

# Identificación preliminar de variantes patógenas en una familia raizal afrocolombiana con factores de riesgo para glaucoma

## Preliminary identification of pathogenic variants in an Afro-Colombian Raizal family with risk factors for glaucoma

Harry Castillo-Plata,<sup>1</sup> Nelson Rivera-Franco,<sup>2,3</sup> Claudia Valencia-Peña,<sup>4</sup> Wilmar Saldarriaga-Gil,<sup>5</sup> Lyle Newball,<sup>6</sup> Andres Castillo<sup>3,7</sup>  
[andres.castillo.g@correounivalle.edu.co](mailto:andres.castillo.g@correounivalle.edu.co)



### ACCESO ABIERTO

**Citación:** Castillo-Plata H, Rivera-Franco N, Valencia-Peña C, Saldarriaga-Gil W, Newball L, Castillo A. **Identificación preliminar de variantes patógenas en una familia raizal afrocolombiana con factores de riesgo para glaucoma.** *Colomb Méd (Cali)*, 2022; 53(2):e2065107 <http://doi.org/10.25100/cm.v53i2.5107>

**Recibido:** 15 Nov 2021

**Revisado:** 28 Abr 2022

**Aceptado:** 12 Jun 2022

**Publicado:** 30 Jun 2022

### Palabras clave:

Glaucoma, Grupo de ascendencia continental africana, Secuenciación del exoma completo, Presión Intraocular, Malla Trabecular, Hipertensión Ocular, Ceguera

### Keywords:

Glaucoma, African Continental Descent Group, Whole Exome Sequencing, Intraocular Pressure, Trabecular Mesh, Ocular Hypertension, Blindness

1 Universidad del Valle, Escuela de Ciencias Básicas, Maestría en Ciencias Básicas Medicas, Cali, Colombia., 2 Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Doctorado Biología, Cali, Colombia., 3 Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Laboratorio TAO-Lab/CiBioFi. Cali, Colombia., 4 Universidad del Valle, Escuela de Ciencias Básicas, Doctorado en Ciencias Básicas Medicas. Cali, Colombia., 5 Universidad del Valle, Escuela de Ciencias Básicas, Departamento de Morfología, Cali, Colombia 6 Clínica Lynd Newball, Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Colombia., 7 Johns Hopkins University School of Medicine, Department of Neurology, Baltimore, USA.,

## Resumen

### Objetivo:

Identificar las variantes patogénicas en una familia raizal afrocolombiana con factores de riesgo para el glaucoma.

### Métodos:

En el presente estudio, se realizó una secuenciación de exoma completo en siete miembros de una familia Raizal del archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina del Caribe colombiano. La mitad de ellos habían sido diagnosticados con glaucoma. Además, se incluyeron dos voluntarios sanos de la isla.

### Resultados:

De las 198 variantes de un solo nucleótido (SNV) asociadas con el glaucoma, previamente informadas por la base de datos DisGeNET, se identificaron cuatro en los miembros de la familia Raizal: rs11938093, rs7336216, rs3817672 y rs983034. Además, en todos los miembros de la familia, pero no en voluntarios sanos, se identificó SNV rs983034 en el gen mediador de secreción de ligando Wnt (WLS). Notablemente, las disfunciones WLS se han relacionado con patologías en la red trabecular (TM) del ojo. TM es un regulador importante del flujo de salida del humor acuoso que mantiene la presión intraocular (presión intraocular) en niveles normales. El daño a la TM se asocia con hipertensión ocular que conduce a la progresión del glaucoma. En relación con los demás SNV identificados, se constató su presencia en algunos miembros de la familia Raizal. Sin embargo, aún no está clara la causa fisiopatológica que asocia estas SNV con el glaucoma.

### Conclusiones:

Fue posible identificar cuatro SNVs no sinónimos con predicción de daño significativo en la estructura y función de genes asociados a patología de glaucoma en un afrocolombiano.

**Copyright:** © 2021 Universidad del Valle



**Conflicto de intereses:**  
No hay

**Financiación:**

Vicerrectoría de investigación de la Universidad del Valle (CI71215 y CI71200)

**Agradecimientos:**

Los autores agradecen a Nathalie Abrahams por ayudar con la presentación del estudio a las personas raizales del archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina en su lengua Nativa Creole. Y a la vicerrectoría de investigación de la Universidad del Valle por apoyar económicamente la investigación (CI71215 y CI71200).

**Autor de correspondencia:**

**Andrés Castillo.** Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Laboratorio TAO-Lab/CiBioFi. Cali, Colombia. **E-mail:** [andres.castillo.g@correounivalle.edu.co](mailto:andres.castillo.g@correounivalle.edu.co)

## Abstract

### Objective:

To identify pathogenic variants in an Afro-Colombian Raizal family with risk factors for glaucoma.

### Methods:

In the present study, whole exome sequencing was performed on seven members of a Raizal family from the archipelago of San Andrés, Providencia, and Santa Catalina, in the Caribbean region of Colombia. Four of them had been diagnosed with glaucoma. In addition, two healthy volunteers from the island were included.

### Results:

Of the 198 single nucleotide variants associated with glaucoma, previously reported by the DisGeNET database, four were identified in members of the Raizal family: rs11938093, rs7336216, rs3817672, and rs983034. Furthermore, single nucleotide variant rs983034 was identified in the Wnt ligand secretion mediator gene in all members of the family but not in healthy volunteers. Notably, WLS dysfunctions have been linked to pathology in the trabecular meshwork of the eye. Trabecular meshwork is an important regulator of the outflow of aqueous humor that maintains intraocular pressure (intraocular pressure) at normal levels. Damage to trabecular meshwork is associated with ocular hypertension, which leads to glaucoma progression. In relation to the other single nucleotide variants that were identified, their presence was confirmed in some members of the Raizal family. However, it is still unclear the pathophysiological cause that associates these single nucleotide variants with glaucoma.

### Conclusions:

It was possible to identify four non-synonymous single nucleotide variants that predict significant damage to the structure and function of genes associated with glaucoma pathology in an Afro-Colombian.

## Contribución del estudio

### 1) Why was this study conducted?

To evaluate a possible hereditary genetic factor related to the development of Glaucoma in a family group.

### 2) What were the most relevant results of the study?

Four pathogenic molecular variants in genes associated with glaucoma were identified using massive exome sequencing techniques, which were: rs11938093 in the BTC gene; rs7336216 in the CENPJ gene; rs3817672 in the TFRC gene and, rs983034 in the WLS gene.

### 3) What do these results contribute?

The study provides new information on possible pathogenic molecular variants in genes associated with glaucoma pathology, which will serve as a reference for future molecular epidemiology studies that calculate the risk of developing the disease by carrying these variants.

## Introducción

El glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible a nivel mundial. Esta enfermedad consiste en el desarrollo de una neuropatía óptica crónica progresiva caracterizada por el aumento de la excavación del disco óptico-asociada a la pérdida progresiva de la visión. Está enfermedad está relacionada con múltiples factores de riesgo como: el aumento de la presión intraocular; diagnóstico de hipertensión arterial y diabetes; etnia; y edad <sup>1</sup>. Se estima que actualmente hay más de 67 millones de pacientes afectados con glaucoma, estimándose a nivel mundial para las comunidades afrodescendientes una prevalencia superior al 15%, en donde en un 10% se presenta ceguera bilateral <sup>2,3</sup>. Uno de los aspectos más complejos de esta enfermedad es el desarrollo paulatino de sus síntomas. La pérdida de la visión es progresiva e irreversible, y por lo general, el paciente solo se identifica la pérdida del campo visual en estados avanzados. Si bien la determinación de la presión intraocular es el método de tamizaje más adecuado en términos costo-efectivo para la identificación de los casos sospechosos de glaucoma, este no es suficiente para establecer el diagnóstico de la enfermedad. Deben evidenciarse al menos otro criterio clínico que demuestre el daño a nivel del nervio óptico, como: el aumento de la excavación del nervio óptico; la pérdida del campo visual; o la detección de hemorragias a nivel del disco óptico <sup>4</sup>.

Se estima que, en los países desarrollados, más del 50% de las personas que padecen glaucoma no han sido diagnosticadas, y que en países en vías de desarrollo esta falta de diagnóstico podría ser aún mayor, del orden del 60 al 80% <sup>5,6</sup>. Se plantea que hasta el 90% de los casos de ceguera por glaucoma podrían evitarse mediante una detección temprana y un tratamiento farmacológico oportuno <sup>7</sup>.

En estudios previos en seis ciudades de Colombia en donde se estimó la prevalencia de glaucoma en pacientes con hipertensión y diabetes <sup>8,9</sup> fue identificada en el archipiélago de San Andrés y Providencia una familia raizal con antecedentes de enfermedades visuales, donde algunos de sus miembros fueron diagnosticados con glaucoma. Lo anterior nos sugiere un posible factor genético hereditario relacionado con el desarrollo de este tipo de patología en este grupo familiar.

En la presente investigación se realizó un análisis de exomas completo para la identificación de variantes moleculares de un solo nucleótido (SNV) no sinónimas potencialmente dañinas en genes asociados con la patología del glaucoma en miembros de una familia raizal de San Andrés y Providencia con antecedentes de presentar enfermedades visuales.

## Materiales y Métodos

### Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo transversal de análisis de exomas en un grupo familiar con antecedentes de glaucoma. El diagnóstico previo de glaucoma fue realizado en la clínica oftalmológica Lynd Newball de San Andrés Islas, Colombia. La investigación contó con la aprobación del comité institucional de revisión de ética humana de la facultad de salud de la Universidad del Valle, números de aval: 106-019 del año 2019.

### Participantes del estudio

Los participantes correspondieron a siete miembros de una familia raizal con antecedentes de la patología de glaucoma que residen en el archipiélago de San Andrés y Providencia. Cuatro de los miembros de la familia presentaban un diagnóstico positivo para glaucoma, uno de sospecha y dos negativos. Adicionalmente, fueron invitados a participar dos personas raizales que no pertenecían al grupo familiar, los cuales tenían diagnóstico negativo para glaucoma. Todos los participantes eran mayores de edad y aceptaron a participar mediante lectura y firma de un consentimiento informado. Los nombres de los participantes fueron anonimizados y reemplazados por un código numérico.

### Toma de muestras

Un profesional del área de la salud realizó la venopunción en la fosa cubital con aguja calibre 21 y sistema de recolección en tubo BD Vacutainer® de 4ml anticoagulado con K2 EDTA 7.2 mg. Las muestras de sangre fueron almacenadas a -20° C y transportadas hasta el laboratorio de patología molecular de la Universidad del Valle.

### Extracción de ADN y secuenciación de exoma completo

Para la extracción de ADN se usó el kit QIAamp DNA blood mini de QIAGEN siguiendo el protocolo del fabricante. La evaluación de la concentración y pureza del ADN se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop® ND-2000c (Thermo Scientific®). Los parámetros óptimos para la secuenciación fueron: una concentración del ADN mayor a 10 ng/uL y una relación de absorbancia  $\geq 1.8$  (260 nm/280 nm) y  $\geq 2$  (260 nm/230 nm). Adicionalmente se evaluó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Para el enriquecimiento del exoma se usaron los kits SeqCap EZ Exome de Nimblegen V2.0 y TruSeq de Illumina. Las librerías fueron construidas con insertos de una longitud de ~300 pb y secuenciadas en un equipo Illumina HiSeq- 2000 (Illumina, San Diego, California). Las lecturas obtenidas fueron de 150 pb en modo Paired-End con una cobertura de 100X.

### Análisis bioinformático

Para el control de calidad, los datos crudos fueron analizados usando el programa FastQC v0.11.7. El filtro de secuencias se realizó con el programa BBDuk v38.25<sup>10</sup> y el paquete FASTX-Toolkit v. 0.0.13 ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)). Las lecturas fueron mapeadas usando como referencia el genoma humano GRCh38.p12 con el software BWA v0.7.17 y el algoritmo BWA-MEM<sup>11</sup>. Los archivos de alineamiento fueron procesados con la herramienta SAMtools<sup>12</sup>. Como parte del procesamiento post-alineamiento, los duplicados por PCR fueron marcados usando la herramienta de Picard MarkDuplicates.jar y removidos de los análisis posteriores (<https://github.com/broadinstitute/picard>). Con la herramienta HaplotypeCaller de GATK versión 4.0.2.1<sup>13</sup> se llevó a cabo el llamado de variantes moleculares de SNV e InDels simultáneamente formato de llamada de variantes genómicas (gVCF, por sus siglas en inglés). Para el filtro de las gVCF se usó la herramienta VCFtools v0.1.16. Las SNV e InDels fueron anotados con el uso de la herramienta ANNOVAR v.2018<sup>14</sup> incorporando la información del NCBI (Homo sapiens Annotation Release 109) y UCSC genoma browser<sup>15</sup>.

### Análisis de ancestría genética

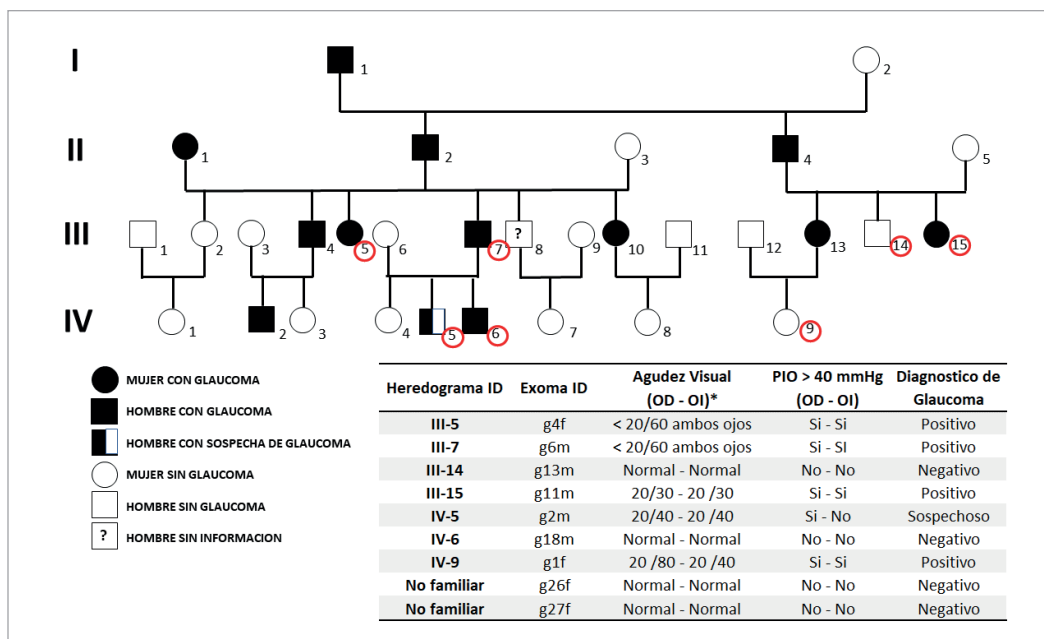
Se estimó los componentes de la ancestría genética para cada participante a partir de un panel de 250 marcadores informativos de ancestría (AIM, por sus siglas en inglés) siguiendo el protocolo propuesto por Wang *et al*<sup>16</sup>. La ancestría genética fue inferida con los programas: vcftools<sup>17</sup>; bcftools<sup>18</sup>; tabix<sup>19</sup>; y structure<sup>20</sup>, disponibles en el paquete R. Los AIM de cada participante fueron filtrados con los de 1,305 individuos pertenecientes a tres poblaciones continentales diferentes de referencia del proyecto 1,000 genomas: africana; europea; y Asia oriental. Para la agrupación de los participantes se realizó a través de un análisis de componentes principales usando la función “read.vcfR” del paquete R<sup>20</sup>. Del programa missMDA con el comando Admixture\_gt2PCA format se convirtieron los haplotipos de cada loci a un código numérico y con el comando estim\_ncpPCA se imputaron los datos faltantes<sup>21</sup>. Con el comando dudi.pca del paquete ade4 se obtuvo el análisis de componentes principales<sup>22</sup>. Por último, se confirmó los resultados del análisis de componentes principales mediante un análisis bayesiano para inferir las proporciones ancestrales de cada individuo mediante el programa Structure<sup>20</sup>. Los resultados fueron representados mediante el porcentaje de ancestría de cada población de origen para cada individuo mediante gráficos de barras con el paquete “ggplot2”<sup>23</sup>.

### Predicción de SNV no sinónimas dañinas

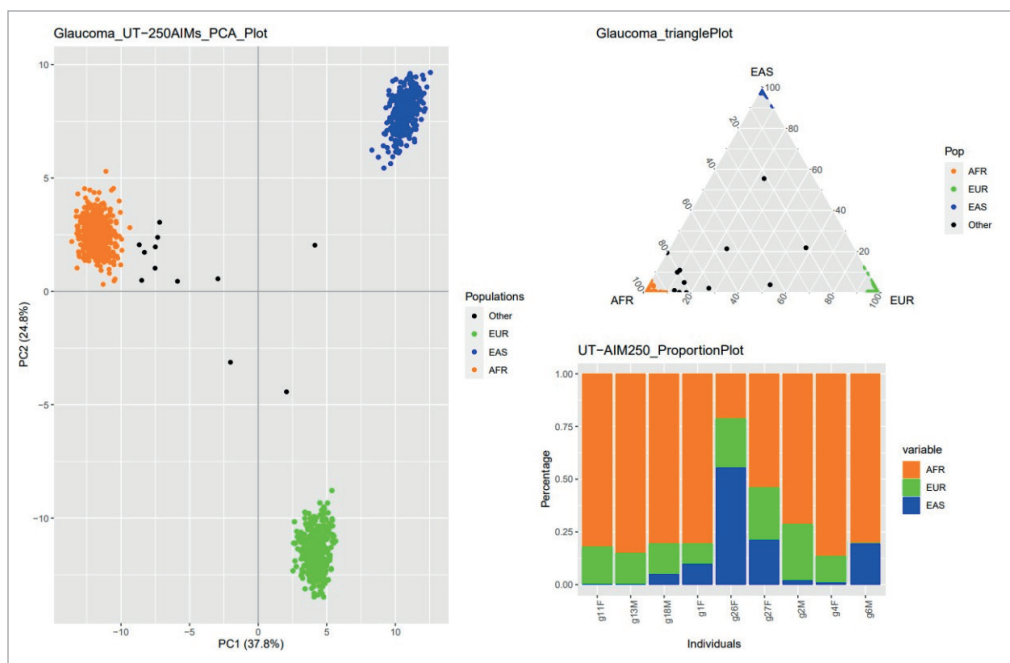
Del archivo gVCF se filtraron las variantes moleculares SNV no sinónimas teniendo en cuenta solo las que tenían un código de referencia (rs). Mediante el programa JVenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) se identificaron SNV no sinónimas presentes en el grupo familiar versus los dos participantes raizales no miembros. Posteriormente, las variantes fueron filtradas según el gen que afectaban usando la lista de variantes moleculares asociadas con el desarrollo del glaucoma disponible en el repositorio de libre acceso DISGENET ([https://www.disgenet.org/Glaucoma/CUI\\_C0017601](https://www.disgenet.org/Glaucoma/CUI_C0017601)). La predicción del daño de las variantes SNV no sinónimas en la estructura y función de la proteína se estableció mediante el algoritmo Combined Annotation Dependent Depletion\_CADD 2425. El valor de CADD para cada SNV se obtuvo con el servidor de libre acceso SNP-NEXUS (<https://www.snp-nexus.org/>). Posteriormente, este valor fue comparado con la puntuación calculada por el servidor Mutation Significance cutoff para establecer la predicción del daño en la estructura o función de la proteína (<https://lab.rockefeller.edu/casanova/MSM>). Se considero un daño alto cuando el valor de CADD en la SNV era mayor que el calculado para el gen con el Mutation Significance cutoff y de daño bajo en caso contrario <sup>26</sup>.

### Resultados

En la Figura 1 se representa la relación filial de los miembros de la familia raizal y los participantes del estudio a quienes se les realizó el análisis de su exoma. Cuatro de los siete participantes pertenecían a la tercera generación y tres a la cuarta, según el heredograma construido a partir de la información recolectada por entrevista a los miembros de la familia. De los cuatro individuos participantes de la generación III, se identificaron dos grupos de hermanos: los individuos participantes III-5 y III-7, medio hermanos de un mismo padre pero diferente madre; y los individuos participantes III-14 y III-15. Salvo el III-4, todos fueron diagnosticados con glaucoma. Los padres de estos dos grupos fueron identificados como hermanos y ambos diagnosticados con glaucoma: individuos II-2 y II-4.



**Figura 1.** Heredograma de miembros de una familia raizal de San Andres, Providencia y Santa Catalina con antecedentes de glaucoma. (\*) OD= ojo derecho; OI= ojo izquierdo. La agudez visual normal es igual a 20/20. presión intraocular = presión intraocular. Los círculos rojos identifican los participantes del estudio. Dos participantes raizales no pertenecían a la familia (g26F y g27F) sin enfermedades visuales diagnosticadas fueron incluidos en el análisis para identificar las variantes moleculares posiblemente patógenas.



**Figura 2.** Componentes genéticos ancestrales de individuos raizales de San Andres, Providencia y Santa Catalina. La estimación se realizó a partir del análisis de 250 marcadores informativos de ancestría. Cada individuo participante se comparó con datos de 1,305 sujetos de tres poblaciones continentales distintas: africana (AFR), europea (EUR) y Asia oriental (EAS) disponibles en el base de datos del proyecto 1,000 genomas. N.F.= No familiar.

Con relación a la IV generación, los individuos participantes IV-5 y IV-6 eran hermanos, hijos de III-7. De este grupo de hermanos, IV-5 presento un diagnóstico de sospecha de glaucoma. En esta misma generación, participo el individuo IV-9 diagnosticado con glaucoma, cuya madre también había sido diagnosticada con glaucoma: individuo IV-13. El IV-5 era sobrina de III-14 y III-15 (Figura 1).

En la Figura 2 se observa la estimación porcentual de los componentes genéticos ancestrales de los participantes del estudio. En el análisis de componentes principales se encontró la separación de las tres poblaciones ancestrales: la separación de la africana de la europea y del asia oriental con un PC1 igual al 37.8%, y la separación de la europea de la africana y del asia oriental con un PC2 igual al 24.8%.

De las nueve personas raizales del estudio, seis presentaron mezcla de componentes genéticos ancestrales de origen africano, europeo y del asia oriental; dos con origen africano y europeo; y uno con ancestría genética africana y del asia oriental. El componente genético ancestral predominante fue el africano, con un porcentaje mayor al 50%, salvo un participante que no perteneciente a la familia raizal, N.F.\_g26F, quien presento un componente ancestral principalmente del Asia oriental, con un porcentaje mayor al 50% (Figura 2).

**Tabla 1.** Total de variantes moleculares identificadas en el análisis de exomas de miembros de una familia raizal del archipiélago de San Andres y Providencia con antecedentes de glaucoma

Variantes \ ID	Miembros de la Familia Raizal							N.F-g26F	N.F-g27F
	III-5*	III-7*	III-15*	IV-9*	IV-5**	III-14	IV-6		
Total de Variantes Moleculares	27,423	27,012	27,325	27,168	26,646	27,082	26,746	24,886	26,532
SNV no sinónimas	12,683	12,330	12,461	12,335	12,073	12,434	12,246	11,410	12,135
Reportadas	10,152	10,070	10,071	10,042	10,066	10,051	10,043	10,014	10,056
No reportadas	595	550	586	605	460	561	577	621	623
InDels	225	247	248	305	225	216	219	209	212
Reportadas	189	203	190	196	193	187	179	171	187
No reportadas	36	44	58	109	32	29	40	38	25

\*Diagnosticado con Glaucoma.

\*\*Sospechoso. SNV: variantes de un solo nucleótido.

InDels: inserciones y deleciones



**Tabla 2.** Genes y variantes moleculares identificadas en miembros de una familia raizal del archipiélago de San Andres y Providencia con antecedentes de glaucoma

GEN \ ID	Miembros de la Familia Raizal							N.F-g26F	N.F-g27F
	III-5*	III-7*	III-14	III-15*	IV-5**	IV-6	IV-9*		
BTC	rs11938093 rs28549760	rs11938093 rs28549760	rs11938093 rs28549760	rs11938093 rs28549760	- rs28549760	- rs28549760	- rs28549760	- -	- -
CENPJ	- - -	rs17402892 rs9511510 rs17081389	- - -	- - -	- - rs17081389	- - -	- - -	- - -	- - -
DHDDS	rs7336216 rs3816539	- rs3816539	rs7336216 rs3816539	rs7336216 rs3816539	- rs3816539	- rs3816539	rs7336216 rs3816539	- -	- -
TFRC	rs3817672	rs3817672	-	rs3817672	rs3817672	rs3817672	rs3817672	-	-
WLS	rs983034	rs983034	rs983034	rs983034	rs983034	rs983034	rs983034	-	-

\*Diagnosticado con Glaucoma.

\*\*Sospechoso.

InDels: inserciones y deleciones

En la Tabla 1 se observa el número de SNV no sinónimos e InDels identificados en los exomas de los participantes del estudio. En promedio de SNV no sinónimos identificados en los miembros de la familia raizal fue de  $12,366 \pm 190$  y en los dos participantes raizales no relacionados con la familia fue de  $11,772 \pm 512$ . Con relación a los InDels, en los miembros de la familia raizal fue de  $241 \pm 31$  y en los dos participantes raizales no relacionados con la familia fue de  $210 \pm 2$ . El número promedio de SNV no sinónimos e InDels que ya han sido reportados, fueron 10,053 y 185, respectivamente. El número de SNV no sinónimos reportados que comparten los miembros de la familia fueron 33,88 y 68 de InDels. Al comparar las variantes moleculares de los miembros de la familia vs. no miembros, se encontró que no compartían 423 SNV no sinónimos y 11 InDels. Estas variantes moleculares posiblemente patogénicas se distribuyeron en 197 genes. Al filtrar los genes con la lista disponible en DisGeNET, se identificaron seis genes asociados con Glaucoma.

En la Tabla 2 se observa los genes identificados con sus variantes moleculares SNV no sinónimas presentes en los miembros de la familia *versus* no miembros. Los genes identificados fueron: BTC (betacelulina); CENPJ (proteína centrómero J); DHDDS (dehidrodicol difosfato sintasa); TFR (Receptor de transferrina); y WLS (receptor para proteínas Wnt en células secretoras).

En la Tabla 3 se presenta la predicción del daño de cada SNV no sinónimo identificado. El gen WLS presentó el SNV no sinónimo rs983034 con una predicción de alto daño en la estructura y función de la proteína. El rs983034 estuvo presente en todos los miembros de la familia raizal pero ausente en los no miembros (Tabla 2). El gen TFRC presentó el SNV no sinónimo rs3817672 con predicción de alto daño en seis de los miembros de la familia raizal. En el gen CENPJ se identificó el rs7336216 con predicción de alto daño en cuatro miembros de la

**Tabla 3.** Variantes moleculares SNV no sinónimas y su potencial dañino en genes asociados con la patología del glaucoma identificadas en una familia raizal afrocolombiana de San Andres y Providencia.

SNV ID	Chromosoma (CRCh38/hg38)	Gen	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Valor de CADD	Valor de CADD_MSC	Predicción del Daño	Frecuencia mundial del alelo menor*
rs11938093	cr4:74750631	BTC	A>T	L124M	24,4	3,313	Alto	0.199880
rs28549760	cr4:74794307	BTC	A>C	C7G	0,02	3,313	Bajo	0.250799
rs17081389	cr13:24912863	CENPJ	G>C	P55A	1,513	10,02	Bajo	0.028155
rs17402892	cr13:24905403	CENPJ	A>C	S879A	0,022	10,02	Bajo	0.061102
rs7336216	cr13:24912839	CENPJ	C>G	D63H	22,5	10,02	Alto	0.024760
rs9511510	cr13:24912773	CENPJ	G>T, A	P85A, T	0,032	10,02	Bajo	0.060903
rs3816539	cr1:26460136	DHDDS	G>A	V253M	16,19	24,721	Bajo	0.455272
rs3817672	cr3:196073940	TFRC	C>T	G142S	4,709	3,313	Alto	0.306310
rs983034	cr1:68137903	WLS	C>T	V463I	22,5	5,269	Alto	0.236621

BTC (betacelulina); CENPJ (proteína centrómero J); DHDDS (dehidrodicol difosfato sintasa); TFR (Receptor de transferrina); y WLS (receptor para proteínas Wnt en células secretoras). CADD: Combined Annotation Dependent Depletion; MSC: Mutation Significance cutoff. Los SNV en negrita presentan una predicción de daño alto según el algoritmo CADD. \*Tomado de la base de datos de 1,000 genomas.

familia. Finalmente, el gen BTC presentó el SNV no sinónimo rs11938093 con predicción de alto daño en cuatro de los miembros de la familia. El gen DHDDS no presentó SNV no sinónimos con predicción de dañinos.

BTC (betacelulina); CENPJ (proteína centrómero J); DHDDS (dehidrodicol difosfato sintasa); TFR (Receptor de transferrina); y WLS (receptor para proteínas Wnt en células secretoras). CADD: Combined Annotation Dependent Depletion; MSC: Mutation Significance cutoff. Los SNV en negrita presentan una predicción de daño alto según el algoritmo CADD. \*Tomado de la base de datos de 1,000 genomas.

## Discusión

En el presente estudio realizo un análisis de exomas completo a un grupo familiar raizal del archipiélago de San Andres y Providencia, Colombia. Esta familia presentaba miembros diagnosticados con la patología del glaucoma y se logró identificar cuatro SNV no sinónimos dañinos en genes asociados con la enfermedad: rs11938093 en el gen BTC; rs7336216 en el gen CENPJ; rs3817672 en el gen TFRC y rs983034 en el gen WLS. Interesantemente, el SNV rs983034 en el gen WLS se identificó solo en los miembros de la familia raizal. Igualmente, los SNV no sinónimos rs3816539 en el gen DHDDS y el rs28549760 en el gen BTC fueron identificados solo en los miembros de la familia, pero con predicción de daño baja. Si nos basamos en el heredograma que se construyó con la información obtenida de los participantes y la historia clínica de los diagnosticados con la patología del glaucoma (Figura 1) se puede sugerir que los SNV no sinónimos rs983034, rs3816539 y rs28549760 presentan una segregación autosómico dominante igual que la enfermedad. Lo anterior coincide con lo reportado por Meneses et al., 2011<sup>27</sup> quien reporto que un 43.1% de los casos de glaucoma son familiares, y de estos el 56.3% muestra un patrón de herencia autosómico dominante, el 38,88% una forma autosómica recesiva y el 2.8% no presenta un patrón definido.

Según los registros de la historia clínica, los familiares con glaucoma de los niveles del I al III en el hederograma, fueron diagnosticados después de los 55 años, mientras que los tres familiares con glaucoma y el sospechosos de nivel IV, fueron diagnosticados antes de los 47 años. Por lo anterior, cabe la posibilidad de que se esté presentando un tipo de glaucoma juvenil causado por variantes de baja frecuencia, sin embargo, es necesario aumentar el número de muestras para hacer futuros análisis que se ajusten por la edad, como por otros factores de riesgo, como la hipertensión arterial sistémica y la diabetes mellitus<sup>8,9</sup>.

También se logró determinar que el principal componente genético ancestral del grupo de participantes raizales del archipiélago de San Andres y Providencia del Caribe Colombiano es la africana seguida de la europea, posiblemente como consecuente de la llegada de estos grupos humanos a las Américas por el tráfico de esclavos y mezcla entre los siglos XVI y XIX por la expansión del imperio británico, y posteriormente, el español<sup>28,29</sup>. Igualmente se encontró componentes ancestrales del Asia Oriental, en una persona siendo esta la principal, posiblemente por la llegada de personas procedentes de la China al archipiélago entre los años 1839 al 1917 en búsqueda de trabajo en los campos de cultivo<sup>30</sup>. De allí la denominación ampliada del término raizal tanto para las personas con ascendencia genética africana como China en el archipiélago de San Andres y Providencia. En la presente investigación se confirmó que la familia raizal bajo estudio tenía un componente ancestral genético africano (Figura 2). Estudios realizados en afroamericanos han señalado que el deterioro visual, la pérdida de visión, y el diagnóstico del glaucoma de ángulo es más frecuente en esta población que en caucásicos<sup>31,32</sup>.

Sobre los genes identificados con SNV no sinónimos con predicción de alto daño para la proteína se identificó el rs983034 en el gen WLS en todos los miembros de la familia raizal (Tablas 2 y 3). El gen WLS codifica un receptor para proteínas Wnt en células secretoras que regula esta vía de señalización. La vía de señalización Wnt participa en la transducción de señales altamente conservada durante el desarrollo que regula diversas funciones celulares<sup>33,34</sup>.



En el desarrollo del ojo, la señalización Wnt controla múltiples procesos de desarrollo y patrones morfogénicos. Estos procesos incluyen el patrón dorsoventral de la copa óptica, el cristalino, el epitelio pigmentario de la retina, el sistema vascular y el margen ciliar<sup>35-39</sup>. Igualmente la señalización Wnt se ha relacionado ampliamente con enfermedades oculares como la degeneración de la retina, cataratas, disfunciones oculares congénitas<sup>40</sup> y glaucoma<sup>41,42</sup>. El principal factor de riesgo para el glaucoma, en especial para el de ángulo abierto primario, es el aumento de la presión intraocular. La elevación de la presión intraocular en pacientes con glaucoma se debe a lesiones glaucomatosas de la malla trabecular y a la alteración de la función de ésta con un incremento de la resistencia al flujo de salida del humor acuoso debido a un depósito excesivo de proteínas de la matriz extracelular. Un estudio demostró que la vía de señalización celular Wnt regulada por WLS, controla la homeostasis de la malla trabecular de manera espaciotemporal y su inhibición se asocia con un incremento de la presión intraocular lo que conlleva a la patología del glaucoma, de manera contraria, su activación después de la inhibición revierte el fenotipo patológico<sup>43</sup>. La SNV no sinónimo rs3817672 en el gen TFRC con predicción de alto daño se identificó en seis de los siete miembros de la familia. En el miembro de la familia en que no se identificó este SNV presentaba un diagnóstico negativo para glaucoma. El gen TFRC codifica un receptor de la superficie celular necesario para la captación celular de hierro mediante el proceso de endocitosis mediada por receptores. La degradación de TFCR inducida por la sobreexpresión de la proteína Optineurina (OPTN) por mecanismo que aún se desconoce<sup>44</sup> y el reclutamiento de la proteína RAB12, llevan a la muerte por autofagia de las células ganglionares de la retina<sup>45</sup> lo que en última instancia podría conducir a la patología del glaucoma. Dos SNV no sinónimos fueron identificados en el gen BTC, donde uno de ellos fue identificado en cuatro miembros de la familia, el rs11938093, con una predicción de alto daño. El gen BTC codifica una proteína que hace parte de la familia de los factores de crecimiento epidérmico. El BTC desempeña un papel crucial en la regulación de la permeabilidad vascular retiniana<sup>46</sup>. Un estudio demostró que la glicosilación de esta proteína tiene efectos proliferativos sobre las células epiteliales pigmentarias de la retina, lo que sugiere que está estrechamente relacionado con la etiología y patogénesis vascular de la retiniana<sup>47</sup>. Un estudio realizado en un modelo animal de ratón con glaucoma demostró que los ARN mensajeros de BTN son inhibidos por microARN-149, lo que se relacionó con un aumento de la apoptosis de las células ganglionares de la retina del murino<sup>48</sup>. La SNV no sinónimo rs7336216 con predicción de alto daño en el gen CENPJ se identificó en cuatro de los siete miembros de la familia raizal. El CENPJ codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas del centrómero, las cuales, durante la división celular, juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad del centrosoma. Igualmente, se ha descrito que la proteína CENPJ puede funcionar como un coactivador transcripcional en la vía de señalización Stat5, y NF-kappa B. SNV en este gen se han relacionados con enfermedades como la microcefalia autosómica recesiva primaria y el síndrome de Seckel<sup>49</sup>. El síndrome de Seckel se asocia con defectos oculares en humanos, que incluyen dislocación espontánea del cristalino, miopía, astigmatismo y degeneración de la retina<sup>50</sup>. Una baja expresión de CENPJ se han detectado en la capa de neuroblastos retinianos de ratones que han presentado una serie de anomalías oculares en comparación con ratones sanos<sup>51</sup>. Con relación al gen DHDSS, se identificó una SNV no sinónimo en todos los miembros de la familia raizal, el rs3816539, sin embargo, la predicción del daño fue baja. El gen DHDSS codifica parte del complejo enzimático dehidrodolicol difosfato sintasa, enzima que participa en la síntesis de Dolicol monofosfato A nivel de retina, el dolicol actúa como “ancla” a nivel de la membrana del retículo endoplásmico de los bastones del ojo permitiendo la glicosilación de la rodopsina sintetizada. La actividad de la DHDSS debe estar equilibrada, ya que la falta de glicosilación de la rodopsina afecta tanto la función de esta proteína como su tráfico intracelular llevando a la progresiva degeneración de los fotorreceptores<sup>52</sup>.

## Conclusión

En el presente estudio fueron identificados cuatro variantes moleculares SNV no sinónimas con una predicción de alto daño a la estructura y función de proteínas de genes asociado con la patología del glaucoma en una familia raizal afrocolombiana con antecedentes para esta enfermedad. Interesantemente, la SNV rs983034 en el gen WLS se identificó solo en los miembros de la familia raizal. Igualmente, las SNV no sinónimos rs3816539 en el gen DHDDS y el rs28549760 en el gen BTC fueron identificados solo en los miembros de la familia, pero con predicción de daño baja. A pesar de la anterior, no descartamos la posibilidad que estos dos últimos SNV puedan ayudar al tamizaje de la oportunidad de riesgo de desarrollar glaucoma en esta familia raizal y en general en población con componentes ancestrales africanos.

Debido al tamaño reducido de la muestra del grupo de control, existe una limitación para identificar las variantes causantes de la enfermedad en estos pacientes. Así, dada la alta frecuencia en diferentes poblaciones de las variantes seleccionadas, existe una alta probabilidad de que estas variantes hayan sido elegidos al azar porque no estaban representados en los dos sujetos de control utilizados en el estudio. Estudios futuros son necesarios para poner a prueba esta hipótesis.

## References

1. Prum BEJ, Rosenberg LF, Gedde SJ, Mansberger SL, Stein JD, Moroi SE, et al. Primary open-angle glaucoma preferred practice pattern guidelines. *Ophthalmology*. 2016; 123(1): 41-111. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.10.053.
2. Hyman L, Wu SY, Connell AM, Schachat A, Nemesure B, Hennis A, Leske MC. Prevalence and causes of visual impairment in The Barbados Eye Study. *Ophthalmol*. 2001; 108(10): 1751-1756. doi: 10.1016/s0161-6420(01)00590-5.
3. Tielsch JM, Sommer A, Witt K, Katz J, Royall RM. Blindness, and visual impairment in an American urban population: The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108(2): 286-290. doi: 10.1001/archoph.1990.01070040138048.
4. Öhnnell H, Bengtsson B, Heijl A. Making a Correct Diagnosis of Glaucoma: Data From the EMGT. *J Glaucoma*. 2019; 28(10): 859-864. doi: 10.1097/IJG.0000000000001342.
5. Friedman DS, Wolfs RCW, O'Colmain BJ, Klein BE, Taylor HR, West S, et al. prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122(4), 532-538. doi: 10.1001/archoph.122.4.532.
6. Varma R, Ying-Lai M, Francis BA, Nguyen BB-T, Deneen J, Wilson MR. et al. prevalence of open-angle glaucoma and ocular hypertension in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Ophthalmol*. 2004; 111(8): 1439-1448. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.01.025.
7. Von-Bischhoffshausen F, Jiménez-Román J. Guía latinoamericana de glaucoma primario de ángulo abierto; . 2019. <https://paao.org/wp-content/uploads/2016/05/Guia-Glaucoma-2019-final-para-www.pdf>.
8. Cantor E, Méndez F, Rivera C, Castillo A, Martínez-Blanco A. Blood pressure, ocular perfusion pressure and open-angle glaucoma in patients with systemic hypertension. *Clin Ophthalmol*. 2018; 12: 1511- 1517. doi: 10.2147/OPHTH.S165747.
9. Rivera CE, Cantor E, Castillo A, Martínez A, Newball L, Rueda JC, et al. prevalence of primary open angle glaucoma among patients with diagnosis of systemic hypertension and diabetes mellitus: The Colombian Glaucoma Study. *Open J Ophthalmol*. 2020; 10(2): 99-114. doi: 10.4236/ojoph.2020.102012.
10. Bushnell B, Rood J, Singer E. BBMerge - Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS ONE*. 2017; 12(10): e0185056. doi: 10.1371/journal.pone.0185056.
11. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010; 26(5): 589-95. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698.
12. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021; 10(2): giab008. doi: 10.1093/gigascience/giab008.

13. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010; 20: 1297-303. DOI: 10.1101/gr.107524.110.
14. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(16): e164. doi: 10.1093/nar/gkq603.
15. Haeussler M, Zweig AS, Tyner C, Speir ML, Rosenbloom KR, Raney BJ, et al. The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1): D853-D858. doi: 10.1093/nar/gky1095.
16. Wang LJ, Zhang CW, Su SC, Chen HH, Chiu YC, Lai Z, et al. An ancestry informative marker panel design for individual ancestry estimation of Hispanic population using whole exome sequencing data. *BMC Genomics.* 2019; 20(Suppl 12):1007. doi: 10.1186/s12864-019-6333-6.
17. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al; 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011;27(15):2156-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btr330.
18. Danecek P, McCarthy SA. BCFtools/csq: haplotype-aware variant consequences. *Bioinformatics.* 2017; 33(13), 2037-2039. 10.1093/bioinformatics/btx100
19. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-59.
20. Knaus BJ, Grünwald NJ. vcfr: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Mol Ecol Resour.* 2017;17(1):44-53. doi: 10.1111/1755-0998.12549.
21. Josse J, Husson F. missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. *J Statist Software;* 2016; 70(1): 1-31. doi: 10.18637/jss. v070.i01.
22. Dray S, Dufour A-B. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J Statist Software.* 2007; 22(4): 1-20. doi: 10.18637/jss. v022.i04.
23. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag; 2016.
24. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014;46(3):310-5. doi: 10.1038/ng.2892.
25. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2018; 47(D1): D886-D894. doi: 10.1093/nar/gky1016.
26. Itan Y, Shang L, Boisson B, Ciancanelli MJ, Markle JG, Martinez-Barricarte R, et al. The mutation significance cutoff: gene-level thresholds for variant predictions. *Nat Methods.* 2016;13(2):109-10. doi: 10.1038/nmeth.3739.
27. Meneses PM, Landrián IB, Pérez AL. Comportamiento clínico y epidemiológico del glaucoma primario de ángulo abierto en familiares de pacientes glaucomatosos. *Mediciego.* 2011;17(2).
28. Márquez-Pérez AI. Culturas migratorias en el Caribe colombiano: El caso de los isleños raizales de las islas de Old Providence y Santa Catalina. *Memorias Rev Digit Hist Arqueol desde el Caribe.* 2012; 16:69-101.
29. Ranocchiaro D, Calabresi G. Ethnicity and religion in the archipelago of San Andrés, Providencia, and Santa Catalina. *Bull Lat Am Res.* 2016; 35:481-495. doi: 10.1111/blr.12475.
30. Emmer OC. Immigration into the Caribbean; The introduction of Chinese and East Indian indentured labourers between 1839 and 1917. *Itinerario.* 1990;14:61-95. doi:10.1017/S0165115300005684.
31. Javitt JC, McBean AM, Nicholson GA, Babish JD, Warren JL, Krakauer H. Undertreatment of glaucoma among black Americans. *N Engl J Med.* 1991; 325(20):1418-22. doi: 10.1056/NEJM199111143252005.
32. Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt JC, et al. Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. *N Engl J Med.* 1991;325(20):1412-7. doi: 10.1056/NEJM199111143252004.
33. Pecina-Slaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell Int.* 2010; 10:22. doi: 10.1186/1475-2867-10-22.

34. Ng LF, Kaur P, Bunnag N, Suresh J, Sung ICH, Tan QH, et al. WNT Signaling in Disease. *Cells*. 2019; 8(8): 826. doi: 10.3390/cells8080826.
35. Carpenter AC, Smith AN, Wagner H, Cohen-Tayar Y, Rao S, Wallace V, et al. Wnt ligands from the embryonic surface ectoderm regulate &apos;bimetallic strip&apos; optic cup morphogenesis in mouse. *Development*. 2015;142(5):972-82. doi: 10.1242/dev.120022.
36. Drenser KA. Wnt signaling pathway in retinal vascularization. *Eye Brain*. 2016; 8:141-146. doi: 10.2147/EB.S94452.
37. Högglund AC, Berghard A, Carlsson L. Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling is essential for optic cup formation. *PLoS One*. 2013;8(12): e81158. doi: 10.1371/journal.pone.0081158.
38. Liu H, Xu S, Wang Y, Mazerolle C, Thurig S, Coles BL, et al. Ciliary margin trans differentiation from neural retina is controlled by canonical Wnt signaling. *Dev Biol*. 2007;308(1):54-67. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.04.052.
39. Wang Z, Liu CH, Huang S, Chen J. Wnt Signaling in vascular eye diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2019; 70:110-133. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.11.008.
40. de longh RU, Abud HE, Hime GR. WNT/Frizzled signaling in eye development and disease. *Front Biosci*. 2006; 11:2442-64. doi: 10.2741/1982.
41. Wang WH, McNatt LG, Pang IH, Millar JC, Hellberg PE, Hellberg MH, et al. Increased expression of the WNT antagonist sFRP-1 in glaucoma elevates intraocular pressure. *J Clin Invest*. 2008;118(3):1056-64. doi: 10.1172/JCI33871.
42. Webber HC, Bermudez JY, Sethi A, Clark AF, Mao W. Crosstalk between TGF $\beta$  and Wnt signaling pathways in the human trabecular meshwork. *Exp Eye Res*. 2016; 148:97-102. doi: 10.1016/j.exer.2016.04.007.
43. Dhamodaran K, Baidouri H, Sandoval L, Raghunathan V. Wnt activation after inhibition restores trabecular meshwork cells toward a normal phenotype. *Investigative Ophthalmol Visual Sci*. 2020;61(6):30. DOI: 10.1167/iovs.61.6.30.
44. Nagabhushana A, Chalasani ML, Jain N, Radha V, Rangaraj N, Balasubramanian D, et al. Regulation of endocytic trafficking of transferrin receptor by optineurin and its impairment by a glaucoma-associated mutant. *BMC Cell Biol*. 2010; 11: 4. doi: 10.1186/1471-2121-11-4.
45. Sirohi K, Chalasani ML, Sudhakar C, Kumari A, Radha V, Swarup G. M98K-OPTN induces transferrin receptor degradation and RAB12-mediated autophagic death in retinal ganglion cells. *Autophagy*. 2013;9(4):510-27. doi: 10.4161/auto.23458.
46. Sugimoto M, Cutler A, Shen B, Moss SE, Iyengar SK, Klein R, Folkman J, Anand-Apte B. Inhibition of EGF signaling protects the diabetic retina from insulin-induced vascular leakage. *Am J Pathol*. 2013;183(3):987-95. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.017.
47. Anand-Apte B, Ebrahim Q, Cutler A, Farage E, Sugimoto M, Hollyfield J, et al. Betacellulin induces increased retinal vascular permeability in mice. *PLoS One*. 2010;5(10): e13444. doi: 10.1371/journal.pone.0013444.
48. Nie XG, Fan DS, Huang YX, He YY, Dong BL, Gao F. Downregulation of microRNA-149 in retinal ganglion cells suppresses apoptosis through activation of the PI3K/Akt signaling pathway in mice with glaucoma. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018;315(6):C839-C849. doi: 10.1152/ajpcell.00324.2017.
49. Reddy S, Starr C. Seckel syndrome and spontaneously dislocated lenses. *J Cataract Refract Surg*. 2006; 33(5):910-2. doi: 10.1016/j.jcrs.2006.12.027.
50. Guirgis MF, Lam BL, Howard CW. Ocular manifestations of Seckel syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2001;132(4):596-7. doi: 10.1016/s0002-9394(01)01046-7.
51. McIntyre RE, Lakshminarasimhan Chavali P, Ismail O, Carragher DM, et al. Disruption of mouse Cenpj, a regulator of centriole biogenesis, phenocopies Seckel syndrome. *PLoS Genet*. 2012; 8(11): e1003022. doi: 10.1371/journal.pgen.1003022.
52. Zelinger L, Banin E, Obolensky A, Mizrahi-Meissonnier L, Beryozkin A, et al. A missense mutation in DHDDS, encoding dehydrodolichyl diphosphate synthase, is associated with autosomal-recessive retinitis pigmentosa in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*. 2011; 88(2): 207-15. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.01.002.