1. *The Retina Society Terminology Committee. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. Ophthalmology 1983; 90: 121-125.*
2. *Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. Surv Ophthalmol 1998; 43: 3-18.*
3. *Pastor JC, Rodríguez de la Rúa E, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. Prog Retin Eye Res, 2002; 21: 127-144*
4. *Miller B, Miller H, Patterson R, Ryan SJ. Retinal wound healing. Cellular activity at the vitreoretinal interface. Arch Ophthalmol 1986;104:281-5.*
5. *Scott JD. Pathogenesis of PVR with analysis of events leading to recurrent retinal detachment. In: K. Heimann and P. Wiedemann, ed, Proliferative Vitreoretinopathy, Kaden, Heidelberg;1989:150-3.*
6. *Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy and retinal degeneration. Surv Ophthalmol 1992;36:373-84.*
7. *Zacks DN, Han Y, Zeng Y, Swaroop A. Activation of signaling pathways and stress-response genes in an experimental model of retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:1691-5.*
8. *Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F, Mayo A, de la Fuente MA, Coco RM. Clinical and surgical features of retinal shortening: the most severe and less recognized form of proliferative vitreoretinopathy (PVR). Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44: S122.*
9. *Haimann. Epidemiology of retinal detachment. Archives of ophthalmology.100; 2:289-92.*
10. *The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for idiopathic rhegmatogenous retinal detachment. Am J Epidemiol 1993;137:749-57.*
11. *Tratamiento del desprendimiento de retina rregmatógeno. Guías de práctica clínica de la SERV.*
12. *Girard P, Mimoun G, Karpouzas I, Montefiore G. Clinical risk for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. Retina 1994; 14: 417-424.*
13. *Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, et al. An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. Am J Ophthalmol 1991;112:159-65.*
14. *de la Rúa E, Pastor JC, Fernández I, et al. Non-complicated retinal detachment management: variations in 4 years. Retina 1 project; report 1. Br J Ophthalmol 2008;92:523-5.*



15. Chang S. Giant retinal tears: surgical management with perfluorocarbon liquids. In: Lewis H, Ryan SJ (eds). *Medical and Surgical Retina: Advances, Controversies and Management*. Mosby: St Louis, 1994, pp 199–207.
16. Chang S, Lincoff H, Zimmerman NJ, Fuchs W. Giant retinal tears. Surgical techniques and results using perfluorocarbon liquids. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 761– 766.
17. Kertes PJ, Wafapoor H, Peyman GA, Calixto N Jr, Thompson H. The management of giant retinal tears using perfluoroperhydrophenanthrene. A multicenter case series. Vitreon Collaborative Study Group. *Ophthalmology* 1997; 104: 1159–1165.
18. Kreiger AE, Lewis H. Management of giant retinal tears without scleral buckling. Use of radical dissection of the vitreous base and perfluoro-octane and intraocular tamponade. *Ophthalmology* 1992; 99: 491–497.
19. Verstraeten T, Williams GA, Chang S, Cox MS Jr, Trese MT, Moussa M, Friberg TR. Lens-sparing vitrectomy with perfluorocarbon liquid for the primary treatment of giant retinal tears. *Ophthalmology* 1995; 102: 17–20.
20. Cardillo JA, Stout T, LaBree L, Azen S, Omphroy L, Cui ZJ et al. Posttraumatic proliferative vitreoretinopathy: the epidemiologic profile, onset, risk factors, and visual outcome. *Ophthalmology* 1997; 104: 1166–1173.
21. Sobaci G, Mutlu FM, Bayer A, Karagui S, Yildirim E. Deadly weapon-related open-globe injuries: outcome assessment by the ocular trauma classification system. *Am J Ophthalmol* 2000; 129: 47–53.
22. Spiegel D, Nasemann J, Nawrocki J, Gabel VP. Severe ocular trauma managed with primary pars plana vitrectomy and silicone oil. *Retina* 1997; 17: 275–285.
23. Malbran E, Dodds R, Hulsbus R. Traumatic retinal detachment. *Mod Probl Ophthalm* 1972; 10: 479–489.
24. Mitra RA, Mieler WF. Controversies in the management of open-globe injuries involving the posterior segment. *Surv Ophthalmol* 1999; 3: 215–225.
25. Morton C, MacKenzie F. Retinal detachment due to ocular penetration. *Arch Ophthalmol* 1978; 96: 1354–1361.
26. Wong TY, Tielsch JM. A population-based study on the incidence of severe ocular trauma in Singapore. *Am J Ophthalmol* 1999; 128: 345–351.
27. Jonas JB, Budde WM. Early versus late removal of retained intraocular foreign bodies. *Retina* 1999; 19: 193– 197.



28. Goffstein R, Burton T. Differentiating traumatic from nontraumatic retinal detachment. *Ophthalmology* 1982; 89: 361–368. 1994; 8: 75–76.
29. Gau M, Meier P, Wiedemann P. Penetrating and perforating eye injuries with foreign bodies during motorized brush-cutting while wearing head protection gear. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1999; 215: 311–314.
30. Colby K. Management of open globe injuries. *Int Ophthalmol Clin* 1999; 39: 59–69.
31. Pieramici DJ, De Juan E Jr, Fujii GY, Reynolds SM, Melia M, Humayan MS et al. Limited inferior macular translocation for the treatment of subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 419–428. 2035–2061.
32. Wilkinson Cp, Rice TA. *Michels Retinal Detachment, 2nd ed.* St. Louis: Mosby, 1997; chap. 15.
33. Schwartz SG, Kuhl DP, McPherson AR. Twenty-year follow-up for scleral buckling. *Arch Ophthalmol.* 2006; 120:325-9.
34. Brazitikos PD, Androudi S, Christen WG, Stangos NT. Primary pars plana vitrectomy versus scleral buckle surgery for the treatment of pseudophakic retinal detachment: A randomized clinical trial. *Retina.* 2005;25:957-964.
35. Abrams GW, Azen SP, McCuen BW 2nd, et al. Vitrectomy with silicone oil or sulfur hexafluoride gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: results of a randomized clinical trial. *Silicone Study Report 1. Arch Ophthalmol.* 1992; 110:770-9.
36. Schwartz SG, Flynn HW Jr, Lee WH, Ssemanda E, Ervin AM. Tamponade in surgery for retinal detachment associated with proliferative vitreoretinopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 7:CD0061
37. Vitrectomy with silicone oil or sulfur hexafluoride gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: Results of a randomized clinical trial. *Silicone study report 1. Arch Ophthalmol* 1992;110:770-9.
38. Vitrectomy with silicone oil or perfluoropropane gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: Results of a randomized clinical trial. *Silicone study report 2. Arch Ophthalmol* 1992;110:780-92.
39. Lewis H, Aaberg TM, Abrams GW. Causes of failure after initial vitreoretinal surgery for severe proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 1991;111:8-14.
40. Lewis H, Aaberg TM. Causes of failure after repeat vitreoretinal surgery for recurrent proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 1991;111:15-9.
41. Andenmatten R, Gonvers M. Sophisticated vitreoretinal surgery in patients with a healthy fellow eye. *Graefe's Arch Ophthalmol* 1993; 231: 495-499.



42. Patel NN, Bunce C, Asaria RH, Charteris DG. Resources involved in managing retinal detachment complicated by proliferative vitreoretinopathy. *Retina* 2004; 24: 883-887.
43. Felix T, Arnd B, Carsten K, Johann R. Autologous retinal pigment epithelium-choroid sheet transplantation in age related macular degeneration: morphological and functional results. *Br J Ophthalmol* 2007;91:349-353.
44. Binder S, Stanzel BV, Krebs I, Glittenberg C. Transplantation of the RPE in AMD. *Prog Retin Eye Res.* 2007 Sep;26(5):516-54.
45. MacLaren RE, Uppal GS, Balaggan KS, Tufail A, Munro PM, Milliken AB, Ali RR, Rubin GS, Aylward GW, da Cruz L. Autologous transplantation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2007 Mar;114(3):561-70.
46. Jousseaume AM, Joeres S, Fawzy N, Heussen FM, Llacer H, van Meurs JC, Kirchhof B. Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in patients with geographic atrophy. *Ophthalmology.* 2007 Mar;114(3):551-60.
47. de la Rúa E, Pastor JC, Aragon J et al. Interaction between surgical procedure for repairing retinal detachment and clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 2005;30:147-53.
48. Sanabria Ruiz-Colmenares MR, Pastor JC, Garrote Adrados JA, et al. Cytokine gene polymorphisms in retinal detachment patients with and without proliferative vitreoretinopathy: a preliminary study. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84:309-13.
49. Jimena Rojas, Itziar Fernandez, JC Pastor, et al. A strong genetic association in the TNF Locus with proliferative vitreoretinopathy. *The retina 4 Project.*
50. Pastor-Idoate S, Rodríguez-Hernández I, Rojas J, et al. The p53 Codon 72 Polymorphism (rs1042522) is Associated with Proliferative Vitreoretinopathy: The Retina 4 Project. *Ophthalmology.* 2012 Dec 1. [Epub ahead of print].
51. Rojas J, Fernandez I, Pastor JC, et al. A Genetic Case-control Study Confirms The Implication Of SMAD7 And TNF Locus In The Development Of Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Dec 20. [Epub ahead of print]
52. Kaminsky Z, Wang SC, Petronis A. Complex disease, gender and epigenetics. *Ann Med.* 2006;38(8):530-44.
53. Giarelli E, Jacobs LA. Modifying cancer risk factors: the gene-environment interaction. *Semin Oncol Nurs.* 2005 Nov;21(4):271-7.



54. MacAuley A, Ladiges WC. Approaches to determine clinical significance of genetic variants. *Mutat Res.* 2005 Jun 3;573(1-2):205-20. Review.
55. Dana C. Crawford and Deborah A. Nickerson. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. *Annual Review of Medicine.* Vol. 56: 303-320.
56. Judkins T, Hendrickson BC, Deffenbaugh AM, Scholl T. Single nucleotide polymorphisms in clinical genetic testing: the characterization of the clinical significance of genetic variants and their application in clinical research for BRCA1. *Mutat Res.* 2005 Jun 3;573(1-2):168-79.
57. International SNP Map Working Group (ISMWG). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409(6822):928-33.
58. Venter et al. The Sequence of the Human Genome. *Science.* 2001; 291: 1304-135.
59. J.K. Pritchard. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;69:124-137.
60. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* 2003;33(2):177-82.
61. MacAuley A, Ladiges WC. Approaches to determine clinical significance of genetic variants. *Mutat Res.* 2005 Jun 3;573(1-2):205-20. Review.
62. Jimena Rojas, Itziar Fernandez, JC Pastor, et al Development of Predictive Models of Proliferative Vitreoretinopathy Based on Genetic Variables: The Retina 4 Project. *IOVS* 2009 May;50(5):2384-90.
63. Gomez-Sanchez JC, Delgado-Esteban M, Rodriguez-Hernandez I, Sobrino T, Perez de la Ossa N, Reverte S, Bolaños JP, Gonzalez-Sarmiento R. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *J Exp Med.* 2011. 14;208(3):429-37.
64. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med.* 2005;56:303-320.
65. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet.* 2001;29(3):306-9.
66. Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* 2000;75(6):2227-40. Review.
67. Fisher SK, Lewis GP. Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Res.* 2003;43(8):887-97.



68. Rodríguez De La Rúa E, Martín F, Saornil MA, Fernández N, Pastor JC. Efficacy of direct paraffin embedding in cytological analysis of vitreous from proliferative vitreo-retinopathy (PVR). *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2001;76(11):655-60.
69. Pastor JC, Méndez MC, de la Fuente MA, Coco RM, García-Arumí J, Rodríguez de la Rúa E, Fernández N, Saornil MA, Gayoso MJ. Intraretinal immunohistochemistry findings in proliferative vitreoretinopathy with retinal shortening. *Ophthalmic Res.* 2006;38(4):193-200.
70. Charteris DG, Downie J, Aylward GW, Sethi C, Luthert P. Intraretinal and periretinal pathology in anterior proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(1):93-100.
71. Bando H, Ikuno Y, Hori Y, Sayanagi K, Tano Y. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathways differently regulate retinal pigment epithelial cell-mediated collagen gel contraction. *Exp Eye Res.* 2006;82(3):529-37.
72. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 2002;9(3):459-70.
73. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87(1):99-163.
74. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 2009;50(9):1721-34.
75. Lo AC, Woo TT, Wong RL, Wong D. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue. *Ophthalmologica*;226 Suppl 1:10-7.
76. Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, et al. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis* 2006;12:867-78.
77. Zacks DN, Zheng QD, Han Y, et al. FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(12):4563-9.
78. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000 ;157(5):1415-30.
79. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35, 4, 495-516.
80. Arroyo JG, Yang L, Bula D, Chen DF. Photoreceptor apoptosis in human retinal detachment. *Am J Ophthalmol.*2005.139, 605-610.



81. Ricker LJ, Altara R, Goezinne F, Hendrikse F, Kijlstra A, La Heij EC. (2011) Soluble apoptotic factors and adhesion molecules in rhegmatogenous retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 16, 52, 4256-4262.
82. Hede SM, Nazarenko I, Nistér M, Lindström MS. Novel Perspectives on p53 Function in Neural Stem Cells and Brain Tumors. *J Oncol.* 2011; 1:852970.
83. Sun Y, Keshava C, Sharp DS, Weston A, McCanlies EC. DNA sequence variants of p53: cancer and aging. *Am J Hum Genet.* 1999;65(6):1779-82.
84. Van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, de Craen AJ, Brandt BW, Slagboom PE, Westendorp RG; Long Life study group. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp Gerontol.* 2005;40(1-2):11-5.
85. Vousden KH, Lu X .Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):594-604.
86. Frank AK, Leu JI, Zhou Y, Devarajan K, Nedelko T, Klein-Szanto A, Hollstein M, Murphy ME The codon 72 polymorphism of p53 regulates interaction with NF- κ B and transactivation of genes involved in immunity and inflammation. *Mol Cell Biol.* 2011;31(6):1201-13.
87. Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C., 3rd, George, D.L. & Murphy, M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003.33, 357-65.
88. Bonafe, M. et al. The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death Differ.* 2004.11, 962-73.
89. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME . Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene.* 2006.25, 1602-1611.
90. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol.* 1999;19(2):1092-100.
91. Francesca Properzi and James W. Fawcett. *Proteoglycans and Brain Repair. Physiology February 2004 vol. 19 no. 1, 33-38.*
92. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta H, Singh M, Aggarwal A, Hall DH, Roth S, Kessler JA. The role of the p53 protein in the selective vulnerability of the inner retina to transient ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(11):2132-9.
93. Lei H, Rheaume MA, Cui J, Mukai S, Maberley D, Samad A, Matsubara J, Kazlauskas A. (2012) A novel function of p53: a gatekeeper of retinal detachment. *Am J Pathol*, 181,3, 866-874.
94. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal.* 2010;30;3(115):re4.



95. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz, Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434:652–658.
96. Xu X, Chua CC, Kong J, Kostrzewa RM, Kumaraguru U, Hamdy RC, Chua BH. Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. *J Neurochem* 2007;103:2004–2014.
97. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett* 2005;579:3287–3296.
98. Locksley RM, Killeen N, Leonardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104: 487-501.
99. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci*, 2002;27:19-26.
100. Aggarwal, Bharat B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews. Immunology*. 2003;3: 745-756.
101. Christofferson DE, Yuan J Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 ;22(2):263-8.
102. Daniel M. Rosenbaum, Alexei Degtarev, Joel David, Pearl S. Rosenbaum, Steven Roth, James C. Grotta, Gregory D. Cuny, Junying Yuan, and Sean I. Savitz Necroptosis, a Novel Form of Caspase- Independent Cell Death, Contributes to Neuronal Damage in a Retinal Ischemia-Reperfusion Injury Model. *Journal of Neuroscience Research*.2010.88:1569–1576.
103. Agnieszka Kaczmarek, Peter Vandenabeel Dmitri V. Krysko. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity*. 2013.21;38(2):209-23.
104. Iwakuma T, Lozano G. (2003) MDM2, an introduction. *Mol Cancer Resc*. 1,14,993-1000.
105. Bond GL, Hu W, Levine A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res*. 2005.1;65(13):5481-4.
106. Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, Vasseur S, Martin C, Brugieres L, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C, et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*. 2006.43,6, 531-533.



107. Di Vuolo V, Buonaguro L, Izzo F, Losito S, Botti G, Buonaguro FM, Tornesello ML. TP53 and MDM2 gene polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among Italian patients. *Infect Agent Cancer*. 2011, 6:13.
108. Alhopuro P, Ylisaukko-Oja SK, Koskinen WJ, Bono P, Arola J, Järvinen HJ, Mecklin JP, Atula T, Kontio R, Mäkitie AA, et al. The MDM2 promoter polymorphism SNP309T-->G and the risk of uterine leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Med Genet*.2005,42, 9, 694-698.
109. Akaike H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE. Trans Automat Control.*, AC-19, 716-723.
110. R Development Core Team (2010). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org/>. Accessed April 2, 2012.
111. Saika S, Kono-Saika S, Tanaka T, Yamanaka O, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A, Yoo J, Flanders KC, et al. Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice. *Lab Invest* .2004.84, 10, 1245-1258.
112. Saika S, Yamanaka O, Nishikawa-Ishida I, Kitano A, Flanders KC, Okada Y, Ohnishi Y, Nakajima Y, Ikeda K, et al. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model.*Arch Ophthalmol*. 2007.125, 5, 647-654.
113. Yu J, Peng R, Chen H, Cui C, Ba J. Elucidation of the pathogenic mechanism of rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy by proteomic analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2012, 53, 13, 8146-8153.
114. Bhattacharya S, Ray RM, Chaum E, Johnson DA, Johnson LR. Inhibition of Mdm2 sensitizes human retinal pigment epithelial cells to apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2011. 52, 6, 3368-3380.
115. Zhang C, Rosenbaum DM, Shaikh AR, Li Q, Rosenbaum PS, Pelham DJ, Roth S. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2002. 43, 9, 3059-3066.
116. Yang P, McKay BS, Allen JB, Jaffe GJ. Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2004.45, 7, 2438-2446.
117. Assmann G, Wagner AD, Monika M, Pfoehler C, Pfreundschuh M, Tilgen W, Roemer K. Single-nucleotide polymorphisms p53 G72C and Mdm2 T309G in patients with psoriasis, psoriatic arthritis, and SAPHO syndrome. *Rheumatol Int*. 2010.30, 10, 1273-1276.
118. Brennan RC, Federico S, Bradley C, Zhang J, Flores-Otero J, Wilson M, Stewart C, Zhu F, Guy K, Dyer MA. Targeting the p53 pathway in retinoblastoma with subconjunctival Nutlin-3a. *Cancer Res*. 2011.71, 4205-4213



119. Dempfle A, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, Schäfer H. (2008) Gene–environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Gen.*, 16:1164–1172.



ANEXO-1 DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Comunicación a congresos

Autores: S. Pastor, I. Rodríguez, J. Rojas, I Fernández, R. González, JC. Pastor.

Título: Distribution of MDM2 T309G polymorphism in European patients with Proliferative vitreoretinopathy (PVR). Retina 4 project

Tipo: Póster

Congreso: ARVO. Seattle, Washington, Mayo 2013.

Premios

I certamen de investigación biomédica de la SERV. Marzo 2013