

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Medicina**

**ESTUDIO DE  
VARIANTES TIPO  
SNP EN LA  
HIPERTENSIÓN  
INTRACRANEAL  
IDIOPÁTICA**

**Trabajo  
Fin de Grado  
2020-2021**

**AUTORA:**

**M.<sup>a</sup> Belén García Lobo**

**TUTOR:**

**Dr. J. J. Tellería Orriols**

**DEPARTAMENTO:**

**Biología celular**

**SERVICIO:**

**Neurocirugía HCUV**



*"Si ser médico es entregar la vida a la misión elegida; si es no cansarse nunca de estudiar y tener todos los días la humildad de aprender la nueva lección de cada día; [...] entonces, ser médico es la divina ilusión de que el dolor sea goce; la enfermedad, salud; y la muerte, vida..."*

*Dr. Gregorio Marañón (1887-1960)*

*Me gustaría expresar todo mi agradecimiento y aprecio a mi tutor, el Dr. Juan José Tellería, cuya guía, apoyo y consejos han sido fundamentales en este trabajo.*

*También quiero agradecer a mi familia y amigos su motivación transmitida y apoyo incondicional a lo largo de todos estos años de duro trabajo y estudio.*

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	.....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	.....	<b>1</b>
1.1 Manifestaciones de la Hipertensión Intracraneal Idiopática	.....	1
1.2 Diagnóstico HII	.....	2
1.3 Patogenia HII	.....	2
<b>2. Hipótesis de Trabajo y Objetivos</b>	.....	<b>4</b>
2.1 Hipótesis	.....	4
2.2 Objetivos	.....	4
2.3 Genes a estudio	.....	5
<b>3. Material y Métodos</b>	.....	<b>5</b>
3.1 Población estudiada	.....	5
3.2 Recogida de muestras	.....	6
3.3 Genotipado con sondas <i>KASP</i>	.....	6
3.4 Preparación del mix de trabajo	.....	9
3.5 Análisis estadístico	.....	12
<b>4. Resultados y Conclusiones</b>	.....	<b>13</b>
4.1 Resultados	.....	13
4.1.1 Equilibrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	.....	13
4.2 Discusión	.....	16
4.3 Conclusiones	.....	18
<b>5. Bibliografía</b>	.....	<b>19</b>
<b>Anexos</b>	.....	<b>21</b>
Anexo A: Tablas de Polimorfismos	.....	21
Anexo B: Glosario	.....	26
Anexo C: Aprobación del Comité de Ética	.....	27
Anexo D: Consentimiento informado	.....	28

## **RESUMEN**

La hipertensión intracraneal benigna o idiopática (HII) es un inusual y grave síndrome consistente en una elevación patológica de la presión intracraneal (PIC). Se manifiesta por una serie de síntomas y signos ocasionados por el incremento de la presión intracraneal (afectación visual, cefalea y papiledema, entre otros), por lo que es necesario al realizar el diagnóstico, descartar otras posibles causas de hipertensión intracraneal (lesiones ocupantes de espacio, traumatismos craneoencefálicos, encefalitis o meningitis). No se ha concretado la causa de esta patología por el momento, por lo tanto, se diagnostica tras descartar el resto de causas posibles. Se da con un LCR dentro de los rangos de normalidad y sin ningún tumor que pueda condicionar a producir efecto masa y posteriormente el síndrome.

Debido a su creciente incremento en la población, interesa comprender sus mecanismos etiológicos para así identificar a pacientes de riesgo lo antes posible. En este estudio observacional, mediante Genotipado con sondas KASP del DNA de 73 pacientes diagnosticados con HII, analizando los genes de la acuaporina 1, acuaporina 4 y colágeno XVIII, y algunos de sus polimorfismos tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), posiblemente relacionados con la HII, investigando la correlación de esta patología con su presencia en los casos.

Esta investigación proporciona evidencias que respaldan la hipótesis de que el **polimorfismo rs3763040** correspondiente al **gen de la acuaporina 4**, condiciona la aparición de HII en la población del estudio.

**Palabras Clave:** hipertensión intracraneal idiopática, gen, polimorfismo, predisposición.

## **INTRODUCCIÓN**

La hipertensión intracraneal idiopática, también llamada benigna o *pseudotumor cerebri* es una importante enfermedad por sus consecuencias, y que, por definición, aún no se ha determinado la etiología concreta que la pueda explicar.

Las **manifestaciones** de la HII son:

- Pérdida visual: principal morbilidad en la HII. Ceguera bilateral hasta en un 10% de los casos.
- Cefalea: es el síntoma más común de la HII, que puede ser muy heterogénea, diaria, bilateral, frontal o retroocular. También se informan características compatibles con migraña, que incluyen pulsaciones unilaterales, náuseas y fotofobia. Con frecuencia se presentan dolor de espalda, dolor de cuello y dolor radicular.

- Síntomas oculares que incluyen oscurecimientos visuales transitorios (<1min), bilaterales y se cree producidos por isquemia transitoria de la papila del nervio óptico; y diplopía (entre 1/3 y 2/3 de los pacientes con HII). Suele ser binocular y horizontal, consecuencia de la parálisis del nervio abducens, y suele resolverse con la normalización de la PIC. La presencia de papiledema severo o de formación de membrana epirretiniana pueden ser la causa de la diplopía monocular.
- Otros síntomas asociados incluyen tinnitus pulsátil mono o bilateral, alteraciones del estado de ánimo y deficiencias en la memoria y la concentración. [1-3]

El **Diagnóstico** es definitivo si se cumplen estos criterios:

- A. Papiledema: hiperemia inicial del disco, visión borrosa de los márgenes del disco, elevación del disco con un halo peripapilar, pérdida de la pulsación venosa espontánea y oscurecimiento de los vasos principales.
- B. Examen neurológico normal, excepto por anomalías del VI par craneal.
- C. Neuroimagen: parénquima cerebral normal sin evidencia de hidrocefalia, masa o lesión estructural, y sin realce meníngeo anormal en la RM, con y sin gadolinio, para pacientes típicos (mujeres y obesos), y RM, con y sin gadolinio, y venografía por resonancia magnética para otros; si la RM no está disponible o está contraindicada, se puede utilizar una tomografía computarizada con contraste.
- D. Composición normal del LCR.
- E. Presión de apertura de la punción lumbar elevada ( $\geq 250$  mm LCR en adultos).

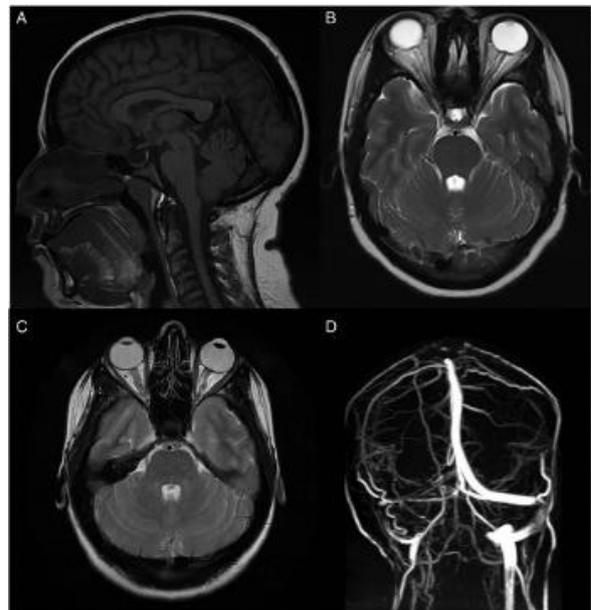
Si no hay papiledema se debe de cumplir el resto de criterios y estar presentes en la RM al menos 3 de los siguientes:

1. Silla vacía.
2. Aplanamiento de la cara posterior del globo.
3. Distensión del espacio subaracnoideo perióptico con o sin un nervio óptico tortuoso.
4. Estenosis del seno venoso transversal. [4]

La **patogenia** subyacente de HII es incierta. El aumento de la PIC es característico, pero el mecanismo por el cual ésta se eleva no está claro. También es cuestionable si son varios mecanismos los que elevan la PIC en los individuos afectados. Se refieren a continuación algunos de los ellos:

- **Papel de la dinámica alterada del LCR:** los cambios en el volumen de sangre, LCR y tejido cerebral influyen en la PIC. La HII puede deberse a un trastorno de la regulación del LCR, bien a través de la hipersecreción de LCR o bien mediante la reducción del drenaje debido al aumento de la resistencia al flujo de salida de LCR o por la reducción del gradiente de presión entre el espacio subaracnoideo y el seno sagital superior. [5]

- **Papel de la obesidad:** Se ha evidenciado correlación entre índice de masa corporal (IMC) y riesgo de HII, igual que asociación entre aumento de peso y recurrencia de la enfermedad. Así mismo, la bajada de peso mejora el pronóstico [6-8].
- El **retinol** (un derivado de la vitamina A) también se ha relacionado con la HII. Los exploradores del Ártico desarrollaron una PIC elevada después de la ingesta excesiva de hígado de oso polar rico en vitamina A [9]. Por otra parte, se ha comprobado la relación de la presencia de vitamina A en el LCR de pacientes con la enfermedad estudiada. La vitamina A se pudo detectar mediante cromatografía líquida de alta presión. Los resultados del estudio concluyeron que hay asociación estadísticamente significativa entre concentraciones elevadas de vitamina A en el LCR de los pacientes con HII, en mujeres y menores de edad. [10]
- **Papel de los receptores de la somatostatina:** en el estudio de Steven E. Katz et al. [11] se investigó la localización de los receptores de somatostatina tipos 1 y 2 (SSTR1 y SSTR2) en el plexo coroideo humano (CP) y granulaciones aracnoideas por inmunohistoquímica. Se demostró su presencia en los mismos, confirmándose su potencial mediación en los procesos de producción y absorción de LCR. Además, SSTR1 y SSTR2 podrían modular el flujo sanguíneo en los capilares CP y la filtración en el epitelio CP. Por tanto, el eje SST tiene un importante papel en el transporte de iones, la producción de líquido extracelular y la absorción en diferentes tejidos de mamíferos y humanos.
- **Influencia anatómica:** Las mejoras en las imágenes de venografía cerebral revelan que la mayoría de los pacientes con HII tienen anomalías anatómicas en el sistema del seno venoso cerebral. Estos incluyen estenosis del seno dominante (figura 1) o de ambos senos transversales. [1]
- **Papel del género:** Un estudio realizado por Klein A et al. [12] mediante radioinmunoensayos (RIA) para evaluar el cortisol, la testosterona, la testosterona biodisponible, la prolactina, el sulfato de dehidroepiandrosterona, la androstenediona, la insulina, la aldosterona, el estradiol, la hormona estimulante del folículo y la hormona luteinizante, comprobó que los pacientes más jóvenes con HII tenían niveles elevados de testosterona y androstenediona, aunque no se evaluó una cohorte de control.



*Fig. 1: RM y venografías por RM que muestra estenosis del seno transversal longitudinal (aspecto extraluminal) y las afectaciones del nervio óptico por la HII.*

- **Influencia genética:** En la investigación llevada a cabo por Zanello et al. [13] se ha analizado el papel de los genes inflamatorios en esta patología. Se estudia la expresión génica de RNA exosómico en el LCR y plasma en pacientes con PIC elevada (>18 mm Hg) en comparación con pacientes con PIC moderadamente elevada (11-18 mmHg). Los sujetos del estudio ya presentaban clínica neurológica.

Se realizó una comparación entre los conjuntos de datos de expresión en plasma (205 genes) y en LCR (162 genes) Ambos conjuntos de genes sugieren que los procesos inflamatorios actúan tanto localmente en el cerebro como sistémicamente, quizás contribuyendo a la fisiopatología de la HII. Los hallazgos respaldan la comunicación entre los sistemas inmunológico y nervioso [14].

Apoyando la hipótesis de componente familiar, en el estudio ya referido anteriormente de Kuehn et al. [1] el 5% de los pacientes confirmaba la existencia de HII en otros miembros de su familia, incluyendo hermanos y gemelos

En esta investigación se analizó el DNA cromosómico de 95 pacientes con HII emparejados con otros 95 controles por sexo, IMC y origen étnico. Tras evaluar 301.908 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), resultó las asociaciones más fuertes observadas fueron para rs2234671 en el cromosoma 2; rs79642714 en el cromosoma 6; y rs200288366 en el cromosoma 12. Además, se identificaron 3 regiones candidatas marcadas por múltiples SNP asociados en los cromosomas 5, 13 y 14.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

**HIPÓTESIS:** Los pacientes portadores de polimorfismos de genes del colágeno XVIII, de la acuaporina 1 y de la acuaporina 4 pueden tener un riesgo significativo de padecer Hipertensión Intracraneal Idiopática.

**OBJETIVO PRINCIPAL:** El objetivo del presente estudio observacional es identificar las variantes tipo SNP de los tres genes candidatos (genes del colágeno XVIII, de la acuaporina 1 y de la acuaporina 4), implicados potencialmente en la HII, con el fin de reconocer a los individuos en riesgo y así poder prevenir los efectos a largo plazo de esta enfermedad.

**OBJETIVO SECUNDARIO:** La identificación de los alelos concretos de cada polimorfismo más frecuentes en los enfermos de HII.

Para ello se han analizado los genotipos de 6 polimorfismos correspondientes a los 3 genes anteriormente mencionados, en una población de estudio comparándolos con los de la población general.

Los polimorfismos a estudio proceden de los siguientes genes:

### **Colágeno XVIII (gen COL18A1)**

Se ha estudiado un SNP - **rs2183589**- del gen del colágeno debido a la posible implicación de la complianza craneal en la HII. Este polimorfismo cuenta con una frecuencia alélica mínima (MAF) superior a 0.10 en la población objeto del estudio. Se ha decidido estudiar este gen por su relación con el *Síndrome de Knobloch* (degeneración macular y vitreorretiniana, encefalocele occipital, y por tanto la predisposición a padecer hidrocefalia) [15].

### **Acuaporina 1 (gen AQP1)**

Esta acuaporina se encuentra principalmente en el plexo coroideo, donde se produce el LCR, puede ser regulada positivamente por retinoides y glucocorticoides, y se ve afectada por los medicamentos utilizados para tratar la HII (1). Los polimorfismos a estudio son el **rs1049305** (también relacionado con la retención de agua en la cirrosis y el glaucoma primario de ángulo abierto) [16,17] y **rs10244884** (relacionado así mismo con el priapismo) [18].

### **Acuaporina 4 (gen AQP4)**

Los polimorfismos estudiados han sido relacionados con el balance homeostático del agua en el cerebro y el riesgo de edema cerebral, en traumatismos, en el SIDS (Síndrome de Muerte Súbita) [19,20]. Además, esta acuaporina se localiza en la apófisis al pie de los astrocitos, y tiene un papel fundamental en el edema cerebral. Los polimorfismos a estudio son: **rs3763043**, **rs3763040** y **rs2075575**.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Población estudiada**

Se ha incluido en este estudio un grupo de 73 pacientes neurológicos con hipertensión intracraneal idiopática, seleccionados al azar provenientes de la *Asociación de Enfermos y Familiares con Hipertensión Intracraneal (ADEFHIC)*. La recogida de muestras de sangre se realizó tras la obtención de su consentimiento informado (Anexo 3), de acuerdo a los estándares legales españoles y tras ser aprobado por el Comité Ético del hospital.

Los datos de la población control proceden de la base de datos *Ensembl* de donde se han tomado los procedentes del subgrupo *IBS (Iberian Population in Spain)* para cada polimorfismo. Además, para el polimorfismo encontrado con resultados estadísticamente

significativos, se seleccionó un grupo de 94 controles procedentes de la Unidad de Neurocirugía del Hospital Clínico Universitario de Valladolid para corroborar la veracidad de la hipótesis confirmada con los resultados obtenidos.

El proyecto de investigación bioinformática Ensembl supone una colaboración entre el Wellcome Trust Sanger Institute y el Instituto Europeo de Bioinformática, división del Laboratorio Europeo de Biología Molecular, cuya información y software son de libre acceso y utilización.

### **Recogida de muestras**

El DNA de los pacientes se extrajo a partir de sangre entera anticoagulada con EDTA mediante el sistema automatizado *Magna Pure de Roche®*. Este es un sistema clínico de extracción de ácidos nucleicos totalmente automatizado sin necesidad de supervisión, diseñado para reducir la intervención del usuario y la variabilidad entre extracciones.

Una vez extraído el DNA se hicieron diluciones (15µL de agua + 3µL de DNA) y se almacenaron en tubos hasta su futura utilización.

### **Genotipado con sondas KASP**

Se utilizó el sistema KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*) SNP Genotyping Chemistry, el cual está basado en la tecnología FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente) que consiste en transferir energía desde un donador o *reporter* (sonda marcada con fluorocromos) a un aceptor o *quencher* mediante hibridación. Esta técnica permite genotipar polimorfismos que difieren tan solo en un nucleótido (SNP), tiene una precisión mayor del 99,8%, y según el manual del fabricante basta entre 0,1 y 10 ng de DNA genómico. Se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones [21 y 22].

Es una PCR que utiliza un cebador universal (*Reverse*) y dos cebadores específicos (*Forward*) que se diferencian en un solo nucleótido que corresponderán a cada uno de los alelos del polimorfismo a estudiar. Este sistema utiliza una sonda marcada con los fluorocromos HEX (emite a 556 nm) o FAM (emite a 510 nm) que tiene una secuencia similar a la encontrada en los extremos 5' de los cebadores. Las sondas marcadas están incluidas en la *master mix* y van unidas a un *quencher* que solo permitirá la emisión de fluorescencia por parte de los fluorocromos cuando el cebador este unido a su secuencia específica. En la figura 2 se presentan los componentes del ensayo KASP.

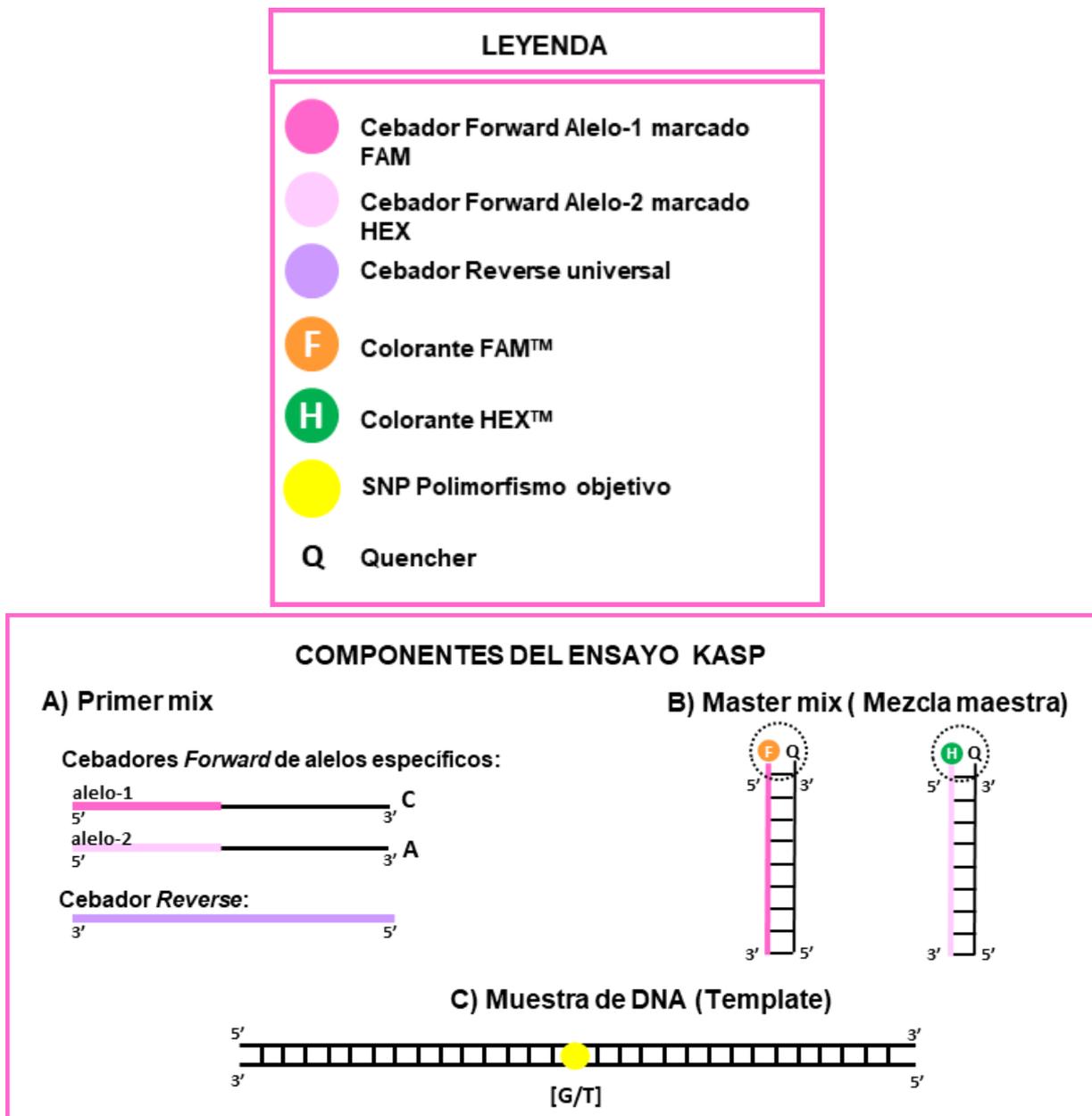


Figura 2. Cebadores, sondas y DNA de la muestra

A continuación, se describen los diferentes ciclos que tienen lugar para la amplificación de nuestra secuencia de interés:

En el primer ciclo: se desnaturaliza la doble hebra de DNA a 94°C. Una vez separadas las dos hebras los cebadores se unen a la secuencia complementaria de DNA genómico a 65°C, el cebador *forward* específico a una hebra y el cebador *reverse* universal a la otra. Una vez unidos, la polimerasa elongará la cadena a partir de la hebra molde (Figura 3).

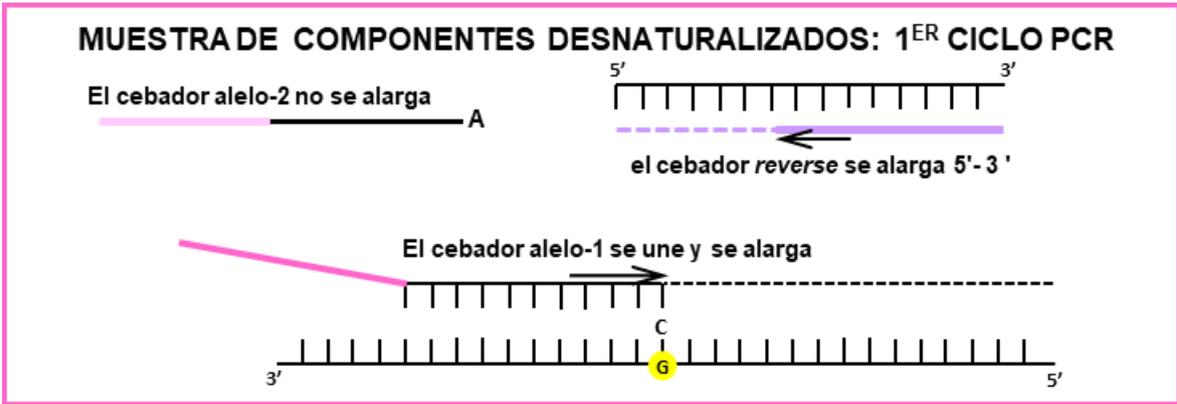


Figura 3. 1<sup>er</sup> Ciclo de PCR

En el segundo ciclo: se desnatura la doble hebra de DNA a 94°C, y vuelven a unirse los cebadores a 65°C, en donde el cebador *reverse* universal se unirá al fragmento elongado por el *primer forward* específico del primer ciclo. La hebra amplificada por el cebador *reverse* contiene en su extremo 3' la secuencia complementaria de la sonda marcada (Figura 4).

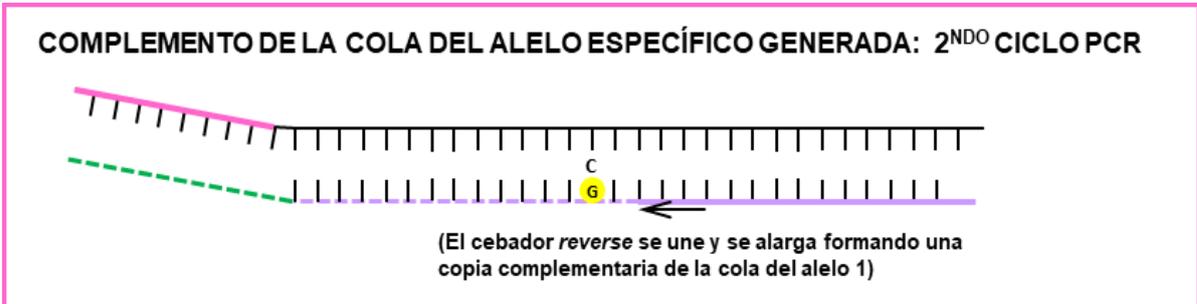


Figura 4. 2<sup>ndo</sup> Ciclo de PCR

En el tercer ciclo: se desnatura de nuevo la doble hebra de DNA a 94°C y a 65°C la sonda marcada liberada del *quencher* se une a su secuencia complementaria que ya se ha marcado con la fluorescencia en el ciclo 2<sup>ndo</sup> de la que es complementaria; de forma que queda la otra sonda marcada correspondiente al otro alelo unido al *quencher* y no emite luz (Figura 5).

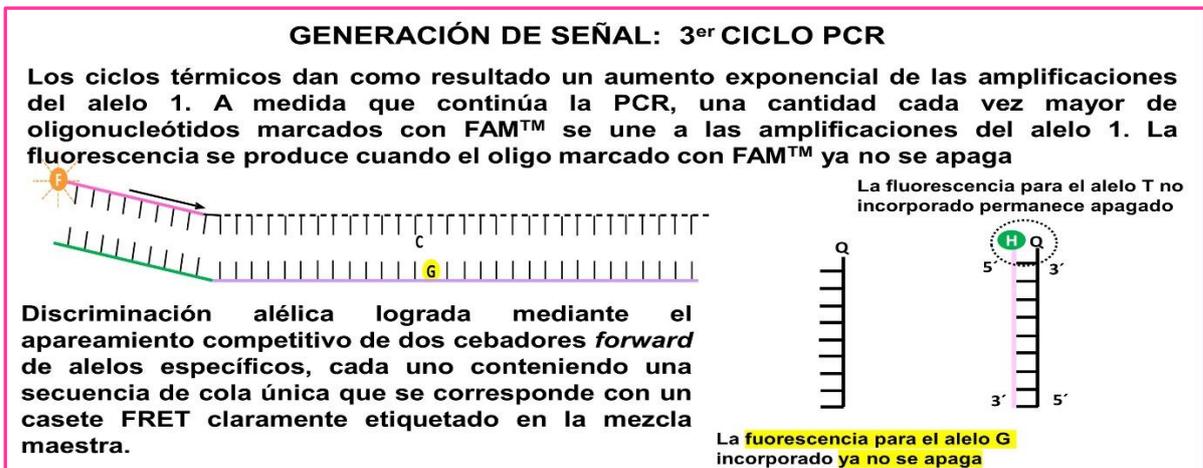


Figura 5. 3<sup>er</sup> Ciclo de PCR

En los siguientes ciclos se producirá la amplificación sucesiva del fragmento unido con el fluorocromo, acumulando fluorescencia a lo largo de los ciclos y de esta manera, determinando la variante del polimorfismo que presenta el paciente.

Se deben analizar los 6 polimorfismos en cada paciente.

Para ello, se utilizan plantillas preparadas en las que se indica el polimorfismo de cada pocillo (figura 6) que se colocarán en las placas blancas "FrameStar® 480/96 for Roche Lightcycler 480" de 96 pocillos (figura 7), donde se pone la muestra y el polimorfismo estudiado.

Experiment: **15 21 83589** Polimorfismo (61-55°C)  
 Scientist: \_\_\_\_\_  
 Date: **11/12/2020** Fecha de visualización de resultados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<del>10</del>
B	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
C	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
D	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
E	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
F	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
G	71	72	73	X								
H												

Número de las muestras

Fig.6 Ficha cumplimentada con el número de la muestra en el pocillo, el polimorfismo utilizado y la fecha de visualización de los resultados



Fig.7 FrameStar® 480/96 para Roche Lightcycler 480" de 96 pocillos

**Preparación del mix de trabajo por pocillo (figura 6):**

- Master Mix (dNTPs, polimerasa y sondas): 4µL.
- Agua: 1µL.
- Mezcla de cebadores: 0,11µL.



Fig.6 Master Mix del Kit comercial, pocillos de trabajo para polimorfismos a estudiar y agua libre de nucleasas

El proceso es el siguiente:

- Se coloca la mezcla en un *vórtex* y se agita.
- Se introducen los 5,11  $\mu\text{L}$  por pocillo del mix de trabajo y se añade 2  $\mu\text{L}$  (200 ug/uL) de DNA previamente vortexado de las muestras a estudiar en el pocillo correspondiente.
- Se mezcla bien con la micropipeta.
- Se precinta la placa, con una pegatina transparente de Roche, "*LightCycler® 480 Sealing Foil*".
- Por último, se centrifugan las placas, dándoles solo un spin.
- Una vez realizado esto, se hace la reacción de PCR específica usando el termociclador *Eppendorf* según el siguiente protocolo:
  - 94°C, 15 minutos.
  - 94°C, 20 segundos y 65°C, 1 minuto, 10 veces.
  - 94°C, 20 segundos y 57°C, 1 minuto, 40 veces.
  - 4°C, todo el tiempo que reste hasta que se recojan las muestras.

(Figuras 8 y 9)



Fig.8 Termociclador utilizado  
*Eppendorf Mastercycler EP Gradient S*

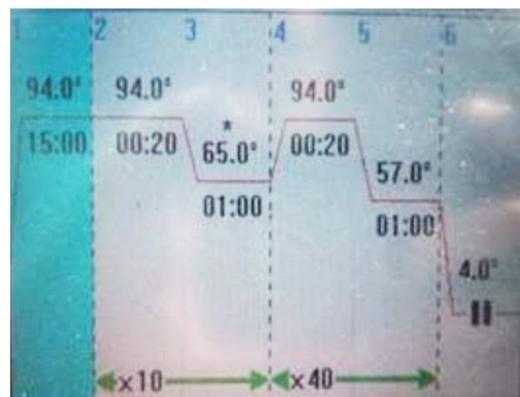


Fig.9 Ciclo del protocolo empleado

Realizada la PCR, se conserva la placa a -20°C durante toda la noche, ya que se ha comprobado que se obtienen mejores lecturas si se realiza de esta forma, si no fuese así, podría llevarse a cabo tanto la reacción de PCR y como el análisis en el mismo aparato.

La lectura de los resultados se realizó en un termociclador *LightCycler 480®* (figura 10), según el siguiente protocolo:

- Modo de adquisición: sencillo.
- Rampa: 4,4°C/s.
- Formato de detección: *Dual Hydrolysis Probe/ UPL Probe*.
- Modo de análisis: Cuantificación.
- Lectura: Mantener 20 seg. a 37°C y a continuación medir la absorbancia de:
  - FAM 465-510nm.
  - HEX 533-580nm.



Fig.10 Termociclador LightCycler 480®,

Cuando se introduce la placa en el termociclador *LightCycler 480®*, seleccionamos los pocillos a analizar. Esto nos permitirá medir la absorbancia de cada muestra para cada polimorfismo con el fin de determinar los diferentes alelos.

La medida de la absorbancia asigna los alelos (en homo o heterocigosis) en función de la fluorescencia emitida por FAM y/o HEX (figura 11).

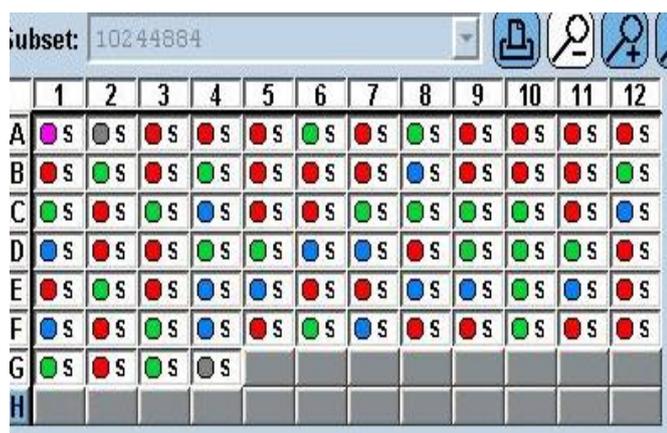


Fig.11 Asignación de muestras como FAM, HEX, BOTH, desconocido o control negativo en cada pocillo de la placa.

Una vez hecho esto, el programa elabora una gráfica (figura 12) representando:

- En el eje de abscisas coloca las muestras FAM, donde los dos cromosomas homólogos contengan la misma secuencia: **Homocigotos para FAM.**
- En el eje de ordenadas coloca las muestras HEX, donde los dos cromosomas homólogos contengan la misma secuencia (y que varíen con respecto a las muestras que ha establecido como FAM en un nucleótido): **Homocigotos para HEX.**
- En la recta bisectriz, entre la ordenada y la abscisa, se colocan los que tengan un cromosoma con un nucleótido y el homologo con otro distinto **BOTH Heterocigotos.**

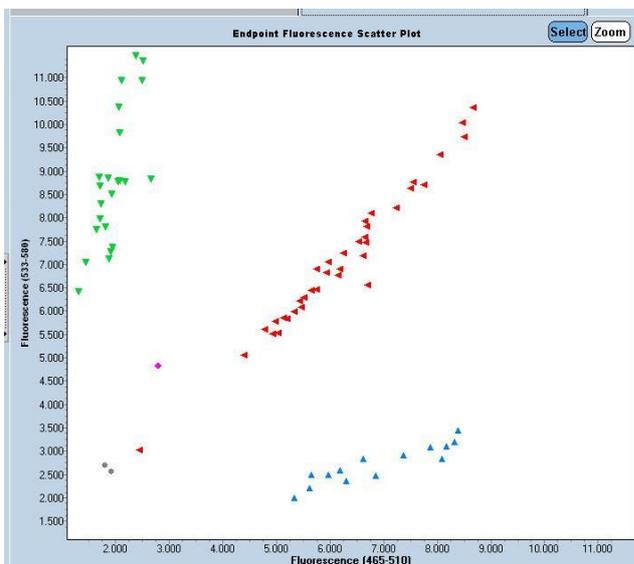


Fig. 12 Gráfica que representa las muestras según su fluorescencia:  
 Verde: homocigotos HEX  
 Rojo: heterocigotos BOTH  
 Azul: homocigotos FAM  
 Gris: controles negativos  
 Rosa: desconocido.

La asignación de las muestras a los diversos genotipos de cada polimorfismo es revisada por el tutor. Se introducen controles negativos para identificar la fluorescencia de fondo.

A continuación, se indican, los 6 polimorfismos estudiados, el gen en el que se encuentran, su secuencia de referencia y la posición en el cromosoma (Tabla 1).

Tabla 1. Polimorfismos estudiados

SNP	GEN	SECUENCIA DE REFERENCIA	POSICIÓN
rs3763040	AQP4	NC_000018.10:g.26864410G>A	18q11.2
rs2075575	AQP4	NC_000018.10:g.26866562G>A	18q11.2
rs3763043	AQP4	NC_000018.10:g.26855854C>G	18q11.2
rs1049305	AQP1	NC_000007.14:g.30924207G>C	7p14.3
rs10244884	AQP1	NC_000007.14:g.30932180T>C	7p14.3
rs2183589	COL18A1	NG_011903.1:g.1395C>T	21q22.3

### Análisis estadístico

Antes de realizar del análisis de la correlación entre el riesgo de padecer la HII y los polimorfismos de las hipótesis, se verificó si los SNP en las poblaciones a estudio, se encontraban en equilibrio según el Test de *Hardy-Weinberg*. Este test analiza las frecuencias genotípicas en una población comparando las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas.

Partiendo de la Base de Datos en la que se recogen los diferentes genotipos de cada polimorfismo a estudiar obtenidos en el termociclador, se realizaron las Tablas de Contingencia (Anexo A).

Mediante la aplicación web <http://vassarstats.net/> (©Richard Lowry 2001-2021), se ejecutó el Test de *Chi cuadrado* (comparación de porcentajes de grupos) para cotejar las frecuencias alélicas y genotípicas, en función de las diversas hipótesis de codominancia, dominancia y recesividad y así sacar conclusiones acerca de la predominancia de genotipos y su relación con la aparición de la HII.

El valor de la  $p$  determina si las diferencias encontradas entre las frecuencias genotípicas en pacientes y población control, son estadísticamente significativas o no. (Valores calculados de  $p < 0.05$  se consideran significativos).

## **RESULTADOS**

Mediante la técnica de sondas específicas KASP para cada polimorfismo, se realizó el genotipado de los 73 pacientes, y se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas.

### **Equilibrio de *Hardy-Weinberg***

El test de equilibrio de *Hardy-Weinberg* es un modelo teórico que analiza la genética de poblaciones. Evalúa las frecuencias genotípicas en una población con los siguientes requisitos:

- 1- Integrada por organismos diploides con reproducción sexual en la que todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar.
- 2- La población es suficientemente grande para minimizar las diferencias entre individuos y las migraciones y mutaciones pueden despreciarse.
- 3- La selección natural no afecta al gen de estudio.
- 4- Las frecuencias genotípicas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones

Una vez obtenidas los datos de las frecuencias alélicas y genotípicas, se comprueba que la población a estudio está en equilibrio de *Hardy-Weinberg* para cada polimorfismo y de esta manera confirmar que la muestra está bien seleccionada.

Si al realizar el test la  $p < 0,05$  no es consistente con el equilibrio de *Hardy-Weinberg*, significaría que la población no estaría en equilibrio.

En el caso de estudio, para todos los polimorfismos la población está en equilibrio, salvo para el SNP rs2183589 que en la población de pacientes el valor de la  $p = 0,010385$  ( $< 0,05$ ), si bien, en este caso, el resultado no es preciso ya que el tamaño de la población para el genotipo TT es de 2 individuos (inferior a 5, demasiado pequeño).

A continuación, se muestran las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro grupo a estudio para los diferentes polimorfismos, en comparación con la población española (frecuencia esperada)

Tabla 2. Frecuencias genotípicas para los polimorfismos estudiados

SNP	rs3763040			rs2075575			rs3763043		
GENOTIPO	GG	GA	AA	GG	GA	AA	CC	CT	TT
FRECUENCIA OBTENIDA (CASOS)	77,78%	19,44%	2,78%	33,33%	48,61%	18,06%	46,38%	44,93%	8,70%
FRECUENCIA ESPERADA (CONTROL)	62,27%	33,28%	4,45%	29,91%	47,66%	22,43%	50,47%	33,64%	15,89%

SNP	rs1049305			rs10244884			rs2183589		
GENOTIPO	GG	GC	CC	CC	CT	TT	CC	CT	TT
FRECUENCIA OBTENIDA (CASOS)	30,39%	50,70%	18,31%	31,51%	50,68%	17,81%	89,96%	10,14%	2,90%
FRECUENCIA ESPERADA (CONTROL)	35,51%	50,47%	14,02%	31,78%	44,86%	23,36%	81,31%	15,89%	2,80%

De los 6 polimorfismos estudiados el único significativo en función del valor  $p < 0,05$  es el **rs3763040** (Anexo A: Tabla 3).

El **polimorfismo rs3763040**, localizado en el **gen de la aquaporina 4** mostró diferencias en la comparación entre pacientes y controles en todas las hipótesis salvo en la hipótesis de Dominancia ( $p = 0,6892 > 0,05$ ).

Tabla 4A. Polimorfismo significativo para HII con población control española

Polimorfismo rs3763040			
Casos vs. Controles (Ensembl)			
Frecuencias		p	X <sup>2</sup>
Alélicas		0,0153	5,88
Genotípicas	Hip. Codominancia	0,0252	7,36
	Hip. Dominancia	0,6892	0,16
	Hip. Recesividad	0,0096	6,71

Puesto que los alelos más frecuentes son los dominantes y por el contrario, los menos frecuentes, los recesivos, en la comparación de las frecuencias alélicas se observa que el alelo G es más frecuente que el alelo A, siendo el genotipo GG el dominante y el AA el recesivo en este caso. Al ser la hipótesis de Dominancia no significativa ( $p = 0,6892 > 0,05$ ), el poseer el genotipo GG no influye en la Hipertensión Intracraneal Idiopática.

Tabla 5A. Comparación Frecuencias alélicas y genotípicas (población control española)

Casos vs. Controles (Ensembl)			
Frecuencias		Casos	Controles
Alélicas	G	126	50906
	A	18	13616
Genotípicas	GG	56	20099
	GA	14	10742
	AA	2	1437

Por el contrario, siendo la p significativa en las **hipótesis de recesividad (p=0 ,0096)** y codominancia (p= 0,0252), se puede concluir que los genotipos AA y AG sí influyen en padecer o no la enfermedad. Además, siendo p aún menor para la hipótesis de recesividad, y siendo más frecuente el genotipo AA en la población control sana esto implica un efecto proporcionalmente inverso entre el genotipo AA y la Hipertensión Intracraneal Idiopática. **Con lo que se concluye que el alelo A es factor “protector” de este síndrome de HII** (Tabla 4A y 5A).

Tras estos resultados se volvieron a elaborarlas tablas de contingencia y frecuencias, pero esta vez tomando la población control del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y se repitieron los resultados obtenidos comprobando que la variante del polimorfismo rs3763040 efectivamente está involucrada en el desarrollo de la HII. (Tablas 4B y 5B)

Tabla 4B. Valores de p para comparación con población control Valladolid HCUV

Casos vs. Controles (HCUV)			
Frecuencias		p	X <sup>2</sup>
Alélicas		0,0303	4,69
Genotípicas	Hip. Codominancia	0,0477	3,92
	Hip. Dominancia	0,6801	0,17
	Hip. Recesividad	0,0293	4,75

Tabla 5B. Comparación Frecuencias alélicas y genotípicas con población control HCUV

Casos vs. Controles (HCUV)			
Frecuencias		Casos	Controles
Alélicas	G	126	146
	A	18	42
Genotípicas	GG	56	57
	GA	14	32
	AA	2	5

En los otros cinco polimorfismos estudiados (rs10244884, rs1049305, rs2183589, rs2075575 y rs3763043) la p resultó >0,05 (Tabla 3 de Anexo A, anteriormente citada) y por lo tanto no se demostraron diferencias entre la población a estudio (de pacientes) y la población control, pudiendo concluirse que el poseerlos no es factor de riesgo para padecer la enfermedad.

Se incluyen en el Anexo A todas las tablas de contingencia de los polimorfismos.

## **DISCUSIÓN**

En este estudio genético, el principal objetivo es encontrar si existe una asociación entre la HII y las variantes cromosómicas de determinados genes, de los que se sospecha podrían explicar la predisposición de algunos pacientes a desarrollar esta afección. De esta manera, a través de un sencillo análisis de sangre del paciente, obteniendo su perfil genético, se podría diagnosticar esta grave enfermedad antes de que éste presente síntomas incapacitantes como el coma o la diplopía. Hacia esta visión de la Medicina, preventiva, orientada específicamente a cada paciente y por tanto más eficaz, se dirigen los esfuerzos en Genética, y aquí radica la importancia de nuestro estudio y estudios similares que se están llevando a cabo actualmente con otras patologías.

En la investigación realizada, el polimorfismo **rs3763040**, estudiado por codificar para el gen de la **acuaporina 4**, ha sido el único polimorfismo que ha mostrado asociación con una  $p < 0,05$ . Se eligió este gen porque la acuaporina 4 es una proteína relacionada con la regulación del LCR y existen evidencias de que su disfunción que puede provocar hidrocefalia, edema relacionado con traumatismos o con síndrome de muerte súbita infantil. En el estudio realizado, comparando los casos pacientes, tanto con la población control española como con la población control seleccionada de Valladolid, se comprobó que la frecuencia genotípica GG no es significativa (con  $p=0,6892$  vs. controles *Ensembl* y  $p=0,6801$  vs. controles *HCUV*  $>0,05$ ). Por ello, este genotipo no predispone a padecer la enfermedad. Por el contrario, el genotipo AG y el genotipo AA, presentan una frecuencia menor a la esperada. Adicionalmente, la hipótesis de recesividad con  $p=0,0096$  aún menor que la hipótesis de codominancia (también significativa  $p=0,00252$ ), demuestra que el genotipo AA tiene efecto “protector” en vez de “productor”.

Los otros dos polimorfismos analizados que codifican para el gen de la acuaporina 4 (rs2075575 y rs3763043), no han mostrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia genotípica entre los casos estudiados y la población control. Sin embargo, en el estudio realizado por *Yadav et al.* sobre la relación del polimorfismo rs2075575 y la leucoaraiosis [23] se concluye que este es estadísticamente significativo en los sujetos que padecen de leucoaraiosis con hipertensión y hemoglobina A1c.

En el estudio también se analizaron los polimorfismos rs1049305 y rs10244884 pertenecientes al gen de la acuaporina 1, dada su asociación a la hiperproducción de líquido ascítico en la cirrosis y la retención de humor vítreo en el glaucoma de ángulo abierto el primero, y del priapismo y su incapacidad para reabsorber el flujo sanguíneo en el segundo. A través de este análisis se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles población en España (siendo  $p > 0,05$  para ambos

polimorfismos), por lo que tampoco podemos asegurar una relación con la HII (Anexo A: Tablas 3 y 5).

Por último, se determinó estudiar el polimorfismo rs2183589 del gen del colágeno COL18A1, por su relación con el *Síndrome de Knobloch*, cuyos síntomas entre otros son el encefalocele occipital y la predisposición a la formación de hidrocefalia. Otra razón para su estudio fue su posible rol en la complianza del cráneo y sus estructuras, pudiendo plantearse que, si hay un fallo en la proteína del colágeno, la complianza disminuirá y aumentarán las posibilidades de producirse efecto masa, y en consecuencia HII. Sin embargo, los análisis efectuados tampoco han demostrado correlación estadísticamente significativa entre este polimorfismo del colágeno en concreto, y la HII padecida por la población del estudio ( $p > 0,05$ ).

Por otra parte, la elección de la técnica de genotipado mediante sondas KASP, se ha realizado en base a su gran precisión (99,8%), sin necesidad de sondas doblemente marcadas, menos asequibles, con una especificidad muy alta lo que nos permite el estudio de SNP, y para lo que basta una muestra muy pequeña (0,1 – 10ng).

Esta técnica, complementada con el uso del termociclador *LightCycler 480®* para la lectura de resultados, permite extraer una base de datos, y su simple y rápido tratamiento en un sistema informatizado, con la ventaja de poder tratar simple y dinámicamente los resultados, e incluso repetirlos y modificarlos fácilmente.

## **CONCLUSIONES**

- 1- Las herramientas y métodos utilizados en el presente análisis genético han demostrado ser **específicas** y, por tanto, **útiles** para los análisis genéticos de los polimorfismos elegidos para el estudio y prevención de síntomas graves en la Hipertensión Intracraneal Benigna o Idiopática.
- 2- Se ha demostrado la asociación entre el polimorfismo tipo SNP **rs3763040** que codifica para el **gen de la acuaporina 4** y el *Pseudotumor Cerebri*, obteniendo en la comparación de casos-contróles una p de 0,0096 estadísticamente significativa para la hipótesis de recesividad. Este polimorfismo ha sido el único de los 3 estudiados en relación con el gen que interviene en la hidrocefalia --y que puede prevenir acontecimientos tan graves como la muerte súbita--, con diferencias significativas entre la población control y los casos
- 3- Según los valores obtenidos, el alelo A, predomina en la población sana (sin HII), pudiendo, por tanto, actuar como **factor “protector”** para la enfermedad.
- 4- Para el resto de los polimorfismos, rs3763043 y rs2075575 para el gen de la acuaporina 4; rs1049305 y rs10244884 para la acuaporina 1; y rs2183589 para el colágeno XVIII, pese a su relación demostrada con la producción, drenaje y reabsorción del LCR y otros fluidos corporales, no han mostrado resultados estadísticamente significativos en la comparación entre pacientes y controles.
- 5- Con los resultados obtenidos, se concluye que deben seguirse investigando nuevas hipótesis sobre el origen genético de esta grave enfermedad, analizando otros polimorfismos de estos genes acuaporina 4 (rs9951307 y rs3906956) y colágeno XVIII (rs2230688, rs11702425 y rs7499) probablemente influyentes, como muestra la bibliografía aportada.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Kuehn MH, Mishra R, Deonovic BE, Miller KN, McCormack SE, Liu GT, Kupersmith MJ, Wall M; NORDIC IIHTT Study Group. Genetic Survey of Adult-Onset Idiopathic Intracranial Hypertension. *J Neuroophthalmol.* 2019; 39:50-55.
2. Mollan SP, Ali F, Hassan-Smith G et al. Evolving evidence in adult idiopathic intracranial hypertension: pathophysiology and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:982–992.
3. Wall M, Kupersmith MJ, Kieburtz KD et al. The Idiopathic Intracranial Hypertension Treatment Trial: Clinical Profile at Baseline. *JAMA Neurol* [Internet] 2014 [cited 2020 Nov 20];71: 693–701. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351808/?report=classic>
4. Friedman DI, Liu GT, Digre KB. Revised diagnostic criteria for the pseudotumor cerebri syndrome in adults and children. *Neurology* [Internet] 2013 [cited 2020 Dec 29]; 81. Available from : <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a55f17>
5. Malm J, Kristensen B, Markgren P et al. CSF hydrodynamics in idiopathic intracranial hypertension: a long-term study. *Neurology* [Internet] 1992 [cited 2020 Dec 29] ;42: 851-8. Available from: <https://n.neurology.org > neurology > 851.full.pdf>
6. Daniels AB, Liu GT, Volpe NJ et al. Profiles of obesity, weight gain, and quality of life in idiopathic intracranial hypertension (pseudotumor cerebri). *Am J Ophthalmol.* [Internet] 2007 [cited 2021 Jan 3]; 143: 635-41. Available from: [https://www.ajo.com/article/S0002-9394\(07\)00004-9/fulltext](https://www.ajo.com/article/S0002-9394(07)00004-9/fulltext)
7. Ko MW, Chang SC, Ridha MA et al. Weight gain and recurrence in idiopathic intracranial hypertension: a case-control study. *Neurology* [Internet] 2011 [cited 2021 Jan 3]; 76: 1564-7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21536635/>
8. Johnson LN, Krohel GB, Madsen RW et al. The role of weight loss and acetazolamide in the treatment of idiopathic intracranial hypertension (pseudotumor cerebri). *Ophthalmology* [Internet] 1998 [cited 2021 Jan 3];105: 2313-7. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(98\)91234-9](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(98)91234-9)
9. Rodahl K, Moore T. The vitamin A content and toxicity of bear and seal liver. *Biochem J* [Internet] 1943 [cited 2021 Jan 3]; 37: 166–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257872/>
10. Warner JE, Bernstein PS, Yemelyanov A et al. Vitamin A in the cerebrospinal fluid of patients with and without idiopathic intracranial hypertension. *Ann Neurol* 2002;52:647-50
11. Katz SE, Klisovic DD, O'Dorisio MS, Lynch R, Lubow M. Expression of somatostatin receptors 1 and 2 in human choroid plexus and arachnoid granulations: implications for idiopathic intracranial hypertension. *Arch Ophthalmol.* 2002;120: 1540-3
12. Klein A, Stern N, Osher E, et al. Hyperandrogenism is associated with earlier age of onset of onset of idiopathic intracranial hypertension in women. *Curr Eye Res.* [Internet] 2013 [cited 2021 Jan 9]; 38: 972-6. Available from:

- <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.799214>
13. Zanello SB, Tadigotla V, Hurley J, Skog J, Stevens B, Calvillo E, Bershad E. Inflammatory gene expression signatures in idiopathic intracranial hypertension: possible implications in microgravity-induced ICP elevation. *NPJ Microgravity*. 2018; 4:1
  14. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural circuitry and immunity. *Immunol Res*. [Internet] 2015 [cited 2021 Feb 13]; 63:38-57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4743890/>
  15. Wu X, Wu J, Xin Z et al. A 3' UTR SNP in COL18A1 is associated with susceptibility to HBV related hepatocellular carcinoma in Chinese: three independent case-control studies. *PLoS One* [Internet] 2012[cited 2021 Feb 13];7: e33855. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312886/>
  16. Fábrega E, Berja A, García-Unzueta MT et al. Influence of aquaporin-1 gene polymorphism on water retention in liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*. [Internet] 2011[cited 2021 Feb 13];46: 1267-74. Available from: <https://doi.org/10.3109/00365521.2011.603161>
  17. Liu W, Liu Y, Qin XJ et al. AQP1 and SLC4A10 as candidate genes for primary open-angle glaucoma. *Mol Vis*. [Internet] 2010 [cited 2021 Feb 20];16:93-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810210/pdf/mv-v16-93.pdf>
  18. Elliott L, Ashley-Koch AE, De Castro L et al. Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. *Br J Haematol*. [Internet] 2007[cited 2021 Feb 9];137: 262-7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2007.06560.x>
  19. Studer J, Bartsch C, Haas C. Aquaporin-4 polymorphisms and brain/body weight ratio in sudden infant death syndrome (SIDS). *Pediatr Res*. [Internet] 2014[cited 2021 Feb 20]; 76:41-5. Available from: <https://www.nature.com/articles/pr201459>
  20. Dardiotis E, Paterakis K, Tsivgoulis G et al. AQP4 tag single nucleotide polymorphisms in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma* [Internet] 2014 [cited 2021 Feb 20];31:1920-6. Available from : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4238262/>
  21. KASP genotyping LGC, Biosearch Technologies. [Internet] 2014[cited 2021 Mar 14]; Available from: <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/kasp-explanation-fact-sheet.pdf>
  22. Guide to running KASP genotyping reactions on the Roche LC480-Series instruments LGC, Biosearch Technologies.[Internet]2015 [cited 2021 Mar 14] Available from: <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/running-KASP-on->
  23. Yadav BK, Oh SY, Kim NK, Shin BS. Association of rs2075575 and rs9951307 polymorphisms of AQP-4 gene with leukoaraiosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. [Internet] 2014 [cited 2021 May 2]; 23: 1199-206. Available from: [https://www.strokejournal.org/article/S1052-3057\(13\)00427-8/pdf](https://www.strokejournal.org/article/S1052-3057(13)00427-8/pdf)

## ANEXOS

### ANEXO A: TABLAS

Tabla 1: Polimorfismos utilizados

SNP	GEN	SECUENCIA DE REFERENCIA	POSICIÓN
rs3763040	AQP4	NC_000018.10:g.26864410G>A	18q11.2
rs2075575	AQP4	NC_000018.10:g.26866562G>A	18q11.2
rs3763043	AQP4	NC_000018.10:g.26855854C>G	18q11.2
rs1049305	AQP1	NC_000007.14:g.30924207G>C	7p14.3
rs10244884	AQP1	NC_000007.14:g.30932180T>C	7p14.3
rs2183589	COL18A1	NG_011903.1:g.1395C>T	21q22.3

Tabla 2: Frecuencias genotípicas para los polimorfismos estudiados

SNP	rs3763040			rs2075575			rs3763043		
GENOTIPO	GG	GA	AA	GG	GA	AA	CC	CT	TT
FRECUENCIA OBTENIDA (CASOS)	77,78%	19,44%	2,78%	33,33%	48,61%	18,06%	46,38%	44,93%	8,70%
FRECUENCIA ESPERADA (CONTROL)	62,27%	33,28%	4,45%	29,91%	47,66%	22,43%	50,47%	33,64%	15,89%

SNP	rs1049305			rs10244884			rs2183589		
GENOTIPO	GG	GC	CC	CC	CT	TT	CC	CT	TT
FRECUENCIA OBTENIDA (CASOS)	30,39%	50,70%	18,31%	31,51%	50,68%	17,81%	89,96%	10,14%	2,90%
FRECUENCIA ESPERADA (CONTROL)	35,51%	50,47%	14,02%	31,78%	44,86%	23,36%	81,31%	15,89%	2,80%

Tabla 3: Resultado de todos los polimorfismos estudiados (con resultados significativos y no significativos)

			Casos vs Controles p
rs3763040	Frecuencias Alélicas G y A		0,0153
	Frecuencias Genotípicas	Hip. Codominancia GG, GA y AA	0,0252
		Hip. Dominancia GG+AG y AA	0,6892
		Hip. Recesividad GG y AG+AA	0,0096
rs2075575	Frecuencias Alélicas G y A		0,5376
	Frecuencias Genotípicas	Hip. Codominancia GG, GA y AA	1,0000
		Hip. Dominancia GG+AG y AA	0,6033
		Hip. Recesividad GG y AG+AA	0,7518
rs3763043	Frecuencias Alélicas C y T		0,8415
	Frecuencias Genotípicas	Hip. Codominancia CC,CT y TT	0,2009
		Hip. Dominancia CC+CT y TT	0,2488
		Hip. Recesividad CC y CC+TT	0,7083
rs1049305	Frecuencias Alélicas G y A		0,4708
	Frecuencias Genotípicas	Hip. Codominancia GG, GA y AA	0,8415
		Hip. Dominancia GG+AG y AA	0,5777
		Hip. Recesividad GG y AG+AA	0,6390
rs10244884	Frecuencias Alélicas C y T		0,6985
	Frecuencias Genotípicas	Hip. Codominancia CC,CT y TT	0,8875
		Hip. Dominancia CC+CT y TT	0,4751
		Hip. Recesividad CC y CC+TT	0,8875
rs2183589	Frecuencias Alélicas C y T		0,4976
	Frecuencias Genotípicas	Hip. Codominancia CC,CT y TT	0,4028
		Hip. Dominancia CC+CT y TT	0,6714
		Hip. Recesividad CC y CC+TT	0,4348

\* Si  $p > 0,05$  el resultado no es significativo, es decir no existe diferencia entre el caso de los pacientes y la población control

Tablas 4A y 4B: Polimorfismo significativo rs3763040 en la HII con las diferentes poblaciones de comparación

Casos vs. Controles (Ensembl)			
Frecuencias		p	X <sup>2</sup>
Alélicas		0,0153	5,88
Genotípicas	Hip. Codominancia	0,0252	7,36
	Hip. Dominancia	0,6892	0,16
	Hip. Recesividad	0,0096	6,71

Tabla 4A. Comparación con base Ensembl

Casos vs. Controles (HCUV)			
Frecuencias		p	X <sup>2</sup>
Alélicas		0,0303	4,69
Genotípicas	Hip. Codominancia	0,0477	3,92
	Hip. Dominancia	0,6801	0,17
	Hip. Recesividad	0,0293	4,75

Tabla 4B. Comparación con controles HCUV

Tablas 5: Tablas de Contingencia para los polimorfismos estudiados

**Gen AQP4: Polimorfismo rs3763040**

Casos vs. Controles (Ensembl)			
		Casos	Controles
<b>Frecuencias</b>			
Alélicas	G	126	50906
	A	18	13616

Casos vs. Controles (HCUV)			
		Casos	Controles
<b>Frecuencias</b>			
Alélicas	G	126	146
	A	18	142

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Codominancia		
	Casos	Controles
GG	56	2099
GA	14	10742
AA	2	1437

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Codominancia		
	Casos	Controles
GG	56	57
GA	14	32
AA	2	5

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Dominancia		
	Casos	Controles
GG +GA	70	30841
AA	2	1437

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Dominancia		
	Casos	Controles
GG +GA	70	89
AA	2	5

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Recesividad		
	Casos	Controles
GG	56	20099
GA+AA	16	12179

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Recesividad		
	Casos	Controles
GG	56	57
GA+AA	16	37

### Gen AQP4:

Polimorfismo rs2075575			
		Casos	Controles
<b>Frecuencias</b>			
Alélicas	<b>G</b>	83	115
	<b>A</b>	61	99

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Codominancia			
	Casos	Controles	
<b>GG</b>	24	32	
<b>GA</b>	35	51	
<b>AA</b>	13	24	

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Dominancia			
	Casos	Controles	
<b>GG +GA</b>	59	83	
<b>AA</b>	13	24	

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Recesividad			
	Casos	Controles	
<b>GG</b>	24	32	
<b>GA+AA</b>	48	75	

Polimorfismo rs3763043			
		Casos	Controles
<b>Frecuencias</b>			
Alélicas	<b>C</b>	95	144
	<b>T</b>	43	70

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Codominancia			
	Casos	Controles	
<b>CC</b>	32	54	
<b>CT</b>	31	36	
<b>TT</b>	6	17	

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Dominancia			
	Casos	Controles	
<b>CC+CT</b>	63	90	
<b>TT</b>	6	17	

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Recesividad			
	Casos	Controles	
<b>CC</b>	32	54	
<b>CT+TT</b>	37	53	

### Gen AQP1:

Polimorfismo rs1049305			
		Casos	Controles
<b>Frecuencias</b>			
Alélica	<b>G</b>	80	130
	<b>C</b>	62	84

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Codominancia			
	Casos	Controles	
<b>GG</b>	22	38	
<b>GC</b>	36	54	
<b>CC</b>	13	15	

Polimorfismo rs10244884			
		Casos	Controles
<b>Frecuencias</b>			
Alélica	<b>C</b>	83	116
	<b>T</b>	63	98

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Codominancia			
	Casos	Controles	
<b>CC</b>	23	34	
<b>CT</b>	37	48	
<b>TT</b>	13	25	

Polimorfismo rs1049305		
Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Dominancia		
	Casos	Controles
GG+GC	58	92
CC	13	15

Polimorfismo rs10244884		
Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Dominancia		
	Casos	Controles
CC+CT	60	82
TT	13	25

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Recesividad		
	Casos	Controles
GG	22	38
GC+CC	49	69

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Recesividad		
	Casos	Controles
CC	23	34
CT+TT	50	73

**Gen COL18A1:**

Polimorfismo rs2183589		
	Casos	Controles
Frecuencias Alélicas		
C	127	191
T	11	23

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Codominancia		
	Casos	Controles
CC	60	87
CT	7	17
TT	2	3

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Dominancia		
	Casos	Controles
CC+CT	67	104
TT	2	3

Frecuencias Genotípicas s/ hipótesis de Recesividad		
	Casos	Controles
CC	60	87
CT+TT	9	20

## ANEXO B: GLOSARIO

SIGLAS	
ADEFHIC	Asociación De Enfermos y Familiares de Hipertensión Intracraneal
CP	Choroid Plexus (Plexo Coroideo)
dNTPs	Deoxyribonucleotide Triphosphate (desoxirribonucleótido trifosfato)
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic (Ácido etilendiaminotetracético)
FAM	Fluorescein Amidites (Amiditas fluoresceína)
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente)
HEX	HEXachloro-fluorescein (Hexacloro fluoresceína)
HII	Hipertensión Intracraneal Idiopática
IBS	IBerian population in Spain
IMC	Índice de Masa Corporal
KASP	Kompetitive Allele Specific PCR (PCR específica de alelos competitivos)
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
p	Probabilidad de significación estadística
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PIC	Presión Intracraneal
MAF	Mínima Frecuencia Alélica
RIA	Radioinmunoensayo
RM	Resonancia Magnética
RNA	Ácido Ribonucleico
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome (Síndrome de Muerte Súbita Infantil)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)
SSTR	Somastostatin Receptor (Receptor de Somatostatina)
SST	Eje de Somatostatina

ANEXO D: CONSENTIMIENTO INFORMADO

	<b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS</b> HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID Versión 4 de 21-03-2014	Código: FO-P-07-03 Edición: 01 Unidad: IISCTV Fecha: 25/08/2014 Pág.: 1 de 7	
---	---	--	---

**SERVICIO / UNIDAD:** Neurocirugía

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:** Carlos A. Rodríguez Arias

**TELEFONO DE CONTACTO:** 983420000 ext 86388 **EMAIL:** carroda@oramge.es

**NOMBRE DE LA LINEA DE TRABAJO:** Estudio de polimorfismos genéticos del Colágeno XVIII y Acuosporinas 1 y 4 en la hidrocefalia crónica del adulto y la hipertensión endocraneal idiopática

**VERSIÓN DE DOCUMENTO: (Número de versión, fecha):**

**I) Finalidad de la línea de trabajo propuesta:**  
 La Hidrocefalia de Presión Normal Idiopática se caracteriza por el aumento de Líquido Cefalorraquídeo en el Sistema Nervioso Central manteniendo una presión normal pero comprimiendo el cerebro lo que origina síntomas como alteraciones de memoria, Incontinencia urinaria y dificultad para la marcha. Se desconoce la causa que la produce pero se relaciona con unas proteínas denominadas Colágeno y Acuosporinas. Se pretende estudiar los genes de estas proteínas y ver su relación con esta enfermedad.

Los resultados de estos estudios ayudarán probablemente a diagnosticar y/o tratar de manera más precisa a los enfermos con una enfermedad como la suya.

**II) Algunas consideraciones sobre su participación:**

Es importante que Vd., como potencial donante de muestras, conozca varios aspectos importantes:

A) La donación de muestras es totalmente voluntaria.

B) Puede plantear todas las dudas que considere sobre su participación en este estudio.

C) Se solicita su autorización para la toma y uso en Investigación biomédica de muestras de Sangre periférica. En dichas muestras se obtendrán y/o analizarán el ADN, utilizando los métodos que el Investigador principal considere necesarios para avanzar en la línea de trabajo arriba expuesta.

Se entrega copia de este documento al paciente 1

	<b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS</b> HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID Versión 4 de 21-03-2014	Código: FO-P-07-03 Edición: 01 Unidad: IISCTV Fecha: 25/08/2014 Pág.: 2 de 7	
--	---	--	---

D) Se le tomará un volumen relativamente pequeño 10 ml de sangre venosa mediante una punción en el brazo en una única toma. La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días.

E) No recibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.

F) Las muestras y los productos obtenidos de las mismas serán almacenados y custodiados en Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), lugar designado para este fin por el Investigador Principal del Estudio. La persona responsable de la custodia es el Dr. D. Juan José Tejería Orrois. La muestra quedará allí depositada de forma indefinida, al menos hasta la consecución de los fines científicos de la línea de trabajo arriba expuesta (siempre que no se haya consumido en su totalidad en el curso de los trabajos asociados a la misma). Si en dicho momento se propusiera el paso de las muestras a un Biobanco oficialmente reconocido, se le volverá a solicitar su consentimiento para ello.

G) Los datos personales asociados a las muestras serán tratados según lo dispuesto en la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999), de 13 de diciembre) y cualquier otra que resultara aplicable.

H) La información obtenida se almacenará en una base de datos, en soporte informático, registrada en la Agencia Española de Protección de Datos, según la legislación vigente (Ley Orgánica 15/1999). Los datos registrados serán tratados estadísticamente de forma codificada. En todo momento el donante tendrá derecho de acceso, rectificación o cancelación de los datos depositados en la base de datos siempre que expresamente lo solicite. Para ello deberá ponerse en contacto con el Investigador principal. Los datos quedarán custodiados bajo la responsabilidad del Investigador Principal del Estudio, D. Carlos A. Rodríguez Arias

Se entrega copia de este documento al paciente 2

	<b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS</b> HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID Versión 4 de 21-03-2014	Código: FO-P-07-03 Edición: 01 Unidad: IISCTV Fecha: 25/08/2014 Pág.: 3 de 7	
---	---	--	---

I) Las muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser utilizadas por el grupo del Investigador principal en estudios futuros de investigación relacionados con la línea de trabajo arriba expuesta. Dichas muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser cedidas a otros Investigadores designados por el Investigador Principal para trabajos relacionados con esta línea, siempre al servicio de proyectos que tengan alta calidad científica y respeto por los principios éticos. En estos dos últimos casos, se solicitará antes autorización al CEIC (Comité Ético de Investigación Clínica) del Área de Salud Valladolid Este.

J) La falta de consentimiento o la revocación de este consentimiento previamente otorgado no supondrá perjuicio alguno en la asistencia sanitaria que Vd. reciba/recibirá.

K) Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Vd. tiene derecho a conocerla y transmitirla a sus familiares si así lo desea.

L) Sólo si Vd. lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información asociada al estudio.

Se entrega copia de este documento al paciente 3

	<b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS</b> HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID Versión 4 de 21-03-2014	Código: FO-P-07-03 Edición: 01 Unidad: IISCTV Fecha: 25/08/2014 Pág.: 4 de 7	
--	---	--	---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.**  
**Estudio de polimorfismos genéticos del Colágeno XVIII y Acuosporinas 1 y 4 en la hidrocefalia de presión normal idiopática**

Yo, \_\_\_\_\_  
 (Nombre y apellidos del paciente ó representante legal)

He leído la información que me ha sido entregada.  
 He recibido la hoja de información que me ha sido entregada.  
 He podido hacer preguntas sobre el estudio.  
 He recibido suficiente información sobre el estudio.  
 He hablado del estudio con \_\_\_\_\_  
 (nombre y apellidos del Investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.  
 Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1.- Cuando quiera.
- 2.- Sin tener que dar explicaciones.
- 3.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para:

- El fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales según lo recogido en la hoja de información al paciente que me ha sido entregada.
- Acordo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten conmigo en el futuro en caso de que se necesite obtener nuevos datos. ...SI..... NO (marcar con una X lo que proceda)
- Acordo a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten conmigo en caso de que los estudios realizados sobre mis muestras / datos aporten información relevante para mi salud o la de mis familiares. ...SI..... NO (marcar con una X lo que proceda)

Una vez firmada, me será entregada una copia del documento de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
 FIRMA DEL PACIENTE / REPRESENTANTE LEGAL NOMBRE Y APELLIDOS  
 FECHA

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este estudio al paciente nombrado anteriormente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en nombre del paciente.

Se entrega copia de este documento al paciente 4





# TFG: ESTUDIO DE VARIANTES TIPO SNP EN LA HIPERTENSIÓN INTRACRANEAL IDIOPÁTICA

2020  
2021

## INTRODUCCIÓN:

- La hipertensión intracraneal benigna o idiopática (HII) es un infrecuente pero grave síndrome consistente en una elevación patológica de la PIC.
- Sus manifestaciones son: afectación visual, cefalea y papiledema, entre otras
- LCR dentro de los rangos de normalidad y sin ningún tumor que pueda condicionar efecto masa y posteriormente el síndrome
- Debido a su creciente incremento en la población, interesa comprender su etiología para así poder identificar a pacientes de riesgo lo antes posible.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

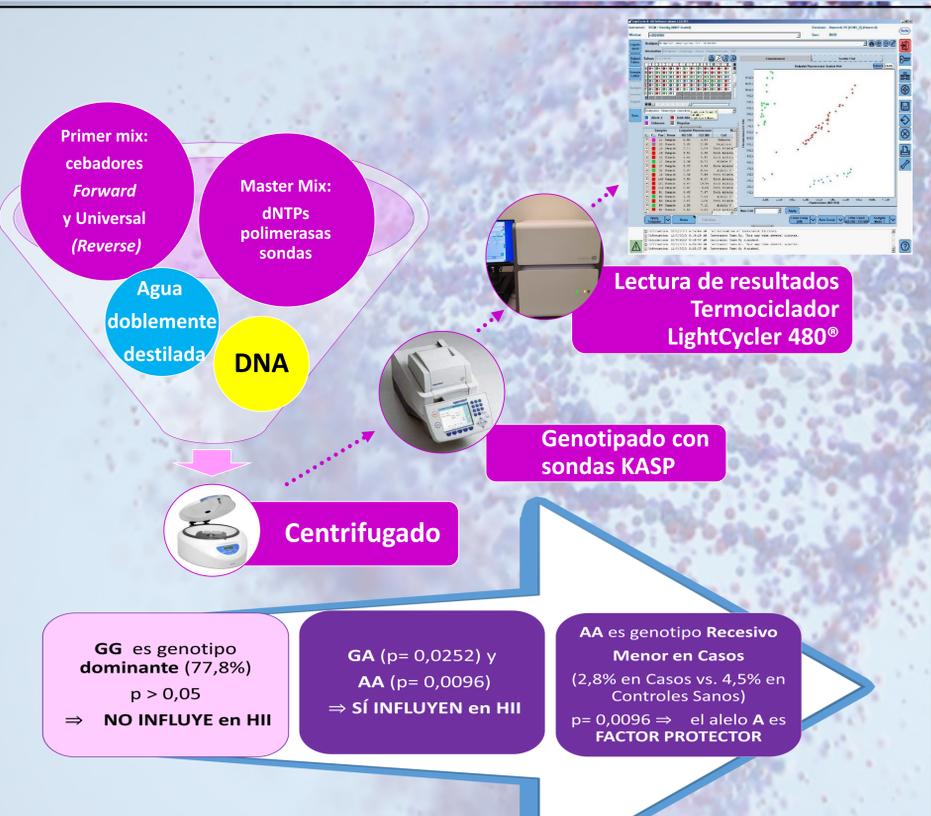
**HIPÓTESIS:** Los genes de las acuaporinas AQP1 y AQP4, implicados en la retención del LCR intracraneal, así como el del colágeno COL18A1, relacionado con la complianza, están implicados potencialmente en esta enfermedad.

**OBJETIVOS:** identificar las variantes tipo SNP de estos 3 genes seleccionados, para reconocer a individuos a riesgo poder prevenir los graves efectos a largo plazo en la HII.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

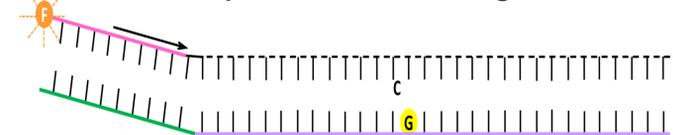
- Estudio observacional analítico de casos y controles
- Casos: 73 pacientes con HII procedentes de la ADEFHIC
- Población control: subgrupo IBS de Ensembl
- Genotipado con sondas KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*)
- Termocicladores utilizados: *Eppendorf Mastercycler* (para realizar la PCR) y *LightCycler 480* (para lectura de resultados)
- Para cada uno de los 6 polimorfismos

## DESCRIPCIÓN DEL PROCESO:

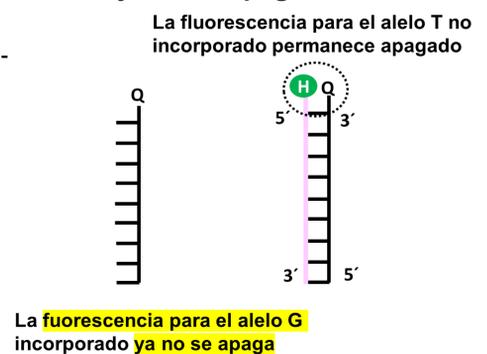


## GENOTIPADO CON SONDAS KASP: GENERACION DE SEÑAL: 3ER CICLO PCR

Los ciclos térmicos dan como resultado un aumento exponencial de las amplificaciones del alelo 1. A medida que continúa la PCR, una cantidad cada vez mayor de oligonucleótidos marcados con FAM™ se une a las amplificaciones del alelo 1. La fluorescencia se produce cuando el oligo marcado con FAM™ ya no se apaga



Discriminación alélica lograda mediante el apareamiento competitivo de dos cebadores forward de alelos específicos, cada uno conteniendo una secuencia de cola única que se corresponde con un casete FRET claramente etiquetado en la mezcla maestra.



## RESULTADOS:

	Polimorfismo	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica		
			Hipótesis de codominancia	Hipótesis de dominancia	Hipótesis de recesividad
AQP 4	rs3763040	0,0153	0,0252	0,6892	0,0096
	rs2075575	0,5376	1,0000	0,6033	0,7518
	rs3763043	0,8415	0,2009	0,2488	0,7083
AQP 1	rs1049305	0,4708	0,8415	0,5777	0,6390
	rs10244884	0,6985	0,8875	0,4751	0,8875
COL18A1	rs2183589	0,4976	0,4028	0,6714	0,4348

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

- Las herramientas y métodos utilizados han mostrado ser **específicas** y, por tanto, **útiles** en este análisis genético.
- La **acuaporina 4** es una proteína relacionada con la regulación del LCR; su disfunción puede provocar hidrocefalia, edema relacionado con traumatismos o con el SIDS.
- El polimorfismo **rs3763040** que codifica para el **gen de la acuaporina 4**, ha sido el **único polimorfismo que ha mostrado asociación con p < 0,05**
- Tanto en la comparación con la **población control española** como con la **población control de Valladolid** se ha demostrado que la **frecuencia genotípica GG es mayor en los casos que en los controles**, y por el contrario el **genotipo GA y el genotipo AA presentan una frecuencia menor a la esperada**. Además, de entre las hipótesis con p significativa, la de recesividad tiene una p aún menor que la hipótesis de codominancia, por lo que se demuestra que el **alelo A tiene efecto "protector"** en vez de "productor".
- El **resto de polimorfismos estudiados**, tanto el rs3763043 y rs2075575 para el gen AQP4, como los rs1049305y rs10244884 correspondientes al gen de la AQP1 y al gen rs2183589 del COL18A1 **no muestran resultados significativos de asociación**.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Kuehn MH et al. Genetic Survey of Adult-Onset Idiopathic Intracranial Hypertension. J Neuroophthalmol. 2019; 39:50-55. doi: 10.1097/WNO.0000000000000648. PMID: 29608535; PMCID: PMC7788379
- Mollan SP et al. Evolving evidence in adult idiopathic intracranial hypertension: pathophysiology and management. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2016;87:982-992. doi:10.1136/jnnp-2015-311302
- Warner JE et al. Vitamin A in the cerebrospinal fluid of patients with and without idiopathic intracranial hypertension. Ann Neurol 2002; 52:647-50. doi:10.1002/ana.10377
- Katz SE et al. Expression of somatostatin receptors 1 and 2 in human choroid plexus and arachnoid granulations: implications for idiopathic intracranial hypertension. Arch Ophthalmol. 2002;120:1540-3.
- Zanello SB et al. Inflammatory gene expression signatures in idiopathic intracranial hypertension: possible implications in microgravity-induced ICP elevation. NPJ Microgravity. 2018; 4:1.
- Guide to running KASP genotyping reactions on the Roche LC480-Series instruments ,LGC, Biosearch Technologies [Internet] 2015[cited 2021 Mar 14]. Available from:https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/kasp-explanation-fact-sheet.pdf



Departamento de Biología Celular  
FACULTAD DE MEDICINA UVA



Servicio: Neurocirugía  
Hospital Clínico Universitario de Valladolid

Autora: M<sup>a</sup> Belén García Lobo  
Tutor: Dr. J.J. Tellería Orríols